



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**PROPRIETÀ COAGULANTI DEI CAGLI  
VEGETALI OTTENUTI DAI FIORI DI  
ALCUNE SPECIE DI *CYNARA***

**MILK-CLOTTING ACTIVITY PROPERTIES  
OF VEGETABLE RENNETS FROM FLOWERS  
OF *CYNARA* SPECIES**

TIPO TESI: Compilativa

Studente:  
DANIELE MAZZOLI

Relatore:  
PROF. NADIA RAFFAELLI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

PROPRIETÀ COAGULANTI DEI CAGLI  
VEGETALI OTTENUTI DAI FIORI DI  
ALCUNE SPECIE DI *CYNARA*

MILK-CLOTTING ACTIVITY PROPERTIES  
OF VEGETABLE RENNETS FROM FLOWERS  
OF *CYNARA* SPECIES

TIPO TESI: Compilativa

Studente:  
DANIELE MAZZOLI

*Daniele Mazzoli*

Relatore:  
PROF. NADIA RAFFAELLI

*Nadia Raffaelli*

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

A mio padre Andrea.

# SOMMARIO

SOMMARIO.....	1
ELENCO DELLE TABELLE.....	2
ELENCO DELLE FIGURE.....	3
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	4
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	5
1. SPECIE DEL GENERE CYNARA AD ATTIVITA' COAGULANTE.....	6
2. IL CAGLIO VEGETALE.....	8
2.1 Proprietà e caratteristiche degli estratti vegetali.....	9
3. PROTEASI ASPARTICHE PRESENTI NEL CAGLIO VEGETALE.....	16
3.1 Proprietà delle cardosine e delle ciprosine.....	17
3.2 Ciprosina B ricombinante.....	19
3.3 Cardosine ricombinanti.....	21
4. FORMAGGI OTTENUTI CON CAGLIO VEGETALE.....	25
4.1 Differenze tra caglio vegetale e caglio animale.....	26
4.2 Formaggio DOC Portoghese "Serra de Estrela.....	28
4.2.1 Produzione del formaggio Serra.....	30
4.2.2 Caratteristiche chimiche del formaggio Serra.....	31
4.3 Formaggio DOP "Los Pedroches" ottenuto con <i>C.cardunculus</i> o <i>C.humilis</i> per verificare eventuali affinità tra le due specie.....	32
CONCLUSIONI.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Contenuto di cardosine totali nei diversi ecotipi misurato mediante cromatografia ad esclusione molecolare. ....	14
Tabella 2. Valori di luminosità del colore durante la maturazione dei formaggi con diversi ecotipi di cardo. ....	14
Tabella 3. Caratteristiche chimiche del formaggio Serra. Per NA si intende un valore non accettabile. (Macedo et al., 1993). ....	32
Tabella 4. Valori medi e deviazione standard dell'umidità, contenuto in grassi, proteine, acido lattico, NaCl (g/100 g di formaggio), pH, Aw nei lotti di formaggio ottenuti con <i>C. cardunculus</i> (CC) o <i>C. humilis</i> (CH) durante la maturazione. ....	33
Tabella 5. Caratteristiche sensoriali dei lotti di formaggio ottenuti con <i>C. cardunculus</i> (CC) o <i>C. humilis</i> (CH) a 60 e 90 giorni di maturazione. ....	34

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. <i>Cynara cardunculus</i> .....	7
Figura 2. <i>Cynara humilis</i> .....	7
Figura 3. Valori medi di pH dell'estratto acquoso crudo ottenuto dai fiori <i>C. cardunculus</i> conservato in condizioni di refrigerazione(□), congelazione(○), e liofilizzazione a temperatura ambiente(Δ). .....	11
Figura 4. Valori medi dell'attività coagulante dell'estratto acquoso ottenuto dai fiori di <i>C. cardunculus</i> conservato in condizioni di refrigerazione(□), congelazione(○), e liofilizzazione a temperatura ambiente(Δ).....	11
Figura 5. Struttura tridimensionale di una proteasi aspartica dimerica, dove in rosso vengono evidenziati i residui di acido aspartico essenziali per l'attività catalitica e, in nero la proteina substrato dell'enzima. ....	17
Figura 6. Attività coagulante della pro-cardosina ricombinante B (pCB) prodotta in <i>K. lactis</i> cresciuto in diversi terreni di coltura. L'enzima è stato espresso per 120 ore nelle condizioni indicate ed è stata determinata l'attività di coagulazione del latte da parte dell'enzima secreto. Per YP, si intende un terreno liquido contenente lievito e peptone (utilizzato per lo sviluppo e il mantenimento dei lieviti in microbiologia). ....	22
Figura 7. Western blot con anticorpo specifico anti-cardosina B. rpCB è stato attivato per incubazione a pH 4,0 a 37 ° C per 24, 48 e 72 ore.....	23
Figura 8. Formaggio DOP "Queso de La Serena" .....	27
Figura 9 e 10. Formaggio DOC Serra de Estrela .....	28
Figura 11 e 12. Formaggio DOP spagnolo "Los Pedroches" e la zona di produzione del formaggio. ....	32

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

- SIGLA1      Inserire qui l'eventuale tavola delle sigle e delle abbreviazioni.
- SIGLA2      Questo è un esempio che mostra le caratteristiche dello stile "Abbreviazioni".
- SIGLA3      La parola "SIGLA" è formattata con lo stile di carattere "Sigla tondo". Si veda anche lo stile di carattere "Sigla corsivo": *SIGLA*. Tra la sigla e la sua spiegazione c'è uno spazio di tabulazione.

## SCOPO DELLA TESI

Con la presente tesi è stato considerato il caglio vegetale ottenuto dai fiori di *C. cardunculus* o *C. humilis* come possibile sostituto del tradizionale caglio animale nella produzione di formaggi.

Inizialmente sono state studiate le proprietà coagulanti del caglio vegetale ed in particolare le varie modalità di estrazione e conservazione.

Sono state poi spiegate le caratteristiche degli enzimi proteolitici responsabili dell'attività coagulante, evidenziandone le eventuali differenze e analogie con la chimosina.

Dalla bibliografia consultata seguente lavoro si evince che l'utilizzo degli enzimi ricombinanti potrebbe essere un'adeguata soluzione per poter standardizzare la produzione del caglio vegetale. Per questo motivo è stato approfondito all'interno dell'elaborato lo studio di questi enzimi.

Infine, sono stati presi in considerazione alcuni formaggi tradizionali spagnoli e portoghesi ottenuti con il caglio vegetale, descrivendone le proprietà sensoriali e organolettiche.



# 1. SPECIE DEL GENERE CYNARA AD ATTIVITA' COAGULANTE

Il cardo (*Cynara cardunculus L.*), appartiene al dominio *Eucaryota*, al Regno *Plantae*, alla Divisione *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordine *Asterales*, Famiglia *Asteraceae* e quindi al Genere *Cynara* che include la sola specie *C. cardunculus L.* (<http://antropocene.it/2017/05/20/cynara-cardunculus/>)

Le piante appartenenti al genere *Cynara* sono perenni, spinose, con peli unicellulari, o a volte pluricellulari, di solito dotati di ghiandole, presentano steli sviluppati semplici o ramificati nella metà superiore.

Le foglie alla base del picciolo sono alternate mentre le altre sono sessili, assenti o appena decadenti, e presentano un margine spinoso.

Presentano un involucri ovoidale, con base troncata, arrotondata o leggermente depressa.

Le brattee sono organizzate in 5-8 paia, ed il talamo (ingrossamento apicale del peduncolo) è piano o convesso.

Le piante presentano fiori ermafroditi, con corolla tubulare, zigomorfa, glabra di un color tendente al blu-violetto o bianco.

Gli stami presentano dei filamenti appiattiti, papillosi, inseriti alla base della corolla; le antere presentano estensioni connettive nella linguetta apicale, hanno una forma allungata e lanceolata.

Lo stilo è piatto, con due rami approssimativi, delimitato da un anello di peli corti.

L'Achenio è amorfo, obovoide, con sezione circolare ellittica, con superficie liscia o finemente striata.

Il pappo (appendice piumosa o leggera di alcuni frutti e di alcuni semi avente la funzione di favorire la dispersione dei semi per l'azione del vento, molto diffuso nelle *Asteraceae*), è semplice, bianco, deciduo, con 5-9 paia di peli disuguali.

