



scienza attiva®

EDIZIONE 2015/2016

AGRICOLTURA, ALIMENTAZIONE E SOSTENIBILITA'

Coagulanti vegetali nella produzione di formaggio

Giuseppe Zeppa, Roberta Dascanio

***Università degli Studi di Torino, Dipartimento
di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari***

Documento di livello: C



Un progetto di



agorà scienza
centro interuniversitario



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



scienza attiva®

Sommario

I cagli vegetali nella storia	2
Tipologie e fonti di proteasi vegetali.....	3
Proteasi aspartiche.....	3
Proteasi cisteiniche	4
Proteasi seriniche	5
Fonti vegetali di coagulanti	5
Cynara scolymus.....	5
Cynara cardunculus	6
Solanum elaeagnifolium var. Cavanilles.....	6
Onopordum acanthium L.	7
Actinidia deliciosa.....	7
Ficus religiosa	8
Albizia lebbek e Helianthus annuus.....	8
Albizia julibrissin.....	9
Carica papaia	9
Calotropis procera	9
Jacarantia corumbensis	10
Solanum dubium	10
Conclusioni	10
Bibliografia	12

I cagli vegetali nella storia

Il passo più importante nella produzione del formaggio è senza dubbio la coagulazione del latte che può avvenire principalmente secondo due modalità: per acidificazione e per azione enzimatica. L'ultima, quella che sfrutta l'azione di particolari enzimi ad azione coagulante, è però la più diffusa ed utilizzata. Questi enzimi coagulanti o cagli sono conosciuti ed utilizzati sin dalla preistoria e possono avere tre origini: animale, vegetale e microbica.

Quelli ottenuti da animali sono particolarmente ricchi in chimosina e sono sempre stati i più diffusi ma la limitata disponibilità di stomaci di ruminanti nonché motivi religiosi e culturali hanno spinto, soprattutto negli ultimi anni, verso fonti alternative ed in particolare verso i cagli di origine vegetale.

In realtà il primo promotore dell'uso dei cagli vegetali fu Mosè con le sue prescrizioni di non mescolare il latte con tutto ciò che veniva prodotto dallo stesso animale (Molon, 1883).

Omero, nel VI secolo a.C., nell'Iliade esplicitamente scrive che "il succo di fico fa cagliare il latte bianco e fluido" ed Euripide, nel V secolo a.C., nel "Ciclope", conferma che "l'acre lattice del fico" veniva usato come coagulante, e alle stesse conclusioni arriva Panagl riferendosi ai lavori di Polifemo nella sua caverna (Panagl, 1972).

Ippocrate, nel V secolo a.C., Aristotele nel IV secolo a.C. e Varrone nel I secolo a.C. scrivono dell'uso del lattice di fico, mentre Columella, nel I secolo a.C., riporta in aggiunta anche l'impiego dei fiori di cardo silvestre, dei semi di cartamo, delle pigne verdi e del timo tritato e precisa che "non c'è dubbio che il cacio rappreso con rametti di fico abbia ottimo sapore" (Bozzetti, 2001).

Con i fiori agresti del cardo ed il lattice del fico si fa il formaggio ai tempi di Palladio, VI secolo d.C., mentre le pigne verdi, il timo tritato e il pepe assumono anche funzione di insaporitori.

Sant'Alberto Magno, nel XIII secolo d.C., descrive la raccolta del lattice di fico tramite lana, successivamente immersa nel latte, come pure la raccolta della lanugine del cardo selvatico, seccata e stemperata nel latte da coagulare (Magno, 1651).

Anche De Crescenzi, nel XIII secolo d.C., ribadisce "e rappiglieremo il cacio co' fiori del cardo selvatico o col lattificio del fico" (De Crescenzi, 1805).

Pantaleone da Confienza, nella sua dotta quanto vasta e completa "Summa Lacticiniorum" del 1477, allunga la lista degli agenti coagulanti con l'erba *Galium verum*, detta prima gallio, quaglio e poi caglio, eponimo di caglio animale.

Pantaleone, viaggiatore europeo, parla anche dei "fiori rossi che giunti a maturazione si trasformano in lanugine", erba che dai medici è detta Camaleontea, e di come "di essi ebbero esperienza diretta in Bretagna e nel Poitou, dove quasi tutti la impiegano, senza far uso d'altro caglio, per coagulare il latte. Presso di loro è chiamata zardoneta. Portai un po' di quel seme dalle nostre parti in Lombardia e scoprii che la Camaleontea può essere sostituita dalla spiga arabica, secondo alcuni, o giudaica, o presso i Latini, cardo bianco o selvatico, e dalla zucca. Molte altre sostanze coagulano il latte, come il Balsamo" (Naso, 1990).

"Come misticar il latte con un rametto verde di fico, rotta la scorza in più parti, causa che si rappiglia" recita Tanara nel 1670 e precisa De Lalande nel 1786: "In Toscana c'è un formaggio dolce chiamato Cacio Marzolino, perché fatto principalmente nel mese di marzo, il cui latte è fatto rapprendere con il fiore del cardo" (Bozzetti, 2001).

Un elogio tecnico viene steso dall'Abate Gerolamo Ottolini: "non è da stupirsi se il *Galium* allontani la putrefazione del formaggio, essendo il sugo di questa pianta acido e perciò antisettico; per lo contrario il presame è una sostanza animale, non solo spogliata d'acido, ma bensì alcalinescente: condizione, che come ognuno sa favorisce la putrefazione" (Ottolini, 1788).

D'avviso contrario Bayle-Barelle che scrive: "il metodo italiano (presame dei vitelli) è superiore a quello dei paesi nei quali si adoperano i fiori dei Cardi o del Gallio, d'onde è poi derivato il nome di

Gallio al presame stesso” e nella nota a margine l’autore precisa: “si usa anche il pappo dei cardi e dei carciofi” (Bayle-Barelle, 1808).

