

ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ
ΜΕ ΠΥΤΙΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
του/της
ΤΣΙΑΚΑΝΙΚΑ ΔΗΜΗΤΡΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2022

ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ
ΜΕ ΠΥΤΙΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

ΔΗΜΗΤΡΕΛΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΛΑΠΠΑ ΙΛΙΑΔΑ

ΜΗΛΛΑ ΣΩΤΗΡΙΑ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η διπλωματική εργασία είναι εξ' ολοκλήρου δικό μου έργο και κανένα μέρος της δεν είναι αντιγραμμένο από έντυπες ή ηλεκτρονικές πηγές, μετάφραση από ξενόγλωσσες πηγές και αναπαραγωγή από εργασίες άλλων ερευνητών ή φοιτητών. Όπου έχω βασιστεί σε ιδέες ή κείμενα άλλων, έχω προσπαθήσει με όλες μου τις δυνάμεις να τα προσδιορίσω σαφώς μέσα από την καλή χρήση αναφορών ακολουθώντας την ακαδημαϊκή δεοντολογία και την αποφυγή λογοκλοπής.»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φυτικές πυτιές κατέχουν σημαντική θέση μεταξύ των διαφόρων πηκτικών μέσων, που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία παραγωγής του τυριού. Οι αυξανόμενες παγκόσμιες απαιτήσεις για την παραγωγή τυριού, καθώς και η μείωση της διαθεσιμότητας πυτιάς ζωικής προέλευσης έχουν καταστήσει την επιλογή ενός κατάλληλου πηκτικού μέσου φυτικής προέλευσης σημαντική.

Στην παρούσα εργασία γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση για τη διερεύνηση των προσφάτων επιτευγμάτων σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες των πηκτικών μέσων φυτικής προέλευσης και τον ενζυμικό ρόλο τους στην τυροκομία. Έχουν γίνει επίσης προσπάθειες να συγκριθούν ορισμένες από τις ρεολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των τελικών προϊόντων, που προέρχονται από ορισμένες πυτιές φυτικής και ζωικής προέλευσης.

Ορισμένα πηκτικά μέσα συμπεριλαμβανομένων της ακτινιδίνης ή της ντουβιουμίνης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριών με οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά που παράγονται από την χρήση ζωικής πυτιάς. Ωστόσο, άλλες φυτικές πυτιές, όπως το τζίντζερ, η κουκουμίσίνη ή οι πρωτεάσες ιερώνυμης συμβάλλουν στην ανάπτυξη γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως τυριά με διαφορετική υφή και γεύση, λόγω της υπερβολικής πρωτεολυτικής δραστηριότητας και της παραγωγής πεπτιδίων με πικρή γεύση.

Όσον αφορά τα ένζυμα πήξης του γάλακτος με υψηλή μη ειδική δράση, έχουν αναπτυχθεί αρκετές βελτιωμένες στρατηγικές για την παραγωγή τυριών με αισθητικές ιδιότητες κοντά σε εκείνες της ζωικής πυτιάς.

Αποτελεσματικοί τρόποι βελτίωσης της υφής και μείωσης της πικρίας θα μπορούσαν να είναι το μίγμα των πηκτικών μέσων (καρδοσίνη/χυμοσίνη), η επιλογή του κατάλληλου γάλακτος ή η υπερδιήθηση του, καθώς και η αύξηση του χρόνου αλατίσματος του τυριού κατά την ωρίμανση.

Όσον αφορά τα τυριά με χαμηλή απόδοση, ο ορός γάλακτος που απορρίπτεται, θα μπορούσε να βρει περαιτέρω χρήση στην παραδοσιακή παραγωγή τυριού από ορό γάλακτος. Επομένως, η επιλογή της κατάλληλης φυτικής πυτιάς με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως υψηλή αναλογία πήξης γάλακτος/πρωτεολυτικής δραστηριότητας, και η αριστοποίηση όλων των παραμέτρων πήξης επηρεάζουν την παραγωγή τυριού, συνεπώς πρέπει να καθορίζονται

κατάλληλα ώστε να λαμβάνονται προϊόντα με άριστες λειτουργικές και οργανοληπτικές ιδιότητες.

ABSTRACT

Plant rennets occupy an important position among the various coagulants used in cheese production technology. The increasing global demands for cheese production, as well as the decreasing availability of animal rennet have made the selection of a suitable coagulant of plant origin important.

In the present work, a literature review is analyzed investigating the recent achievements regarding the functional properties of plant-based coagulants and their enzymatic role in cheesemaking. Attempts have also been made to compare some of the rheological and organoleptic properties of the final products, derived from certain rennets of plant and animal origin.

Certain coagulants including actinidine or dubiumin are used to produce cheeses with organoleptic characteristics similar to those produced using animal rennet. However, other plant rennets such as ginger, cucumisin or hieronymus proteases contribute to the development of dairy products such as cheeses with a different texture and flavor due to excessive proteolytic activity and the production of bitter-tasting peptides.

Regarding milk coagulation enzymes with high non-specific activity, several improved strategies have been developed to produce cheeses with sensory properties close to those of animal rennet.

Effective ways to improve the texture and reduce the bitterness could be the mixture of coagulants (cardosin/chymosin), the selection of the appropriate milk or its ultrafiltration, as well as increasing the salting time of the cheese during ripening.

As for low-yielding cheeses, the whey that is discarded could find further use in traditional whey cheese production. Therefore, the selection of the appropriate plant rennet with the desired characteristics such as high ratio of milk coagulation/proteolytic activity and optimization of all coagulation parameters affect cheese production, therefore, they must be properly determined to obtain products with excellent functional and organoleptic properties.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΙΚΗ ΠΥΤΙΑ.....	13
1.1 Ορισμός – Είδη – Πηγές.....	13
1.2 Βιολογικές Ενώσεις Πηγών Φυτικής Πυτιάς.....	18
1.2.1 Ασπαρτικές πρωτεάσες.....	19
1.2.2 Πρωτεάσες κυστεΐνης	20
1.2.3 Πρωτεάσες σερίνης.....	21
1.2.4 Ανάλυση μελέτης - βιολογικές ενώσεις της σφαιρικής αγκινάρας.....	22
1.3 Ο ενζυμικός ρόλος στην πήξη του γάλακτος και στην τυροκομία	24
1.4 Αξιολόγηση ενζυμικής δραστηριότητας φυτικής πυτιάς	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΗΚΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΣΤΙΣ ΡΕΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ, ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	29
2.1 Επίδραση φυτικών πηκτικών μέσων στις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων	29
2.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων.....	31
2.2 Επίδραση φυτικών πηκτικών μέσων στις οργανοληπτικές ιδιότητες των τυριών και ορισμένες στρατηγικές βελτίωσης.....	35
2.2.1 Υφή, γεύση και χρώμα	35
2.3 Επίδραση φυτικών πηκτικών μέσων στην απόδοση τυριού	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	41
3.1 Εφαρμογές σε εργαστηριακή κλίμακα	41
3.1.1 Χρήση ενζύμων από φυτά της οικογένειας <i>Euphorbiaceae</i>	41
3.1.2 Χρήση ενζύμων από εκχυλίσματα <i>Cynara cardunculus</i> , <i>Carica papaya</i> και <i>Ficus carica</i>	43
3.1.3 Δραστικότητα πήξης γάλακτος εκχυλισμάτων μούρων από εννέα φυτά <i>Solanum</i>	50
3.2 Εφαρμογές σε βιομηχανική κλίμακα	54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Λουλούδι άγριων γαϊδουράγκαθων.....	15
Εικόνα 2: Τυπική ασπαρτική πρωτεάση.....	19
Εικόνα 3: Τυπική κυστεϊνική πρωτεάση.....	20
Εικόνα 4: Τυπική πρωτεάση σερίνης.....	21
Εικόνα 5: Ειδικότητα δράσης της καρδοσίνης A και B από το <i>Cynara cardunculus</i> σε απομονωμένες καζεΐνες βοοειδών και αιγοπροβάτων (αs1, β και κ) (Cavalli et al., 2013).	26
Εικόνα 6: Εξέλιξη του συντελεστή αποθήκευσης (G') και του συντελεστή απώλειας (G'') πηκτωμάτων αποβουτυρωμένου γάλακτος που παράγονται από εκχυλίσματα <i>C. cardunculus</i> που παρασκευάζονται, αντίστοιχα, σε pH 3 (A) και pH 6 (B) και από χυμοσίνη (C) ως συνάρτηση του χρόνου (ben Amira et al., 2017).	32
Εικόνα 7: Διατροφική ανάλυση δείγματος τυριού που παρασκευάστηκε με νωπό γάλα αγελάδας (Raghunath T. Mahajan and Gunjan M. Chaudhari, 2014).	42
Εικόνα 8: Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα πήξης του γάλακτος (MCA) των εκχυλισμάτων <i>Cynara cardunculus</i> (Cc), <i>Carica papaya</i> (Cp), πυτιάς μόσχου (Cr) και <i>Ficus carica</i> (Fc), μετρημένη σε γάλα από βοοειδή, βουβάλια, κατσίκια και πρατίνια. Το (%) σχετικό MCA αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών των ανεξάρτητων προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε πηκτικό (Liburdi et al., 2019b).....	45
Εικόνα 9: Η επίδραση της θερμοκρασίας στις καζεϊνολυτικές δραστικότητες (CAs) των εκχυλισμάτων <i>C. cardunculus</i> , <i>C. papaya</i> , πυτιάς μόσχου και <i>F. carica</i> , μετρημένη σε οξικό άλας (pH 5,5). Τα ποσοστά (%) της σχετικής CA αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε πηκτικό (Liburdi et al., 2019b).	46
Εικόνα 10: Ταξινόμηση μορφής ραντάρ της δραστικότητας πήξης του γάλακτος (10 IU/mL) μέσω εκχυλισμάτων στην κλίμακα από 0,0 έως 3,0 (ν. D. Guíama*, 2010).	53

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιστημονικές ονομασίες φυτών <i>Solanum</i> , χρώμα, μορφή, διάμετρος, διαθεσιμότητα και χρήση καρπών από εννέα φυτά <i>Solanum</i> (Almeida & Simões, 2018a).....	15
Πίνακας 2: Παραδείγματα πρωτεασών πήξης γάλακτος από φυτά: πηγή, ταξινόμηση και δραστηριότητα πήξης του γάλακτος (Ben Amira et al., 2017).....	17
Πίνακας 3: Παραδείγματα απόδοσης τυριού ορισμένων τυριών που παρασκευάζονται με πυτιά φυτών, σε σύγκριση με εκείνα που παρασκευάζονται με πυτιά του εμπορίου (Chymosin).	41
Πίνακας 4: Χημικές συνθέσεις των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα πήξης (Liburdi et al., 2019b).....	44
Πίνακας 5: Δείκτες πήξης γάλακτος (MCIs) που ελήφθησαν για εκχύλισμα <i>C. cardunculus</i> , <i>C. paraya</i> , πυτιάς μόσχου και <i>F. carica</i> , σε γάλα από βοοειδή, βουβάλι, αίγες και πρόβατα, σε διαφορετική επώαση θερμοκρασίες (25, 37, 50, 60 και 70°C) (Liburdi et al., 2019b).	47

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρώτη βασική βιοχημική διαδικασία κατά την τυροκομία είναι η μετατροπή του υγρού γάλακτος σε ένα μαλακό ημιστερεό, που ονομάζεται τυρόπηγμα. Σύμφωνα με τους αρχαίους τυροκόμους το τυρόπηγμα σχηματίζεται από τη δράση μιας ουσίας που υπάρχει στο στομάχι των μηρυκαστικών ζώων. Επομένως, κατά τη παραγωγή των τυροκομικών προϊόντων, οι αγροτικές κτηνοτροφικές επιχειρήσεις προμήθευαν τους τυροκόμους με αποξηραμένα στομάχια μηρυκαστικών ζώων όπως μοσχარიού, κατσικιού ή αρνιού και στην πορεία κατά τον 20^ο αιώνα, τους προμήθευαν με τα συμπυκνωμένα ή αποξηραμένα εκχυλίσματα τους, όπως η υγρή ή αποξηραμένη πυτιά εξασφαλίζοντας την υγιεινή και την ασφάλεια των συνθηκών παραγωγής (Liburdi et al., 2019a).

Η παραγωγή τυριού παρουσίασε από το 1961 αύξηση κατά 3,5 φορές, αλλά η διαθεσιμότητα της ζωικής πυτιάς μειώθηκε λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας των στομάχων των μηρυκαστικών ζώων. Παράγοντες, όπως η υψηλή τιμή της ζωικής πυτιάς, οι θρησκευτικοί λόγοι (π.χ. Ισλάμ και Ιουδαϊσμός), οι συνήθειες διατροφής (χορτοφαγία) ή η απαγόρευση της χρήσης επεξεργασμένης πυτιάς από μόσχο (στη Γαλλία, στη Γερμανία και στην Ολλανδία) οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών για τη χρήση τους στη πήξη του γάλακτος (P. F. ; Fox et al., 2004).

Οι Huppertz et al. (2018) δήλωσαν ότι τα εναλλακτικά πηκτικά μέσα πρέπει να φέρουν συγκεκριμένες βιοχημικές ιδιότητες, που θα είναι κατάλληλες να εξασφαλίζουν την πήξη του γάλακτος και θα φέρουν υψηλή εξειδίκευση ως προς την κ-καζεΐνη, έντονη πρωτεολυτική δράση σε κατάλληλο pH και θερμοκρασία τυροκόμησης όπως και επαρκή θερμοθερμικότητα, ώστε να παράγονται και τυροκομικά προϊόντα από ορό γάλακτος χωρίς περαιτέρω υπολειμματική πηκτική δράση.

Τα πιο συχνά εναλλακτικά υποκατάστατα της ζωικής πυτιάς περιλαμβάνουν κυρίως ένζυμα μικροβιακής προέλευσης και ανασυνδυασμένες πρωτεάσες, που έχουν μεταβολιστεί με τη βοήθεια γενετικών τροποποιημένων μικροοργανισμών. Αυτά τα ένζυμα μικροβιακής προέλευσης που χρησιμοποιούνται για τη πήξη του γάλακτος είναι οι ασπαρτικές πρωτεάσες, που διασπούν τον δεσμό Phe₁₀₅–Met₁₀₆ της κ-καζεΐνης βόειας προέλευσης. Ωστόσο, τα

μικροβιακά πηκτικά μέσα μπορεί να οδηγήσουν σε αλλοίωση της γεύσης και να επηρεάσουν την απόδοση και την ποιότητα του τυριού (Garg & Johri, 1994).

Η σύγχρονη βιβλιογραφία αναφέρει επίσης και τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ως εναλλακτικά υποκατάστατα της ζωικής πυτιάς. Επιπλέον, αυτά τα φυτικά πηκτικά μέσα που έχουν την ικανότητα να πήζουν το γάλα έχουν επίσης και πρωτεολυτική δράση. Διάφορες πρωτεάσες συμπεριλαμβανομένων της φικίνης από το *Ficus* sp., του κόμμεος, της παπαΐνης από το *Carica papaya* και τις καρδοσίνες από το *Cynara* sp., αποτελούν κυρίως συστατικά από κόμμεα, καρπούς, ρίζες, σπόρους ή/και χυμούς, καθώς και των φύλλων ή των ανθέων τους.

Συγκεκριμένα, η παπαΐνη και η φικίνη, που ανήκουν στις πρωτεάσες κυστεΐνης, έχουν πρωτεολυτική δράση και έχουν μελετηθεί για την πηκτική ικανότητά τους στο γάλα. Η επίδραση των φυτικών πηκτικών μέσων, που εκχυλίζονται από το κόμμι *Ficus carica* και το *Carica papaya* στην πήξη του αγελαδινού γάλακτος έχουν μελετηθεί συγκρίνοντας τις ιδιότητες του πηγμένου γάλακτος και των προϊόντων ενζυματικής πρωτεόλυσης με εκείνες του πηγμένου γάλακτος από εμπορική πυτιά μόσχου (Low et al., 2006). Ωστόσο, τα φυτικά πηκτικά μέσα χρησιμοποιούνται σπάνια στην τυροκομία, λόγω της ισχυρής πρωτεολυτικής τους δράσης/πήξης γάλακτος, που προκαλεί χαμηλότερες αποδόσεις τυριού, πικρές γεύσεις και ελαττώματα υφής (π.χ. απαλότητα).

Αντίθετα, το εκχύλισμα αγριαγκινάρας έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την παρασκευή τυριών από πρόβειο γάλα, αλλά παρήγαγε τυρί κακής ποιότητας όταν χρησιμοποιήθηκε για την πήξη αγελαδινού γάλακτος (Tejada et al., 2007). Επίσης, το κόμμι από άγριο σύκο (*Caprifig*) χρησιμοποιείται στη νότια Ιταλία για την παραγωγή του τυροκομικού προϊόντος *Caciocotta*, που αποτελεί ένα βιοτεχνικό τυρί από κατσικίσιο γάλα.

Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει πως ο τύπος γάλακτος (βόειο, πρόβειο ή αιγοπρόβειο) και η σύνθεση του γάλακτος επηρεάζουν την ανάπτυξη του πηγματος καθώς και την απόδοση και την ποιότητα του τυριού (Lacroix et al., 1993). Επιπλέον, οι Silvestre et al., (2012) έχουν συμπεράνει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία πήξης και οι πρωτεολυτικές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων επηρεάζονται από ποικίλους παράγοντες, όπως τη φυτική πηγή, τον ιστό, τη συγκέντρωση και τον τύπο της πρωτεάσης.

Τα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται ως πηκτικά μέσα στον τομέα της τυροκομίας από την αρχαιότητα σε χώρες της Μεσογείου, της Δυτικής Αφρικής και της Νότιας Ευρώπης. Τα τυροκομικά προϊόντα που παράγονται με εκχύλισμα αγριαγκινάρας (*Cynara cardunculus*) και παρασκευάζονται σε βιομηχανικό επίπεδο φέρουν την ετικέτα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) στην Ισπανία και την Πορτογαλία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΙΚΗ ΠΥΤΙΑ

1.1 Ορισμός – Είδη – Πηγές

Η πήξη του γάλακτος είναι αποτέλεσμα της δράσης των πρωτεασών που αποσταθεροποιούν τα μικκύλια της καζεΐνης, τα οποία υπάρχουν στο φρέσκο γάλα διασκορπισμένα σε μια συνεχή φάση που περιλαμβάνει νερό, αλάτι, λακτόζη και πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Πρόσφατες δημοσιεύσεις για νέες πρωτεάσες φυτικής προέλευσης για την πήξη του γάλακτος έδειξαν ότι υπόκεινται σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για την χρήση τους στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Duarte et al., 2008). Η χρήση των φυτών ως πηκτικά μέσα χρησιμοποιούνται στην τυροκομία εδώ και σχεδόν 5 αιώνες. Από το 1960, ήδη λαχανικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηκτικά μέσα στην παρασκευή των γαλακτοκομικών προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα. Η παρασκευή τυριού με φυτικά πηκτικά μέσα επηρεάζει θετικά την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη μιας περιοχής και κατά επέκταση μίας ολόκληρης της χώρας όπου αυτό παρασκευάζεται. Η εισαγωγή φυτικών πηκτικών μέσων βελτιώνεται συνεχώς λόγω των κανονιστικών περιορισμών που επιβάλλονται για τη χρήση ζωικών και μικροβιακών πηκτικών μέσων.

Το τυρί είναι ίσως η πιο πολύπλοκη ομάδα γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς έχουν αναφερθεί περισσότερα από 750 τυροκομικά είδη μέχρι σήμερα (Fox PF, 2017). Αν και οι πρώτες προσπάθειες μετατροπής του γάλακτος σε τυρί μπορεί να ήταν ένας τρόπος διευκόλυνσης της μεταφοράς του γάλακτος, βελτίωσης της σταθερότητάς του και τελικά διαφοροποίησης της ανθρώπινης διατροφής με ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας, με την πάροδο του χρόνου το τυρί μετατράπηκε σε προϊόν πρωταρχικής οικονομικής σημασίας. Η τρέχουσα παγκόσμια παρασκευή τυριού υπολογίζεται περίπου σε 19×10^6 τόνους ετησίως,

που αντιπροσωπεύει περίπου το 35% του συνολικού παραγόμενου γάλακτος σε παγκόσμια κλίμακα. Το 75% αυτής της παγκόσμιας παραγωγής και η πλειονότητα των ποικιλιών των τυροκομικών προϊόντων παρασκευάζονται με χρήση ενζυμικής πήξης (πυτιάς) (Fox PF, 2017) . Το τυρί ως σημαντικό διατροφικό προϊόν διαφαίνεται από τις πρώτες γνωστές αναφορές, οι οποίες χρονολογούνται από τη ρωμαϊκή περίοδο όπου πιστεύεται ότι η τυροκομία ήταν ήδη καλά καθιερωμένη. Πράγματι, στη γεωργική πραγματεία του Ρωμαίου στρατιώτη Lucius Junius Moderatus Columella με τίτλο «De Re Rustica» (περίπου το 50 μ.Χ.), περιγράφεται με λεπτομέρεια η τέχνη της τυροκομίας της εποχής επικεντρώνοντας στη χρήση πυτιάς από μηρυκαστικά ζώα όπως αρνί ή κατσίκι και αναφέρεται ότι τα τυροκομικά προϊόντα μπορούν επίσης να παρασκευάζονται με πυτιά φυτικής προέλευσης. Στο προαναφερθέν σύγγραμμα αναφέρεται η χρήση ανθών άγριων γαϊδουράγκαθων (πιθανώς *Cynara cardunculus* – Εικόνα 1), σπόρων *Carthamus tinctorius* (άλλο άνθος που μοιάζει με γαϊδουράγκαθο) ή χυμών από συκιές για την πήξη του γάλακτος από μικρά μηρυκαστικά (P. F. Fox et al., 2017).