Per quanto riguarda la produzione di caglio vegetale le specie del genere *Cynara* maggiormente utilizzate nell'industria lattiero-casearia sono *Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*.



*Figura 1. Cynara cardunculus*



*Figura 2. Cynara humilis*

## 2. IL CAGLIO VEGETALE

La coagulazione è la fase della caseificazione che comporta il primo cambiamento di struttura del latte (da liquido a gel) e può avvenire secondo due diverse modalità:

- Per azione degli enzimi coagulanti del caglio, ed in questo caso si parla di coagulazione presamica.
- Per destabilizzazione della caseina in seguito alla sua demineralizzazione dovuta ad acidificazione, solitamente provocata dall'azione dei batteri lattici, ed in questo caso prende il nome di coagulazione acida.

Il caglio contiene quel complesso di enzimi che sono importanti nella coagulazione presamica e che agiscono sulle caseine, più specificamente sulla k-caseina.

Il caglio può essere di diversa origine, tradizionalmente è di origine animale, ma esistono altre tipologie che sono quello vegetale, microbiologico e biotecnologico (caglio prodotto attraverso tecnologia del DNA ricombinante).

Il caglio vegetale come quello animale ha una sua tradizione, anche se è meno diffuso di quest'ultimo ci sono delle produzioni che tipicamente anche nel passato utilizzavano questo tipo di caglio.

Oggi c'è una vera e propria riscoperta di questo tipo di coagulante, grazie all'affermarsi del veganismo e del vegetarianismo. Infatti, poiché le persone vegetariane consumano alimenti a base di latte e uova, ma non a base di carne, e visto che il caglio animale è ottenuto dall'abomaso dei bovini o ovini lattanti, i vegani ed i vegetariani non potrebbero consumare formaggio ottenuto con questo tipo di coagulante. Per questo motivo negli ultimi tempi è tornata in auge la consumazione di formaggio ottenuto con caglio vegetale.

Ovviamente tra il caglio animale e vegetale ci sono delle forti differenze, in particolare per quanto riguarda le caratteristiche sensoriali ed organolettiche del prodotto finale.

Per ottenere caglio vegetale solitamente si fa un macerato di fiori o steli sminuzzati in acqua. Dopo filtrazione, il macerato viene aggiunto al latte per indurre la coagulazione.

L'uso di estratti acquosi grezzi dei fiori del genere *Cynara* come coagulanti nella produzione di formaggi di capra e pecora di alta qualità, è stato mantenuto fin dai tempi antichi.

Gli attributi reologici e le proprietà sensoriali caratteristiche dei formaggi che ne derivano hanno sempre suggerito che questo coagulante vegetale potrebbe essere usato come alternativa al caglio animale nell'industria lattiero-casearia.

La mancanza di standardizzazione della preparazione dell'estratto grezzo floreale di *Cynara cardunculus* o *Cynara humilis*, ha sempre ostacolato l'impiego del caglio vegetale nella produzione industriale su larga scala. Il problema principale è, la variabilità di questi estratti vegetali rispetto all'attività enzimatica e alla qualità microbiologica. Un problema ulteriore è dato dalle limitate risorse dei fiori.

Queste intrinseche limitazioni hanno sempre sollecitato la ricerca di strategie alternative per sviluppare forme standardizzate di caglio di origine vegetale.

Negli ultimi 20 anni sono stati intrapresi diversi approcci con questo obiettivo, con sforzi di ricerca focalizzati sia su nuove formulazioni di estratti floreali di cardo che sulla produzione di forme ricombinanti di cardosine o ciprosine. (Almeida & Simões, 2018)

Le aziende del settore lattiero caseario investendo una parte delle proprie risorse nella ricerca e lo sviluppo del caglio vegetale potrebbero riscontrare svariate opportunità come:

- Soddisfare la crescente domanda da parte dei consumatori di nuove tipologie di formaggio a base di caglio vegetale.
- Utilizzare il latte di capra e pecora (con cui vengono prodotti i formaggi a base di caglio vegetale) che hanno alti valori nutrizionali e proprietà fisico-chimiche peculiari molto apprezzate da alcune fasce di consumatori.
- Sviluppare una tipologia di caglio adeguato alla produzione di formaggi di capra e pecora su scala industriale.

## 2.1 Proprietà coagulanti degli estratti vegetali

Gli estratti di cardo sono ottenuti da fiori di *Cynara cardunculus* o da una miscela di fiori secchi di *Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*.

In letteratura sono descritte diverse procedure per la preparazione dell'estratto. Solitamente l'estratto viene preparato macinando gli stigmi dei fiori per 36 secondi, poi si procede omogeneizzando in tampone citrato 0.1 M, pH di 5.9 e infine il tutto viene centrifugato a 12000 giri per 5 minuti (Sousa & Malcata, 1998). Alternativamente un certo quantitativo di fiori secchi di *C. cardunculus* o *C. humilis* vengono macinati in un mortaio e, immersi successivamente in acqua a temperatura ambiente per circa 24 ore, infine il macerato viene filtrato utilizzando una semplice tela per formaggi. La preparazione così ottenuta prende il nome di estratto acquoso grezzo.

L'attività coagulante dell'estratto acquoso grezzo dipende da diversi fattori:

- Dall'ecotipo dei fiori di *Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*
- Dalla parte del fiore utilizzata
- Dalla fase di maturazione del fiore
- Dal tempo di essiccamento del fiore
- Dal contenuto di umidità finale

Per poter ovviare alle limitazioni dell'utilizzo dell'estratto acquoso grezzo di *C. cardunculus* o della miscela di *C. cardunculus* e *C. humilis*, è stata sviluppata e brevettata una forma in polvere di questo coagulante vegetale.

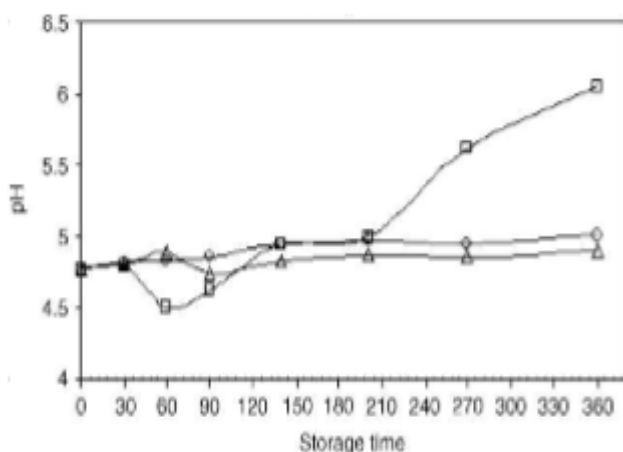
Questa nuova formulazione è stata chiamata "coagulante vegetale in polvere" (PVC), e si ottiene per liofilizzazione di estratti acquosi di fiori secchi di *C. cardunculus* ( i fiori vengono macerati in acqua per 24-36 ore, a temperatura ambiente, e con un rapporto peso/volume che varia da 1/2 a 1/10).

Tradizionalmente i produttori di formaggio hanno sempre conservato i coagulanti vegetali in condizioni di refrigerazione fino al loro utilizzo, nonostante si sapesse ancora poco o nulla sull'influenza dello stoccaggio nei confronti della qualità microbiologica e dell'attività di coagulazione.

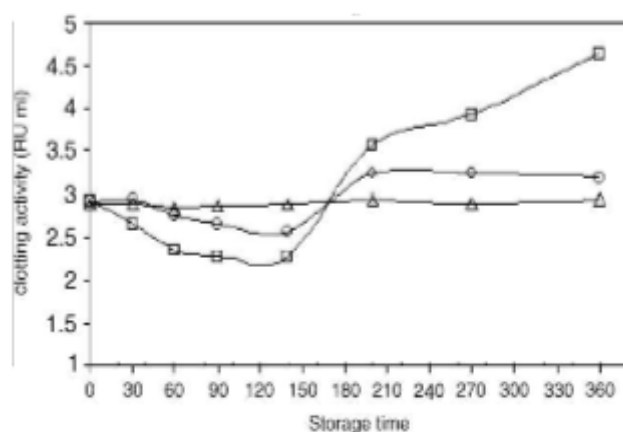
Quindi alcuni studi hanno iniziato a valutare e confrontare le condizioni di stoccaggio degli estratti, in modo da poter capire quale potesse essere il modo migliore per ottenere un prodotto finale maggiormente stabile, e in modo da poter uniformare l'attività coagulante, il pH e la qualità microbiologica dell'estratto.