Ferrari nel 1816 scrive che “il *Galium* è una pianta di cui Linneo ne conta ventiquattro specie. La più comune è il *Galium verum* che i francesi chiamano Caille lait” ed inoltre sottolinea che “il formaggio riesce un po’ verdiccio” anche se “più consistente e più dolce”. Il problema della putrefazione del formaggio doveva essere tanto importante da far ripetere al Ferrari quanto già espresso da Ottolini sulla preventiva azione antisettica del caglio vegetale. Cattaneo cita ancora i fiori agresti del cardo, il galio luteo e bianco, i carciofi ed il latte del fico, perché “possono tutto il siero trarre fuori dal latte” (Cattaneo, 1839).

L’evoluzione dei cagli animali in essere a metà Ottocento, porta a una riduzione dell’impiego di cagli vegetali. Questi da un ruolo primario passano ad un ruolo secondario ed anche nella letteratura del Novecento sono trattati come minoritari prima e marginali poi.

Oggi, al principio del terzo millennio, i cagli vegetali trovano ancora impiego in diverse parti del mondo e sono oggetto di studio per diversi gruppi di ricerca. Così ad esempio sono a caglio vegetale in Italia Cacioricotta, Caciotte di Pienza, Raviggiolo, Casizolu e Fresa; in Spagna Queso de la Serena, Torta del Casar, Queso Flor de Giuia; in Portogallo Serra e Serpa; in Scozia Dunsyre Blue; nel Regno Unito Exmoore Blue, Belstone e Devon. Altri formaggi per motivi religiosi e/o di piccola economia sono prodotti grazie ai coadiuvanti vegetali (Bozzetti, 2001).

In conclusione, sulla precedenza dell’uso del caglio vegetale sul caglio animale concordano Molon, che scrive: “uomini dei primi tempi apprendessero questa maniera di coagulazione per fatto dell’aver mescolato assieme ne loro pasti il latte con qualche parte di queste piante”(Molon, 1883), Besana, che scrive: “caglio perché il nome è derivato da *Galium verum*, pianta il cui fiore ha la proprietà di fornire un decotto coagulante il latte”(Besana, 1908) e Corradini che scrive: “per produrre i primi formaggi utilizzando parti di piante, come ad esempio i fiori del cardo e il latte di fico, mentre l’idea di utilizzare gli stomaci degli animali lattanti risale probabilmente all’uso della gemma (latte cagliato contenuto nello stomaco subito dopo l’assunzione) per coagulare il latte in sacrifici rituali” (Corradini, 1995).

Tipologie e fonti di proteasi vegetali

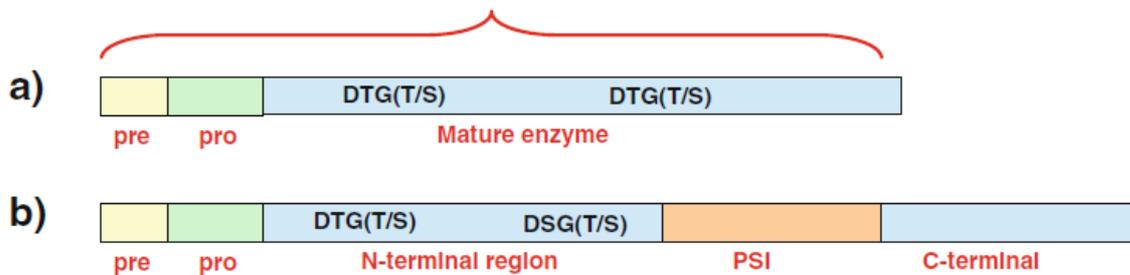
I coagulanti vegetali sono delle proteasi ossia enzimi caratteristici delle piante e coinvolti in tutto il loro ciclo di vita dalla mobilitazione delle proteine di riserva durante la germinazione dei semi all’inizio della morte cellulare e della senescenza (Schaller, 2004). Le proteasi vegetali sono divise in gruppi in base al meccanismo catalitico usato durante il processo idrolitico. Le principali tipologie sono le aspartiche, le seriniche, le cisteiniche e le metalloproteasi (Bah et al., 2006), ma le proteasi vegetali usate per coagulare il latte appartengono solo ai primi tre tipi. Le proteasi seriniche e cisteiniche sono differenti a livello catalitico dalle aspartiche e dalle metalloproteasi, in quanto il nucleofilo del sito catalitico è parte di un aminoacido, mentre negli altri due gruppi è una molecola di acqua attivata.

Proteasi aspartiche

La maggior parte delle proteasi aspartiche vegetali hanno un’inserzione extra tra il gruppo N-terminale e il C-terminale, che consiste di circa cento aminoacidi ed è chiamata PSI, ovvero inserto pianta specifico (Yegin e Dekker, 2013).

Nella figura 1 si nota la differenza tra la struttura primaria di una proteasi aspartica vegetale rispetto ad un'altra comune proteasi aspartica. La funzione biologica del PSI non è ancora stata stabilita. Pare che la proteasi aspartica vegetale sia poi convertita in un enzima maturo a due catene, mentre la proteasi aspartica animale ad un enzima a una singola catena (Costa et al., 2010), benché non si sappia attualmente che importanza biologica abbia.

Figura 1 - Rappresentazione schematica della struttura di una proteasi aspartica di un mammifero o di un microorganismo (a) e rappresentazione schematica di una proteasi aspartica vegetale (b) (Yegin e Dekker, 2013)



Le proteasi aspartiche sono attive a pH acido ed hanno una specificità nella scissione dei legami peptidici tra i residui aminoacidici idrofobici responsabili dell'attività catalitica (Domingos et al., 2000).

Le proteasi aspartiche con attività coagulante nel latte sono state trovate, come si può notare nella tabella 1, nel carciofo (*Cynara scolymus* L.) (Llorente et al., 1997); nel cardo mariano (*Silybum marianum* L. Gaertn.) (Vairo-Cavalli et al., 2005); nell'*Onopordum turcium* (Tamer, 1993); nel riso (Asakura et al., 1997) e nella *Centaurea calcitrapa* (Domingos et al., 2000).