Στην Πορτογαλία και σε ορισμένες περιοχές της Ισπανίας, η χρήση εκχυλισμάτων από αποξηραμένα άνθη του *C. cardunculus* L. χρησιμοποιείται επιτυχώς από τους αρχαίους χρόνους για την παρασκευή πολλών παραδοσιακών τυροκομικών προϊόντων, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα αυτού του είδους φυτικής πυτιάς για την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Τις τελευταίες δεκαετίες, γίνεται μεγάλη προσπάθεια για την κατανόηση των ιδιοτήτων αυτού του πηκτικού μέσου φυτικής προέλευσης. Αρκετοί ερευνητές προσπαθούν να χαρακτηρίσουν τα ένζυμα πήξης του γάλακτος που υπάρχουν στα άνθη αγριαγκινάρας, το ρόλο τους στην υδρόλυση των καζεϊνών *in vitro* και την επίδρασή τους στη διαδικασία πρωτεόλυσης κατά την ωρίμανση του τυριού (Almeida & Simões, 2018a). Λόγω της δυνατότητας αυτών των ενζύμων να χρησιμεύσουν ως εναλλακτικές πυτιές σε παραγωγικές διαδικασίες μεγαλύτερης κλίμακας, σήμερα πραγματοποιείται έρευνα είτε για την ανάπτυξη πιο τυποποιημένων σκευασμάτων εγγενών ενζύμων, είτε για τη διερεύνηση της παραγωγής τους σε συστήματα για τη δημιουργία συνθετικών μορφών αυτών των πρωτεασών.



Εικόνα 1: Λουλούδι άγριων γαϊδουράγκαθων.

Αρκετά εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης είναι γνωστά για την εφαρμογή τους στην τυροκομία. Εκχυλίσματα του γένους *Cynara* χρησιμοποιούνται επιτυχώς ως φυτική πηγή ενζύμων για την πήξη του γάλακτος στην Ιβηρική Χερσόνησο και στη Λατινική Αμερική. Εκχυλίσματα τροπικών φυτών όπως από: *Carica papaya*, *Ananas comocus*, *Ficus glabra*, *Calotropis procera* και *Lactuca sativa* έχουν επίσης εφαρμοστεί ως πηγές ενζύμων για την πήξη του γάλακτος. Ωστόσο τα περισσότερα από αυτά τα εκχυλίσματα έχουν αποδειχθεί μη κατάλληλα για τον τομέα της τυροκομίας, καθώς παράγουν τυρί με πικρή γεύση. Τα υδατικά εκχυλίσματα από φρούτα του φυτού *Solanum dobium* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως πηκτικά μέσα στην παραγωγή λευκού και μαλακού τυριού στο Σουδάν. Άλλα φυτικά είδη του γένους *Solanum* όπως, *Solanum incanum*, *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* και *Solanum melongena* έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για την πήξη του γάλατος. Εννέα ακόμα φυτικά είδη από το ίδιο γένος θεωρούνται διαθέσιμα στο Καμερούν (v. D. Guiama*, 2010).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών του γένους Solanaceae (Almeida & Simões, 2018a).

A/A	Είδος	Χρώμα	Μορφή	Διάμετρος (cm)	Διαθεσιμότητα	Χρήση
1	<i>S. aculeastrum</i>	Κίτρινο	Σφαιρική	5 ± 0,1	Χαμηλή	Φαρμακευτική
2	<i>S. aethiopicum</i>	Κόκκινο	Κυκλική	1,5 ± 0,2	Υψηλή	Τρόφιμα
3	<i>S. anomalum</i>	Κόκκινο	Σφαιροειδής	2 ± 0,2	Χαμηλή	Φαρμακευτική
4	<i>S. cerasiferum</i>	Κίτρινο	Κυκλική	3 ± 0,7	Πολύ χαμηλή	Φαρμακευτική

5	<i>S. dasyphyllum</i>	Κίτρινο	Οβάλ	4,5 ± 0,2	Χαμηλή	Φαρμακευτική
6	<i>S. indicum</i>	Πορτοκαλί	Σφαιροειδής	2,3 ± 0,1	Χαμηλή	Φαρμακευτική
7	<i>S. nigrum</i>	Μαύρο	Κυκλική	1 ± 0,02	Υψηλή	Φαρμακευτική
8	<i>S. nodiflorum</i>	Μαύρο	Σφαιρική	1,2 ± 0,01	Μέση	Φαρμακευτική
9	<i>S. terminale</i>	Κόκκινο	Οβάλ	0,8 ± 0,02	Μέση	Φαρμακευτική

Πρόκειται για ξυλώδη βότανα που φέρουν συμπαγείς όρθιους μίσχους με πράσινο χρώμα και έχουν ύψος περίπου 30 cm. Τα φύλλα τους εναλλάσσονται, έχουν μακρύ μίσχο και είναι ωοειδούς σχήματος με οξεία ή αμβλεία κορυφή και ωχροπράσινο χρώμα, ενώ οι ρίζες τους έχουν καφέ χρώμα με πάχος περίπου 5 mm και μήκος 15 cm. Οι μη ώριμοι καρποί τους έχουν πράσινο χρώμα, ενώ οι ώριμοι είναι κίτρινοι, μαύροι ή κόκκινοι (Πίνακας 1). Οι καρποί τους είναι εδώδιμοι ή βρίσκουν εφαρμογή στη φαρμακευτική βιομηχανία. Ωστόσο αυτοί οι καρποί δεν έχουν βρει ακόμα εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο ως πηγή ενζύμων για την πήξη του γάλακτος, προκειμένου να υποκαταστήσουν τη ρεννίνη (v. D. Guíama*, 2010).

Η ταξινόμηση των φυτικών πρωτεασών γίνεται σε διάφορες ομάδες σύμφωνα με τον καταλυτικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της υδρολυτικής διαδικασίας. Οι κύριες ομάδες πρωτεασών που χρησιμοποιούνται στην πήξη του γάλακτος είναι: η ασπαρτική, η σερίνη και η κυστεΐνη. Ο αριθμός και ο τύπος του ενζύμου εξαρτώνται από το είδος του φυτού αλλά και από το τμήμα από το οποίο παραλαμβάνεται στο ίδιο το φυτό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εμφανίζονται στον Πίνακα 2. Οι ασπαρτικές πρωτεάσες (APs) εντοπίζονται σε πολλές ποικιλίες φυτικών ειδών. Συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία ανάπτυξης των φυτών, στους μηχανισμούς αποθήκευσης των πρωτεϊνών και στη γήρανση των φυτών (Ben Amira et al., 2017). Αυτά τα ένζυμα έχουν δύο ασπαρτικά υπολείμματα υπεύθυνα για την καταλυτική δραστηριότητα, των οποίων η δράση τους προτιμάται για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των υδρόφοβων υπολειμμάτων των αμινοξέων. Η πλειονότητα των ενζύμων αυτών είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που φέρουν μία μεγάλη υπομονάδα στα 28–35 kDa και μία μικρή υπομονάδα στα 11–16 kDa αλλά και έχουν και ένα πολύ μικρό αριθμό μονομερών πρωτεϊνών με μοριακή μάζα από 36 έως 65 kDa. Στις ενεργές θέσεις των πρωτεασών σερίνης (SPs) εντοπίζονται υπολείμματα σερίνης. Ο κύριος ρόλος τους στα φυτά είναι παρόμοιος με τις AP αλλά

διαθέτουν κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά. Οι SP είναι περισσότερο διαδεδομένες στα φυτικά είδη και ανήκουν σε διάφορες ομάδες. Εκχυλίζονται και καθαρίζονται από διάφορα μέρη φυτών, και κυρίως φρούτων. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης ή οι θειολο-πρωτεάσες διαθέτουν έναν καταλυτικό μηχανισμό που φέρει μια χαρακτηριστική ομάδα κυστεΐνης στην ενεργό τους θέση. Τα φυτικά εκχυλίσματα ή και οι καθαρισμένες πρωτεάσες τους έχουν χαρακτηριστεί σε αρκετές σχετικές επιστημονικές μελέτες, για την πιθανή εφαρμογή τους ως πηκτικά μέσα για την πήξη του γάλακτος προς την Παρασκευή τυροκομικών προϊόντων. Τα ευρήματα από τις μελέτες εμφανίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Παραδείγματα πρωτεασών πήξης γάλακτος από φυτά: πηγή, ταξινόμηση και δραστηριότητα πήξης του γάλακτος (Ben Amira et al., 2017).

Φυτό	Όργανο	Τύπος πρωτεάσης	Όνομα	Αριθμός & Κλάση	Δραστικότητα
<i>Cynara cardunculus</i>	Άνθη	Ασπαρτική	<i>Cardosin</i>	8	7556UACI/g
<i>Cynara scilymus</i>	Άνθη	Ασπαρτική	<i>Cynarase</i>	3	100CAU/mg
<i>Cynara humilis</i>	Άνθη	Ασπαρτική	<i>Cardosin A</i>	-	-
<i>Silybum marianum</i>	Άνθη	Ασπαρτική	Ενζυμικό εκχύλισμα	-	0,083CAU/mL
<i>Oryza sativa</i>	Σπόροι	Ασπαρτική	<i>Oryzasin</i>	1	-
<i>Moringa oleifera</i>	Άνθη	Ασπαρτική	Ενζυμικό εκχύλισμα	-	1,9CAU
<i>Onopordum acanthium</i>	Άνθη	Ασπαρτική	<i>Onopordosin</i>	-	0,546CAU/mL
<i>Cirsium vulgare</i>	Άνθη	Ασπαρτική	<i>Cirsin</i> JN703462	-	-
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Εξωκυτταρικό υγρό	Ασπαρτική	Ενζυμικό εκχύλισμα	-	2,023U/mg
<i>Albizia lebeck</i>	Σπόροι	Κυστεϊνική	Ενζυμικό εκχύλισμα	-	156x10 ⁻³ U/mg
<i>Helianthus annuus</i>	Σπόροι	Κυστεϊνική	Ενζυμικό εκχύλισμα	-	591x10 ⁻³ U/mg
<i>Ficus carica sylvestris</i>	Κλαδιά	Κυστεϊνική	<i>Ficin</i>	2	1,4U/mg
<i>Sideroxylonobtusifolium</i>	Μίσχος	Κυστεϊνική	-	1	917U/mg

<i>Actinidia chinensis</i>	Καρπός	Κυστεϊνική	<i>Actinidin</i>	1	244U/mg
<i>Calotropis gigantea</i>	Κόμμι	Κυστεϊνική	<i>Calotropain</i>	4	450CAU/mL
<i>Zingiber officinale</i>	Ριζικό	Κυστεϊνική	<i>Zingibain</i>	3	288,3CAU/mg
<i>Bromelia hieronymi Mez</i>	Καρποί	Ασπαρτική Κυστεϊνική	<i>Hieronymain</i>	3	40ICAU/mL
<i>Solanum dubium Fresen</i>	Σπόροι	Σερινική	<i>Dubiumin</i>	1	880CAU/mL
<i>Cucumis melo</i>	Καρποί	Σερινική	<i>Cucumisin</i>	1	25CAU/MI
<i>Lactuca sativa</i>	Φύλλα	Σερινική	<i>Lettucin</i>	1	20 UP
<i>Ficus religiosa</i>	Φυτό	Σερινική	<i>Religosin</i>	3	803CAU/MI
<i>Streblus asper</i>	Μίσχος	Σερινική	<i>Streblin</i>	1	2306CAU
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Καρποί	Ασπαρτική Σερινική	-	2	6,88CAU/mL
<i>Citrus aurantium</i>	Άνθη	-	Ενζυμικό εκχύλισμα	-	0,18CAU/mL 40°C

1.2 Βιολογικές Ενώσεις Πηγών Φυτικής Πυτιάς

Παρακάτω παρουσιάζονται οι πρωτεάσες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων και αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Οι πρωτεάσες είναι απαραίτητες για τα φυτά σε όλες τις φάσεις του κύκλου ζωής τους. Λαμβάνουν μέρος κατά τη βλάστηση των σπόρων στην κινητοποίηση των πρωτεϊνών αποθήκευσης μέχρι την έναρξη των διαδικασιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο και τη γήρανση.

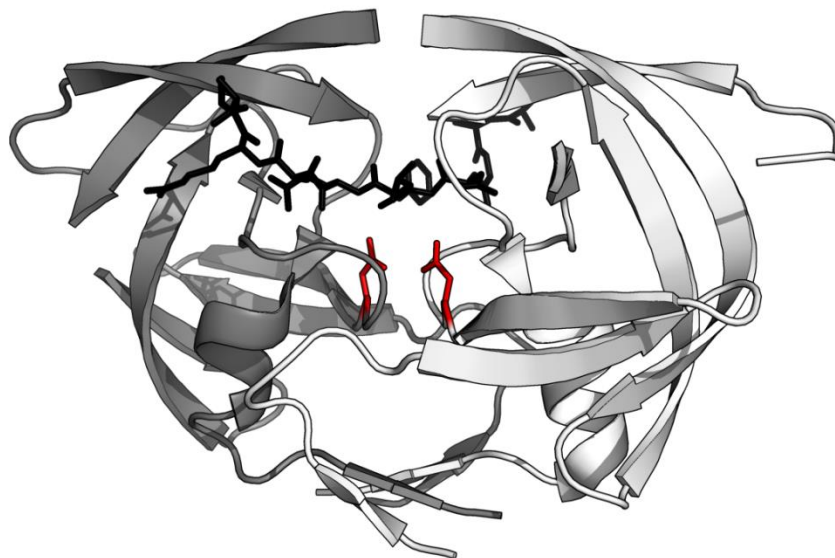
Οι πρωτεάσες χωρίζονται σε ομάδες σύμφωνα με τον καταλυτικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της υδρολυτικής διαδικασίας. Η ασπαρτική, η σερίνη, η κυστεϊνή και οι μεταλλοπρωτεάσες είναι οι κυριότεροι τύποι πρωτεασών, αλλά ως πηκτικά μέσα για την πήξη του γάλακτος έχουν αναφερθεί μόνο από εφαρμογές των τριών πρώτων τύπων πρωτεασών (Duarte et al., 2008).

Οι πρωτεάσες σερίνης και κυστεϊνης διαφέρουν από τις ασπαρτικές και τις μεταλλοπρωτεάσες στο γεγονός ότι το πυρηνόφιλο της καταλυτικής θέσης είναι μέρος ενός αμινοξέος, ενώ στις άλλες δύο ομάδες (ασπαρτική και τις μεταλλοπρωτεάσες) είναι ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού.

1.2.1 Ασπαρτικές πρωτεάσες

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες διαθέτουν δύο ασπαρτικά υπολείμματα στην καταλυτική τους θέση. Είναι πιο δραστικές σε όξινο περιβάλλον και είναι εκλεκτικές για τη διάσπαση πεπτιδικών δεσμών μεταξύ υδρόφοβων υπολειμμάτων αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για την καταλυτική δραστηριότητα.

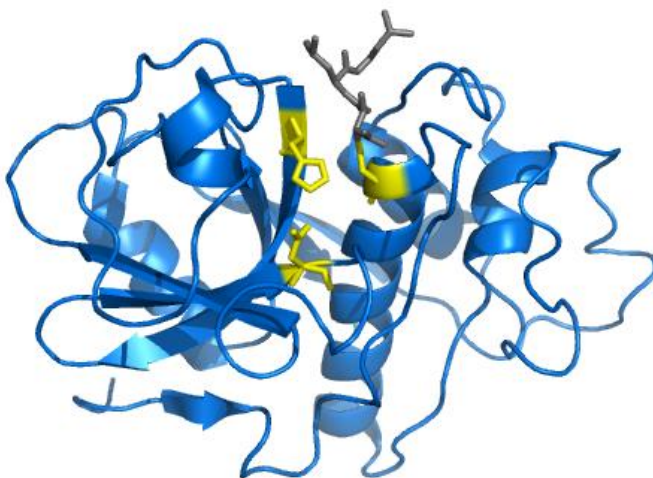
Ασπαρτικές πρωτεάσες με δράση πήξης του γάλακτος έχουν αναφερθεί στην αγκινάρα (*Cynara scolymus* L.), στο γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum* L.), στο *Onopordum turcicum* και στο *Centaurea calcitrapa*. Τα άνθη της αγριοαγκινάρας (*Cynara cardunculus*) εφαρμόζονται στην περιοχή της Μεσογείου στον τομέα της τυροκομίας (Barros et al. 2003). Παράγουν τις ασπαρτικές πρωτεάσες καρδοσίνες και κινάρες που συσσωρεύονται σε ώριμα άνθη της αγριοαγκινάρας (πέταλα και ύπερα), αλλά δεν εντοπίζονται σε φύλλα ή στους σπόρους του φυτού. Η καρδοσίνη Α είναι μια ασπαρτική πρωτεάση από ύπερους του φυτού *C. cardunculus* που βρίσκεται σε αφθονία. Επίσης, οι Heimgartner et al., (1990) απομόνωσαν και χαρακτήρισαν τρεις κινάρες από αποξηραμένα άνθη του *C. cardunculus* με πηκτική δραστηριότητα στο γάλα. Οι τρεις πρωτεάσες αποτελούν γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν γλυκάνες. Αυτές οι ασπαρτικές πρωτεάσες έχει αποδειχθεί ότι έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τη χυμοσίνη και την πεψίνη κατά την παραγωγή του τυριού.



Εικόνα 2: Τυπική ασπαρτική πρωτεάση.

1.2.2 Πρωτεάσες κυστεΐνης

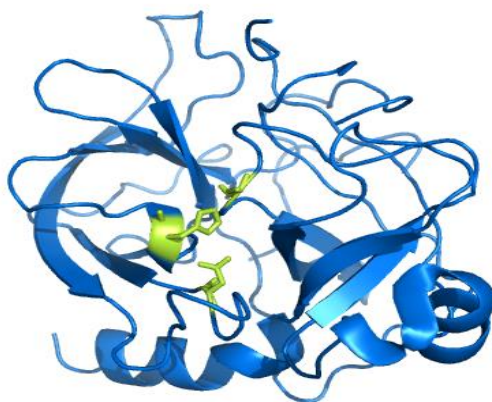
Οι πρωτεάσες κυστεΐνης (CPs), είναι γνωστές ως πρωτεάσες θειόλης και εμπλέκουν μια ομάδα κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης βρίσκουν αρκετές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, στη βιοτεχνολογία και στη φαρμακευτική λόγω της δραστηρικής τους ικανότητας σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και τιμών pH. Τα φυτά αυτά αποτελούν μια ελκυστική εναλλακτική λύση για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των CPs καθώς εντοπίζονται σε διαφορετικούς φυτικούς ιστούς σε μεγάλες ποσότητες. Η φικίνη που απομονώνεται από διαφορετικά είδη *Ficus* sp. έχει ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες. Μια φικίνη που απομονώθηκε από τον *Ficus racemosa*, έδειξε ικανότητα πέψης της καζεΐνης, υποδηλώνοντας την ιδιότητα πήξης του γάλακτος. Εκχυλίσματα πρωτεϊνών από σπόρους ηλίανθου και του φυτού *Albizia* παρασκευάστηκαν για να προσδιοριστεί η δράση αυτών των φυτικών εκχυλισμάτων στην πήξη του γάλακτος από βοοειδή. Η ακτινιδίνη έχει απομονωθεί από ώριμα ακτινίδια (*Actinidia chinensis*) (Katsaros et al., 2010). Η πρωτεάση τζίντζερ έχει απομονωθεί από ριζώματα τζίντζερ (*Zingiber officinale*) και έχει μοριακή μάζα 36 kDa (Huang et al., 2011).



Εικόνα 3: Τυπική κυστεϊνική πρωτεάση.