In uno studio, (Tejada et al. 2008) sono stati misurati i valori di pH e dell'attività coagulante dell'estratto acquoso dei fiori di *C. cardunculus* trattato e conservato nelle seguenti condizioni:

- Estratto acquoso conservato in condizioni di refrigerazione
- Estratto acquoso conservato in condizioni di congelamento
- Estratto acquoso liofilizzato e conservato a temperatura ambiente



**Figura 3.** Valori medi di pH dell'estratto acquoso crudo ottenuto dai fiori *C. cardunculus* conservato in condizioni di refrigerazione(□), congelazione(○), e liofilizzazione a temperatura ambiente(Δ).



**Figura 4.** Valori medi dell'attività coagulante dell'estratto acquoso ottenuto dai fiori di *C. cardunculus* conservato in condizioni di refrigerazione(□), congelazione(○), e liofilizzazione a temperatura ambiente(Δ).

I risultati ottenuti mostrano che negli estratti refrigerati si ha una notevole variazione di pH: i valori di pH infatti diminuiscono nei primi 60 giorni per poi, aumentare gradualmente fino alla fine del periodo di conservazione (Fig.3). Inoltre, è stata osservata una correlazione positiva tra il pH e le conte vitali, suggerendo che l'aumento del pH potrebbe essere attribuito ad un accumulo di sostanze alcaline derivanti dal metabolismo microbico.

In questi estratti l'attività coagulante aumenta progressivamente fino a 140 giorni dall'inizio dello stoccaggio, per poi declinare marcatamente, per tutto il tempo restante dello studio (Fig.4).

La conservazione degli estratti acquosi in condizioni di congelamento provoca un leggero aumento dell'attività coagulante fino ai 140 giorni, poi un calo progressivo, anche se meno significativo di quello osservato nell'estratto refrigerato (Fig.4). Il pH ha un andamento costante per tutto il periodo di conservazione, senza subire variazioni significative (Fig.3).

Come mostrato nelle due figure, la liofilizzazione non provoca cambiamenti significativi né a carico del pH né dell'attività coagulante, che rimangono costanti per tutto l'anno di conservazione a temperatura ambiente. Ciò significa che questo tipo di conservazione non influenza l'attività degli enzimi coagulanti.

Quindi lo stoccaggio refrigerato non può essere considerato un metodo adatto per la conservazione prolungata degli estratti acquosi di cardo, poiché induce un aumento dei tempi di coagulazione e di contaminazione microbica.

Sia la liofilizzazione che la conservazione in condizioni di congelamento degli estratti acquosi si sono invece dimostrati idonei per la conservazione prolungata del coagulante vegetale.

Tuttavia, la liofilizzazione presenta dei vantaggi rispetto allo stoccaggio in condizioni di congelamento. In primo luogo, dopo 4-5 mesi di conservazione in condizioni di congelamento, l'attività di coagulazione è diminuita, mentre nell'estratto liofilizzato è rimasta costante per addirittura un anno. Secondo, i microorganismi vitali sono praticamente scomparsi dopo la liofilizzazione, mentre negli estratti congelati sono state rilevate delle cariche microbiche piuttosto elevate anche dopo 7-9 mesi di conservazione. Terzo, gli estratti liofilizzati richiedono meno spazio per la conservazione e il trasporto, occupando circa il 2% dello spazio occupato dagli estratti acquosi congelati.

Per concludere si può affermare che la liofilizzazione è il trattamento ottimale per la conservazione degli estratti vegetali utilizzati nella produzione di formaggi.

Uno studio, (Fernández-Salguero, Tejada, & Gómez, 2002) ha messo a confronto campioni di formaggio ottenuti con PVC e lotti di formaggio "Los Pedroches" ottenuti con estratto acquoso grezzo ottenuto dai fiori di *C. cardunculus*. Sono stati monitorati per circa tre mesi durante la maturazione dei prodotti diversi parametri: chimici, biochimici, microbiologici e sensoriali.

Per la maggior parte dei parametri non sono state osservate differenze tra le due tipologie di formaggio, sebbene la conta vitale per alcuni gruppi di microorganismi sia risultata più elevata nei formaggi ottenuti con estratto acquoso grezzo di *C. cardunculus*

Il coagulante vegetale in polvere (PVC) è caratterizzato dalle seguenti proprietà fisico-chimiche:

- Umidità 20-60 g Kg<sup>-1</sup>
- Proteine 150-180 g Kg<sup>-1</sup>
- pH 4.8-5
- Aw 0.2-0.34

Questa formulazione è stata utilizzata con successo nella produzione dei formaggi “Los Pedroches” e “Manchego” (due formaggi tradizionali spagnoli ottenuti da latte di pecora), e nella produzione di diversi tipi di formaggi di capra.

Anche se il PVC si è dimostrato un valido sostituto degli estratti acquosi grezzi dei fiori di *C.cardunculus* e *C.humilis*, presenta comunque delle limitazioni per un'applicazione su scala a livello industriale dovute alla disponibilità dei fiori e alla intrinseca variabilità dell'attività proteolitica. Infatti, come è stato recentemente dimostrato da alcuni autori, l'uso di diverse tipologie di estratti floreali di *C.cardunculus* per produrre il formaggio “Serra de Estrela” (formaggio DOP portoghese ottenuto da latte di pecora) ha avuto un impatto significativo sulle proprietà del prodotto finale. (Correia et al., 2016).

Gli ecotipi dei fiori di *C.cardunculus* utilizzati in questo studio sono quattro: A,B,C e D. È stato studiato come i vari ecotipi influenzano il tempo di coagulazione del latte e alcuni parametri del prodotto finale, tra cui il colore, il sapore e la consistenza. È stato osservato che il latte presenta tempi di coagulazione diversi a seconda degli ecotipi utilizzati. In particolare, l'ecotipo B dà il tempo di coagulazione più basso e contiene una concentrazione di cardosine totali tra le più alte (474 µg/ml), (fig.5), confermando che la quantità di enzima è correlata alla riduzione del tempo di coagulazione.

L'ecotipo C è quello da cui si ottiene l'estratto che dà il tempo più lungo per la completa coagulazione della materia prima e, infatti, ha mostrato una delle concentrazioni più basse di cardosine totali (422 µg/ml), (fig.5).

Il colore dei formaggi ottenuti con gli estratti di questi fiori è stato misurato dopo la produzione e lungo il periodo di maturazione del prodotto. Per studiare questo parametro è stato utilizzato un colorimetro portatile. Per ogni formaggio sono state eseguite circa 25 misurazioni, sia nella parte inferiore (bottom) che nella superiore (top).

Nella Fig.6 sono riportati i valori di luminosità L\*, che varia da 0 a 100 (rispettivamente dal nero al bianco) misurata a diversi tempi di maturazione e nel prodotto finale. Dal confronto



dei formaggi alla fine della maturazione si osserva che quelli prodotti con l'ecotipo C hanno valori di luminosità significativamente più bassi degli altri.

Da questo studio è emerso anche che i formaggi a base di ecotipo C hanno un'intensità di sapore più elevata, una diversa texture e sono più apprezzati da un punto di vista sensoriale.

Ecotipi	Cardosine totali (µg/ml)
A	453
B	474
C	422
D	419

**Tabella 1. Contenuto di cardosine totali nei diversi ecotipi misurato mediante cromatografia ad esclusione molecolare.**

Ecotype	15 dam <sup>1</sup>		30 dam <sup>1</sup>		90 dam <sup>1</sup>		90 dam <sup>1</sup>
A	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Cheese eco. A <sup>4</sup>
	71.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	67.0 ± 3.6 <sup>b</sup>	65.2 ± 2.5 <sup>a</sup>	61.8 ± 2.7 <sup>b</sup>	69.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	67.6 ± 2.6 <sup>b</sup>	
	Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		
	69.3 ± 3.2 <sup>A</sup>		63.4 ± 2.3 <sup>C</sup>		68.5 ± 1.0 <sup>B</sup>		
B	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Cheese eco. B <sup>4</sup>
	75.2 ± 2.2 <sup>a</sup>	71.0 ± 3.4 <sup>b</sup>	65.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	61.5 ± 1.9 <sup>b</sup>	68.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	68.2 ± 2.0 <sup>a</sup>	
	Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		
	73.1 ± 2.9 <sup>A</sup>		63.3 ± 2.8 <sup>C</sup>		68.7 ± 0.5 <sup>B</sup>		
C	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Cheese eco. C <sup>4</sup>
	66.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	64.5 ± 3.3 <sup>a</sup>	61.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	57.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	64.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	64.3 ± 2.4 <sup>a</sup>	
	Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		
	65.3 ± 1.5 <sup>A</sup>		59.5 ± 2.5 <sup>C</sup>		64.5 ± 0.4 <sup>B</sup>		
D	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Top <sup>2</sup>	Bottom <sup>2</sup>	Cheese eco. D <sup>4</sup>
	69.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	70.9 ± 3.5 <sup>a</sup>	65.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	63.9 ± 2.4 <sup>b</sup>	68.5 ± 1.8 <sup>a</sup>	68.9 ± 3.6 <sup>a</sup>	
	Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		Whole cheese <sup>3</sup>		
	70.4 ± 1.0 <sup>A</sup>		64.5 ± 1.1 <sup>C</sup>		68.6 ± 0.3 <sup>B</sup>		