Nel cardo (*Cynara cardunculus*) troviamo cardosina e ciprosina, proteasi aspartiche che si accumulano nei fiori maturi (petali e pistilli), ma non li troviamo nelle foglie o nei semi (Cordeiro et al., 1998). La cardosina A è formata da due subunità con peso molecolare di 31 e 15 kDa, mentre la cardosina B consiste di due subunità con peso molecolare di 34 e 14 kDa. La cardosina A è stata molto studiata per la sua elevata somiglianza in specificità di azione con la k-caseina e si è visto che rompe lo stesso legame peptidico Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ su cui agisce la chimosina. La cardosina B è simile alla pepsina, in termini di specificità e azione (Egito et al., 2007). Una caratteristica unica per la cardosina A e che manca nella cardosina B, è la presenza della sequenza funzionale Arg-Gly-Asp (RGD), che è conosciuta come sequenza di legame presente nell'integrina. Si è visto che la sequenza RGD ha la funzione di recettore di legame sulla superficie cellulare. A partire dai fiori secchi del *C. cardunculus* sono state trovate tre ciprosine con attività coagulante che sono state isolate, purificate e caratterizzate (Yegin e Dekker, 2013).

Proteasi cisteiniche

Le proteasi cisteiniche hanno un meccanismo catalitico che coinvolge un gruppo cisteinico nel sito attivo. Le proteasi cisteiniche sono molto usate nell'ambito alimentare, delle biotecnologie, della farmacia e questo per la loro attività in un ampio range di temperature e pH.

Appartenente a questo gruppo è la ficina, isolata dal lattice di diverse specie di *Ficus*. In particolare la ficina isolata dal lattice del *Ficus racemosa* si è dimostrata avere un'abilità nella digestione della caseina, indice di una capacità di coagulazione del latte (Devaraj et al., 2008). Anche enzimi estratti da *Albizia lebeck* e *Helianthus annuus* appartenerebbero a questo gruppo ed avrebbero attività coagulante (Egito et al., 2007) così come l'actinidina isolata dal frutto maturo del kiwi

(*Actinidia chinensis*) (Katsaros et al., 2010) e le proteasi estratte dalle radici dello zenzero (*Zingiber officinale*) (Hashim et al., 2011).

Proteasi seriniche

Le proteasi seriniche possiedono un residuo serinico nel loro sito attivo e sono diffuse tra diversi gruppi tassonomici e presenti in quasi tutte le parti della pianta, ma soprattutto nei frutti.

Le proteasi seriniche vegetali sono state trovate ed estratte dal lattice, dai semi, dai fiori, dalle foglie e dalle radici. La neriifolina, una proteasi serinica simile alla chimitropsina, è stata purificata dal lattice di *Euphorbia neriifolia* (Yadav et al., 2011). Un altro enzima, la neriifolina S., una proteasi serinica dimerica di massa molecolare 94kDa, ha attività coagulante nel latte ed è stata purificata dal lattice di *E. neriifolia* (Yadav et al., 2012). La religiosina, la religiosina B e la religiosina C sono state isolate dal lattice del *Ficus religiosa* (Kumari et al., 2012). Dallo *Streblus asper* è stato purificato un enzima termostabile con massa molecolare di 63 kDa, la streblina (Tripathi et al., 2011).

Ancora la cucumisina dal *Cucumis melo* (Uchikoba e Kaneda, 1996) e la lattucina dalla *Lactuca sativa* (Lo Piero et al., 2002) sono state usate come coagulanti nel latte.

Fonti vegetali di coagulanti

Tra il vasto numero di proteasi con applicazioni nell'industria alimentare quelle aspartiche, come la chimosina, sono le più utilizzate per la coagulazione del latte. La scissione primaria avviene a livello del legame Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ causando una destabilizzazione delle micelle di caseina, con conseguente coagulazione del latte per formare la cagliata.

Cynara scolymus

Sebbene diverse proteinasi vegetali siano in grado di coagulare il latte, purtroppo, la maggior parte del caglio vegetale ottenuto è spesso inadeguato per la produzione di formaggio a causa del suo carattere eccessivamente proteolitico che ne abbassa la resa finale e produce un sapore amaro (Lo Piero, 2002).

Un'eccezione a questa regola generale è rappresentata dagli estratti acquosi dei fiori di *Cynara cardunculus*, che sono stati usati per anni, e continuano ad esserlo nella produzione di vari formaggi tradizionali portoghesi e spagnoli (Silva et al., 2002).

Anche gli estratti dei fiori di altre due specie *Cynara*, ovvero *C. humilis* e *C. scolymus*, sono risultati essere efficaci come coagulanti (Silva e Malcata, 2000). Recentemente sono state purificate le proteinasi di *C. scolymus*, una specie che contiene tre proteinasi (cinarasi A, B e C) con attività di coagulazione del latte. Tutte e tre le proteinasi sono glicoproteine e sono composte da due subunità.

Nel caso degli estratti di cardo la purificazione porta ad una diminuzione della specifica attività coagulante rispetto a quella dell'estratto grezzo in caso di cinarasi A e C, e ad un aumento per la cinarasi B.



Cynara scolymus

Inoltre, le cinarasi A e C mostrano un leggero aumento dell'attività peptidasica specifica rispetto all'iniziale estratta, mentre l'attività specifica di cinarasi B è molto più alta.

Tutte e tre le cinarasi presenti nel carciofo tagliano la k-caseina allo stesso legame peptidico del caglio animale. Tuttavia i profili elettroforetici relativi all'idrolisi dell' α - β caseina determinati dalle tre cinarasi differiscono.