1.2.3 Πρωτεάσες σερίνης

Οι πρωτεάσες σερίνης έχουν ένα υπόλειμμα σερίνης στην ενεργό τους θέση. Είναι ευρέως διαδεδομένες σε διάφορα φυτικά είδη όπως δέντρα και καλλιέργειες μέχρι και όσπρια και βότανα. Εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών σε ιδιαίτερη αφθονία. Οι πρωτεάσες σερίνης από κολοκύθια, δημητριακά και διάφορα δέντρα ομαδοποιούνται συνήθως μαζί. Φυτικές πρωτεάσες σερίνης έχουν εκχυλιστεί από πηγές κόμμεων, σπόρων, ανθών, μίσχων, φύλλων και ριζών. Η *Neriifolin*, μια πρωτεάση σερίνης που μοιάζει με τη χυμοθρυψίνη, έχει απομονωθεί από το κόμμι του *Euphorbia neriifolia* (ένα είδος κάκτου). Ένα άλλο ένζυμο η *Neriifolin S*, είναι μια διμερής πρωτεάση σερίνης μοριακής μάζας 94 kDa, με δραστικότητα στην πήξη του γάλακτος που έχει απομονωθεί από το κόμμι του *E. neriifolia*. Οι Kumari et al. (2012) και Sharma et al. (2012) απομόνωσαν από το κόμμι του *Ficus religiosa* (είδος συκιάς) τα ακόλουθα: *Religiosin A* (43,3 kDa), *Religiosin B* (63 kDa) και *Religiosin C* (80 kDa). Το *Streblin* είναι ένα θερμοσταθερό ένζυμο με μοριακή μάζα 63 kDa και έχει απομονωθεί από το *Streblus asper*. Το *Dubiumin* έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τους σπόρους του *Solanum dubium* και έχει μοριακή μάζα 66 kDa (Shah et al., 2014). Η *Cucumisin* ανακτήθηκε από το *Cucumis melo* (πεπονιά) και η *Lettucin* από το *Lactuca sativa* (μαρούλι) και χρησιμοποιήθηκαν ως πηκτικά μέσα του γάλακτος.



Εικόνα 4: Τυπική πρωτεάση σερίνης.

1.2.4 Ανάλυση μελέτης - βιολογικές ενώσεις της σφαιρικής αγκινάρας

Παρακάτω παρουσιάζεται το γένος *Cynara* που περιλαμβάνει τη σφαιροειδή αγκινάρα (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L) και την αγκινάρα (*Cynara cardunculus* var. *altilis* DC). Τα αγροτοβιομηχανικά και εδώδιμα παραπροϊόντα της αγκινάρας είναι πλούσια σε ινουλίνη. Οι ενώσεις που εκχυλίζονται και χαρακτηρίζονται από τις αγκινάρες βρίσκουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην ιατρική, στην τυροκομία ως υποκατάστατο της πυτιάς για την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων υψηλής ποιότητας, ως έλαιο κατάλληλο για κατανάλωση και ως βιοκαύσιμο. Οι αγκινάρες χρησιμοποιούνται και ως τροφή των μηρυκαστικών ζώων εξαιτίας της υψηλής πεπτικότητάς τους σε οργανικές ουσίες. Η σφαιρική αγκινάρα χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και υψηλή συγκέντρωση μετάλλων (κάλιο, νάτριο, φώσφορος), βιταμίνης C, φυτικών ινών, πολυφαινόλων, φλαβονών, ινουλίνης και υδροξυκινναμικών – παραγώγων του καφεοϋλκινικού οξέος. Οι σπόροι της αγκινάρας περιέχουν 21,6% πρωτεΐνη, 17,1% διαιτητικές ίνες, 24,05% έλαιο και 3,8% τέφρα. Τα άνθη της αγκινάρας έχουν υψηλή συγκέντρωση βιταμίνης C (10 mg/100 g FW) και μετάλλων (K 360 mg/100 g FW; Ca 50 mg/100 g FW). Τα φύλλα και τα άνθη της αγκινάρας είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, ινουλίνη, διαιτητικές ίνες και μέταλλα. Το εκχύλισμα των φύλλων της αγκινάρας έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντιαπτική, χολική, ηπατοπροστατευτική και ουροποιητική δράση, και έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και επιβραδύνει την οξείδωση της LDL. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές ανέφεραν ότι αυτά τα εκχυλίσματα έχουν ευρεία ανασταλτική δράση κατά των μικροοργανισμών και θα μπορούσαν να έχουν μια πολλά υποσχόμενη χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Η ακριβής συγκέντρωση σε πολυφαινόλες ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόζεται. Οι κύριες πολυφαινολικές ενώσεις είναι τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος όπως το 5-O-καφεοϋλοκινικό οξύ (χλωρογενικό οξύ) σε συγκέντρωση 39%, ακολουθούμενο από το 1,5-O-δικαφεοϋλοκινικό οξύ (21%) και το 3,4-O-δικαφεοϋλκινικό οξύ (11%) (Merck, 2006). Επιπλέον, τα μεθανολικά εκχυλίσματα αγκινάρας από τον πολτό των φύλλων έχουν χαμηλή συγκέντρωση 1,3-O-δικαφεοϋλκινικού οξέος (*cynarine*) (περίπου 1,5%). Οι φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση έναντι των δραστικών ειδών

οξυγόνου (ROS) και των ελεύθερων ριζών και λειτουργούν προστατευτικά έναντι οξειδωτικών βλαβών των βιολογικών μορίων, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Επιπλέον, άλλα φαινολικά όπως οι φλαβόνες 5,7-διυδροξυ-2-(4-υδροξυφαινυλ)-4H-1-βενζοπυραν-4-όνη (απιγενίνη) και 2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)- 5,7-διυδροξυ-4-χρωμενόνη (λουτεολίνη), καθώς και οι ανθοκυανιδίνες όπως 2-(3,4-διυδροξυφαινυλ) χρωμενυλίου-3,5,7-τριόλη (κυανιδίνη), 2-(4-υδροξυ-3 μεθοξυφαινυλ) χρωμενυλίου-3,5,7-τριόλη (παιονιδίνη) και 2-(3,4,5-τριυδροξυφαινυλ)χρωμενυλίου-3,5,7-τριόλη (δελφινιδίνη) έχουν απομονωθεί μόνο από τους καρπούς της αγκινάρας. Οι παραπάνω φλαβόνες απιγενίνη και λουτεολίνη έχουν εντοπιστεί στα φύλλα και τις κεφαλές του φυτού με τη μορφή γλυκοσιδών και ρουτινοσιδών, ενώ οι χρωστικές της ανθοκυανίνης υπάρχουν μόνο σε κεφαλές με τη μορφή γλυκοσιδών (Lattanzio et al., 2009).

Αυτές οι χρωστικές ενώσεις καθορίζουν το χρώμα της αγκινάρας που ποικίλλει από πράσινο έως ιώδες. Οι ανθοκυανίνες, εκτός από τις ιδιότητες που προάγουν την υγεία, έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των φυτών τροφίμων και ως εκ τούτου στην αποδοχή των τροφίμων από τους καταναλωτές. Δεδομένου ότι η απιγενίνη, καθώς και άλλες φλαβόνες, δεν εντοπίζονται σε πολλά φυτά, η αγκινάρα αντιπροσωπεύει μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή αυτής της ένωσης. Επιπλέον, η ινουλίνη μπορεί να απομονωθεί από τα εξωτερικά βράκτια, οι σαρκώδεις και ανεπτυγμένες ρίζες αγκινάρας. Η σφαιρική αγκινάρα διαθέτει μόρια ινουλίνης με μήκος αλυσίδας έως 200. Η ινουλίνη στις ρίζες ποικίλλει από 30,6% έως 36,7% σε βάση ξηρής ουσίας ή 50 - 70g/kg φρέσκου βάρους αγκινάρας. Η συγκέντρωση της ινουλίνης στην αγκινάρα επηρεάζεται από τις θερμοκρασίες αποθήκευσης και τη μέθοδο συντήρησης της αγκινάρας. Είναι ένας εξαιρετικά υδατοδιαλυτός υδατάνθρακας, που δεν απορροφάτε στο λεπτό έντερο λόγω της έλλειψης των κατάλληλων ενζύμων που απαιτούνται για την υδρόλυση των φρουκτανών, αλλά ζυμώνεται από ωφέλιμα βακτήρια όπως τα *Bifidobacteria*, επομένως η ινουλίνη λειτουργεί ως πρεβιοτικό, που μπορεί να καταναλωθεί ως συμπλήρωμα διατροφής σε λειτουργικά τρόφιμα. Η ινουλίνη έχει ευεργετικές επιδράσεις στην απορρόφηση των μετάλλων, στη σύσταση των λιπιδίων του αίματος και στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Βρίσκει εφαρμογές στην παρασκευή λειτουργικών τροφίμων με μειωμένα λιπαρά. Επιπλέον, μπορεί να καταναλώνεται από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (Pandino et al., 2011). Οι ινουλίνες μακράς αλυσίδας έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μικροκρυστάλλους

ινουλίνης που έχουν λεία κρεμώδη υφή και παρέχουν στοματική αίσθηση σαν λίπος. Η ινουλίνη μακράς αλυσίδας εφαρμόζεται σε κατεψυγμένα τρόφιμα καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου αλλά και ως υποκατάστατο λιπαρού σε προϊόντα επάλειψης, γαλακτοκομικά προϊόντα και κατεψυγμένα επιδόρπια.

Ως εκ τούτου, η αγκινάρα ως πηγή ινουλίνης μπορεί να προσφέρει νέες ευκαιρίες στη βιομηχανία τροφίμων για νέα και υγιεινά μελλοντικά προϊόντα. Οι τρεις πρωτεΐνες (κινάρες A, B, C) που έχουν απομονωθεί από άνθη αγκινάρας έχουν αποδείξει την πηκτική τους ικανότητα στην παραγωγή τυροκομικών προϊόντων και ανοίγουν το δρόμο για περισσότερες εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων και των φαρμακευτικών προϊόντων (Christaki et al., 2012).

1.3 Ο ενζυμικός ρόλος στην πήξη του γάλακτος και στην τυροκομία

Μετά την προσθήκη της φυτικής πυτιάς, η ενζυμική πήξη του γάλακτος πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που ακολουθείται και κατά την πήξη του γάλακτος με ζωική πυτιά από στομάχι μοσχαριού (ή χυμοσίνη μόσχου). Η πρώτη φάση της ενζυμικής πήξης είναι εξ ολοκλήρου πρωτεολυτική, κατά την οποία το C-τερματικό τμήμα της κ-καζεΐνης υδρολύεται από το πηκτικό μέσο στο δεσμό Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Η παρα-κ-καζεΐνη, που σχετίζεται με τις α- και β- καζεΐνες, παραμένει ενσωματωμένη στο υδρόφοβο μικκύλιο. Το υδρόφιλο πεπτίδιο που απελευθερώνεται από το μικκύλιο στον ορό γάλακτος, ονομάζεται μακροπεπτίδιο καζεΐνης (CMP). Η απόρριψη του 85-90% της κ-καζεΐνης προκαλεί αποσταθεροποίηση των μικκυλίων που έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της δευτερογενούς φάσης πήξης. Αυτό αντιστοιχεί στη συσσώρευση μικκυλίων παρακαζεΐνης σε ένα τρισδιάστατο δίκτυο γέλης. Μετά τη μείωση της ηλεκτροστατικής απώθησης (μείωση 50% του δυναμικού Z), τα αποσταθεροποιημένα μικκύλια μπορούν να ομαδοποιηθούν προοδευτικά μέσω της δημιουργίας υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών δεσμών. Πολλές μελέτες έχουν μελετήσει την ιδιαιτερότητα των ασπαρτικών πρωτεασών προς τον δεσμό Phe-Met. Μελέτες των (P. F. Fox et al., 2017) επιβεβαίωσαν ότι τα δι-, τρι- ή τετρα-πεπτίδια που περιέχουν δεσμούς Phe-Met δεν υδρολύονται, ενώ το πενταπεπτίδιο (Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OMe) υφίσταται ενζυμική διάσπαση με ευκολία. Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος εξαρτώνται

από το μήκος του πεπτιδίου και τα υπολείμματα που βρίσκονται γύρω από τον δεσμό Phe-Met. Τα υπολείμματα γύρω από τη θέση διάσπασης επιτρέπουν τη διατήρηση του υποστρώματος στο σωστό προσανατολισμό του εντός της ενεργού θέσης του ενζύμου. Ορισμένες φυτικές πρωτεάσες διασπούν λίγες θέσεις στις αs1- και β-καζεΐνες, κάτι που μπορεί να συμβεί στη διατήρηση της μικκυλιακής σταθερότητας. Αυτές οι περιοχές αs1- και β-καζεϊνών είναι μερικές φορές κοντά στην επιφάνεια των μικκυλίων και συμβάλλουν στην ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ των μικκυλίων καζεΐνης. Το αποτέλεσμα της αφαίρεσης αυτών των τμημάτων βοηθά σημαντικά τη διαδικασία δημιουργίας πήγματος. Αρχικά βελτιώνεται η αρχική αποσταθεροποίηση των μικκυλίων και προωθείται η πρόσβαση του πηκτικού μέσου στην κ-καζεΐνη. Στη συνέχεια αφαιρούνται αυτά τα τμήματα και αυξάνεται η ευκαμψία και/ή η ευαισθησία των καζεϊνών να μπορούν να αναδιαταχθούν προς το σχηματισμό πήγματος. Ένα παράδειγμα εξειδίκευσης δράσης των AP από το *Cynara cardunculus* (καρδοσίνες A και B) σε πεπτιδικούς δεσμούς αs1-, β- και κ-καζεϊνών περιγράφεται λεπτομερώς στην Εικόνα 5. Εκτός από την κύρια λειτουργία ως πηκτικά μέσα του γάλακτος, οι φυτικές πρωτεάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των τυροκομικών προϊόντων. Η υδρόλυση των καζεϊνών στο τυρί από υπολειμματικό πηκτικό μέσο παράγει τα απαραίτητα υποστρώματα για την ανάπτυξη κάποιας βακτηριακής μικροχλωρίδας, η αποικοδόμηση των οποίων επιτρέπει την ανάπτυξη της γεύσης κατά την ωρίμανση (Ben Amira et al., 2017). Ωστόσο, η ποιότητα των τυροκομικών προϊόντων εξαρτάται από τον τύπο του πηκτικού μέσου που παρέχεται από τη φυτική πηγή, τη συγκέντρωσή του στο τυροκομικό προϊόν του και τις ενζυμικές του δράσεις. Το κύριο μειονέκτημα των περισσότερων φυτικών πυτιών είναι ελαττώματα που σχετίζονται με τη γεύση όπως έντονη πικράδα και την υφή των τυροκομικών προϊόντων κατά την αποθήκευση ή/και την ωρίμανσή τους. Αυτά τα ελαττώματα οφείλονται κυρίως σε υπερβολικές πρωτεολυτικές δράσεις και στη χαμηλή αναλογία της δραστηριότητας πήξης γάλακτος προς την πρωτεολυτική δράση (MCA/PA). Για το λόγο αυτό, η αξιολόγηση των ενζυμικών δράσεων των φυτικών πυτιών και η σύγκρισή τους με αυτές της εμπορικής πυτιάς (χυμοσίνη) είναι σημαντική για την επιλογή ενός φυτού ως κατάλληλη εναλλακτική λύση για την εφαρμογή του ως πηκτικό μέσο.

Endo-peptidase	Bovine caseins		
	α_{s1} -Casein	β -Casein	κ -Casein
Cardosin A	Phe23-Phe24 Phe153-Tyr154 Trp164-Tyr165 Tyr165-Tyr166	Leu127-Thr128 Leu165-Ser166 Leu192-Tyr193	Phe105-Met106
Cardosin B	Phe23-Phe24 Phe150-Arg151 Phe153-Tyr154 Trp164-Tyr165 Caprine caseins	Leu165-Ser166 Leu192-Tyr193	Phe105-Met106
Cardosin A and cardosin B	α_{s1} -Casein Phe153-Tyr154	β -Casein Leu127-Thr128 Leu190-Tyr191	κ -Casein Lys116-Thr117
Cardosin B	Ovine caseins α_{s1} -Casein Leu156-Asp157 Trp164-Tyr165	β -Casein Leu127-Thr128 Leu165-Ser166 Leu90-Tyr191	κ -Casein Phe105-Met106

Εικόνα 5: Ειδικότητα δράσης της καρδοσίνης A και B από το *Cynara cardunculus* σε απομονωμένες καζεΐνες βοοειδών και αιγοπροβάτων (α_{s1} , β και κ) (Cavalli et al., 2013).

1.4 Αξιολόγηση ενζυμικής δραστηριότητας φυτικής πυτιάς (MCA)

Το MCA (δραστικότητα της πήξης του γάλακτος) είναι η πιο σημαντική ιδιότητα των πρωτεασών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των τυροκομικών προϊόντων. Είναι η ικανότητα του ενζύμου να υδρολύει ειδικά την κ -καζεΐνη από το γάλα. Το MCA μπορεί να μετρηθεί με διαφορετικές μεθόδους, συγκεκριμένα με Berridge 1945, Soxhlet και IDF Standard 157 (ben Amira et al., 2017), χρησιμοποιώντας διαφορετικές μονάδες όπως μονάδα πυτιάς (RU-Rennet Unit) ή MCU-Milk Clotting Unit)), μονάδα Soxhlet και διεθνή μονάδα πήξης γάλακτος (IMCU- International Milk Clotting Unit), αντίστοιχα. Όσον αφορά την παραγωγή των τυροκομικών προϊόντων με χρήση φυτικής πυτιάς, ο αρχικός στόχος ήταν πάντα η απομόνωση πηκτικών μέσων με μέγιστη ειδική πηκτική δράση (AC). Αυτή η δραστικότητα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η φυτική πηγή, το μέρος του φυτού, καθώς και ο τύπος και η συγκέντρωση της πρωτεάσης. Έχουν πραγματοποιηθεί διαφορετικές μελέτες για τη σύγκριση της δράσης των εκχυλισμάτων διαφορετικών μερών στο ίδιο φυτό στην πήξη τους γάλακτος. Αποτελέσματα των (Anusha et al., 2014) αποκάλυψαν ότι η υψηλότερη δραστικότητα στην πήξη του γάλακτος παρατηρήθηκε με τη χρήση εκχυλίσματος από κόμμι ακολουθούμενο από

εκχυλίσματα φύλλων και ανθέων από το φυτό *Calotropis gigantea*. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα από τα διάφορα μέρη του φυτού *C. cardunculus*, των οποίων η πηκτική δραστηριότητα είναι έντονη όταν αυτή προέρχεται από εκχυλίσματα ανθών λόγω της αφθονίας ενζύμων πήξης (καρδοσίνες) σε αυτό το τμήμα του φυτού. Στην πραγματικότητα, τα υδατικά εκχυλίσματα από άνθη έχουν εφαρμοστεί ευρέως ως υποκατάστατα της ζωικής πυτιάς (AR) σε ορισμένα ιταλικά, ισπανικά και πορτογαλικά τυροκομικά προϊόντα. Οι δραστηριότητες πήξης του γάλακτος και οι πρωτεολυτικές δραστηριότητες, καθώς και οι κινητικές παράμετροι των ενζύμων του *C. cardunculus*, αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Almeida & Simões, 2018b; Ben Amira et al., 2017), (Silva, 2003).