**Tabella 2. Valori di luminosità del colore durante la maturazione dei formaggi con diversi ecotipi di cardo.**

1. *dam*: giorni di maturazione del prodotto
2. lettere minuscole diverse corrispondono a campioni statisticamente diversi
3. lettere maiuscole diverse corrispondono a campioni statisticamente diversi
4. lettere greche diverse corrispondono a campioni statisticamente diversi

Recentemente, è stato sviluppato un concentrato di ciprosina ottenuto mediante macerazione di fiori secchi di *C. cardunuculus* attraverso un'estrazione a bassa temperatura con fosfato di sodio a pH 7.4 (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=551>).

Questo nuovo tipo di formulazione è addizionato di cloruro di sodio utilizzato come stabilizzante e benzoato di sodio come preservante, ed è commercializzato sia in polvere che in forma liquida, con il marchio registrato “Cynzime™”, dalle compagnie “Fytozimus Biotech inc.” (Edmonton, Canada) e “Enzyme Development Corporation” (New York, USA). Essendo prodotto da estratti vegetali, “Cynzime™” presenta gli stessi limiti e problemi del PVC per quanto riguarda la sua potenziale applicazione nei processi di produzione su larga scala. (Almeida & Simões, 2018)

### 3. PROTEASI ASPARTICHE PRESENTI NEL CAGLIO VEGETALE

Gli enzimi sono dei catalizzatori biochimici di natura proteica, hanno la capacità di accelerare una reazione chimica specifica.

Essi hanno un alto grado di specificità per i loro substrati e agiscono in soluzione acquosa a temperatura e pH ottimali.

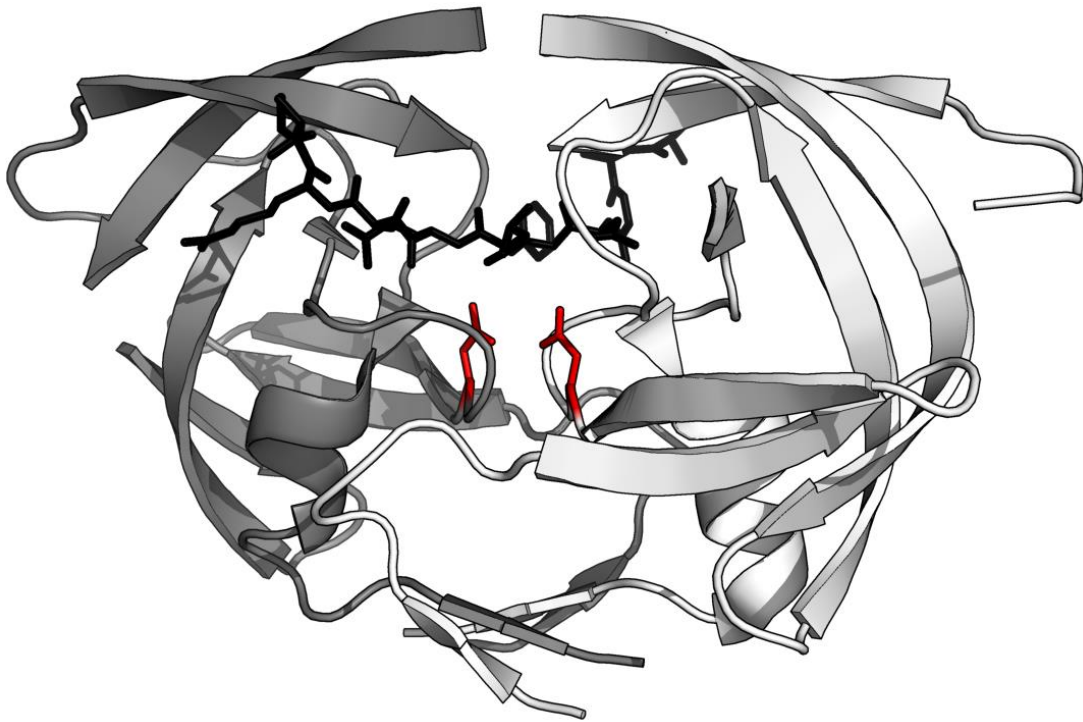
Ad eccezione di un piccolo gruppo di molecole di RNA catalitico, tutti gli enzimi sono proteine, e la loro attività catalitica dipende dall'integrità della loro conformazione proteica nativa, se un enzima viene denaturato o dissociato in subunità, perde la sua attività catalitica.

Gli enzimi, come tutte le proteine, hanno un peso molecolare che può variare da circa 12000 a oltre un milione. Alcuni enzimi necessitano per esplicare la loro attività di componenti chimici aggiuntivi che prendono il nome di cofattori. Un cofattore può essere costituito da uno o più ioni inorganici (es.  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), oppure da complesse molecole organiche chiamate coenzimi che agiscono come trasportatori transitori di gruppi funzionali specifici, come ad esempio il NAD o il FAD che trasportano elettroni. (David L. Nelson, Michael M. Cox, 2015). Gli enzimi vengono classificati per convenzione internazionale in sei classi principali, in base al tipo di reazione chimica che catalizzano.

1. Ossidoreduttasi, enzimi che catalizzano reazioni che coinvolgono il trasferimento di elettroni.
2. Trasferasi, enzimi che catalizzano reazioni di trasferimento di gruppi funzionali.
3. Idrolasi, enzimi che catalizzano reazioni di idrolisi.
4. Liasi, enzimi che catalizzano reazioni che provocano la scissione dei legami C-C, C-O, C-N o di altro tipo.
5. Isomerasi, enzimi che catalizzano reazioni che coinvolgono il trasferimento di gruppi all'interno di molecole per formare degli isomeri
6. Ligasi, enzimi che catalizzano reazioni che provocano la formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N mediante reazioni di condensazione accoppiate alla scissione di ATP.

Le proteasi sono idrolasi, in grado di catalizzare idrolisi del legame peptidico delle proteine.

Il caglio vegetale ottenuto dagli estratti di *C.cardunculus* o *C.humilis* è costituito da due tipi di proteasi ad acido aspartico (amminoacido necessario all'enzima per esplicare la propria attività): in particolare le cardosine e le ciprosine. Questi, enzimi, come la chimosina, idrolizzano il legame peptidico tra gli aminoacidi Phe-105 e Met-106 della caseina-k, ma a differenza della prima idrolizzano parzialmente anche le altre caseine del latte ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).



**Figura 5.** *Struttura tridimensionale di una proteasi aspartica dimerica, dove in rosso vengono evidenziati i residui di acido aspartico essenziali per l'attività catalitica e, in nero la proteina substrato dell'enzima.*

### 3.1 Proprietà delle cardosine e delle ciprosine

L'attività coagulante di *C.cardunculus* e *C.humilis* è limitata ai fiori, in particolare allo stigma e allo stilo dell'infiorescenza, e risulta dall'espressione di diversi membri di una famiglia multi-gene di proteasi aspartiche.

Due gruppi di proteasi aspartiche sono state isolate dai fiori di *C.cardunculus* e *C.humilis*:

- Ciprosine (cinarasi)
- Cardosine

Per quanto riguarda le ciprosine uno studio (Heimgartner et. al 1990) ne ha isolate e caratterizzate tre tipi (cinarasi 1,2 e 3) dall'estratto di fiori di *C.cardunculus* e *C.humilis* ed è

stato osservato che sono tutte delle glicoproteine, con un peso molecolare stimato intorno ai 49 kDa. Esse presentano una catena pesante, dai 32 ai 36 kDa e una catena leggera, dai 14 ai 18 kDa. Tutti e tre gli enzimi hanno un'attività massima ad un pH intorno a 5,1 e ad una temperatura di 37°C.