I pattern di degradazione prodotti tramite l'azione di cinarasi A e C su α e β caseina sono simili tra loro e diversi da quelli osservati con il caglio animale, mentre la cinarasi B produce un tracciato elettroforetico più simile a quello ottenuto con caglio animale.

Cynara cardunculus

Gli studi effettuati su questa pianta hanno evidenziato la presenza di due proteasi aspartiche, cardosina A e cardosina B, responsabili dell'attività coagulante. L'estratto dei fiori può quindi essere utilizzato per la produzione di formaggi e non determina la presenza nel formaggio a fine maturazione di un off-flavor amaro soprattutto se non si utilizza latte ultra filtrato (Agboola et al., 2009).



Cynara cardunculus

Solanum elaeagnifolium var. Cavanilles

Solanum elaeagnifolium var. *Cavanilles* è una pianta erbacea con spine sugli steli e sulle nervature fogliari. Il frutto inizialmente è sferico, verde e carnoso, e diventa poi giallo/arancione a maturazione. Una pianta generalmente produce dai 40 ai 60 frutti, contenenti ciascuna dai 60 ai 120 semi.

Solanum elaeagnifolium è una pianta originaria dell' America ed è stato suggerito che i centri più probabili di origine geografica siano il nord-Messico (dove è nota con il nome di "trompillo") e il sud-ovest degli Stati Uniti.

Questa pianta è sempre stata molto diffusa in diverse regioni del mondo ed è considerata un'erba fastidiosa perché in concorrenza con le colture, interferisce con la zootecnia e disturba le pratiche di raccolta.

Tuttavia, ci sono descrizioni di bacche mature di *S. elaeagnifolium*, utilizzate dagli indiani Pima del sud-ovest degli Stati Uniti, come agente di coagulazione del latte. In alcuni luoghi di Chihuahua, in Messico, le bacche di questa pianta sono state utilizzate per decenni nella produzione di un formaggio a pasta filata chiamato Asadero.

Le proprietà coagulanti di *S. elaeagnifolium* sono state descritte da Bodansky in due opere, la prima pubblicata nel 1916 e la seconda nel 1924 (Bodansky 1916, 1924). Bodansky scrisse che solo le bacche di *S. elaeagnifolium* avevano un'attività coagulante, in particolare le bacche mature.

Recentemente è stato scoperto che le bacche di *S. elaeagnifolium* producono una idrolisi aspecifica della k-caseina e della β -caseina ma non idrolizzano le siero proteine (Gutierrez-Mendez et al., 2011). Dette attività sarebbero ascrivibili a proteinasi aspartiche.

Gli estratti da *S. elaeagnifolium* richiedono tempi più lunghi rispetto alla chimosina od al caglio animale per coagulare il latte e l'aumento di viscosità nel latte durante la coagulazione con gli estratti da *S. elaeagnifolium* è la metà di quello osservato nel latte coagulato con chimosina. Il tasso di aggregazione della caseina è quasi 8 volte più veloce nel latte rappreso con chimosina rispetto al latte coagulato con il caglio vegetale. Questo probabilmente è dovuto a differenze nel tipo di legami peptidici che ciascun coagulante scinde. D'altra parte, il valore più basso nell'attività di coagulazione è stato registrato nell'estratto tal quale, ma questo valore migliora con la purificazione che si realizza mediante precipitazione con solfato d'ammonio.



S. elaeagnifolium var.
Cavanilles

Le proteinasi aspartiche come la chimosina contengono due residui nella zona attiva che possono essere modificati dalle variazioni di pH, variando la loro specificità. Tuttavia, il pH ottimale per la proteolisi da proteinasi aspartiche dipende dalla specie da cui si produce l'enzima e dal substrato utilizzato (Crabe, 2004).

I formaggi ottenuti da *S. elaeagnifolium* sono friabili e morbidi rispetto ai formaggi realizzati con chimosina o caglio animale ed i valori di durezza, fratturabilità ed elasticità dei mini-formaggi prodotti con chimosina o caglio animale sono due o tre volte maggiori dei valori osservati nei formaggi prodotti con il coagulante vegetale probabilmente perché il caglio vegetale è più proteolitico.

La coesione nei formaggi ottenuti con il coagulante vegetale è invece simile a quella osservata nei formaggi con caglio animale e chimosina.

Questa pianta può quindi essere una interessante fonte di coagulante vegetale e viste le sue proprietà potrebbe essere usata soprattutto nella produzione di prodotti caseari particolari quali le creme di formaggio.

Onopordum acanthium L.

L'*O. acanthium* è una pianta erbacea della famiglia delle Asteracee dai fiori purpurei, presente in Asia Centrale ed Europa.

L'onopordosina estratta dallo stigma e dallo stilo risulta avere una buona attività di cagliatura del latte ed il peso molecolare dell'enzima è di circa 45 kDa (Brutti et al., 2011).

La massima attività proteolitica della onopordosina è stata raggiunta a pH acido (> 95% in un intervallo di pH 2.0-3.3). Prove di caseificazione volte ad ottenere formaggi a pasta semi-dura hanno evidenziato che i formaggi ottenuti con onopordosina hanno un contenuto proteico leggermente superiore mentre sia l'aspetto esterno che quello interno sono risultati paragonabili a quelli dei prodotti commerciali (Reis et al., 2000).



Onopordum acanthium L.

Actinidia deliciosa

Dalla polpa del kiwi (*Actinidia deliciosa*) è possibile ottenere un enzima coagulante, l'actinidina (Lo Piero et al., 2011). L'actinidina è una proteasi cisteinica attiva in un ampio intervallo di pH (4 - 10) ed ha un'ampia specificità di substrato (Grozdanovic et al., 2013).