Στο πλαίσιο της έρευνας για ένα κατάλληλο υποκατάστατο της χυμοσίνης μόσχου, υπάρχουν κάποιες συγκριτικές μελέτες των πηκτικών δράσεων και μερικές αναλογίες MCA/PA φυτικών εκχυλισμάτων (ή απομονωμένων πρωτεασών). Για παράδειγμα, οι δραστηριότητες ακατέργαστων και συμπυκνωμένων εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από σπόρους *Helianthus annuus* (ηλίανθος) και *Albizia lebbbeck* (είδος αλβιζίας) έχουν αξιολογηθεί και παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, οι οποίες αποδόθηκαν σε διαφορετικούς τύπους πρωτεασών που βρέθηκαν σε εκχυλίσματα των διαφορετικών φυτικών ειδών, αντίστοιχα. Η αξιολόγηση της αναλογίας MCA/PA έδειξε ότι η χυμοσίνη είχε μια τιμή 67, 95 και 500 φορές υψηλότερη από αυτές που ελήφθησαν, αντίστοιχα, για τα τρία εκχυλίσματα, όταν χρησιμοποιήθηκε καζεΐνη ως υπόστρωμα. Για να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα της μειωμένης αναλογίας MCA/PA που εντοπίζεται στα φυτικά εκχυλίσματα, οι (Ben Amira et al., 2017) μετέβαλλαν την τιμή του pH της πυτιάς από *C. cardunculus* από 3 σε 6 και αξιολόγησαν τις ενζυμικές δράσεις των ακατέργαστων εκχυλισμάτων. Έδειξαν ότι η πτώση του pH οδήγησε σε αύξηση της αναλογίας MCA/PA η οποία έφτασε τη μέγιστη τιμή 28,71 για το εκχύλισμα σε pH 3, το οποίο υπερέβαινε την αντίστοιχη τιμή που επιτυγχάνεται με τη χυμοσίνη. Η χαμηλότερη αναλογία που αποδόθηκε στο εκχύλισμα σε pH 6 σχετίστηκε κυρίως με το υψηλό PA του καθώς και με το χαμηλό MCA του. Η επίδραση της αύξησης του ρυθμιστικού pH στη δραστηριότητα της πυτιάς θα μπορούσε να αποδοθεί σε υψηλές τιμές pH και στην εκχύλιση και άλλων ενώσεων, όπως μη πρωτεολυτικών ενζύμων. Αυτές οι ενώσεις προάγουν την ανάπτυξη εξωτερικών αντιδράσεων και παρεμβαίνουν στις ενζυμικές δραστηριότητες, προκαλώντας μειωμένη ικανότητα MCA. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση σε πολυφαινολικές ενώσεις

οδηγεί σε ταχεία οξείδωση με το σχηματισμό χρωστικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να προσκολληθούν σε φυσικά ένζυμα, προκαλώντας την αδρανοποίησή τους. Ακόμη, σε όξινο περιβάλλον, η συνολική εκχυλισμένη ενζυμική δραστηριότητα αποδίδεται στην καρδοσίνη Α. Αυτό το ένζυμο αποδείχθηκε ότι έχει παρόμοια δράση με τη χυμοσίνη, όσον αφορά τις κινητικές παραμέτρους και την εκλεκτικότητα καθώς διασπά τον πεπτιδικό δεσμό (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) της κ-καζεΐνης. Έτσι, η ειδική δράση της πυτιάς από *C. cardunculus* ενισχύεται σε όξινο περιβάλλον. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με τα δεδομένα για το εκχύλισμα από το φυτό *Withania coagulans*, για το οποίο το υψηλότερο MCA καταγράφεται σε χαμηλό pH εκχύλισης. Επιπλέον, η ενζυμική σύσταση και η περιοχή συλλογής των ανθών του *C. cardunculus* παίζουν σημαντικό ρόλο στην προώθηση της δραστηριότητας του πηκτικού εκχυλίσματος. Στην πραγματικότητα, μόνο τέσσερις καρδοσίνες εντοπίστηκαν στα Τυνησιακά άνθη της αγριαγκινάρας (*cardoon*), μεταξύ των οποίων η καρδοσίνη Α όπου μπορεί να αντικαταστήσει επιτυχώς τη χυμοσίνη μόσχου. Όπως συμπέραναν οι (ben Amira et al., 2017), η απουσία των άλλων καρδοσινών (B, C, D και F) είναι πλεονέκτημα, καθώς μειώνει την υπερβολική μη ειδική ΡΑ κατά την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων. Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι εντοπίζονται σχετικά υψηλά επίπεδα MCA σε πυτιά από φυτικά είδη σε σύγκριση με τη χυμοσίνη. Οι (Almeida & Simões, 2018a) ανέφεραν επίσης ότι το εκχύλισμα από το φυτό *Solanum dubium* είναι κατάλληλο υποκατάστατο πυτιάς μόσχου, καθώς το MCA είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό της πυτιάς μόσχου (880 και 249,6 CAU/mL στους 37°C, αντίστοιχα). Οι Kumari et al. (2012) συνέκριναν επίσης τις τιμές MCA της *Religiosin A* και της *Religiosin B* από το φυτό *Ficus religiosa* με την τιμή MCA που προκύπτει από πυτιά μόσχου και βρήκαν, τιμές 387, 803 και 498,9 CAU στους 37 °C αντίστοιχα. Αναφέρθηκε επίσης ότι η αναλογία MCA/ΡΑ σε πυτιά από κόμμι quíxaba ήταν υψηλή για την εμπορική παρασκευή τυροκομικών προϊόντων και ξεπερνούσε αυτή της χυμοσίνης (ben Amira et al., 2017). Επιπλέον, το MCA του εκχυλίσματος από τους καρπούς του *W. coagulans* βρέθηκε αρκετά υψηλότερο από το ΡΑ και μπορεί να δικαιολογηθεί η χρήση του ως κατάλληλο υποκατάστατο της πυτιάς μόσχου. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη για την πυτιά φυτών, τα κλάσματα κόμμεων από *Calotropis procera* και *Cryptostegia grandiflora* βρέθηκαν να είναι καλές πηγές πρωτεασών που πήζουν το γάλα. Και τα δύο κλάσματα παρουσίασαν παρόμοια προφίλ πεπτιδίων κ-καζεΐνης, με αυτά που ελήφθησαν από εμπορική χυμοσίνη. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και με την

ανάλυση των τυροκομικών προϊόντων που ελήφθησαν, η οποία έδειξε παρόμοιες αποδόσεις και περιεκτικότητα σε διαλυτές πρωτεΐνες με εκείνες των προϊόντων με χρήση χυμοσίνης. Για να εκτιμηθεί ολοκληρωτικά η ικανότητα ενός φυτού ως πηκτικό μέσο πρέπει να συμπεριληφθούν ρεολογικές μελέτες και οργανοληπτικές αξιολογήσεις (υφή, γεύση, χρώμα) των τυριών. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για την καλύτερη κατανόηση της επίδραση των φυτών ως πηκτικά μέσα και στη συνέχεια να ελεγχθεί η χρήση τους για βιομηχανική εφαρμογή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΗΚΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΣΤΙΣ ΡΕΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ, ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

2.1 Επίδραση φυτικών πηκτικών μέσων στις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων

Η παρακολούθηση της εξέλιξης των ρεολογικών ιδιοτήτων είναι ένα από τα μέσα για τη μέτρηση του σχηματισμού γέλης/πηκτής κατά την πήξη. Αυτή η μελέτη (ben Amira et al., 2017) αξιολογεί την επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης της καζεΐνης και τις αλλαγές στην εξειδίκευση των ενζύμων στις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών γάλακτος.

Σε αυτό το πλαίσιο, πολλές παράμετροι αξιολογούνται χρησιμοποιώντας τη μελέτη της παραμόρφωσης (γ_0) και τις μετρήσεις της απόκρισης στην ανάπτυξη της γέλης. Αυτές οι παράμετροι περιλαμβάνουν το μέτρο ελαστικότητας ή αποθήκευσης (G'), το οποίο αποτελεί ένα μέτρο της ενέργειας που αποθηκεύεται ανά κύκλο ταλάντωσης και δείχνει τη συμπεριφορά του δείγματος ως ελαστικού στερεού, το συντελεστή ιξώδους.

Η απώλεια (G'') αποτελεί ένα μέτρο της ενέργειας που διαχέεται ανά κύκλο και υποδεικνύει τη συμπεριφορά του δείγματος ως παχύρρευστο υγρό, τη γωνία φάσης (δ) που είναι ένα μέτρο του τύπου ζεύξης στον οποίο στηρίζεται το δίκτυο και ο συντελεστής απώλειας (εφαπτομένη δ), που αντιστοιχεί στην εφαπτομένη της γωνίας φάσης της απόκρισης στην παραμόρφωση. Αυτό συνδέεται με τη χαλάρωση των συνδέσμων μέσα στο πήγμα κατά την παραμόρφωση.

Οι Esteves et al. (2003) μελέτησαν ενδελχώς τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων του γάλακτος που πήζουν με χρήση των φυτικών εκχυλισμάτων (*C. cardunculus* L. και *C. humilis* L.) αλλά και χυμοσίνη. Οι τιμές G' που καταγράφηκαν στην αρχή της ζελατινοποίησης από τη χρήση φυτών ως πηκτικά μέσα ήταν υψηλότερες από αυτές της χυμοσίνης. Σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτό εξηγήθηκε από τις διαφορές μεταξύ των πρωτεολυτικών δράσεων των πηκτικών μέσων στην καζεΐνη, οι οποίες μπορεί να μεταβάλλουν αισθητά το βαθμό πρωτεόλυσης στην κ-καζεΐνη. Είναι επίσης πιθανό ότι κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του πήγματος, η υδρόλυση ορισμένων πρόσθετων δεσμών σε μόρια καζεΐνης μπορεί να συνοδεύεται από σημαντικές αναδιατάξεις ολόκληρης της δομής του πήγματος. Τα τελευταία οδηγούν στην αύξηση της αντοχής και του αριθμού των δεσμών μεταξύ γειτονικών μορίων, με αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση των αρχικών τιμών G' . Σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (6 ώρες), τα φυτικά πηκτικά μέσα του *C. cardunculus* και του *C. humilis* παρήγαγαν τιμές G' 74,6 και 72,7 Pa, αντίστοιχα, οι οποίες ήταν χαμηλότερες από την τιμή που ελήφθη με τη χρήση χυμοσίνης ως πηκτικού (96 Pa). Αυτό το αποτέλεσμα σχετίζεται με μη ειδικές πρωτεολυτικές δραστηριότητες που δημιουργούνται από τα φυτικά ένζυμα και ως αποτέλεσμα θα οδηγούσαν σε κάποια πρόσθετη υδρόλυση στο δίκτυο της γέλης.

Όσον αφορά τον παράγοντα απώλειας (εφαπτομένη δ), παρατηρείται σημαντική και γρήγορη μείωση, όταν ξεκινά η δευτερογενής φάση πήξης, ιδιαίτερα κατά τη στιγμή της μετάβασης από το γάλα στο σχηματισμό του πήγματος. Στη συνέχεια, κατά την αύξηση της αντοχής της γέλης, ο παράγοντας αυτός διατηρείται σταθερός και ανεξάρτητος από ορισμένες φυσικοχημικές παραμέτρους όπως το pH του γάλακτος. Σύμφωνα με μια ερευνητική μελέτη που αναπτύχθηκε από τους Esteves et al. (2002), οι μετρήσεις του παράγοντα απώλειας της αντοχής, σε συχνότητες μέχρι 0,002 Hz, έδειξαν υψηλές τιμές αντοχής σε τυρί που παράγεται από οποιοδήποτε πηκτικό μέσο (φυτικά και ζωικά). Αυτές οι υψηλές τιμές θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μια αυξημένη ευαισθησία των δεσμών (πρωτεΐνη-πρωτεΐνη) που όμως χαλαρώνουν με την πάροδο του χρόνου. Αυτό εξηγεί ικανοποιητικά την μεγαλύτερη ικανότητα των πηκτωμάτων που παράγονται από φυτικές πυτιές να υφίστανται συνέργεια και αναδιατάξεις. Επιπλέον, για να αξιολογηθεί η σκληρότητα των πηκτωμάτων που λαμβάνονται από τα φυτικά πηκτικά μέσα σε σύγκριση με το πήγμα από χυμοσίνη, ορισμένοι συγγραφείς συνέκριναν το στρες απόδοσης σε αυτά τα πηκτώματα (van Vliet et al., 1991). Διαπίστωσαν ότι

η χυμοσίνη παρήγαγε πιο στιβαρά και πιο άκαμπτα πηγμένα προϊόντα από αυτά των φυτικών πρωτεασών, καθώς η τιμή αυτής της παραμέτρου ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τυριά που παρήχθησαν από άλλα πηκτικά μέσα.

Στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα των ρεολογικών ιδιοτήτων των πηκτωμάτων που παράγονται από φυτικά φυτών διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων μελετών. Αυτές οι διαφοροποιήσεις οφείλονται στη χρήση πηκτικών μέσων από διαφορετική προέλευση, στην εφαρμογή διαφορετικών τιμών παραμέτρων ανάλυσης για τις ρεολογικές μετρήσεις (όπως η συχνότητα ταλάντωσης και η επιφανειακή τάση) αλλά και σε άλλους παράγοντες που θα μπορούσαν να επέμβουν στη διαδικασία ζελατινοποίησης και με αποτέλεσμα να επηρεάσουν τις ρεολογικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

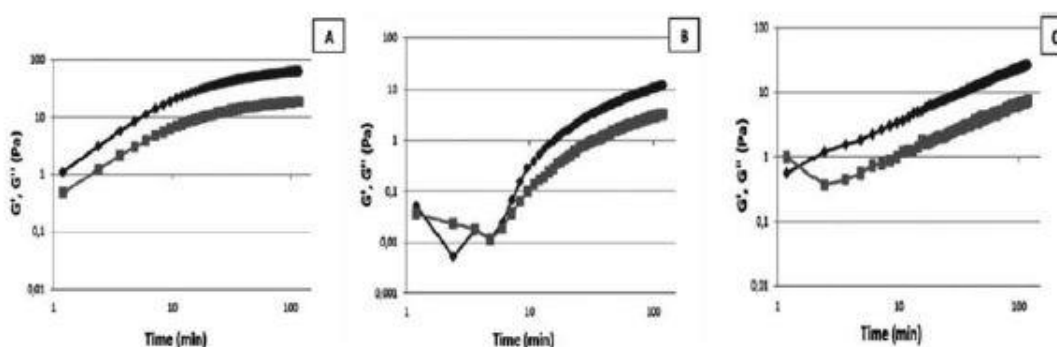
2.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων

Διάφοροι παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του πηκτικού μέσου, το pH του πηκτικού μέσου, το pH και η θερμοκρασία του γάλακτος και η θερμική επεξεργασία ή η υπερδιήθηση του γάλακτος, επηρεάζουν τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων που λαμβάνονται. Ο έλεγχος τους θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τη διαδικασία ζελατινοποίησης από την φυτική των φυτών καθώς και τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

Η χρήση μικρής ποσότητας φυτικής φυτικής στην ζελατινοποίηση γάλακτος με χαμηλό pH, μπορεί να αποτρέψει την αρνητική επίδραση της υπερβολικής πρωτεόλυσης των καζεϊνών πάνω στην υφή και τη γεύση των τυριών. Στην πραγματικότητα, μειώνοντας το pH του γάλακτος, προκαλείται μείωση της ηλεκτροστατικής απώθησης μεταξύ των μικκυλίων της καζεΐνης, λόγω της μείωσης της πυκνότητας φορτίου στην κ-καζεΐνη. Το γεγονός αυτό προάγει τη συσσωμάτωση των σωματιδίων και την ταχύτερη αύξηση των αρχικών τιμών του G' .

Σε σχετική έρευνα έχει επίσης παρατηρηθεί πως μετά την προσθήκη CaCl_2 (σε χαμηλές τιμές pH 6,2 και 6,4), η αύξηση του σύνθετου συντελεστή (G^*) είναι πιο γρήγορη στην περίπτωση των πηκτωμάτων που παράγονται από τις *cardosines* A και B του *C. Cardunculus* (Silva 2003). Αυτό εξηγήθηκε επίσης από την αύξηση της δραστηριότητας των κατιόντων Ca^{2+} που με τη σειρά τους θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ταχύτερες δομικές ανακατατάξεις και σε πιο ευνοϊκή επακόλουθη συσσωμάτωση των μικκυλίων. Αντίθετα, η διακύμανση της

ενζυμικής συμπεριφοράς ως προς το ρυθμό σύσφιξης (dG^*/dt) του προκύπτοντος πήγματος εξαρτάται από την τελική οξύτητα. Στην ίδια μελέτη, ο ρυθμός σύσφιξης μιας γέλης χυμοσίνης ξεπέρασε αυτή ενός πήγματος που παράγεται από τα ένζυμα *C. cardunculus* (*cardosines* A και B), μετά από πήξη του γάλακτος σε pH 6,2 και 6,4. Ωστόσο, σε pH 6,6, οι *cardosines* έδωσαν υψηλότερες τιμές σταθερότητας του τελικού προϊόντος. Επομένως, μια μεταβολή του pH του γάλακτος μετά την προσθήκη $CaCl_2$ θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά την τελική σταθερότητα του γαλακτοκομικού προϊόντος που παρασκευάζεται με φυτικά ένζυμα.



Εικόνα 6: Εξέλιξη του συντελεστή αποθήκευσης (G') και του συντελεστή απώλειας (G'') πηκτωμάτων αποβουτυρωμένου γάλακτος που παράγονται από εκχυλίσματα *C. cardunculus* που παρασκευάζονται, αντίστοιχα, σε pH 3 (A) και pH 6 (B) και από χυμοσίνη (C) ως συνάρτηση του χρόνου (ben Amira et al., 2017).

Με αυτόν τον τρόπο, η συνεκτικότητα του τελικού τυριού θα μπορούσε να υπερβαίνει τις αντίστοιχες ιδιότητες που λαμβάνονται από ένα τυρόπηγμα με χρήση χυμοσίνης.

Η οξύτητα του γάλακτος θα μπορούσε επίσης να επηρεαστεί από το pH της πυτιάς, όπως αναφέρεται από τους ben Amira et al. (2017), οδηγώντας έτσι σε σημαντική απόκλιση όλων των ρεολογικών παραμέτρων [G' , G'' και για σκληρότητα τυροπήγματος (CF)] των πηκτωμάτων που παράγονται από τα ακατέργαστα εκχυλίσματα *C. cardunculus* (CEs) σε διαφορετικά επίπεδα οξύτητας (Εικόνα 6). Μειώνοντας το pH της πυτιάς μειώθηκε και το pH του γάλακτος προκαλώντας παράλληλα μια σημαντική αύξηση των ιξωδοελαστικών παραμέτρων του αποβουτυρωμένου γάλακτος και πιο υψηλές αρχικές τιμές του G' (Εικόνα 6). Τα τελικά CF και G' που καταγράφηκαν στο τέλος της ζελατινοποίησης κυμαίνονταν, αντίστοιχα, από 5,78 και 12,10 Pa, για CE σε pH = 6 έως τις μέγιστες τιμές που ελήφθησαν 55,73 και 64,16 Pa για CE σε

pH = 3. Για να ερμηνευθεί αυτό, οι ben Amira et al. (2017) ανέφεραν ότι οι χαμηλότερες τιμές σκληρότητας των πηκτωμάτων που παρασκευάζονται με CE σε οξύτητα 6, ήταν πιθανώς αποτέλεσμα της υψηλής μη ειδικής πρωτεολυτικής δράσης, η οποία οδηγεί σε μερική υδρόλυση στην προκύπτουσα γέλη.

Οι McMahon & Brown (1985) έδειξαν ότι πυτιές πιο πρωτεολυτικές από τη χυμοσίνη, τείνουν να παράγουν ελαφρώς πιο μαλακό τυρόπηγμα με χαμηλότερα ποσοστά σκληρότητας του πήγματος. Τα αποτελέσματα των ben Amira et al. (2017) ήταν διαφορετικά από αυτά των Esteves et al. (2003), καθώς έδειξαν ότι το φυτικό πηκτικό μέσο είχε παρόμοιες τιμές G' στο τέλος της διαδικασίας ζελατινοποίησης, ανεξάρτητα από τις τιμές οξύτητας του αρχικού γάλακτος. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το εύρος του pH ήταν μεγαλύτερο και εστιάστηκε σε τιμές από 3,0 έως 6,0 συγκριτικά με αυτό που χρησιμοποιούσαν οι Esteves et al, (2003) (pH = 6–6.7), με αποτέλεσμα μια σημαντική διακύμανση της οξύτητας του γάλακτος και επομένως σημαντική επίδραση στις ρεολογικές του ιδιότητες.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία του γάλακτος, οι ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων που παράγονται από πυτιές των φυτών επηρεάζονται λιγότερο από τις αλλαγές της θερμοκρασίας σε σχέση με τα πηκτώματα που παράγονται από χυμοσίνη. Αυτό είναι ένα πλεονέκτημα για την παραγωγή τυριού από φυτικά ένζυμα χρησιμοποιώντας ένα ευρύτερο φάσμα θερμοκρασιών. Ωστόσο, η εφαρμογή χαμηλότερης θερμοκρασίας στο γάλα οδηγεί σε καλύτερη αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ζελατινοποίησης από τις φυτικές πρωτεάσες και σε ελάττωση της μη ειδικής πρωτεόλυσης. Πράγματι, στους 25 °C, η πήξη του γάλακτος είναι ταχύτερη με τα φυτικά πηκτικά μέσα παρά με τη χυμοσίνη. Επιπλέον, η χρήση χαμηλής θερμοκρασίας πήξης θα μπορούσε να προκαλέσει αποτελεσματικά διαμορφωτικές αλλαγές των μικκυλίων καζεΐνης, οδηγώντας στην αύξηση της προσβασιμότητας των ενζύμων στις καζεΐνες.