Nonostante le tre ciprosine presentino delle somiglianze, in particolare per quanto riguarda il pH e la temperatura ottimale, hanno diverse attività proteolitiche e di coagulazione del latte. Ad esempio, è stata segnalata un'attività proteolitica più elevata per la cinarasi 3 (ciprosina B), insieme ad un'attività coagulante del latte paragonabile alla chimosina presente nel caglio animale, soprattutto nella fase iniziale dell'idrolisi. (Heimgartner et. al 1990).

Quando le attività della chimosina e della ciprosina sono state confrontate, sono state rilevate delle differenze nella compattezza della cagliata. Questa infatti è risultata più morbida con la ciprosina, dimostrando che l'utilizzo del caglio vegetale al posto del canonico caglio animale conferisce una texture diversa ai formaggi.

Inoltre, è interessante notare come alcuni studi (Cordeiro et al. 1992), hanno riportato una maggiore attività di coagulazione della cinarasi 3 nel latte di pecora rispetto al latte vaccino e un'idrolisi più limitata sulle caseine in questa tipologia di latte, rispetto a quello vaccino.

Gli stessi studi sul latte vaccino hanno confermato la scissione del legame tra Phe105 e Met106 della  $\kappa$ -caseina e l'idrolisi aggiuntiva delle caseine  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  e almeno una delle caseine  $\gamma$  da parte dell'enzima ciprosina (Cordeiro et al. 1992).

Il secondo gruppo di proteasi aspartiche isolate dai fiori di *C. cardunculus* e *C. humilis* sono conosciute come cardosine e rappresentano la maggior parte delle proteine solubili totali presenti negli stigmi maturi della pianta.

Le più abbondanti sono la cardosina A e la cardosina B sebbene dai fiori della pianta sono state isolati altri quattro enzimi (cardosina E, F, G e H). (Almeida & Simões, 2018).

Tra tutti gli enzimi coagulanti del cardo le cardosine A e B sono le più caratterizzate finora. Come le ciprosine anche le cardosine sono delle glicoproteine costituite da una catena leggera (15 kDa nella A, 14 kDa nella B), ed una catena pesante (31 kDa nella A, 34 kDa nella B).

Entrambi gli enzimi idrolizzano solitamente i legami peptidici in cui sono impegnati aminoacidi con catene laterali idrofobiche. La cardosina A ha una specificità di substrato più stretta e una minore efficienza catalitica rispetto alla cardosina B.

Dallo studio delle proprietà cinetiche, è emerso che la cardosina A ha un'azione simile alla chimosina, mentre la cardosina B ha un'azione simile alla pepsina.

### 3.2 Cipsosina B ricombinante

Per proteina ricombinante si intende una proteina codificata da un gene che è stato clonato in un sistema che supporta l'espressione del gene e la traduzione dell'RNA messaggero. Per ottenere proteine ricombinanti occorre clonare il gene che codifica per la proteina in particolari vettori di espressione che contengano i segnali necessari per l'inizio della trascrizione e traduzione. I vettori vengono quindi inseriti in opportune cellule ospiti in cui la proteina viene espressa in grandi quantità.

Negli ultimi anni molti studi si sono cimentati sulla caratterizzazione di forme ricombinanti di cipsosina o cardosina, in modo da poter cercare di standardizzare la produzione di formaggi ottenuti con caglio vegetale a livello industriale, problema che fino adesso si è sempre verificato con l'utilizzo degli estratti acquosi, del PVC, o l'utilizzo di cipsosine concentrate (Cynzyme™).

La cipsosina B ricombinante è stata espressa per la prima volta nel lievito *Pichia Pastoris* (specie di lievito largamente impiegato per la produzione di proteine tramite l'uso delle tecniche del DNA ricombinante). Grazie a questo lavoro (White, Cordeiro, Arnold, Brodelius, & John, 1999) si è contribuito ad approfondire il tema della modifica e maturazione di questa proteasi, nonché dell'impatto di una sequenza di 104 aminoacidi (nota come PSI) sul ripiegamento proteico.

Da questo studio è emerso che quando la proteina viene espressa con un costrutto genico in cui i nucleotidi che codificano per i 104 residui aminoacidici del PSI venivano in parte eliminati si otteneva un enzima ricombinante che aveva un'efficienza catalitica minore di quello nativo, ciò veniva attribuito alla rimozione incompleta del PSI.

Quando invece la proteina viene espressa con un costrutto genico in cui i nucleotidi che codificano per i 104 residui aminoacidici del PSI venivano tutti eliminati, si accumulava una forma inattiva chiamata pro-cipsosina, indicando quindi il ruolo fondamentale del PSI nel corretto ripiegamento del polipeptide nascente necessario per generare la forma matura attiva della cipsosina B.

Dopo questo studio sono stati fatti enormi sforzi alla ricerca di un sistema di espressione per la produzione della cipsosina B ricombinante attiva per applicazioni su larga scala nella produzione di formaggi. Il sistema che è stato maggiormente caratterizzato è la produzione in *Saccharomyces cerevisiae* (Sampaio, Fortes, Cabral, Pais, & Fonseca, 2008). In questo organismo, la produzione di cipsosina B è stata testata con diverse strategie, come ad esempio l'utilizzo di diversi plasmidi e diversi ceppi di lievito, l'ottimizzazione della composizione dei terreni di coltura, o la crescita del lievito in diverse condizioni.

Gli studi iniziali sono stati effettuati utilizzando un ceppo di *S.cerevisiae*, di nome W303-1A, trasformato con un plasmide contenente il gene CYP11 (codificante la ciprosina B). Il lievito è stato coltivato all'interno di un bioreattore in condizioni di completa aerobiosi.

In questo sistema l'espressione della ciprosina B dipende dalla presenza nel mezzo di coltura di galattosio (utilizzato come induttore dell'espressione) e la proteasi prodotta viene secreta e si accumula nel terreno di coltura sia in forma matura/attiva sia nella forma di precursore (prociprosina)/inattiva. È stato osservato che quando il lievito fermenta all'interno del bioreattore ha un aumento significativo della biomassa (82%) e della produzione di ciprosina B ricombinante (139%). (Sampaio et al., 2010).

Una volta prodotto, l'enzima è stato purificato attraverso due cromatografie consecutive a scambio ionico, ed è stato osservato come l'attività proteolitica della ciprosina B ricombinante sia ottimale a 42°C e ad un pH di 4,5.

L'attività dell'enzima ricombinante è inibita quasi totalmente dalla pepstatina A, il che conferma la sua natura di proteasi aspartica.

Come l'enzima nativo, la ciprosina B ricombinante pura è costituita da due subunità, una catena leggera da 14 kDa e una pesante da 32 kDa legate da un ponte disolfuro, inoltre presenta un'attività coagulante simile all'enzima nativo.

I risultati riportati in questo studio mostrano come la ciprosina B ricombinante, la prima proteasi di origine vegetale ad attività coagulante prodotta in un bioreattore, possa essere prodotta su larga scala.

Successivamente sono stati pubblicati diversi lavori sull'implementazione di strumenti di monitoraggio in tempo reale (principalmente basato su tecniche di spettroscopia infrarossa) per ottimizzare e controllare i processi di produzioni della ciprosina B in *S.cerevisiae*. (Sampaio, Sales, Rosa, Lopes, & Calado, 2014).

Tuttavia, nonostante gli sforzi significativi per cercare di ottimizzare la produzione di questo enzima ricombinante in questo tipo di lievito, la resa della proteasi dopo il processo di purificazione è ancora bassa, sia se la purificazione viene effettuata con cromatografia a scambio ionico che con altre tecniche.

Per il momento la ciprosina B ricombinante è l'unica forma di enzima di sintesi che è presente nei portafogli delle aziende lattiero casearie, ma il livello di purificazione e la resa in *S.cerevisiae*, potrebbero comunque avere un impatto negativo sui costi di produzione di questo enzima ricombinante.

### 3.3 Cardosine ricombinanti

La cardosina A è stata inizialmente espressa in *E.coli* (Castanheira et al., 2005). In questo studio sono stati approfonditi i meccanismi di modificazione/attivazione della proteina, dimostrando che la forma zimogena della cardosina A (cioè il precursore inattivo) subisce una modificazione autocatalitica sequenziale.