È stato dimostrato che l'actinidina ha la capacità di formare coaguli di latte e che l'enzima è pienamente compatibile con le condizioni necessarie per la produzione di formaggio (attività ottimale a 40 - 42 °C, valori di pH leggermente acidi) (Lo Piero et al., 2011). L'analisi dei prodotti di idrolisi generati dall'actinidina ha dimostrato che il substrato preferito per questo enzima è la β -caseina, seguita dalla k-caseina, che è idrolizzata in un piccolo numero di peptidi abbastanza grandi (Lo Piero et al., 2011). I prodotti lattiero-caseari coagulati con l'uso di succo di kiwi sviluppano meno off-flavor. Tutti questi risultati indicano che le proteasi estratte dal kiwi potrebbero essere una soluzione adatta per la produzione di nuovi prodotti caseari. Tuttavia, il livello di actinidina nei kiwi differisce a seconda dello stadio di crescita del frutto e del trattamento di questo durante la conservazione post-raccolta (Larocca et al., 2010). Un kiwi maturo può avere una diversa concentrazione di proteine totali e una diversa quantità di singoli componenti quando la maturazione è raggiunta tramite diversi mezzi di lavorazione post-raccolta, come l'esposizione



Actinidia deliciosa

all'etilene con o senza precedente stoccaggio in celle frigorifere. Inoltre, in un precedente studio, è stato dimostrato che i preparati di actinidina isolati dal kiwi in condizioni native contengono una miscela di actinidia attiva e inattiva. Queste due forme di enzimi hanno mostrato di avere mobilità elettroforetica diversa: l'enzima attivo presenta una banda di circa 22 kDa in elettroforesi su gel di poliacrilammide (Grozdanovic et al., 2012).

L'actinidina del kiwi è comunque nota per essere molto meno proteoliticamente attiva verso la caseina rispetto ad altre proteasi vegetali cisteiniche, come la papaina, la bromelina e la ficina.

Questo potrebbe essere utile per quanto riguarda il potenziale uso di actinidina come alternativa alla chimosina, poiché l'elevata attività proteolitica delle proteasi vegetali è stata una delle maggiori difficoltà nella ricerca di una idonea alternativa al caglio animale (Egito et al., 2007)

L'actinidina mantiene la capacità di idrolizzare frazioni caseiniche fino alla presenza del 5% di grassi ed ha una potenziale applicazione nella produzione di formaggio con un contenuto di grassi ottimizzato (Puglisi et al., 2012).

Ficus religiosa

Diversi studi hanno evidenziato le buone attività di coagulazione del latte ad opera delle proteasi seriniche. In particolare la scoperta del coagulante religiosina dal lattice del *Ficus religiosa* (Kumari et al., 2012) ha portato ad ulteriori studi sulla stessa pianta ed alla scoperta di una nuova proteasi serinica.



Ficus religiosa

L'enzima è stato scoperto nel lattice del *Ficus religiosa* ottenuto dallo stelo inciso longitudinalmente e purificato mediante cromatografia a scambio cationico.

Il profilo di eluizione proteico si risolve in quattro picchi e la maggiore attività proteolitica è stata osservata esclusivamente per il secondo.

L'enzima è stato purificato ed indicato come religiosina B. E' caratterizzato da un punto isoelettrico a pH 7.6 il che indica che è una proteina debolmente basica al contrario della maggior parte dei recente isolati di proteasi seriniche da piante che hanno punti isoelettrici nel range di pH 4.0 -7.0 (Tomar et al., 2008).

La religiosina B non contiene frazioni di carboidrati nella struttura molecolare, come la maggioranza delle proteasi seriniche vegetali segnalate che sono invece delle glicoproteine.

La religiosina B agisce in modo ottimale a pH 8 e 55 °C, ma mostra più dell' 80% dell'attività proteolitica rispettivamente nei range di pH e di temperatura di 7.0-9.5 e 50-60 °C.

La sua stabilità diminuisce a pH 10 riducendone l'attività al 40%. Analogamente a 65 °C la stabilità dell'enzima si riduce a solo il 50%. Queste osservazioni confermano l'elevata stabilità dell'enzima in un ampio intervallo di temperatura e pH.

L'enzima inoltre è stabile in presenza di denaturanti, solventi organici e ioni metallici, è resistente all'autolisi e può essere conservato a bassa temperatura per lungo tempo, senza perdita di attività.

L'enzima coagula il latte e forma una cagliata bianca e stabile. La capacità della religiosina B di produrre una cagliata insieme al suo elevato rapporto di capacità coagulante su attività proteolitica, potrebbe renderla utile come nuovo coagulante vegetale del latte, anche se devono ancora essere effettuati ulteriori studi sia sulla qualità del latte coagulato che sui formaggi prodotti per confermare la sua applicabilità nel settore lattiero-caseario.

Albizia lebbek e Helianthus annuus

Gli estratti grezzi della *A. lebeck* e del *H. annuus* e la loro corrispondente proteina estratta e precipitata con solfato d'ammonio hanno evidenziato una capacità di coagulazione dovuta alla presenza di enzimi con attività simile al caglio animale. Nel caso del girasole l'attività è bassa. Infatti, la proteasi aspartica purificata da *H. annuus* ha mostrato una attività di coagulazione del latte quasi trascurabile (Park et al., 2000). Gli estratti di Albizia hanno invece attività molto superiori a quelle degli estratti di semi di girasole corrispondenti e la maggior parte della k-CN e dell' α_5 -CN scompaiono in 40 min di idrolisi, mentre la β -CN è ancora presente dopo 6 ore.



Albizia lebeck e *Helianthus annuus*

Non esistono però riscontri in merito alla formazione di peptidi amari nel corso della caseificazione.

Albizia julibrissin

L'*Albizia julibrissin* è una pianta ornamentale della famiglia delle mimosaceae coltivata nell'area settentrionale dell'Italia. Dai semi di questa pianta si può ottenere una proteasi cisteinica con rapido potere coagulante e con attività proteolitica limitata. L'estratto è stato sperimentato nella produzione di Gouda, un formaggio vaccino dei Paesi Bassi ottenendo una coagulazione più veloce



Albizia julibrissin

rispetto allo stesso formaggio prodotto con la chimosina, ma il prodotto finito risultava leggermente pastoso in bocca rispetto allo stesso prodotto con caglio animale (Otani e Matsumori, 1990).