Η υπερδιήθηση του γάλακτος είναι, επίσης, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων που προκύπτουν. Η συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιείται γενικά για την τυποποίηση ή την αύξηση της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών στο γάλα. Παρατηρείται πως μετά την αύξηση της συγκέντρωσης της καζεΐνης, διαφοροποιούνται οι ιδιότητες του γάλακτος κατά την πήξη του. Εξαιτίας του υψηλού ιξώδους του υπερδιηθημένου γάλακτος και της μέσης ελεύθερης

απόστασης μεταξύ των μικρών μικκυλίων, επεκτείνεται η διάρκεια της φάσης συσσωμάτωσης. Όμως, αυτή η απόσταση είναι σχετικά χαμηλή, γεγονός που επιτρέπει μια μικρή καθυστέρηση του ρυθμού διάχυσης και της συχνότητας σύγκρουσης μεταξύ των γειτονικών μικκυλίων της καζεΐνης. Η ελαστικότητα της γέλης είναι ωστόσο υψηλότερη παρουσιάζοντας ελάχιστη απώλεια νερού και πρωτεϊνών του ορού γάλακτος. Επιπλέον, η παρουσία πρωτεϊνών ορού στο τυρί μπορεί να μειώσει την πρωτεόλυση της καζεΐνης κατά την ωρίμανση του τυριού, η οποία υποβλήθηκε σε προηγούμενη υπερδιήθηση του γάλακτος. Εκτός από τη διαδικασία διαχωρισμού με χρήση ημιπερατών μεμβρανών, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος επηρεάζει τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων. Καθώς λαμβάνει χώρα η υπερδιήθηση του γάλακτος, η επίδραση αυτού του παράγοντα στη ρεολογία του πηκτώματος προβλέφθηκε μόνο στην περίπτωση της ζελατινοποίησης του γάλακτος με πυτιά μόσχου. Οι Blecker et al. (2012) έδειξαν ότι η εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας στο γάλα συμβάλλει στη μείωση του ρυθμού σύσφιξης κατά τη διάρκεια της πήξης που ακολουθείται από μείωση του ιξώδους του πηγματος. Οι τιμές του μέγιστου ρυθμού συσσωμάτωσης του πηγματος που παράγεται από τη χυμοσίνη μόσχου ήταν περίπου 0,0202, 0,0175 και 0,0003 Pa⁻¹, για φρέσκο νωπό γάλα και θερμικά επεξεργασμένο γάλα στους 60 °C και 80 °C για 20 λεπτά, αντίστοιχα. Αυτό εξηγήθηκε από την μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού (κυρίως της α- και β-λακταλβουμίνης), με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της β-λακταλβουμίνης και της καζεΐνης, μέσω ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Έτσι, εφαρμόζοντας χαμηλές θερμοκρασίες στο γάλα θα δημιουργηθούν καλύτερα αποτελέσματα στη σταθερότητα του τελικού πηγματος κατά τη χρήση κάποιας φυτικής πυτιάς στην πήξη του γάλακτος.

Συνεπώς, η καλύτερη κατανόηση των διαφορετικών παραμέτρων και όλων γενικά των παραγόντων, που μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία ζελατινοποίησης με χρήση φυτικής πυτιάς, συμβάλλει σε καλύτερες ρεολογικές ιδιότητες, που συνδέονται κατά κύριο λόγο με την υφή και την αποδοχή του τελικού προϊόντος.

2.2 Επίδραση φυτικών πηκτικών μέσων στις οργανοληπτικές ιδιότητες των τυριών και στρατηγικές βελτίωσης

Ο προσδιορισμός των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του παραγόμενου τυριού είναι ένα σημαντικό βήμα για την αξιολόγηση της ικανότητας ενός φυτικού πηκτικού μέσου να

αντικαθιστά επιτυχώς τις κλασικές ζωικές πυτιές που χρησιμοποιούνται ευρέως για το σκοπό αυτό. Αυτές οι ιδιότητες εξαρτώνται από τον τύπο της φυτικής πυτιάς. Ορισμένα φυτικά πηκτικά μέσα παράγουν τυριά με οργανοληπτικές ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες που παράγονται από πυτιές ζωικής προέλευσης (AR), αλλά συμβάλλουν στη δημιουργία πολύ διαφορετικών υφών και γεύσεων, λόγω της υπερβολικής πρωτεολυτικής δραστηριότητας (PA) και της παραγωγής πεπτιδίων που προσδίδουν μια πικρή επίγευση στο τελικό προϊόν. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες για τη σύγκριση της υφής, της γεύσης και του χρώματος διαφορετικών τυριών που παράγονται από φυτικές αλλά και ζωικές πυτιές (AR). Αναφέρονται επίσης στρατηγικές βελτίωσης για την καλύτερη εφαρμογή της φυτικής πυτιάς στην παραγωγή των τυριών.

2.2.1 Υφή, γεύση και χρώμα

Η αξιολόγηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των ημίσκληρων τυριών που παρασκευάζονται με φυτικά πηκτικά μέσα έδειξε διαφορετικές υφές. Το ημίσκληρο τυρί, που παρασκευάστηκε με χρήση ως πηκτικού, ενός ενζύμου που εκχυλίστηκε από άνθη γαϊδουράγκαθου (*Oenopordum acanthium*), παρουσίασε παρόμοια χαρακτηριστικά με άλλα εμπορικά τυριά του ίδιου τύπου. Διέθετε μια ελαφριά πικράδα με μια γλυκιά επίγευση, μαζί με μια έντονη ώριμη γεύση, η οποία ήταν ελαφρώς αλμυρή. Ωστόσο, η συνολική του υφή παρουσίαζε μια ικανοποιητική συνοχή. Η υφή του τυριού λαμβάνεται κυρίως λόγω της πρωτογενούς πρωτεόλυσης των καζεϊνών του γάλακτος από τα πηκτικά μέσα των φυτών και όχι από την κυρίαρχη μικροχλωρίδα. Η σκληρότητα όλων των παραγόμενων τυριών μειώνεται λόγω της ενζυμικής υδρόλυσης της αs1-καζεΐνης στο στάδιο της ωρίμανσης. Το «Peshwari» είναι ένα ημίσκληρο φρέσκο τυρί, που παρασκευάζεται από εξ ολοκλήρου ή μερικώς αποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα. Η πήξη λαμβάνει χώρα στους 32 °C για 1 ώρα χρησιμοποιώντας ένα πηκτικό μέσο από τις ρίζες τζίντζερ (*Zingiber officinale*) που ονομάζεται πρωτεάση τζίντζερ (GP).

Σε αντίθεση με το τυρί από το ένζυμο που προέκυψε από άνθη γαϊδουράγκαθου, το τυρί τζίντζερ είναι προικισμένο με κρεμώδη υφή, και δεν εμφάνισε ελάττωμα γεύσης ή πικρίας

κατά την αποθήκευση. Τα αποτελέσματα της υφής ήταν παρόμοια με εκείνα του τυριού «*Murcia al Vino*» που παρασκευάζεται με πηκτικό φυτικής προέλευσης (Hashim et al., 2011). Αυτό ήταν πιο μαλακό, λιγότερο κοκκώδες και πιο κρεμώδες από το ίδιο τυρί που παρασκευάζεται από πυτιά μόσχου. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και για το μικροσκοπικό τυρί που παρασκευάστηκε με πηκτικό μέσο από το *Bromelia hieronymi* (ένα φυτό από τη Νότια Αμερική). Αυτό παρουσίασε μια υφή που δεν ήταν πολύ ικανοποιητική σε σύγκριση με το τυρί που παράγεται από χυμοσίνη.

Επιπλέον, παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και τα τυριά που παρασκευάζονται από πρόβειο γάλα με χρήση πηκτικού μέσου που παράγεται από *C. cardunculus*. Αυτά τα ελαττώματα στην υφή οφείλονταν στο υπολειμματικό πηκτικό μέσο στο τυρί, που ήταν υπεύθυνο για την υψηλή πρωτογενή πρωτεόλυση. Παρά τις μεγάλες δραστηρότητες και τις διαφορές στην υφή του τελικού προϊόντος, ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα όπως αυτά του *C. cardunculus* χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μαλακών τυριών όπως το «*Roquefort*» και το «*Serra da Estrela*». Αρκετά φυτικά εκχυλίσματα θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν επιτυχώς τη χυμοσίνη μόσχου όσον αφορά τις ιδιότητες υφής. Για παράδειγμα, το πήγμα που παράγεται από εκχύλισμα ακτινιδίου και από χυμοσίνη χαρακτηρίστηκε από παρόμοιες τιμές των παραμέτρων που περιγράφουν την ελαστικότητα, τη συνοχή και την υφή. Επίσης παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές σκληρότητας (6,19 και 5,52 N). Ωστόσο, το εκχύλισμα φυτικών πηκτικών από πεπόνι παρήγαγε ένα τυρόπηγμα με τις χαμηλότερες τιμές όλων των διαφορετικών παραμέτρων που καθορίζουν την υφή και ιδιαίτερα τη σκληρότητα που ήταν κοντά στα 2 N. Αυτό αποδόθηκε στις αρκετά υψηλές πρωτεολυτικές δραστηρότητες, με αποτέλεσμα τη χαμηλή αναλογία πηκτικών MCA/PA.

Στη συνέχεια, κατά την ανάλυση της γεύσης του τυριού «*Mozzarella*» που παρασκευάζεται με χρήση εκχυλίσματος ακτινιδίου, τα αποτελέσματα έδειξαν την απουσία της πικρής γεύσης. Οι δοκιμαστές του οργανοληπτικού ελέγχου ταξινόμησαν τη γεύση και την αποδοχή του προϊόντος στο εύρος της κλίμακας αποδοχής από 4 (καλό) έως 5 (πολύ καλό) και δεν παρατήρησαν καμία διαφορά μεταξύ του παρασκευασμένου δείγματος και του εμπορικού τυριού «*Mozzarella*» που χρησιμοποιήθηκε ως σύγκριση. Η αποδεκτή γεύση αυτού του τύπου τυριού οφειλόταν κυρίως στην ικανότητα της ακτινιδίνης να αποικοδομεί τις ανεπιθύμητες πρωτεΐνες που υπάρχουν στην κρέμα γάλακτος. Εκτός από το πηκτικό μέσο από εκχύλισμα

ακτινίδιου, το εκχύλισμα *S. dubium* χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός τύπου τυριού με το όνομα «*Gibna bayda*» το οποίο δε διέφερε από το τυρί που παρασκευάζεται με χρήση πυτιάς μόσχου, όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, και ιδιαίτερα τη γεύση (Osman Khei et al., 2011). Ο Yousif (1996) ανέφερε ότι είναι δυνατό να μειωθεί αυτή η ελαφρά πικρή γεύση χρησιμοποιώντας ένζυμο υψηλής καθαρότητας και βέλτιστη συγκέντρωση εκχυλίσματος πηκτικού μέσου. Στην περίπτωση του παραδοσιακού τυριού, η επιλογή του τύπου του τελικού τυριού έχει μεγάλη σημασία καθώς η διαδικασία παρασκευής του δεν παρουσιάζει ένα αρχικό στάδιο ωρίμανσης η οποία χαρακτηρίζεται από μια πρωτογενή και μια δευτερογενή πρωτεόλυση.

Επομένως, όταν αποφεύγεται αυτό το στάδιο και χρησιμοποιείται εκχύλισμα πηκτικού μέσου με υψηλό MCA (880 MCU/mL), τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος θα μπορούσαν να μοιάζουν πολύ με εκείνα του ίδιου τυριού που παρασκευάζεται με πυτιά μόσχου (Nasr et al., 2016). Όσον αφορά τα ώριμα τυριά, επιτεύχθηκαν ορισμένες παραγωγικές επιτυχίες χρησιμοποιώντας φυτικά εκχυλίσματα, χάρη στην κυριαρχία ορισμένων παραμέτρων κατά την προετοιμασία ή την ωρίμανση. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα από άνθη *Cynara scolymus* (αγκινάρα) θεωρήθηκε ως καλό υποκατάστατο των ζωικών πυτιών στην παραγωγή τυριών τύπου Gouda, καθώς οι φυσικοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν κατά την ωρίμανση και οι οργανοληπτικές ιδιότητες του παραγόμενου τυριού ήταν παρόμοιες. Επιπλέον, το αλάτισμα του τυριού για μεγαλύτερη περίοδο (40 ώρες) κατά την ωρίμανση αποτρέπει την ανάπτυξη της πικράδας. Για να αξιολογηθεί αυτό, ο προσδιορισμός της αναλογίας (υδατοδιαλυτό άζωτο (WSN)/ολικό άζωτο (TN)) κατά την ωρίμανση ήταν ο καλύτερος δείκτης για τη μέτρηση της έντασης της πρωτεόλυσης. Αυτή η αναλογία ήταν χαμηλότερη στα τυριά *C. scolymus* που αλατίστηκαν κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 40 ωρών από εκείνη των αλατισμένων για 30 ώρες. Οι Galán et al. (2012) συνέκριναν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ώριμων τυριών που παρασκευάζονται από πρόβειο γάλα, χρησιμοποιώντας ως πηκτικά: AR, πηκτικό από *C. cardunculus* (CCP) και ένα μίγμα και των δύο σε ίση αναλογία. Τα τυριά που παρασκευάζονται με φυτικά πηκτικά (CCP και AR/CCP) πέτυχαν σε πολύ μικρότερο χρόνο τα βιοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ώριμων τυριών που παρασκευάζονται με χρήση των πηκτικών AR. Κατά συνέπεια, ο συνδυασμός πηκτικών (AR/CPC) μπορεί να αξιοποιηθεί για να επιταχυνθεί το στάδιο ωρίμανσης. Αυτό το μίγμα

φυτικών πυτιών δεν είχε καμία επίδραση στην υφή, ιδιαίτερα στη σκληρότητα που παραμένει σημαντικά υψηλότερη για τα τυριά που παράγονται με χρήση AR. Ωστόσο, η πικρή γεύση του προκύπτοντος τυριού μπορεί να μειωθεί δραστικά, χρησιμοποιώντας ένα μίγμα των πηκτικών (AR/CCP). Επιτρέποντας έτσι στους καταναλωτές που δεν επιθυμούν την πικρή γεύση να απολαμβάνουν μια καλύτερη γεύση. Γενικά, η γεύση των τυριών που παρασκευάζονται με φυτική πυτιά σχετίζεται και με το είδος του γάλακτος αλλά και τη σύνθεσή του. Μια πιο σωστή επιλογή του αρχικού γάλακτος θα μπορούσε να αποφύγει κάποια ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά της τελικής γεύσης του τυριού. Για παράδειγμα, τα πηκτικά εκχυλίσματα του *C. cardunculus* χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στην παραγωγή τυριών που παρασκευάζονται τόσο από κασιόγιο, όσο και από πρόβειο γάλα. Τα τυριά που προκύπτουν από τα τελευταία δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα έντονα πικρή γεύση.

Αντιθέτως τα τυριά που παράγονται από το αγελαδινό γάλα και τα εκχυλίσματα *C. cardunculus* τείνουν να εμφανίζουν σχεδόν πάντα την ανεπιθύμητη πικρή γεύση. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε καζεΐνες του πρόβειου γάλακτος οι οποίες είναι λιγότερο ευαίσθητες από τις καζεΐνες του γάλακτος των βοοειδών, για να σχηματίσουν υδρόφοβα πικρά πεπτίδια μετά από πρωτεολυτική δράση. Πραγματοποιήθηκαν επίσης μελέτες συσχέτισης για την καλύτερη κατανόηση της προέλευσης της τυπικής γεύσης του τυριού που παράγεται από τις φυτικές πυτιές.

Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε μια αρκετά ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών κλασμάτων αζώτου που προτάθηκαν και της έντονης γεύσης του τυριού «*Los Pedroches*» που παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα και εκχύλισμα *C. cardunculus*. Ωστόσο, αποδείχθηκε μια αρκετά ασθενής συσχέτιση μεταξύ της γεύσης και των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με τους Sanjuán et al. (2002) το επίπεδο SN στο τυρί «*Los Pedroches*» που παρασκευάζεται από πυτιά λαχανικών ήταν 30% υψηλότερο από αυτό που παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας ζωική πυτιά. Αυτή η υψηλή περιεκτικότητα οφειλόταν στο αυξημένο PA των ενζύμων πήξης του γάλακτος παρά στη συμμετοχή των μικροβιακών ενδο- και εξω-πρωτεασών.

Αντίθετα, ορισμένοι συγγραφείς έχουν χαρακτηρίσει τα πεπτίδια που απελευθερώνονται κατά την παρασκευή ή την ωρίμανση του τυριού για να έχουν μια σαφή ιδέα για τη γεύση του προκύπτοντος τυριού. Τα πεπτίδια που εξάγονται από τα τυριά αυτά είναι εκείνα με το υψηλότερο ποσοστό υπολειμμάτων αρωματικών αμινοξέων και με αυξημένη μέση

υδροφοβικότητα. Τα περισσότερα από αυτά προκύπτουν από την υδρόλυση της αs1- και β-καζεΐνης από την υπολειμματική πυτιά. Η υψηλή συγκέντρωση των κατακρατούμενων πεπτιδίων στο τυρί προκαλεί την ανεπιθύμητη πικρή γεύση. Έχει αποδειχθεί ότι η αναλογία υδρόφοβων προς υδρόφιλων πεπτιδίων συσχετίζεται με την ένταση της πικρής γεύσης. Στην πραγματικότητα, φάσεις από το τυρί Cheddar, διαχωρισμένες με RP-HPLC, αποκάλυψαν ότι τα υδρόφοβα πεπτίδια αποδίδονταν στις φάσεις με πικρή γεύση, ενώ τα υδρόφιλα πεπτίδια σε αυτές με την αλμυρή γεύση. Για να αντιμετωπίσει τα προβλήματα της πικρής γεύσης, ο Agboola (2002) προχώρησε σε υπερδιήθηση αγελαδινού γάλακτος για να διατηρήσει ένα σταθερό ποσοστό παρόμοιο με αυτό του πρόβειου γάλακτος. Έτσι, η εφαρμογή της πυτιάς που προέρχεται από *cardoon* στο υπερδιηθημένο γάλα είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη ενός ημίσκληρου τυριού με παρόμοιες οργανοληπτικές ιδιότητες με αυτές των τυριών που παρασκευάζονται από μη συμπυκνωμένο γάλα και μικροβιακή πυτιά ή πυτιά ζωικής προέλευσης.

Η βελτίωση της οπτικών χαρακτηριστικών, κυρίως του χρώματος των τυριών που παρασκευάζονται από πυτιά, έχει μεγάλη σημασία για την κάλυψη των αναγκών των τελικών καταναλωτών αλλά και την εμπορική επιτυχία του τελικού προϊόντος. Για το λόγο αυτό, η μείωση της συγκέντρωσης του φυτικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται (στερεό/υγρό) και του όγκου του πηκτικού μέσου που προστίθεται στο γάλα, συμβάλλει στα όσο το δυνατόν καλύτερα χρωματικά αποτελέσματα. Ο Chikrahi (2014) έδειξε ότι το πράσινο χρώμα του μαλακού τυριού που παρασκευάζεται στη Δυτική Αφρική με χρήση του πηκτικού *Calotropis procera*, επηρεάστηκε κυρίως από το χρώμα του φυτικού εκχυλίσματος που προστέθηκε στο γάλα. Σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε επίσης η επεξεργασία της πρώτης ύλης (φύλλα και βλαστοί σε μορφή φρέσκιας ή αποξηραμένης σκόνης) και η συγκέντρωση του πηκτικού. Στην πραγματικότητα, το πράσινο χρώμα του εκχυλίσματος των φύλλων του *C. procera* ήταν υπεύθυνο για το χρώμα του τυριού. Το τελευταίο έγινε πιο έντονο με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και της φρεσκάδας της πρώτης ύλης (φρέσκα φύλλα και μίσχοι). Η χρήση των καθαρών φυτικών εκχυλισμάτων στην πήξη του γάλακτος μπορεί επίσης να μειώσει την ποσότητα των πολυφαινόλων και των έγχρωμων χρωστικών που προστίθενται στο γάλα, οδηγώντας σε βελτίωση του χρώματος του τελικού τυριού. Πραγματοποιήθηκαν επίσης συγκριτικές μελέτες του χρώματος του τυριού προκειμένου να επαληθευτεί η

ικανότητα της φυτικής πυτιάς να παράγει τυρί συγκρίσιμο με αυτό της ζωικής πυτιάς. Αποτελέσματα των Agboola et al. (2009) έχουν δείξει ότι τα τυριά που παρασκευάζονται με εκχύλισμα *C. cardunculus* έχουν πιο σκούρο και πιο κίτρινο χρώμα από αυτό του τυριού που παρασκευάζεται με χρήση ζωικής πυτιάς. Αυτό αποδόθηκε από τους συγγραφείς που υποστήριξαν ότι ο όγκος του εκχυλίσματος *cardo* (400 mL/100 L γάλακτος) που προστέθηκε στο γάλα ήταν υψηλότερος από αυτόν της ζωικής πυτιάς (20 mL/ 100 L γάλακτος). Η χρήση υπερδιηθημένου γάλακτος από το ίδιο πηκτικό μέσο (εκχύλισμα *C. cardunculus*) οδήγησε σε βελτίωση του χρώματος που γίνεται πιο ανοιχτό και λιγότερο κίτρινο (Agboola et al., 2009).

2.3 Επίδραση φυτικών πηκτικών μέσων στην απόδοση τυριού

Μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή ενός κατάλληλου υποκατάστατου για την πυτιά μόσχου είναι ο προσδιορισμός της απόδοσης κατά βάρος του τυριού. Η βέλτιστη απόδοση σε τυρί είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος για τη διαδικασία παραγωγής του τυριού. Έχουν μελετηθεί πολλά φυτικά ένζυμα λόγω των δραστικότητων τους στην πήξη του γάλακτος (Khan & Masud, 2013). Τα περισσότερα όμως από αυτά κρίθηκαν ακατάλληλα για την παραγωγή τυριού σε βιομηχανική κλίμακα. Στο πλαίσιο αυτής της διαδικασίας, τα τυριά υφίστανται απώλεια των πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα των υπερβολικών πρωτεολυτικών δράσεων. Ο Πίνακας 3 περιλαμβάνει ορισμένες αποδόσεις τυριού που προσδιορίστηκαν για τυριά που παράγονται με χρήση φυτικής πυτιάς σε σύγκριση με εκείνα που παρασκευάζονται με χυμοσίνη που διατίθεται στο εμπόριο. Συγκεκριμένα, στο παράδειγμα των πορτογαλικών τυριών που παράγονται από το πηκτικό *C. Cardunculus*, η απώλεια στην απόδοση δεν μπορεί να θεωρηθεί μεγάλο παράπτωμα, καθώς ο ορός γάλακτος, χρησιμοποιείται συνήθως για μια παραδοσιακή παραγωγή τυριού από ορό γάλακτος (Requeijão). Κατά συνέπεια, η απώλεια πρωτεϊνών και λίπους κατά την παρασκευή του τυριού αντισταθμίζεται κατά την παρασκευή αυτού του παραπροϊόντος.