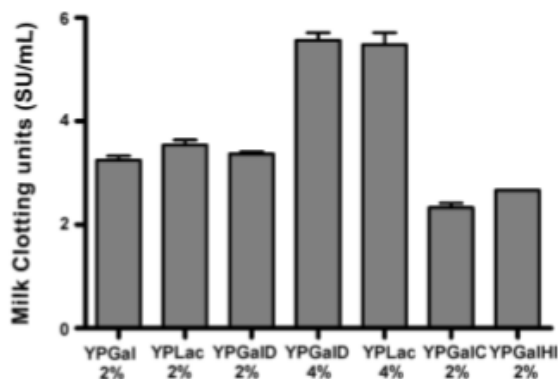
Come osservato per la ciprosina B, la cardosina A ricombinante matura mantiene le catene leggere e pesanti legate da un ponte disolfuro. Tuttavia, in contrasto con quanto descritto per la ciprosina B, è stato possibile produrre una forma accorciata di cardosina A senza il dominio PSI, con proprietà catalitiche molto simili a quelle dell'enzima nativo.

Il metodo di produzione dell'enzima ricombinante in *E.coli* si basa sulla solubilizzazione della proteina dai corpi d'inclusione. Questi sono, aggregati insolubili e spesso inattivi di proteina e di solito la loro formazione è una conseguenza degli alti livelli di espressione. La purificazione dell'enzima dai corpi d'inclusione richiede l'implementazione dei processi di purificazione (tecniche cromatografiche), che porterebbe ad un aumento significativo dei costi di produzione dell'azienda. Quindi considerando una potenziale applicazione dell'enzima ricombinante nella produzione di formaggio, il sistema di espressione in *E.coli* non sembra essere la miglior strada da seguire.

Pertanto, per esplorare a fondo il potenziale biotecnologico di questi enzimi sono inevitabili nuovi approcci. L'espressione nei lieviti presenta vantaggi rispetto ai sistemi procariotici, in particolare per quanto riguarda l'introduzione di modifiche post-traduzionali e la capacità di accumulare proteine ricombinanti nel terreno di coltura, contribuendo chiaramente a semplificare le fasi del processo di purificazione.

Negli ultimi anni sono stati svolti numerosi studi, tra cui quello eseguito da (Almeida, Gomes, Faro, & Simões, 2014) sulla produzione di una forma ricombinante di cardosina B utilizzando il lievito *Kluyveromyces lactis*, un microorganismo considerato generalmente sicuro (GRAS). La strategia iniziale consisteva nell'espressione della forma precursore dell'enzima cardosina B, ossia la forma inattiva (zimogeno). L'ottimizzazione dell'espressione della proteasi è stata raggiunta variando le condizioni del terreno di coltura dove cresceva il lievito. In particolare, è stato ottenuto un miglioramento della produzione della proteina (tradotto in un aumento dell'attività di coagulazione del latte) aumentando la concentrazione finale di entrambi gli induttori testati, lattosio e galattosio, dal 2 al 4% di concentrazione finale (Fig.6).





**Figura 6.** Attività coagulante della pro-cardosina ricombinante B (pCB) prodotta in *K.lactis* cresciuto in diversi terreni di coltura. L'enzima è stato espresso per 120 ore nelle condizioni indicate ed è stata determinata l'attività di coagulazione del latte da parte dell'enzima secreto. Per YP, si intende un terreno liquido contenente lievito e peptone (utilizzato per lo sviluppo e il mantenimento dei lieviti in microbiologia).

*YP con aggiunta del 2% di galattosio (YPGal 2 %)*

*YP con aggiunta del 2 % di lattosio (YPLac 2 %)*

*YP con aggiunta del 2 % di galattosio e di destrosio (glucosio) 2 % (YPGalD 2 %)*

*YP con aggiunta del 4 % di galattosio (YPGal 4 %)*

*YP con aggiunta del 4 % di lattosio (YPLac 4 %)*

Si sa che la forma inattiva precursore della proteina, una volta espressa, deve andare incontro ad un processo di attivazione che prevede la rimozione del pro-segmento e del dominio PSI. Questi eventi di attivazione generano un enzima maturo con catene polipeptidiche tenute insieme da interazioni idrofobiche e legami idrogeno. Questi eventi di attivazione possono essere causati o da un'altra proteasi oppure da un processo auto-catalitico (ossia è la proteina stessa che si taglia) e vengono promossi da un evento di acidificazione.

Infatti, in questo studio gli autori hanno osservato un aumento dell'attività coagulante dei terreni di coltura contenenti la cardosina ricombinante in seguito ad incubazione a valori di pH acidi.

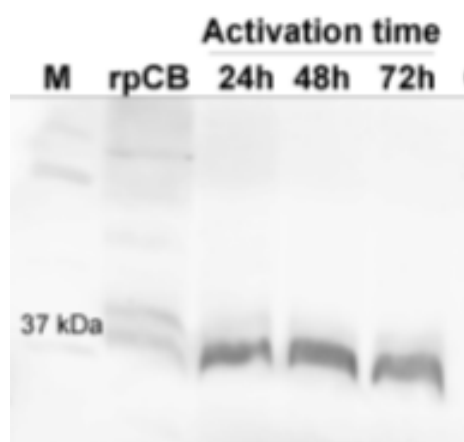
Il fatto che un po' di attività coagulante si osservi anche senza il trattamento acido (fig.6) significa che un po' di proteasi matura è già presente nel terreno.

L'accumulo della forma attiva della cardosina B dopo il trattamento acido, è stato visualizzato tramite "Western Blot".

Il "Western blot" è un tipo di analisi biochimica che sfrutta il legame di anticorpi specifici per la cardosina B alla proteasi, così da poter rilevare in un estratto solamente la proteina

d'interesse. Se il terreno di coltura del lievito venisse sottoposto soltanto ad elettroforesi ci sarebbero tantissime proteine nel gel, e quindi non si riuscirebbe a identificare la proteina d'interesse. Con il "Western blot" le proteine vengono trasferite dal gel ad una membrana che si fa reagire con l'anticorpo anti-cardosina B. In questo modo verrà visualizzata solo la banda corrispondente alla cardosina B.

Tramite questa analisi è stato dimostrato che, dopo acidificazione del terreno, la proteasi viene rilevata come una singola banda di peso molecolare di 37 kDa (fig.7). Si tratta della forma matura perché, il precursore, ossia la forma inattiva, dovrebbe pesare intorno ai 52 kDa (per la presenza del pro-segmento e del dominio PSI).



**Figura 7. Western blot con anticorpo specifico anti-cardosina B. rpCB è stato attivato per incubazione a pH 4,0 a 37 ° C per 24, 48 e 72 ore.**

Dalla figura si può notare che senza attivazione (rpCB) si rilevano due bande principali e numerose bande a pesi molecolari più alti.

Dopo acidificazione invece, già dopo 24 ore, si può notare in maniera nitida la banda che rappresenta l'enzima attivo con peso molecolare di 37 kDa.

L'attivazione dell'enzima a pH 4 e l'incubazione per 2 ore a 37°C è sufficiente per promuovere la massima attivazione della proteasi.

È interessante notare che nel terreno non attivato una delle due bande più intense ha un peso molecolare simile alla forma attivata. Data la specificità dell'anticorpo che riconosce solo la cardosina, questa banda corrisponde alla forma attiva dell'enzima e la banda superiore probabilmente è una forma parzialmente matura.

Questi risultati dimostrano che solo una minima frazione della cardosina B ricombinante subisce il processo di maturazione. La massima parte deve essere attivata.

In sintesi, con questo passaggio di attivazione è stata aumentata la produzione di cardosina B matura a concentrazioni accettabili, che hanno consentito la realizzazione di una nuova tipologia di caglio senza la necessità di una purificazione proteica.

## 4. FORMAGGI OTTENUTI CON CAGLIO VEGETALE

Il formaggio è storicamente definito come il prodotto che si ricava dal latte intero o parzialmente scremato, che si ottiene dalla destabilizzazione enzimatica (presamica) o acida della k-caseina.

Il processo di trasformazione del latte in formaggio può essere schematicamente suddiviso in due blocchi di operazioni. Il primo avviene in vasca di coagulazione, detta caldaia, ed è costituito dalle fasi di lavorazione del latte che portano alla produzione della cagliata. Il secondo invece avviene fuori dalla caldaia ed è costituito da una serie di operazioni che trasformano la cagliata in formaggio.