Carica papaia

La Papaya è una pianta della famiglia delle *Caricaceae*. Vive in ambienti tropicali (America centrale e meridionale) a temperature che non devono mai scendere sotto i 0°C per evitare marciumi. Anche la Papaya possiede enzimi proteolitici ma non viene utilizzata in campo caseario per i pessimi risultati ottenuti. La proteasi ottenuta dalle foglie della pianta di Papaya (la papaina) rilascia un eccessivo sapore amaro che risulta essere un difetto nella produzione casearia. Dagli studi però è emerso che i formaggi prodotti con la papaina



Carica papaya

sono dal punto di vista nutrizionale, migliori di quelli prodotti con caglio di origine animale. Le percentuali di lipidi, di proteine, di glucidi e di minerali sono nettamente superiori all'apporto nutrizionale di prodotti caseari fabbricati con coagulante animale (Adentunji e Salawu, 2008).

Calotropis procera

La *Calotropis procera* è una pianta che si trova nelle regioni desertiche che si affacciano sul mar Mediterraneo (Giordania, Israele ed Egitto). L'estratto ottenuto dalle foglie è utilizzato nella produzione di formaggi tradizionali nei Paesi dell'Africa occidentale. Anche questa proteasi non è utilizzata nella caseificazione industriale per i pessimi risultati organolettici che si ottengono. La proteolisi è troppo spinta e porta a un sapore amaro pronunciato e a difetti nella consistenza del prodotto. L'estratto enzimatico



di *Calotropis procera* possiede una elevata qualità nutrizionale.

L'alto potere coagulante di questa pianta può comportare un elevato contenuto di lipidi nei prodotti caseari con il quale sono fabbricati e un alto contenuto in umidità che favorisce la crescita di microrganismi che riduce il tempo di conservazione del prodotto. I formaggi prodotti presentano un elevato contenuto di lattosio (Adentunji e Salawu, 2008).

Calotropis procera

Jacarantia corumbensis

Questa pianta appartiene alla famiglia delle *Caricaceae* ed è conosciuta come papaya selvatica. Cresce spontaneamente nelle zone semi-aride del sud America ed il suo tubero è usato per l'alimentazione animale nei periodi di siccità.

La proteasi cisteinica estratta dal lattice delle radici della *Jacarantia corumbensis* e parzialmente purificata, ha elevato potere coagulante. La massima attività coagulante di questa proteasi si ha ad una temperatura di 55°C sia per l'estratto grezzo sia per l'estratto parzialmente purificato. Entrambi gli estratti risultano stabili nel range di pH 3.6 - 6.5 e si ha un'elevata attività proteolitica dopo 120 minuti (Duarte e Moreira, 2009).



Jacarantia corumbensis

Solanum dubium

La *Solanum dubium*, pianta della famiglia delle Solanaceae, è un'erba infestante che cresce nell'area orientale del Sudan. È una pianta perenne che fiorisce durante la stagione delle piogge (da giugno ad agosto) e che produce frutti in gennaio. I produttori di formaggio in alcune zone del Sudan, usano le bacche di *Solanum dubium* per produrre un formaggio tradizionale a pasta molle il "Jibna beida". Per la sua produzione 10 – 15 bacche di *Solanum dubium* vengono sbriciolate in 250 ml di acqua. Dopo 5 minuti, l'estratto viene sgocciolato e



Solanum dubium

aggiunto a 20 Kg di latte (vaccino, ovino o caprino) precedentemente salato. La coagulazione avviene in 2 ore. La cagliata viene tagliata, lasciata in immersione per circa 30 minuti e poi spurgata dal siero e pressata. Viene poi conservato nel suo siero salato in contenitori ermetici. Il formaggio prodotto è amaro, molle, acidulo e molto friabile. Potrebbe essere possibile ridurre il sapore amaro, purificando e concentrando l'enzima estratto. Il calore ha il suo effetto sul potere coagulante degli enzimi estratti dalla pianta. Il trattamento termico da 60 a 70°C, riduce l'attività coagulante rispettivamente dal 28 al 86%. Quando l'estratto viene portato ad una temperatura da 80 a 90°C per 10 minuti, si forma un precipitato che disattiva l'enzima (Yousif e Shammet, 1996).

Conclusioni

I coagulanti vegetali hanno una radicata tradizione nella tecnologia lattiero-casearia ed oggi risultano largamente applicati non solo in quei Paesi dove l'utilizzo dell'abomaso dei ruminanti lattanti è limitato per questioni religiose od in cui risulta vietato l'utilizzo del caglio di vitello ricombinato, ma anche laddove è poco utilizzato per motivi dietetici o a causa di una diminuzione della domanda a seguito dell'incidenza della BSE.

Il mercato inoltre è sempre più direzionato verso una diversificazione dell'offerta, verso scelte vegetariane e verso il ritorno alle antiche tradizioni. Sempre più persone seguono un regime alimentare misto, e anche se nella loro dieta quotidiana consumano proteine animali, vanno alla ricerca di prodotti di qualità, con standard qualitativi di livello elevato. Molte aziende cercano quindi di dirigere la produzione verso tali scelte.

Il mercato comunque propone, nella grande maggioranza dei casi, il coagulante vegetale ottenuto dai fiori di cardo, ed è sicuramente una buona possibilità laddove il sapore amaro non ecceda e diventi un off-flavor.

In realtà l'ampia bibliografia mette in evidenza come ci siano però tante altre possibilità di coagulanti vegetali ottenibili da piante, le cui proteasi sono di facile estrazione e che nella maturazione del formaggio non determinano in genere sapori amari nel prodotto finito.