Πίνακας 3: Παραδείγματα απόδοσης της πήξης ορισμένων τυριών που παρασκευάζονται με φυτικές πυτιές, σε σύγκριση με εκείνα που παρασκευάζονται με πυτιά διαθέσιμη στο εμπόριο (Chymosin).

Φυτό	Απόδοση σε προϊόν		
	Τυρί	Πυτιά	Χυμοσίνη
<i>Bromelia hieronymi</i>	Τυρί μινιατούρα	14,52 ± 0,31 g/100g	16,05 ± 0,06 g/100g
		8,63 ± 0,43g/100g	9,26 ± 0,46 g/100g
<i>Withania coagulans</i>	Λευκό τυρί	268g/L	234g/L
<i>Calotropis procera</i>	Μαλακό τυρί	237,4g/L	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιασθούν οι βασικές εφαρμογές της φυτικής πυτιάς στα τρόφιμα τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα.

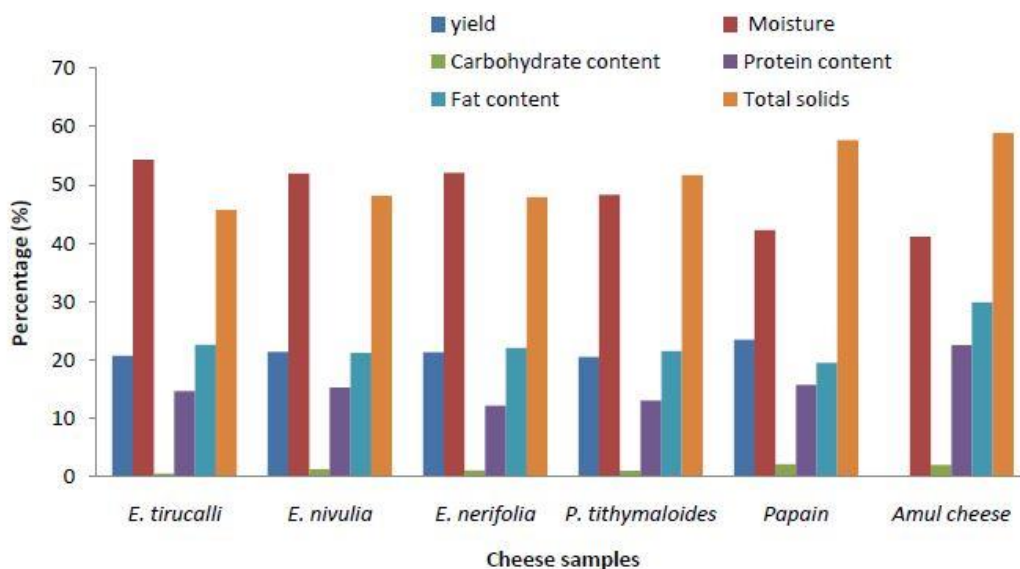
3.1 Εφαρμογές σε εργαστηριακή κλίμακα

3.1.1 Χρήση ενζύμων από φυτά της οικογένειας *Euphorbiaceae*

Τα κόμμεα από φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας *Euphorbiaceae* αξιολογήθηκαν ως προς την δραστικότητα πήξης του γάλακτος και τη χρήση τους στην παραγωγή τυριού (Raghunath T. Mahajan and Gunjan M. Chaudhari, 2014). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστικότητα πήξης του γάλακτος του ενζύμου από κόμμεα τεσσάρων φυτών είναι κατά σειρά το *Euphorbia tirucalli* ακολουθούμενη από το *Euphorbia neriifolia*, το *Euphorbia nivulia* και το *Pedilanthus tithymaloides*.

Η πήξη του γάλακτος είναι το βασικό βήμα στην παραγωγή του τυριού, επομένως αυτά τα ένζυμα μελετήθηκαν για την παραγωγή τυριού. Οι αναλύσεις αφορούσαν συγκριτικούς υπολογισμούς σχετικά με την εκατοστιαία απόδοση, τα συνολικά στερεά, την περιεκτικότητα σε υγρασία και τη χημική σύνθεση των δειγμάτων των παραγόμενων τυριών. Η απόδοση σε τυρί προσδιορίστηκε με βάση το βάρος του γαλακτοκομικού προϊόντος. Η απόδοση τυριού που παρήχθη από καθένα από τα ένζυμα του κόμμεος των τεσσάρων φυτών *Euphorbiaceae*

εκφράστηκε σε ποσοστό και τα αποτελέσματα είναι *E. nivulia* (21,4%), *E. nerifolia* (21,3%), *E. tirucalli* (20,7%) και *P. tithymaloides* (20,4%). Η χρήση της παπαΐνης έδωσε την υψηλότερη ποσότητα τυριού (23,4%). Τα συνολικά στερεά βρέθηκε να αυξάνονται και η περιεκτικότητα σε υγρασία βρέθηκε να μειώνεται με την ακόλουθη σειρά τυρί Amul > παπαΐνη > *P. tithymaloides* > *E. nivulia* > *E. nerifolia* > *E. tirucalli* (Εικόνα 7). Τα υψηλότερα συνολικά στερεά και η ελάχιστη περιεκτικότητα σε υγρασία υπήρχε στο τυρί Amul. Το επεξεργασμένο τυρί τύπου Cheddar, Amul παρασκευάζεται από τυρί, κιτρικό νάτριο, αλάτι, κιτρικό οξύ και φυσικό χρώμα. Παρασκευάζεται από αγελαδινό ή βουβαλίσιο γάλα χρησιμοποιώντας μικροβιακή πυτιά.



Εικόνα 7: Διατροφική ανάλυση δείγματος τυριού που παρασκευάστηκε με νωπό γάλα αγελάδας (Raghunath T. Mahajan and Gunjan M. Chaudhari, 2014).

Η ωρίμανση του τυριού συνοδεύεται από μερική αποικοδόμηση πρωτεΐνης (Gaya et al., 2005). Κατά την ωρίμανση του τυριού, μέρος της αδιάλυτης στο νερό καζεΐνης μετατρέπεται σε υδατοδιαλυτές αζωτούχες ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των ενδιάμεσων προϊόντων υδρόλυσης πρωτεϊνών και ελεύθερων αμινοξέων.

Το αλάτι έχει επιβραδυντική επίδραση στη διάσπαση των πρωτεϊνών. Η ελάχιστη μείωση που καταγράφεται για τα αλατισμένα δείγματα μπορεί να οφείλεται στην αναστολή των μικροοργανισμών και της ενζυμικής δραστηριότητας. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες εντοπίστηκε στο τυρί Amul (22,5%), ακολουθούμενη από το τυρί που παράγεται με

χρήση παπαΐνης (15,7%), με χρήση *E. nivulia* (15,2%), με χρήση *E. tirucalli* (14,6%), με χρήση *P. tithymaloides* (13,0%) και με χρήση *E. neriifolia* (12,1%).

Σύμφωνα με τους (Talib et al., 2009) κατά την ωρίμανση, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της περιεκτικότητας σε λίπος λόγω της διάσπασης του λίπους, της πρόσληψης αλατιού και της συνεχούς απώλειας των αποικοδομημένων συστατικών του τυριού. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά βρέθηκε στο τυρί Amul (29,9%) ακολουθούμενο από *E. tirucalli* (22,6%), *E. nerifolia* (22,1%), *P. tithymaloides* (21,5%), *E. nivulia* (21,2%) και παπαΐνη (19,5%).

Η λακτόζη είναι ένα από τα βασικά θρεπτικά συστατικά που καταναλώνονται από μικροοργανισμούς που παράγουν γαλακτικό οξύ. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες βρέθηκε σε εκχύλισμα παπαΐνης (2,1%) ακολουθούμενη από το τυρί Amul (2,0%), το εκχύλισμα *E. nivulia* (1,2%) το εκχύλισμα *E. Nerifolia*, με το εκχύλισμα από *P. tithymaloides* να έχει παρόμοια περιεκτικότητα, ενώ το *E. tirucalli* να εμφανίζει την ελάχιστη (0,5%).

Η πήξη του γάλακτος είναι το αρχικό βήμα στην ανάπτυξη της υφής και της γεύσης των τυριών, ιδιότητες που εξαρτώνται από την ειδική ενζυμική πρωτεολυτική αποικοδόμηση των μορίων του γάλακτος και ειδικότερα των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ένζυμα πήξης του γάλακτος με τα ένζυμα που απομονώθηκαν από τα φυτά της οικογένειας *Euphorbiaceae* έχουν ιδιότητα τυροκομίας και προτείνονται ως υποκατάστατο της πυτιάς στη γαλακτοβιομηχανία.

Ακόμη, η θρεπτική αξία των τυριών αυτών δεν ταιριάζει πλήρως με το τυρί Amul αλλά είναι συγκρίσιμη με το τυρί που παρασκευάζεται με καθαρή παπαΐνη. Ωστόσο, περαιτέρω διερεύνηση και προσοχή για τη διατροφική κατάσταση καθώς και την ποιότητα που παράγεται από τα ένζυμα των φυτών είναι απαραίτητη και προτείνεται ο εμπλουτισμός δειγμάτων τυριού με απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως μέταλλα, βιταμίνες, αμινοξέα, προβιοτικά και αρωματικούς παράγοντες κ.λπ.

3.1.2 Χρήση ενζύμων από εκχυλίσματα *Cynara cardunculus*, *Carica papaya* και *Ficus carica*

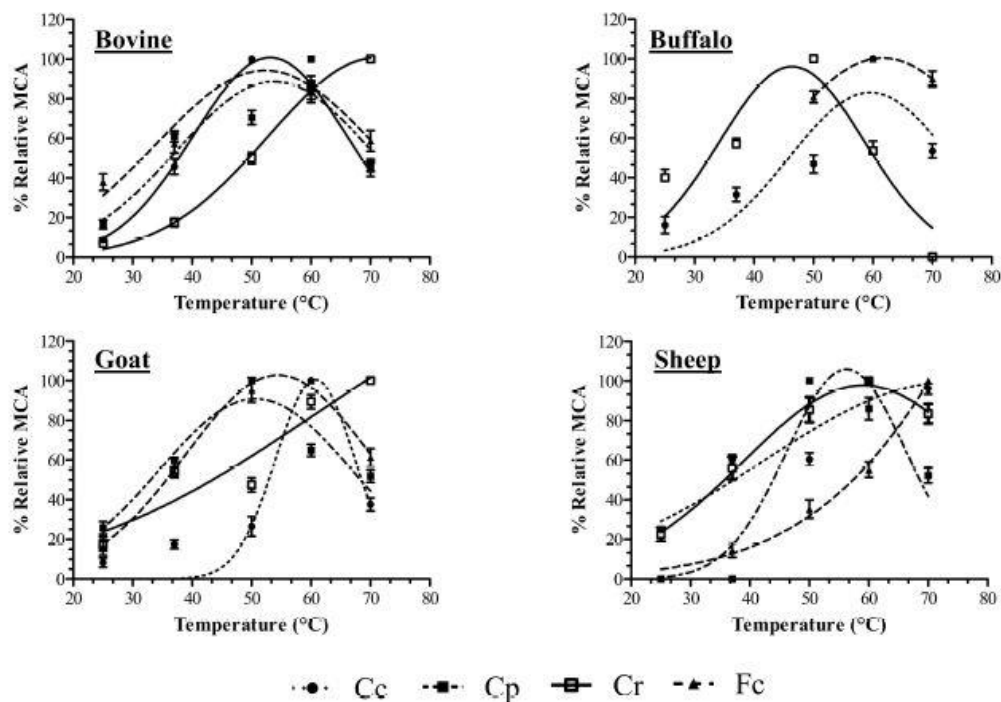
Η ικανότητα πήξης των ενζύμων αυτών μετρήθηκε σε αγελαδινό, βουβαλίσιο, κατσικίσιο και πρόβριο γάλα που επωάστηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η πήξη του γάλακτος και οι πρωτεολυτικές δραστηριότητες προσδιορίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τη ζωική πυτιά ως

πηκτικό μέσο αναφοράς. Η φυτική πυτιά, που εκχυλίζεται από το *C. cardunculus*, αποδείχθηκε ότι είναι το καταλληλότερο ένζυμο πήξης του γάλακτος για τυροκόμηση, αφού έχει παρόμοιες ιδιότητες πήξης του με τη συμβατική πυτιά μόσχου. Ένζυμο από κόμμι *F. carica*, αποδείχθηκε ότι είναι ένα πολλά υποσχόμενο εναλλακτικό πηκτικό μέσο σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η ισχυρή πρωτεολυτική δράση του εκχυλίσματος παπαΐνης προκάλεσε μη ικανοποιητική πήξη του γάλακτος σε όλα τα δείγματα γάλακτος που δοκιμάσθηκαν. Η βελτιστοποίηση της χρήσης φυτικής πυτιάς σε μια γαλακτοκομική εφαρμογή μπορεί να γίνει επιλέγοντας την κατάλληλη φυτική πυτιά με συγκεκριμένη αποτελεσματικότητα στην πήξη του γάλακτος. Αυτές οι διαδικασίες παραγωγής μπορούν να οδηγήσουν στη βελτιστοποίηση των υπάρχοντων διεργασιών παραγωγής και στην παραγωγή νέων τυροκομικών προϊόντων.

Πίνακας 4: Χημική σύσταση των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα πήξης (Liburdi et al., 2019b).

	% Πρωτεΐνη	pH	% Καζεΐνη	% Λίπη	% Λακτόζη
Βοοειδές	3,74	6,58	2,89	4,10	4,62
Βουβάλι	4,15	6,71	3,21	7,50	4,74
Κατσίκι	3,74	6,65	2,74	4,00	4,51
Πρόβατο	6,90	6,34	5,54	7,00	4,45

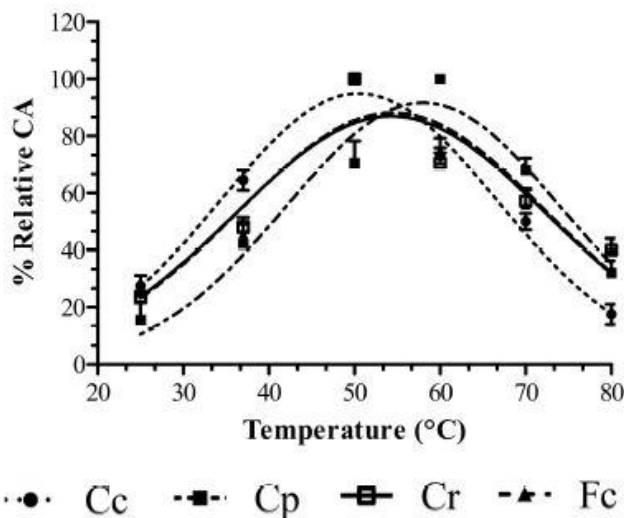
Οι χημικές συνθέσεις του αγελαδινού, του βουβαλίσιου, του κατσικίσιου και του πρόβειου γάλακτος αναφέρονται στον Πίνακα 4. Τα δεδομένα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα ήταν καλής μέχρι και μέτριας ποιότητας ως προς τη συγκέντρωση καζεΐνης, λιπαρών και πρωτεΐνης. Στην πρώτη φάση των πειραμάτων, τα φυτικά πηκτικά μέσα αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να πήζουν αποτελεσματικά το γάλα προσδιορίζοντας την τιμή MCA σε διαφορετικά είδη γάλακτος σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Εικόνα 8). Η μέγιστη τιμή MCA του δείγματος *C. cardunculus* παρατηρήθηκε στο βόειο γάλα στους 50 °C περίπου, ενώ οι μέγιστες τιμές MCA του βουβαλίσιου, κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος παρατηρήθηκαν στους 60 °C. Το πηκτικό *C. papaya* εμφάνισε μέγιστες τιμές MCA σε δείγματα γάλακτος διαφόρων οικόσιτων θηλαστικών στους 50 °C και 60 °C αντίστοιχα. Ωστόσο, όταν εκχύλισμα του *C. papaya* προστέθηκε σε πρόβειο γάλα, η πήξη πραγματοποιήθηκε μόνο για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50 °C που αντιστοιχεί σε τιμή MCA 100%.



Εικόνα 8: Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα πήξης του γάλακτος (MCA) των εκχυλισμάτων *Cynara cardunculus* (Cc), *Carica papaya* (Cp), πυτιάς μόσχου (Cr) και *Ficus carica* (Fc), προσδιοριζόμενη σε γάλα διαφορετικής προέλευσης όπως βοοειδή, βουβάλια, κατσίκια και πρόβατα. Το (%) σχετικό MCA αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο 3 ανεξάρτητων προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν για κάθε πηκτικό μέσο (Liburdi et al., 2019b).

Επιπλέον, στην περίπτωση του βουβαλίσσιου γάλακτος, δεν παρατηρήθηκε πήξη σε καμία θερμοκρασία που εφαρμόστηκε με την προσθήκη του εκχυλίσματος *C. papaya*. Το *F. carica* παρουσίασε καλή πηκτική δράση σε όλα τα είδη γάλακτος που εξετάστηκαν, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή στους 50 °C στο βόειο γάλα, στους 60 °C στο βουβαλίσιο και στο κατσικίσιο γάλα και στους 70 °C στο πρόβειο γάλα. Ωστόσο, η χρήση του ενζύμου *F. carica* εμφάνισε χαμηλή απόδοση πήξης σε βουβαλίσιο και πρόβειο γάλα σε θερμοκρασίες 37 °C και 25 °C, αντίστοιχα. Επιπλέον, η τιμή του MCA της πυτιάς μόσχου σε δείγματα γάλακτος βοοειδών και αιγών παρουσίασε αύξηση εφαρμόζοντας υψηλές θερμοκρασίες που φτάνουν τους 70°C. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε στο δείγμα από γάλα προβάτου όπου οι 50°C αποδείχθηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία για την πήξη του γάλακτος ακόμα κι αν το Cr διατηρούσε περίπου το 80% του MCA του στους 70 °C. Μόνο στο βουβαλίσιο γάλα, η ζωική πυτιά παρουσίασε βέλτιστη τιμή MCA στους 50 °C. Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στη δραστηριότητα MCA μεταξύ των τριών φυτικών εκχυλισμάτων και της εμπορικής πυτιάς μόσχου. Αναφέρθηκε παραπάνω, ότι τα

πηκτικά μέσα από *C. cardunculus* περιέχουν δύο ένζυμα, την *cardosine A* και την *cardosine B*, τα οποία είναι παρόμοια με τη χυμοσίνη και την πεψίνη όσον αφορά την υδρόλυση της καζεΐνης. Προκειμένου να προσδιοριστεί η αναλογία MCA/CA, η οποία είναι απαραίτητη για την εφαρμογή ενός φυτικού εκχυλίσματος στην τυροκομία, αξιολογήθηκαν οι καζεϊνολυτικές δράσεις των εκχυλισμάτων από *C. cardunculus*, παπάγιας και *F. carica* σε διάφορες θερμοκρασίες (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Η επίδραση της θερμοκρασίας στις καζεϊνολυτικές δραστηριότητες (CAs) των εκχυλισμάτων *C. cardunculus*, *C. papaya*, πυτιάς μόσχου και *F. carica*, ως προς το οξικό άλας (pH 5,5). Τα ποσοστά (%) της σχετικής CA αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων προσδιορισμών για κάθε πηκτικό μέσο (Liburdi et al., 2019b).