In questa fase, durante l'eventuale stagionatura, il gusto e l'aroma, ancora simili a quelli del latte, e le caratteristiche reologiche della cagliata si modificheranno permettendo di ottenere le peculiarità che contraddistinguono le diverse tipologie di formaggi.

I formaggi possono essere classificati mediante molti criteri. Le classificazioni più ricorrenti si basano su:

- tipologia di latte (di vacca, di pecora, di bufala, di capra ecc.)
- origine di produzione (Gorgonzola, Grana Padano, Parmigiano-Reggiano, Roquefort ecc.)
- caratteristiche reologiche (formaggi molli, semiduri, duri)
- contenuto di grasso (formaggi magri, semigrassi, grassi)
- aspetti della produzione come per esempio la temperatura di processo (formaggi a pasta cruda, semicotta o cotta), la durata della maturazione (formaggi freschi, a media o lunga stagionatura)
- tipo di coagulazione (acida o presamica)

Il formaggio è probabilmente il gruppo più diversificato e complesso dei prodotti lattiero-caseari, con circa 750 varietà descritte.

Sebbene i primi tentativi di convertire il latte in formaggio possano essere stati un modo per facilitare il trasporto, migliorare la stabilità e, infine, diversificare la dieta umana con un prodotto nutrizionale elevato, nel tempo il formaggio si è trasformato in un prodotto di

primaria importanza economica. L'attuale produzione mondiale di formaggio è di circa  $19 \times 10^6$  tonnellate all'anno, pari a circa il 35% del latte totale prodotto. Circa il 75% di questa produzione e la maggior parte delle varietà di formaggio sono prodotte dalla coagulazione enzimatica (caglio). Sorprendentemente, i riferimenti all'uso di diversi tipi di caglio risalgono al periodo romano in cui si ritiene che la produzione di formaggio fosse già ben consolidata. (Almeida & Simões, 2018)

In Portogallo e in alcune regioni della Spagna, l'uso di estratti di fiori secchi di *C. cardunculus* L. e *C. humilis* è stato mantenuto con successo sin dai tempi antichi per la produzione di molte varietà tradizionali di formaggi di pecora e capra, rafforzando ulteriormente l'idoneità di questo caglio per la produzione di formaggi di alta qualità. (Almeida & Simões, 2018).

#### 4.1 Differenze tra caglio vegetale e caglio animale

Ovviamente tra il caglio animale e vegetale esistono delle forti differenze, e anche le caratteristiche del prodotto finito variano.

Il caglio animale è un estratto enzimatico salino piuttosto grezzo ottenuto dall'abomaso di bovini lattanti o ovini lattanti (vitelli, agnelli, capretti). Per poter estrarre il complesso enzimatico lo stomaco viene fatto essiccare all'aria con un processo chiamato saling-out, ossia una salificazione. Terminato questo processo si ottiene lo stomaco disidratato ricco di enzimi. Le proteasi caratteristiche del caglio animale sono la chimosina e la pepsina.

Una delle differenze più importanti tra il caglio animale e quello vegetale è l'azione delle rispettive proteasi a carico delle caseine del latte. La chimosina idrolizza soltanto il legame tra Phe105 e Met106 della k-caseina, mentre le proteasi aspartiche presenti nel caglio vegetale sono in grado di idrolizzare anche le altre caseine presenti in particolare  $\alpha$  e  $\beta$ .

Questa differenza provoca una modifica della consistenza del formaggio ottenuto con caglio vegetale, perché questa proteolisi più spinta rende il prodotto finito più morbido e cremoso, che è una caratteristica non sempre apprezzata dai consumatori.

Inoltre, i formaggi preparati con latte vaccino e ottenuti con l'enzima cardosina estratto dai fiori di *C. cardunculus* tendono ad avere un retrogusto amaro e difetti di texture molto rilevanti. È l'azione proteolitica delle cardosine sulle caseine  $\alpha$  e  $\beta$  bovine ad influenzare la resa, la consistenza e il sapore del formaggio. Gli effetti sulla consistenza e sulla resa del prodotto sono dovuti alla formazione di peptidi solubili che si perdono nel siero del latte. L'effetto sul sapore è essenzialmente dovuto dalla formazione di peptidi idrofobici all'interno della cagliata, che contribuiscono a conferire un sapore amaro al formaggio. Per questi motivi, i

formaggi di latte vaccino ottenuti con caglio animale sono ancora i più apprezzati, non essendo né amari né molli.

Tuttavia nei formaggi ottenuti con latte di pecora o capra, l'uso del fiore di *C.cardunculus* o *C.humilis* come agente coagulante ha portato alla produzione di formaggi di alta qualità (formaggi DOP e non Spagnoli e Portoghesi) ed è stato dimostrato che l'ulteriore proteolisi delle caseine del latte contribuisce alla consistenza finale e alle proprietà aromatiche di questi formaggi. In effetti, alcuni studi (Samson Agboola et al. 2004) hanno evidenziato che sebbene i formaggi prodotti con estratto di cardo presentassero livelli elevati di peptidi idrofobici, l'intensità dell'amaro del formaggio non veniva percepita da un panel addestrato (Samson Agboola et al. 2004). Per questo motivo il caglio vegetale viene utilizzato principalmente nei formaggi ottenuti con latte di pecora o capra e non con latte vaccino.



**Figura 8 Formaggio DOP "Queso de La Serena"**

In uno studio (Nunez et al. 1991) sono state valutate le caratteristiche del formaggio “La Serena” (in figura), formaggio ottenuto con latte intero crudo di pecora utilizzando il caglio vegetale come coagulante. Una volta maturato questo formaggio ha un aspetto fino, con una crosta gialla cerulea segnata dall'impronta dello stampo di sparto nel quale viene elaborato, e al tatto risulta morbido o semiduro a seconda della stagionatura. Il sapore è caratteristico, leggermente amaro quando è stagionato e burroso quando è più fresco. Durante la stagionatura il formaggio può andare incontro a rotture a livello della crosta e all'interno la pasta si ammorbidisce fino a diventare quasi liquida. Nel 1992 è stata creata la Denominazione d'Origine “Quesos de La Serena”.

Nunez et al. (1991) hanno analizzato le caratteristiche di questo formaggio preparato con caglio animale e le hanno confrontate con quelle del formaggio tradizionale. È emerso che la proteolisi era più rapida nel formaggio prodotto con caglio vegetale rispetto al formaggio

prodotto con caglio animale. Di conseguenza, la consistenza morbida del formaggio era considerevolmente più pronunciata nel formaggio di caglio vegetale, che mostrava anche una qualità e un'intensità di sapore significativamente più elevate.

Dato che il formaggio ottenuto con caglio animale presentava delle caratteristiche sensoriali e organolettiche inferiori rispetto a quello ottenuto con caglio vegetale questo fa pensare che quest'ultimo sia più adatto per la produzione di formaggi con latte di pecora o capra.

#### 4.2 Formaggio DOC Portoghese "Serra de Estrela"



**Figura 9 e 10 Formaggio DOC Serra de Estrela**

Il formaggio Serra da Estrela, spesso chiamato formaggio Serra, è economicamente e organoletticamente la varietà più importante di formaggio tradizionale prodotto in Portogallo. Questo tipo di formaggio è ottenuto dalla coagulazione del latte crudo di pecora con un estratto del fiore di cardo (*Cynara cardunculus L.*).

Sebbene il formaggio Serra genuino sia sempre più difficile da trovare (a causa dell'esodo delle giovani generazioni dalle fattorie alle città), le caratteristiche uniche di questo formaggio gli hanno conferito lo status di prelibatezza gastronomica.

Il formaggio Serra ha una forma cilindrica senza spigoli vivi; il rigonfiamento è notevole sui lati, ha un diametro da 15 a 20 cm, un'altezza da 4 a 6 cm e un peso da 1 a 1,7 kg. La crosta è sottile, uniforme, liscia e ben formata e possiede un colore giallo paglierino tenue. (Macedo, Xavier Malcata, & Oliveira, 1993).

Il formaggio non presenta occhiature, il suo colore varia dall'avorio al bianco, ha una consistenza burrosa, che provoca una deformazione spontanea e rapida al momento dell'affettatura e possiede un aroma forte e un sapore pulito, morbido e leggermente acido.