L'utilizzo del caglio vegetale, da usi di antiche tradizioni, potrebbe quindi diventare la scelta del futuro. Si tratta infatti di novità interessanti perché propongono alimenti tradizionali di grande richiamo con una formula leggermente modificata in grado di soddisfare le richieste di nuove fasce di consumatori.

Bibliografia

- Adentunji V.O., Salawu O.T. (2008), West african soft cheese “wara” processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: a comparative assessment of nutritional values. *African Journal of Biotechnology*, 7, 18, 3360-3362
- Agboola S., Chan H., Zhao J., Rehman A.(2009), Can the use of Australian cardoon (*Cynara cardunculus L.*) coagulant overcome the quality problems associated with cheese made from ultrafiltered milk? *Food Science and Technology*, 42, 1352-1359
- Aristotele, Opere biologiche, *UTET*, Torino, 238
- Asakura T., Watanabe H., Keiko A., Soichi A. (1997), Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk-clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1070-1075
- Bah S., Paulsen B., Diallo D., Johansen H. (2006), Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *Ethnopharmacol Journal*, 107, 189-198
- Bayle-Barelle G. (1808), Saggio intorno la fabbricazione del Cacio detto Parmigiano, ed i mezzi più acconci di perfezionare quest’arte. *Giornale di Agricoltura*, Milano, 4-67
- Barbagallo N., Chisari M., Spagna G., 2009. Ingredienti naturali per il settore caseario - cagli vegetali estratti da *Cynara cardunculus*. *Ingredienti alimentari*, Novembre/Dicembre
- Besana C. (1876), Manuale di chimica applicata al caseificio, *Brignola Edizione*, Milano, 270
- Besana C. (1908), Caseificio, *UTET*, Torino, 89 – 95
- Bodansky A. (1916), The chymase of *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Biological Chemistry*, 27, 103-105
- Bodansky A. (1924), A study of milk-coagulating enzyme of *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Biological Chemistry*, 61, 365-375
- Bozzetti V. (2001), L’evoluzione storica dei cagli vegetali ed animali. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 52, 227-245
- Brutti C., Pardo M., Caffini N., Natalucci C. (2011), *Onopordum acanthium L.* (Asteraceae) flowers as coagulant agent for cheesemaking. *Food Science and Technology*, 45, 172-179
- Castillo M., Payne F., Hicks C., Lopez M. (2000), Predicting cutting and clotting time of coagulation goat’s milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 10, 551-562
- Cattaneo L. (1837), Il caseificio o la fabbricazione dei formaggi, *Molina Editore*, Milano, 145 -152
- Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D., Rodriguez-Lopez J. (2007), Characterization of the milk-clotting properties of extract from artichoke (*Cynara scolymus,L.*) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393-1400
- Columella (1977), L’arte dell’Agricoltura e libro sugli alberi, *Einaudi editore*, Torino, 533
- Cordeiro M., Pais M., Brodelius P. (1998), *Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* (cardoon): in vitro culture, and the production of cyprosin (milk-clotting enzymes). *Bajaj YPS Biotechnology in agriculture and forestry*, 132-153
- Corradini C. (1995), Chimica e tecnologia del latte, *Tecniche nuove editore*, Milano, 173-202
- Costa D., Pereira S., Moore I., Pisarra J. (2010), Dissecting cardosin B trafficking pathways in heterologous systems. *Planta*, 232, 1517-1530
- Crabe M. (2004), Rennets: general and molecular aspects. *Elsevier Academic Press*, 19-45
- De Crescenzi (1805), Trattato dell’agricoltura, *Società tipografica de’ Classici Italiani*, Milano, 121-122

- Devaraj K., Gowda L., Prakash V. (2008), An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa*. *Phytochemistry*, 69, 647-655
- Domingos A., Cardos P., Xue Z., Clemente A., Brodelius P., Pais M. (2000), Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6942-6831
- Duarte A.R., Moreira K.A., Cavalcanti M.T.H., 2009. *Jacarantia corumbensis* Kuntze a new vegetable source for milk-clotting enzymes. *Brazilian Archives of biology and technology*, 52, 1, 1-9
- Egito A., Girardet J., Laguna L., Poirson C., Mollé D., Miclo L., Humbert G., Gaillard J. (2007), Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal* 17, 816-825
- Euripide, Ciclope, *Chiantore Editore*, Torino, 136, 17
- Faccia M., Picariello G., Trani A., Loizzo P., Gambacorta G., Lamacchia C., Di Luccia A. (2012), Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with caprifiig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research Technology*, 234, 527–533
- Farkye N. (2004), Cheese technology. *Journal of Dairy Technology*, 57, 91-98
- Fernandez-Salguero J., 2009. Proteolysis during the ripening of goat' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42, 324-330
- Ferrari G. (1816), Modo di migliorare le fabbriche dei formaggi, *Pulini Editore*, Milano, 17-18
- Galán E., Prados F., Pino A., Tejada L., Fernández-Salguero J. (2008), Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18, 93-98
- Gesuiti (1990), La Bibbia, *Piemme editore*, Roma, Deuteronomio 14, 3-21, 317-318
- Girardet J.M., Laguna L.E., Poirson C., Mollè D., 2007. Milk-clotting activity of enzymes extract from sunflower and *Albizia lebeck* seeds and specific hydrolysis of bovine K-casein. *International Dairy Journal*, 17, 816-825
- Grozdanovic M., Burazer L., Gavrovic – Jankulovic M. (2013), Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as low cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal* 32, 46 – 52
- Grozdanovic M., Popovic M., Polovic N., Burazer L., Vuckovic O., Atanaskovic-Markovic M. (2012), Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1013-1018
- Gutierrez-Mendez N., Chavez-Garay D., Jimenez-Campos H. (2012), Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. *Cavanilles*. *Journal of Food Science*, 71, 1
- Hashim M., Dong M., Iqbal F., Li W., Chen X. (2011), Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet. *Dairy Science and Technology*, 91, 431-440
- Hashim M., Mingsheng D., Iqbal F., Xiaohong C. (2011), Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, 72, 458-464
- Hippocrate (1967), Du Regime, *Société D' Edition "Les Belles Lettres"*, Parigi, 49
- Jung, K., Song T., Han D., Kim I., Lee C. (2005), Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1782-1785
- Kappeler S., Van den Brink H., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E. (2006), Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 647-654