Η καζεϊνολυτική δραστηριότητα CA της ζωικής πυτιάς ήταν χαμηλότερη από την CA των φυτικών εκχυλισμάτων, ενώ το εκχύλισμα παπάγιας έδειξε υψηλότερα επίπεδα πρωτεολυτικής δράσης με την καζεΐνη σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα *C. cardunculus* και *F. carica*. Ωστόσο, η CA αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται από τη θερμοκρασία για όλα τα πηκτικά που αναλύθηκαν. Οι βέλτιστες τιμές αποκτήθηκαν στους 60 °C για *C. papaya* και στους 50 °C για *C. cardunculus*, πυτιά μόσχου και *F. carica*. Δεδομένου ότι τα ένζυμα ρεννίνης που είναι κατάλληλα για την παραγωγή τυριού χαρακτηρίζονται από υψηλή καζεϊνολυτική δράση και χαμηλή πρωτεολυτική δράση, προσδιορίστηκε η αναλογία MCA/CA που ορίζεται ως MCI. Ένα πηκτικό μέσο που έχει υψηλό MCI σχηματίζει τυρόπηγμα και αποδίδει υψηλή απόδοση τυροκομικών προϊόντων. Ανεξάρτητα από τον τύπο πυτιάς που χρησιμοποιήθηκε, η πυτιά

μόσχου έδειξε πολύ υψηλότερο λόγο MCA/CA από εκείνους που ελήφθησαν για τα πηκτικά από *C. cardunculus*, *C. paraya* και *F. carica* για όλα τα είδη γάλακτος σε όλες τις θερμοκρασίες. Οι τιμές MCI με τη χρήση ζωικής πυτιάς ήταν 23, 28 και 44 φορές υψηλότερες από τις αντίστοιχες της εφαρμογής των εκχυλισμάτων *C. cardunculus*, *C. paraya* και *F. carica*, αντίστοιχα. Τα τρία φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν διαφορές στην τιμή του MCI στις διαφορετικές θερμοκρασίες που αξιολογήθηκαν για κάθε δείγμα γάλακτος. Στο βόειο γάλα, οι υψηλότερες τιμές MCI μετρήθηκαν για εκχυλίσματα *C. paraya* και *F. carica* λήφθηκαν στους 50 °C και 25 °C, αντίστοιχα. Στο βουβαλίσιο γάλα, οι τιμές MCI δεν προσδιορίστηκαν εξαιτίας της απουσίας της τιμής MCA των εκχυλισμάτων παπάγιας σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν και για το *F. carica* σε θερμοκρασίες 25 και 37 °C. Ωστόσο, το εκχύλισμα από *C. cardunculus* βρέθηκε το καλύτερο σε σχέση με όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν στην πήξη του βουβαλίσιου γάλατος. Τα εκχυλίσματα από *C. cardunculus* και *C. paraya* παρουσίασαν υψηλές αποδόσεις στην πήξη του κατσικίσιου γάλακτος στους 60 °C και 37 °C, αντίστοιχα, ενώ οι μέγιστες τιμές του MCI βρέθηκαν μόνο για το εκχύλισμα *C. cardunculus* στην πήξη του πρόβειου γάλατος σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματική του χρήση για την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων με βάση το πρόβειο γάλα. Η πυτιά μόσχου εμφάνισε τις μέγιστες τιμές MCI στην πήξη του βουβαλίσιου γάλατος στους 25 °C, ενώ στο πρόβειο γάλα οι καλύτερες τιμές εντοπίστηκαν για θερμοκρασία πήξης του γάλακτος στους 37 °C.

Πίνακας 5: Δείκτες πήξης γάλακτος (MCIs) με χρήση εκχυλισμάτων *C. cardunculus*, *C. paraya*, πυτιάς μόσχου και *F. carica*, σε γάλα από διάφορα μηρυκαστικά ζώα όπως βοοειδή, βουβάλι, αίγες και πρόβατα, σε διαφορετική θερμοκρασία επώασης (25, 37, 50, 60 και 70 °C) (Liburdi et al., 2019b).

Πηκτικό	Θερμοκρασία	Δείγματα γάλακτος			
		Βοοειδή	Βουβάλι	Κατσίκι	Πρόβατο
Εκχύλισμα C. cardunculus	25	3,47	16,10	12,49	35,04
	37	5,46	10,61	8,33	25,24
	50	17,51	24,11	18,41	41,40
	60	21,17	73,28	110,33	87,72
	70	11,21	36,21	37,39	82,31
Εκχύλισμα	25	23,38	N/A	49,2	N/A
	37	39,83	N/A	88,96	N/A

παπάγιας	50	3,65	N/A	6,40	3,24
	60	10,10	N/A	1012	4,71
	70	3,52	N/A	6,53	2,23
Πυτιά μόσχου	25	314,17	862,92	371,92	716,74
	37	327,62	596,61	551,67	625,09
	50	447,75	515,43	244,86	540,93
	60	2311,78	878,43	1428,47	1839,26
	70	2532,74	200,00	1564,46	1528,77
Εκχύλισμα <i>F. carica</i>	25	56,42	N/A	N/A	19,82
	37	24,26	N/A	N/A	23,05
	50	19,90	28,68	1,14	21,18
	60	13,23	27,32	2,90	16,46
	70	18,08	35,51	5,63	14,96

Το εκχύλισμα *C. cardunculus* έδειξε τις υψηλότερες τιμές MCI στο πρόβειο γάλα στους 25, 37, 50 και 70 °C, ωστόσο υπό τις ίδιες συνθήκες, οι τιμές MCI στα βουβαλίσια και κατσικίσια γάλατα δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές. Το εκχύλισμα παπάγιας παρουσίασε αποτελεσματική πήξη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (25 και 37 °C) στα υπό δοκιμή γάλατα. Αυτή η παράμετρος ήταν υψηλότερη στο αιγοπρόβειο γάλα για όλες τις άλλες θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν. Το εκχύλισμα από *F. carica* φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικό στους 70 °C στο κατσικίσιο γάλα και στους 37 °C στο πρόβειο γάλα, ενώ το υψηλότερο MCI για το ίδιο εκχύλισμα βρέθηκε για το βόειο γάλα στους 25 °C.

Το γάλα με χαρακτηριστικά πήξης, όπως ο σύντομος χρόνος πήξης και η δημιουργία σφιχτού τυροπήγματος, αναμένεται να δώσει υψηλότερη απόδοση παραγωγής τυριού (Kübarsepp et al., 2005). Η πήξη του γάλακτος που προκαλείται από την πυτιά μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η ενζυμική υδρόλυση κατά την οποία το ένζυμο πυτιάς διαχωρίζει τα καζεΐνομακροπεπτίδια από την κ-καζεΐνη, με αποτέλεσμα την εξαφάνιση της αντίστασης στη συσσωμάτωση των μικκυλίων καζεΐνης. Το δεύτερο στάδιο είναι η συσώρευση, κατά την οποία τα μικκύλια καζεΐνης συναρμολογούνται σε ένα τρισδιάστατο δίκτυο που δεσμεύει την υγρασία, το λίπος του γάλακτος και άλλα στερεά γάλακτος.

Το πρώτο στάδιο κατά την πηκτική δράση της πυτιάς περιγράφεται από μια παράμετρο που ονομάζεται χρόνος πήξης πυτιάς, που ορίζεται ως ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της

προσθήκης πυτιάς στο γάλα και της έναρξης της πήξης του τελευταίου. Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα του δεύτερου σταδίου της πήξης από την πυτιά, έχουν χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί διαφορετικές παράμετροι πήξης, οι οποίες είναι:

- (1) ο χρόνος που μεσολαβεί από την προσθήκη της πυτιάς στο γάλα ή από την έναρξη του σχηματισμού του τυροπήγματος μέχρι να επιτευχθεί σκληρότητα 20mm (k20, min).
- (2) η σκληρότητα του τυροπήγματος μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο στην περίπτωση αυτή ήταν συνολικά 60 λεπτά από την έναρξη του σχηματισμού του τυροπήγματος.

Τα δεδομένα σχετικά με το εκχύλισμα παπάγιας λείπουν καθώς δεν σημειώθηκε πήξη γάλακτος σε κανένα δείγμα γάλακτος. Κατά συνέπεια, οι προκύπτουσες ιδιότητες πήξης δεν ακολούθησαν ένα σταθερό πρότυπο για την ανίχνευση των παραμέτρων r , k20 και a60. Όσον αφορά τους χρόνους πήξης του γάλακτος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για την πυτιά μόσχου που προστέθηκε σε όλους τους τύπους γάλακτος. Είναι ενδιαφέρον ότι το εκχύλισμα *C. cardunculus* έδειξε τις χαμηλότερες τιμές του αρχικού χρόνου ενεργοποίησης στο βουβαλίσιο γάλα, ακολουθούμενο από το κατσικίσιο και τέλος το πρόβειο γάλα, ενώ απαιτείται ακόμη μεγαλύτερος χρόνος πήξης για το βόειο γάλα. Το εκχύλισμα από *F. carica* έδειξε επίσης διαφορές κατά την έναρξη της πήξης του γάλακτος, η οποία εμφανίστηκε ταχύτερα στο πρόβειο γάλα από ότι στο βουβαλίσιο γάλα. Ωστόσο, το εκχύλισμα *F. carica* δεν πέτυχε τη σταθερότητα του τυροπήγματος στο βουβαλίσιο και κατσικίσιο γάλα. Όσον αφορά την τιμή k20, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για τα εκχυλίσματα *C. cardunculus*, *F. carica* και πυτιάς μόσχου στα δείγματα γάλακτος, εκτός από την περίπτωση που προστέθηκε εκχύλισμα *F. carica* στο πρόβειο γάλα, το οποίο στη συνέχεια έλαβε τη χαμηλότερη τιμή για τη σκληρότητα του τυροπήγματος. Η παράμετρος a60 που μετρήθηκε για την πυτιά προέλευσης από μόσχο δεν ήταν σημαντικά διαφορετική στους διάφορους τύπους γάλακτος που δοκιμάστηκαν (βουβαλίσιο, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα). Το ίδιο αποτέλεσμα λήφθηκε για το εκχύλισμα *C. cardunculus* σε όλα τα προηγούμενα δείγματα γάλακτος. Μια υψηλότερη τιμή της παραμέτρου a60 λήφθηκε για το εκχύλισμα *F. carica* στο πρόβειο γάλα από ότι στο βόειο γάλα. Οι τιμές r για τα πηκτικά *C. cardunculus* και *F. carica* ήταν σημαντικά χαμηλότερες από ότι για την πυτιά μόσχου σε κάθε τύπο γάλακτος. Η σκληρότητα του τυροπήγματος στα 60

λεπτά αποδείχθηκε υψηλότερη στο βόειο γάλα που επωάστηκε με πηκτικά από πυτιά μόσχου και εκχύλισμα *F. carica*.

Η σταθερότητα του τελικού τυροκομικού προϊόντος καθορίζεται τόσο από τη σύνθεση και τη δομή των μικκυλίων της καζεΐνης, όσο και από τον τρόπο υδρόλυσης αυτών των καζεϊνών. Η πυτιά και τα εκχυλίσματα *cardoon* έδωσαν παρόμοιες τιμές σκληρότητας (α60) για συγκεκριμένα υποστρώματα γάλακτος (βουβάλι, κατσίκια και πρόβατο) υποδηλώνοντας ότι τα δύο πηκτικά υδρολύουν τις καζεΐνες με παρόμοιο τρόπο, ειδικά στα αρχικά στάδια της πήξης, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη μελέτη (Chen et al., 2003). Συνολικά, οι ιδιότητες της πήξης που λαμβάνονται για τα φυτικά εκχυλίσματα και την πυτιά μοσχαριού, στο πρόβειο γάλα υποδεικνύουν ότι τα ένζυμα από φυτικές πηγές μπορούν να χρησιμεύσουν ως εναλλακτική επιλογή των ζωικών πυτιών στην τυροκομία. Το γεγονός ότι το εκχύλισμα από το φυτό *F. carica* επωάστηκε στους 35 °C με πηγμένο βουβαλίσιο και κατσικίσιο γάλα δείχνει ότι δεν είναι ιδιαίτερα κατάλληλο ως πηκτικό μέσο για την παραγωγή τυριού υπό αυτές τις συνθήκες επεξεργασίας.

3.1.3 Δραστικότητα πήξης γάλακτος εκχυλισμάτων μούρων από εννέα φυτά *Solanum*

Η δραστικότητα ενζύμων από εκχυλίσματα φυτών του γένους *Solanum*, ως προς την πήξη του γάλακτος εξετάστηκε στη μελέτη του ν. D. Guiana (2010). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν εννέα είδη του φυτού *Solanum* (*Solanum aculeastrum*, *Solanum aethiopicum*, *Solanum anomalum*, *Solanum cerasiferum*, *Solanum dasyphyllum*, *Solanum indicum*, *Solanum nigrum*, *Solanum nodiflorum* και *Solanum terminale*).

Αρχικά οι καρποί των φυτών τεμαχίστηκαν και τα κομμάτια εκχυλίστηκαν σε απεσταγμένο νερό ή διάλυμα χλωριούχου νατρίου 5% w/v. Δοκιμάστηκαν διάφοροι χρόνοι εκχύλισης, ώστε να μελετηθεί η δραστικότητα του εκχυλίσματος. Όλα τα εκχυλίσματα δείξαν πρωτεολυτική δράση, όμως το εκχύλισμα από τους καρπούς του *S. aethiopicum* είχε την υψηλότερη. Υψηλές δραστικότητες πήξης γάλακτος βρέθηκαν και στο εκχύλισμα από *S. cerasiferum* που λήφθηκε μετά από 24 ώρες εμποτισμού αποξηραμένων μούρων σε διάλυμα NaCl 5%. Ικανοποιητική όμως δραστικότητα στην πήξη του γάλακτος αλλά και χαμηλή πρωτεολυτική δράση βρέθηκε στο εκχύλισμα από *S. aethiopicum* που ελήφθη με τις ίδιες συνθήκες.

Γενικά, η δραστηριότητα του εκχυλίσματος στην πήξη του γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο εκχύλισης των ενζύμων που θα διαδραματίσουν πρωτεύοντα ρόλο στην πήξη. Για παράδειγμα η ενζυμική εκχύλιση από φρέσκα μούρα *S. aculeastrum* ήταν αρχικά ταχύτερη μέχρι την ένατη ώρα εμποτισμού του καρπού στο εκχυλιστικό μέσο. Ωστόσο, η δραστηριότητα του ενζύμου μειώθηκε σημαντικά για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης του. Όμοια η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος των εκχυλισμάτων από *S. anomalum*, *S. dasyphyllum*, *S. indicum* και *S. nigrum* φρέσκων μούρων αυξήθηκε σε δείγματα ενζύμων όπου η διάρκεια της εκχύλισης ήταν δεκαπέντε ώρες, ενώ μειώθηκε μετά από αυτό το διάστημα. Η πήξη του γάλακτος από φρέσκα μούρα *S. Cerasiferum* αυξήθηκε σημαντικά με το χρόνο εκχύλισης μέχρι τις 24 ώρες. Η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος των εκχυλισμάτων από *S. eathiopticum* και *S. cerasiferum* φρέσκων μούρων είναι μεγαλύτερες από τα εκχυλίσματα των *S. terminale*, *S. nigrum*, *S. dasyphyllum*, *S. indicum*, *S. nodiflorum*, *S. anomalum* και *S. aculeastrum*. Η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος δεν ήταν αισθητά διαφορετική μεταξύ των εκχυλισμάτων από μούρα *S. eathiopticum* και *S. cerasiferum*. Όλα τα ένζυμα πήξης του γάλακτος εκχυλίστηκαν σε απεσταγμένο νερό.

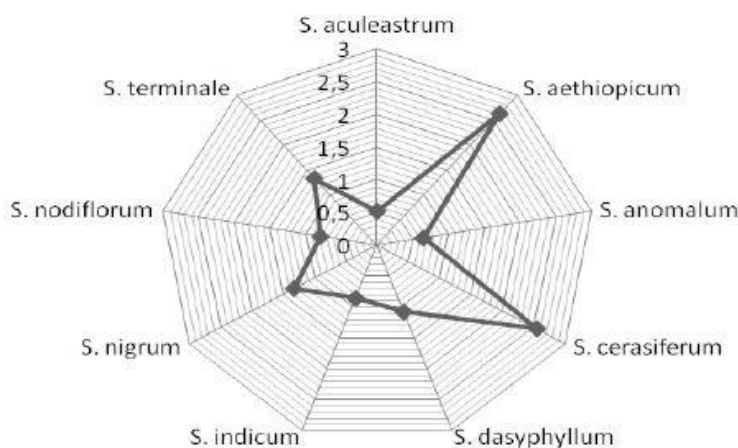
Όταν τα φρέσκα μούρα εμποτίστηκαν σε 5% (w/v) διαλύματος NaCl, η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος ήταν υψηλότερη από αυτή που ελήφθη στο απεσταγμένο νερό. Η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων από φρέσκα μούρα *S. aethiopicum* και *S. cerasiferum* ήταν η υψηλότερη και αυξήθηκε σημαντικά έως τις 15 και 24 ώρες για το *S. cerasiferum* και το *S. aethiopicum*, αντίστοιχα. Ωστόσο, η δραστηριότητα των άλλων εκχυλισμάτων από φρέσκα μούρα αυξήθηκε με το χρόνο εκχύλισης και μειώθηκε μετά από 24 ώρες (*S. nodiflorum* και *S. terminale*), 15 ώρες (*S. Anomalum*, *S. Indicum* *S. Nigrum* και *S. dasyphyllum*) και 9 ώρες (*S. aculeastrum*) συνολικού χρόνου εκχύλισης. Η εξαγωγή του ενζύμου από αυτά τα φρέσκα μούρα ήταν ταχύτερη τις πρώτες 9 ώρες. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων *S. cerasiferum* και *S. aethiopicum* των φρέσκων καρπών κατά τη διεργασία της εκχύλισης. Η χρήση διαλύματος άλατος ως εκχυλιστικού μέσου ήταν εξίσου αποτελεσματική με τη χρήση του απεσταγμένου νερού, όσον αφορά την ποσότητα του εκχυλισμένου ενζύμου.

Σε όλες τις περιπτώσεις η ενζυμική εκχύλιση αυξήθηκε με τον χρόνο εκχύλισης μέχρι τη βέλτιστο σημείο. Μετά από αυτό, η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος μειώθηκε (*S. aethiopicum*, *S. cerasiferum*, *S. dasyphyllum*, *S. nigrum* και *S. terminale*) ή παρέμεινε σταθερή

(*S. aculeastrum*, *S. anomalum*, *S. indicum*, *S. nodiflorum*). Η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος με χρήση διαλύματος αλατιού ως εκχυλιστικό μέσο, ήταν υψηλότερη από αυτή που λήφθηκε με την εκχύλιση των φρέσκων μούρων σε απεσταγμένο νερό. Η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των εκχυλισμάτων από μούρα *S. aethiopicum* και *S. cerasiferum*, τα οποία είχαν τη μεγαλύτερη δραστηριότητα μετά από 24 ώρες εμποτισμού. Τα αποξηραμένα μούρα απελευθέρωσαν τα περισσότερα ένζυμα για την πήξη του γάλακτος στο απεσταγμένο νερό σε σχέση με τα φρέσκα, λόγω του ότι η διαδικασία ξήρανσης μπορεί να είχε αποδυναμώσει ένα κυτταρικό στρώμα γύρω από την κυτταρική μεμβράνη, καθιστώντας έτσι τα ένζυμα για την πήξη του γάλακτος πιο διαθέσιμα κατά την εκχύλιση. Η δράση στην πήξη του γάλακτος ήταν εμφανέστερη κατά τη διάρκεια των πρώτων 15 ωρών εκχύλισης για *S. aculeastrum*, *S. dasyphyllum*, *S. indicum* και *S. terminale* και για διάρκεια 24 ωρών εκχύλισης για *S. anomalum*, *S. aethiopicum*, *S. cerasiferum*, *S. nigrum* και *S. nodiflorum*. Η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος αυτών των εκχυλισμάτων ήταν υψηλότερη από τα πηκτικά προερχόμενα από φρέσκα μούρα σε διάλυμα αλατιού, αποξηραμένα μούρα σε απεσταγμένο νερό και φρέσκα μούρα σε απεσταγμένο νερό. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ένζυμα πήξης του γάλακτος από τα φυτά που εκχυλίστηκαν με ταυτόχρονη εμβάπτιση ξηρού βιολογικού υλικού σε διάλυμα άλατος, μπορεί να αυξήσει τη διαθεσιμότητα ενζύμων πήξης του γάλακτος.

Η Εικόνα 10 δείχνει την ταξινόμηση των διαφορετικών εκχυλισμάτων για την πήξη του γάλακτος από κάθε φυτό *Solanum* στην κλίμακα από 0,0 έως 3,0. Η μέγιστη δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος κυμαινόταν από 0,5 έως 2,6U/mL για ακατέργαστο διάλυμα ενζύμου που παρασκευάστηκε με εμβάπτιση αποξηραμένων φυτικών καρπών σε διάλυμα NaCl 5% (w/v). Η Εικόνα 10 δείχνει επίσης ότι το εκχύλισμα από *S. aethiopicum* είχε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα πήξης γάλακτος ακολουθούμενο από εκχυλίσματα από *S. cerasiferum*, *S. terminale*, *S. nigrum*, *S. dasyphyllum*, *S. indicum*, *S. nodiflorum*, *S. anomalum* και *S. aculeastrum*. Η δραστηριότητα στην πήξη του γάλακτος του εκχυλίσματος από μούρα *S. aethiopicum* ήταν ισοδύναμη με το εκχύλισμα από σπόρους *S. dobium* και υψηλότερη από το εκχύλισμα από ολόκληρα μούρα *S. dobium*, που παρασκευάστηκε με εκχύλιση των καρπών σε διάλυμα NaCl 5% για 7 ημέρες. Το εκχύλισμα από τα μούρα *S. aethiopicum* θα μπορούσε να είναι ένα αξιόπιστο συστατικό στην τυροκομία για τους παραγωγούς τυροκομικών προϊόντων, επειδή

αυτά τα μούρα είναι βρώσιμα, φθηνά και άμεσα διαθέσιμα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του εκχυλίσματος από τα μούρα *S. aethiopicum* είναι η χαμηλή πρωτεολυτική δράση, γεγονός που θα μπορούσε να ενισχύσει το ενδιαφέρον αυτού του εκχυλίσματος στην τεχνολογία παραγωγής των γαλακτοκομικών προϊόντων. Περαιτέρω μελέτες διεξάγονται για την απομόνωση ενζύμων πήξης του γάλακτος από τη φλούδα και τους σπόρους των μούρων *S. aethiopicum*, με στόχο να προσδιοριστεί το τμήμα του μούρου που απελευθερώνει τα μέγιστα ένζυμα για την πήξη του γάλακτος. Πειράματα πραγματοποιήθηκαν με εκχύλισμα μούρων του φυτού *S. aethiopicum* ως πηκτικό για να προσδιοριστούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού που προκύπτει.



Εικόνα 10: Ταξινόμηση μορφής ραντάρ της δραστικότητας πήξης του γάλακτος (10 IU/mL) μέσω εκχυλισμάτων στην κλίμακα από 0,0 έως 3,0 (v. D. Guïama*, 2010).

Μελετήθηκαν λεπτομερώς η οξύτητα, το ξηρό βάρος, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, η δραστικότητα στην πήξη του γάλακτος, η πρωτεολυτική δράση και η δραστικότητα πήξης γάλακτος προς την πρωτεολυτική δράση των εκχυλισμάτων που παρασκευάζονται με εμβάπτιση αποξηραμένων μούρων σε διάλυμα NaCl 5% αλλά και ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης. Το pH κυμαινόταν από 4,8 για το *S. nigrum* έως 5,3 για το *S. aethiopicum*. Οι τιμές που ελήφθησαν ήταν υψηλότερες από το pH της ισοηλεκτρικής κατακρήμνισης. Έτσι, η δραστικότητα πήξης του γάλακτος που παρατηρήθηκε αποδόθηκε αποκλειστικά στην ενζυμική δραστικότητα. Η διεργασία πήξης του γάλακτος από πρωτεολυτικά ένζυμα είναι πολύ σημαντική γενικά στη γαλακτοκομική βιομηχανία αλλά και ιδιαίτερα στην τυροκομία. Η ενζυμική πήξη του γάλακτος περιλαμβάνει μια ειδική υδρόλυση του δεσμού Phe-Met της κ-

καζεΐνης που καλύπτει τα πρωτεϊνικά μικκύλια. Εκχυλίσματα από το φυτό *Solanum* εμφάνισαν έντονη πρωτεολυτική δράση. Το εκχύλισμα από το φυτό *S. cerasiferum* είχε την υψηλότερη πρωτεολυτική δράση που μπορεί να αποθαρρύνει τη χρήση του ως πηκτικό του γάλακτος. Όλα τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να πήξουν το γάλα, ωστόσο το σημαντικότερο από αυτά με τη μεγαλύτερη απόδοση είναι η ρενίνη. Η ρενίνη είναι ένα ένζυμο ικανό για την παραγωγή τυριού, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή δραστικότητα πήξης του γάλακτος σε συνδυασμό με τη χαμηλή πρωτεολυτική δράση. Η αναλογία μεταξύ της πήξης του γάλακτος και της πρωτεολυτικής δραστικότητας του εκχυλίσματος από τα φυτά *Solanum* ήταν υψηλότερη από 1,0, γεγονός που δείχνει ότι η δραστικότητα στην πήξη του γάλακτος ήταν υψηλότερη από την πρωτεολυτική δραστικότητα και επομένως το εκχύλισμα από το *S. aethiopicum* εμφάνιζε την υψηλότερη τιμή R. Το R μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για να δικαιολογήσει την επάρκεια του ενζυμικού εκχυλίσματος για χρήση ως υποκατάστατο της πυτιάς μόσχου. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ακατέργαστο διάλυμα ενζύμου από τους καρπούς του *S. aethiopicum* μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως πηκτικό του γάλακτος στην τεχνολογία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων.

3.2 Εφαρμογές σε βιομηχανική κλίμακα

Λόγω της σημασίας τους για στον τομέα της παραγωγής τυριού, η βιομηχανική παραγωγή AP από γαϊδουράγκαθο έχει αποτελέσει θέμα εκτενούς ερευνητικής μελέτης. Το γεγονός αυτό απέδωσε αρκετές έρευνες σχετικά με τη λειτουργία και τη χρήση αυτών των APs σε συστήματα όπως οι ζυμομύκητες, τα βακτήρια και οι καλλιέργειες φυτικών κυττάρων.

Η απομόνωση της κυπροσίνης B μελετήθηκε σε *Pichia pastoris* και *Saccharomyces cerevisiae*. Η χρήση του *P. pastoris* οδήγησε στην επεξεργασία του ενζύμου με αποτέλεσμα την ατελή απομάκρυνση του PSI και την απομόνωση μιας μορφής πρωτεΐνης με μεγάλες αλλά και μικρές αλυσίδες που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Αυτό οδήγησε σε διαφορές στη δομή και την καταλυτική απόδοση της πρωτεΐνης - ενζύμου. Πιο πρόσφατα, ένα AP απομονώθηκε από ένα είδος ακρίδας (*Galium verum* L.). Σε αυτή την ερευνητική προσπάθεια, οι ερευνητές παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που έχουν αναφερθεί για την κυπροσίνη B: η πρωτεΐνη βρέθηκε στο μέσο καλλιέργειας, με τις δύο αλυσίδες που την αποτελούν να συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς.

Ωστόσο, μια βαθύτερη ανάλυση σε όλη την καμπύλη ανάπτυξης αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη εκκρίθηκε στο μέσο καλλιέργειας στην ακατέργαστη μορφή της και έλαβε χώρα περαιτέρω επεξεργασία λόγω αλλαγών στην οξύτητα του μέσου καλλιέργειας. Σε κάποιο χρονικό σημείο το μέσο έγινε όξινο, οδηγώντας σε αλλαγή της εκκρινόμενης μορφής της πρωτεΐνης. Η έκφραση σε *Saccharomyces cerevisiae* έδειξε διαφορετικά αποτελέσματα: η ανασυνδυασμένη κυπροσίνη B εκκρίθηκε εν μέρει στο μέσο καλλιέργειας ως μίγμα ενεργών αλλά και ανενεργών μορφών. Ωστόσο, η διαδικασία απελευθέρωσης ήταν περιορισμένη και ένα σημαντικό μέρος της πρωτεΐνης διατηρήθηκε εντός του κυττάρου. Αυτό καθιστά την όλη διαδικασία εξαρτημένη από την παραγωγή της απαιτούμενης βιομάζας και περιορίζει τη βιομηχανική χρήση της. Στην πραγματικότητα, ένα από τα προβλήματα που σχετίζονται με την παραγωγή APs γαϊδουράγκαθου σε διαφορετικά συστήματα είναι οι διαφορετικές συμπεριφορές τους σε αυτά τα συστήματα. Με άλλα λόγια, ένα σύστημα που λειτουργεί για την παραγωγή και απομόνωση ενός ενζύμου μπορεί να μη λειτουργεί για ένα άλλο.

Οι Almeida et al., 2015 ανέπτυξαν μια μέθοδο που επέτρεψε την παραγωγή και έκκριση συνθετικής καρδοσίνης B (VRen) στο *Kluyveromyces lactis* χρησιμοποιώντας τεχνικές μηχανικής απομόνωσης των παραγόμενων πρωτεϊνών. Οι αλλαγές που εισήχθησαν στη δομή του ενζύμου περιλάμβαναν την αφαίρεση του PSI και την ένωση των δύο υπομονάδων μέσω ενός συνδετικού μορίου γλυκίνης. Αυτή η μέθοδος επέτρεψε στη συνθετική μορφή της καρδοσίνης B να παραχθεί και να εκκριθεί στο μέσο καλλιέργειας στην ανενεργή της όμως μορφή, απαιτώντας ένα επόμενο βήμα ενεργοποίησης με όξινο pH για να ληφθεί το λειτουργικό ένζυμο. Αυτός ο τρόπος παραγωγής είχε ήδη αξιοποιηθεί σε μελέτες που αφορούσαν την έκφραση της ανασυνδυασμένης καρδοσίνης A στο βακτήριο *Escherichia coli*, στις οποίες η απομάκρυνση του PSI οδήγησε στον σχηματισμό μιας πρωτεΐνης μονής αλυσίδας. Η ανασυνδυασμένη καρδοσίνη A μονής αλυσίδας ήταν ενεργή, με μικρές διαφορές στην εξειδίκευσή της για αμινοξέα στη θέση P1' σε σύγκριση με την κανονική ανασυνδυασμένη καρδοσίνη A. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης καρδοσίνης B, η οποία εμφάνισε και αυτή διαφορετική εκλεκτικότητα. Η μορφή της μονής αλυσίδας έδειξε πιο μεγάλη εξειδίκευση, αλλά και χαμηλότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τη φυσική καρδοσίνη B. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι αυτή η διαφορά οφείλεται σε πιθανή μειωμένη ευκαμψία του ενζύμου στην C-τερματική περιοχή

λόγω της άμεσης σύντηξης του σε βαριές και σε ελαφριές αλυσίδες (Almeida et al., 2017). Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό και θα μπορούσε να έχει μεγάλο αντίκτυπο στην επιτυχή εφαρμογή της συνθετικής καρδοσίνης B στην τυροκομία σε βιομηχανική κλίμακα. Η καρδοσίνη A συχνά τονίζεται ως πιο κατάλληλη για την πήξη του γάλακτος, λόγω της υψηλότερης εξειδίκευσής της αλλά και της χαμηλότερης πρωτεολυτικής της δραστηριότητας, σε σύγκριση με την καρδοσίνη B. Ωστόσο, η ποσότητα της καρδοσίνης A που απαιτείται για την πήξη του γάλακτος έχει βρεθεί ότι είναι 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή της καρδοσίνης B, δηλαδή, η ειδική δραστηριότητα της καρδοσίνης A είναι χαμηλότερη από αυτή της καρδοσίνης B. Αυτές οι αναφορές καταδεικνύουν τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλης κλίμακας συνθετικής καρδοσίνης B και τις τεράστιες δυνατότητες καινοτομίας που υπάρχουν με την εφαρμογή της μηχανικής πρωτεϊνών σε αυτό τον τομέα. Λόγω της πιο ειδικής πρωτεολυτικής της δράσης, η συνθετική καρδοσίνη B έχει τη δυνατότητα να είναι η πρώτη από τις καρδοσίνες που θα μπορεί να γίνει βιώσιμη για εφαρμογή της στη βιομηχανική κλίμακα παραγωγής τυροκομικών προϊόντων. Ωστόσο, και παρά τη σημαντική αυτή ανακάλυψη, αυτά τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν τις δυσκολίες ανάπτυξης μιας βιοτεχνολογικής λύσης που είναι κατάλληλη για την εμπορική εκμετάλλευση όλων των φυτικών AP.

Παρά την αφθονία τους στη φύση και την οικονομική τους σημασία, τα φυτικά AP εξακολουθούν να είναι ελάχιστα μελετημένα σε σχέση με τους μηχανισμούς διαλογής, τις λειτουργίες και τις δομές τους. Από τα φυτικά AP που έχουν διερευνηθεί, οι καρδοσίνες είναι από τις καλύτερα μελετημένες για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Όπως συζητήθηκε, η παραγωγή φυτικών APs χρησιμοποιώντας εναλλακτικές πλατφόρμες επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την πλατφόρμα έκφρασης που χρησιμοποιείται και τη μορφή της πρωτεΐνης που παράγεται. Η παραγωγή φυτικών AP σε λύσεις που βασίζονται σε φυτά μπορεί να είναι η λύση που να επιτρέπει τη βιομηχανική εκμετάλλευση των AP. Τα φυτικά συστήματα προσφέρουν τους ίδιους δομικούς και βασικούς μηχανισμούς που υπάρχουν στη φύση για την έκφραση και την επεξεργασία των APs, καθιστώντας έτσι την παραγωγή των AP παρόμοια με αυτή που συμβαίνει στη φύση. Αυτό το γεγονός πιθανώς εξηγεί γιατί η κυπροσίνη B καθαρίστηκε στην ενεργή της μορφή όταν εκφράστηκε σε καλλιέργειες εναιωρήματος κυττάρων γαϊδουράγκαθου. Η αναφερθείσα έρευνα έχει ήδη δώσει τα ίδια αποτελέσματα για την έκφραση της καρδοσίνης B σε καλλιέργειες αιωρήματος κυττάρων BY2. Αυτό είναι ένα

πλεονέκτημα σε σχέση με άλλες πλατφόρμες έκφρασης και αποτρέπει το βήμα ενεργοποίησης κατά την κατάντη επεξεργασία. Ωστόσο, η ομοιότητα των πλατφορμών παραγωγής με βάση τα φυτά προέλευσης του ενζύμου, οδηγεί επίσης σε συσσώρευση APs στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, μειώνοντας την έκκριση της πρωτεΐνης στο μέσο καλλιέργειας και παρεμποδίζοντας την επεκτασιμότητά της. Οι στρατηγικές της πρωτεϊνικής μηχανικής που εφαρμόστηκαν στην καρδοσίνη B, δηλαδή η αφαίρεση του τμήματος PSI, επέτρεψαν την έκκριση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η ίδια στρατηγική που εφαρμόστηκε στην καρδοσίνη B που εκφράζεται σε BY2 δεν ήταν το ίδιο επιτυχημένη.

Συλλογικά, η γνώση που έχει αποκτηθεί μέχρι σήμερα υποστηρίζει τη χρήση ενζύμων από φυτικά κύτταρα ως εναλλακτικές πλατφόρμες για την παραγωγή APs και ενθαρρύνει μελλοντικές μελέτες για περαιτέρω ανάπτυξη αυτών των πλατφορμών. Η έκκριση APs από γαϊδουράγκαθο στο μέσο καλλιέργειας και οι στρατηγικές για την αύξηση των αποδόσεων παραγωγής και επίσης για τη διευκόλυνση των διαδικασιών καθαρισμού είναι ερευνητικά πεδία που πρέπει να διερευνηθούν στο εγγύς μέλλον προκειμένου να ενισχυθούν αυτές οι πλατφόρμες ως πηγές APs. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η προώθηση της πήξης του γάλακτος από εκχυλίσματα ανθών γαϊδουράγκαθου είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής δραστηριότητας όλων των APs, η οποία ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών του γαϊδουράγκαθου. Η ανάπτυξη πλατφορμών ικανών να παράγουν μεμονωμένα AP για γαϊδουράγκαθο θα επέτρεπε τη χρήση μεμονωμένων ή συνδυασμένων ενζυμικών σκευασμάτων στη διαδικασία παραγωγής του τυριού, οδηγώντας στην ανάπτυξη νέων και προσαρμοσμένων προϊόντων. Αυτό θα μπορούσε επίσης να συμβάλει στον αυξημένο έλεγχο των διαδικασιών παραγωγής του τυριού που χρησιμοποιούν APs από γαϊδουράγκαθο και να επιτρέψει την υιοθέτησή τους σε βιομηχανική κλίμακα.

Συμπεράσματα

Διαφορετικοί τύποι πρωτεασών παραγόμενων από φυτά χρησιμοποιούνται στη διαδικασία πήξης του γάλακτος στην τυροκομία. Η βιομηχανική χρήση τους είναι πρακτικά μη εφαρμόσιμη λόγω της έντονης πικράδας που προσδίδουν στο τελικό προϊόν και της χαμηλότερης απόδοσης τυριού που δίνουν. Ωστόσο, η έρευνα για την κατανόηση της δράσης τους επάνω στις πρωτεΐνες του γάλακτος, κατά τη διάρκεια της ζελατινοποίησης καθώς και ο έλεγχος των διαφόρων παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαδικασία παραγωγής τυριού υποδηλώνουν την επιθυμία για μετάβαση στη χρήση φυτικής προέλευσης πηκτικών. Στη βιβλιογραφία, οι ρεολογικές ιδιότητες των πηκτωμάτων γάλακτος και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τυριών που παράγονται από φυτικές πυτιές διέφεραν ανάλογα με τον τύπο του πηκτικού, τις ενζυμικές του δραστηριότητες κατά την ενζυμική τους δράση και τη συγκέντρωσή του πηκτικού. Άλλες φυσικοχημικές παράμετροι μπορεί επίσης να συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας των πηκτωμάτων και των τυριών, όπως η οξύτητα του γάλακτος, η θερμοκρασία ζελατινοποίησης, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος ή η υπερδιήθησή του και η προσθήκη αλατιού κατά την ωρίμανση. Στην πραγματικότητα, η επιλογή ενός κατάλληλου φυτικού πηκτικού με την καλύτερη αναλογία MCA/PA, τη χρήση χαμηλής δόσης πηκτικού, τη βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων της πήξης και τον έλεγχο του σταδίου ωρίμανσης θα μπορούσαν να δώσουν εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά τις ρεολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες (υφή και γεύση) των τυριών που παράγονται από φυτικές πυτιές. Για ένζυμα πήξης του γάλακτος με υψηλή πρωτεολυτική δράση, έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές βελτίωσης για την παραγωγή τυριών παρόμοια με αυτά που παρασκευάζονται με πυτιά του είναι διαθέσιμη στο εμπόριο. Η καλή επιλογή του τύπου γάλακτος για συγκεκριμένη ποικιλία τυριού (μη ώριμο τυρί) παίζει σημαντικό ρόλο στην εμπορική επιτυχία των τυριών που παρασκευάζονται με αυτά τα πηκτικά. Παρά την ανάπτυξη που παρατηρήθηκε για ορισμένα είδη τυριών, η παραγωγή τους σε βιομηχανική κλίμακα παραμένει οριακή. Μεταγενέστερες ερευνητικές μελέτες για την παραγωγή φυτικών εκχυλισμάτων, χωρίς δράση πρωτεάσης ή που έχουν υποβληθεί σε ειδικές επεξεργασίες για τη μείωση της υπερβολικής πρωτεόλυσης θα έχουν πολύ μεγάλη εμπορική σημασία. Η δημιουργία αποτελεσματικών σκευασμάτων φυτικής πυτιάς (υψηλής δραστηριότητας ως προς την παραγωγή τυριού) που θα

μπορούν να εμπορευματοποιηθούν επιτυχώς, θα είναι επίσης σημαντική για μελλοντικές χρήσεις σε παραγωγή τυριού σε βιομηχανική κλίμακα.

Βιβλιογραφία

- Almeida, C. M., & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4675–4686.
- Anusha, R., Singh, M. K., & Bindhu, O. S. (2014). Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *European Food Research and Technology*, 238(6), 997–1006.
- Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), S76–S93.
- Cavalli, S. V., Lufrano, D., Colombo, M. L., & Priolo, N. (2013). Properties and applications of phytepsins from thistle flowers. *Phytochemistry*, 92, 16–32.
- Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2012). Nutritional and functional properties of *Cynara* crops (globe artichoke and cardoon) and their potential applications: A review. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(2).
- Duarte, P., Pissarra, J., & Moore, I. (2008). Processing and trafficking of a single isoform of the aspartic proteinase cardosin A on the vacuolar pathway. *Planta*, 227(6), 1255–1268.
- Fox, P. F. ., McSweeney, P. L. H. ., Cogan, T. M. ., & Guinee, T. P. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science*. New York: Springer US. 121–183.
- Garg, S. K., & Johri, B. N. (1994). Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, 10(3), 313–355.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A. C., & Pais, M. S. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), 1405–1410.
- Huppertz, T. ., Fox, P. F. ., & Kelly, A. L. (2018). 3—*The caseins: Structure, stability, and*

- functionality. In Proteins in Food Processing, 2nd ed.; Yada, R.Y., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2018.*
- Katsaros, G. I., Tavantzis, G., & Taoukis, P. S. (2010). Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 47–51.
- Kumari, M., Sharma, A., & Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*, 131(4), 1295–1303.
- Lacroix, C. ., Verret, P. ., & Emmons, D. B. (1993). *Design of Experiments and Statistical Treatment of Yield Data [In Cheesemaking];* FAO: Rome, Italy.
- Liburdi, K., Boselli, C., Giangolini, G., Amatiste, S., & Esti, M. (2019). An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species. *Foods*, 8(12), 600.
- Low, Y. H., Agboola, S., Zhao, J., & Lim, M. Y. (2006). (2006). Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*, 16(4), 335–343.
- Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., Ramírez-Suarez, J. C., de Jesús Torres-Llanez, M., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2013). Sour orange Citrus aurantium L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 325–330.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2011). Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 148–153.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5–16.
- Sharma, A., Kumari, M., & Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*. *Process Biochemistry*, 47(6), 914–921.
- Silvestre, M. P. C., Carreira, R. L., Silva, M. R., Corgosinho, F. C., Monteiro, M. R. P., & Morais, H.

- A. (2012). Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1824–1831.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (1997). Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und-Forschung A*, 205(2), 97–103.
- Tejada, L., Gomez, R., & FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. O. S. É. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Quality*, 30(1), 91–103.