- Katsaros G., Tavantzis G., 2009. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1, 47-51
- Katsaros G., Tavantzis G., Taoukis P. (2010), Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 47-51
- Kumari M., Sharma A., Jagannadham M. (2012), Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry* 131, 1295 – 1303
- Lalande (1786), *Voyage in Italie*. Istituto tecnico agrario “A. Zanelli”, Reggio Emilia, 232
- Larocca M., Rossano R., Riccio P. (2010), Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. *Hayward*) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2411-2418
- Lilbæk H., Broe M., Høier E., Fatum T., Ipsen R., Sørensen N. (2006), Improving the yield of mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 4114-4125
- Llorente B., Brutti C., Natalucci C., Caffini N. (1997), Partial characterization of a milk clotting proteinase isolated from artichoke (*Cynara scolymus*). *Acta Farm Bonaer*, 16, 37-42
- Llorente B., Obregon W., Avilés F., Caffini N., 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., Puglisi I., Petrone G. (2002), Characterization of “lettucine”, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2439-2443
- Lo Piero A., Puglisi I., Petrone G. (2011), Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233, 517-524
- Magno A. (1651), *De Animalibus*, XXVI vol., 9, 150 -153
- Molon G. (1883), *Sulle prime maniere di coagulazione del latte*, *Anselmi Editore*, Crema, 9
- Naso I. (1990), *I formaggi del Medioevo*, La “*Summa Lacticiniorum*” di Pantaleone da Confienza. *Edizione Il Segnalibro*, Torino, 41
- Naveena B., Mendiratta S., Anjaneyulu A. (2004), Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus* and *Zingiber officinale*. *Meat Science*, 68, 363-369
- Ohtsuki K., Taguchi K., Sato K., Kawabata M. (1995), Purification of ginger proteases by DEAE-Sephadex and isoelectric focusing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1243, 181-184
- Oliva A. (1904), *I presami nel caseificio*, *Tip. Degli Operai*, Mantova, 11-41
- Omero, *Iliade*, *Newton Compton Editore*, Milano
- Otani H., Matsumori M., 1990. Purification and some properties of milk clotting protease from young seeds of *Albizia julibrissin*. *Facoltà di Agraria, Shinshu University, Nagano-ken*, 45, 399
- Ottolini G. (1788), *Prodromo dell’Abate Gerolamo Ottolini, intorno alla maniera di migliorare la fabbrica dei formaggi*. *Ediz. S. Ambrogio*, Milano, 16-17
- Panagl O. (1972), Pa-ke-te-re and Ka-na-to: two terms of tools of Mycenaean dairying. *Ziva Antika Editore*, XXII vol., 71-84
- Park H., Yamanaka N., Mikkonen A., Kusakabe I., Kobayashi H. (2000), Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 931-939
- Payens T., Wiersma A., Brinkhuis J. (1977), On enzymatic clotting processes. *Biophysical Chemistry*, 6, 253-262

- Puglisi I., Petrone G., Lo Piero A. (2012), Role of actinidin in the hydrolysis of the cream milk proteins. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 449-452
- Puglisi I., Petrone G., Lo Piero A. (2014), A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 67-72
- Reis P., Lourenco P., Domingos A., Clemente A., Pais M., Malcata F. (2000), Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *International Dairy Journal*, 10, 775-780
- Rush E., Patel M., Plank L., Ferguson L. (2002), Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11, 164-168
- Salvadori del Prato O., 1998. Trattato di tecnologia casearia. *Edizioni Edagricole*, Bologna, 3-6, 146-149, 149-153, 151-154
- Sanjuán E., Millán R., Saavedra P., Carmona M., 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
- Schaller A. (2004), A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220, 183-197
- Shah M. (2014), Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science and Technology*, 94, 5-16
- Silva S., Barros M., Malcata F. (2002), Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science*, 67, 1746 – 1751
- Silva S., Malcata F. (2000), Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates, *Journal of Dairy Research*, 67, 449-457
- Silva S., Malcata F. (2005), Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89, 19-26
- Sousa M., Ardö Y., Mcsweeney P. (2001), Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345
- Sousa M., Malcata F. (1996), Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of the crude extracts of *Cynara cardunculus*. *Food Science and Technology International*, 2, 255-263
- Tamer M. (1993), Identification and partial purification of a novel milk-clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, 13, 427-432
- Tejada L., Gómez R., Fernández-Salguero J. (2007), Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Quality*, 30, 91-103
- Tejada L., Fernandez-Salguero J., 2008. Proteolysis in goats milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18, 139-146
- Tomar R., Kumar R., Jagannadham M. (2008), A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1479-1487
- Tripathi P., Tomar R., Jagannadham M. (2011), Purification and biochemical characterization of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125, 1005-1012
- Uchikoba T., Kaneda M. (1996), Milk – clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, 325-330
- Vairo-Cavalli S., Claver S., Priolo N., Natalucci C. (2005), Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. *Journal of Dairy Research*, 72, 271-275
- Varrone, Opere, *UTET*, Torino, 789

- Yadav R., Patel A., Jagannadham M. (2011), Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin-like serine protease from *Euphorbia nerifolia*. *Process Biochemistry*, 46, 1654-1662
- Yadav R., Patel A., Jagannadham M. (2012), Neriifolin S., a dimeric serine protease from *Euphorbia nerifolia*: purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 132, 1296-1304
- Yegin S., Dekker P. (2013), Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition and engineering. *Dairy Science and Technology*, 93, 565- 594
- Yousif B.H., Shammet K.M., 1996. Milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* plant. *International Dairy Journal*, 6, 637-644