Il formaggio Serra ha lo status di formaggio DOC (denominazione di origine controllata) e, per definizione legale, può essere prodotto solo da latte crudo prodotto in aziende agricole

situate nella regione di Serra da Estrela utilizzando un estratto del fiore di cardo (*Cynara cardunculus* L.) come caglio.

La regione del DOC di Serra da Estrela è illustrata nella figura 10. Le regioni di maggiore produzione di formaggio Serra sono Manteigas, Gouveia, Seia, Celorico da Beira, Oliveira do Hospital e Guarda. Di recente, il governo portoghese ha affidato a FAPROSERRA (la Federazione dei produttori di formaggio di Serra da Estrela) il potere di certificare il formaggio Serra. (Macedo et al., 1993)

I criteri per la certificazione (il sigillo di denominazione è riprodotto nella Figura 11) includono la conformità agli standard minimi di igiene durante la fabbricazione, la forma, le caratteristiche organolettiche e il contenuto chimico e microbico del prodotto finale.



**Figura 11. Mappa del Portogallo con l'indicazione della regione "DOC" del formaggio Serra da Estrela (zona ombreggiata): 1) Manteigas. 2) Gouveia, 3) Seia, 4) Celorico da Beira, 5) Oliveira do Hospital e 6) Guarda.**





*Figura 12. Etichetta ufficiale del formaggio Serra.*

#### *4.2.1 Produzione del formaggio Serra*

Il formaggio Serra tradizionalmente viene spesso prodotto in pessime condizioni igieniche. Le principali operazioni associate alla produzione di questo tipo di formaggio sono:

- 1) manipolazione del latte
- 2) coagulazione
- 3) rottura e lavorazione della cagliata e drenaggio del siero
- 4) pressatura
- 5) salatura
- 6) maturazione

La mungitura viene eseguita due volte al giorno: all'alba, prima che il gregge venga portato al pascolo e al tramonto, dopo che il gregge viene restituito alla stalla. La mungitura viene eseguita manualmente dal pastore.

Durante questo processo, il latte è soggetto a diversi tipi di contaminazione dalle ghiandole mammarie, la lana delle pecore e le mani del pastore.

Il latte viene accumulato in grandi contenitori che vengono portati nell'area di produzione del formaggio ossia nella casa di questi pastori e tenuti caldi per 30-60 minuti prima della pressatura. Il latte di pecora viene quindi filtrato attraverso un panno fine e pulito per rimuovere le impurità del particolato (come ad esempio capelli e polvere) e versato in una vasca di coagulazione (di solito una padella domestica con una capacità di circa 20 L).

Per raggiungere e mantenere la temperatura desiderata per la coagulazione, la padella viene solitamente posizionata accanto al camino o, meno frequentemente, a bagnomaria. La temperatura è controllata empiricamente dal casaro, che valuta la temperatura con le punte delle dita.

Una volta raggiunta la temperatura desiderata, viene aggiunto il caglio vegetale.

Sebbene la tecnica di aggiunta differisca notevolmente, la maggior parte dei produttori di formaggi scelgono uno dei seguenti metodi:

- aggiunta diretta del fiore di cardo secco al latte caldo, seguito da un'efficace miscelazione per alcuni minuti e filtrazione del latte attraverso un panno fine e pulito
- macerazione dei fiori secchi di cardo con piccole quantità di acqua e sale fino a ottenere una pasta, diluizione della pasta in acqua per favorire l'estrazione degli enzimi, viene filtrato l'estratto attraverso un panno fine e pulito e infine avviene l'aggiunta diretta di questo estratto grezzo al latte
- macerazione del fiore di cardo secco con sale e acqua, recupero di questa pasta all'interno di un panno con estremità chiuse, seguito da immersione nel latte, agitazione e spremitura.

Il latte viene quindi lasciato riposare nella padella chiusa per un intervallo di tempo che dipende dalla conoscenza empirica del casaro.

La fine della coagulazione è confermata da una leggera agitazione della padella per valutare empiricamente la consistenza della cagliata. I tempi e le temperature medie della coagulazione sono stati misurati in vari casali nella regione DOC del formaggio Serra (Macedo et al., 1993):

- 30/45 minuti a 20/30 °C
- Da 28 a 240 minuti da 17 fino a 40° C
- Da 25 a 63 minuti a 28 fino a 32 °C
- Da 37 a 90 minuti a 27 fino a 31 °C
- Intorno ai 60 minuti a 27 fino a 29 °C

La quantità di estratto di cardo grezzo aggiunta al latte è variabile in base all'esperienza e conoscenza del casaro.

#### *4.2.2 Caratteristiche chimiche del formaggio Serra*

La consistenza, il sapore e l'aroma di qualsiasi formaggio sono associati soprattutto alla sua composizione chimica.

La composizione è, in generale, una funzione complessa della qualità del latte crudo e del processo di trasformazione del latte in formaggio.

Come con altre specie allevate per le loro caratteristiche di mungitura, le pecore Bordaleira da Serra da Estrela producono latte che è generalmente caratterizzato da elevate proteine (circa il 6%) e grassi (circa l'8%).

La composizione chimica del formaggio Serra varia notevolmente da prodotto a prodotto. Questa variazione può essere attribuita alla mancanza di standardizzazione del latte crudo e alla mancanza di procedure standardizzate per la produzione e la maturazione del formaggio. I valori medi sono circa 40% di acqua, 30% di grassi, 20% di caseina, 3% di zucchero, 5% di ceneri e 2,5% di sale.

Nella tabella 3, vengono riportate alcune caratteristiche chimiche del formaggio: l'umidità, contenuto in grassi, caseine, zuccheri, ceneri e sale. Le analisi di questi parametri sono state eseguite in vari studi e i risultati mostrano la notevole variabilità dei parametri analizzati.

Moisture	Fat	Casein	Sugar	Ash	Salt	Reference
(%)						
48.8	28.8	19.9	NA <sup>1</sup>	4.4	2.6	(4)
46.7 to 48.8	28.1 to 30.7	19.2 to 20.4	NA	4.1 to 4.3	2.2 to 2.6	(5)
31.9	40.1	22.2	2.2	3.4	.9	(21)
39.4 <sup>2</sup> ± 19.3	27.9 ± 14.4	NA	3.9 ± 4.0	5.8 ± 4.1	2.6 ± 2.9	(28)
34.0 to 48.8	30.6 ± 7.3	NA	NA	NA	2.9 ± 1.2	(35)
NA	23.0 to 40.0	18.0 to 23.0	NA	NA	NA	(36)

*Tabella 3. Caratteristiche chimiche del formaggio Serra. Per NA si intende un valore non accettabile.* (Macedo et al., 1993).

#### 4.3 Formaggio DOP “Los Pedroches”



*Figura 11 e 12. Formaggio DOP spagnolo “Los Pedroches” e la zona di produzione del formaggio.*

Il formaggio DOP “Los Pedroches” è uno tra i più rappresentativi prodotti artigianali spagnoli. Questo prodotto è ottenuto da latte di pecora ed è prodotto nel nord della regione andalusa (Cordova, Spagna). La sua produzione è stagionale (da dicembre a maggio) e può essere descritto come un formaggio a pasta dura non stagionato, ottenuto dal latte crudo di pecora “Merino”, senza aggiunta di colture starter e solitamente viene utilizzato il caglio vegetale come coagulante. Durante la maturazione, si verificano una serie di cambiamenti fisici, chimici, microbiologici e organolettici che danno origine ad un formaggio dalla consistenza molto cremosa e con un sapore delicato; queste caratteristiche sono molto apprezzate dai consumatori, soprattutto se il formaggio è prodotto con caglio vegetale.

*C.cardunculus* e *C.humilis* anche se appartengono allo stesso genere tassonomico, a volte conferiscono ai formaggi caratteristiche chimiche, microbiologiche, nonché di sapore e di aroma a volte molto differenti.

Uno studio (Vioque et al., 2000) ha messo a confronto il formaggio “Los Pedroches” prodotto con estratto acquoso grezzo dei fiori di *C.cardunculus* con quello prodotto con estratto di *C.humilis*.

Le due specie di cardo testate non hanno avuto effetti apprezzabili sul contenuto di umidità, sui grassi, sulle proteine, e sul contenuto di NaCl del formaggio, sull’attività dell’acqua, sul sapore o sull’aroma; tuttavia l’uso di *C.humilis* ha comportato un ridotto contenuto di acido lattico e valori di pH più alti, rispetto all’uso di *C.cardunculus*. (tab.4).

		Giorni di maturazione					
	Batch	2	8	15	30	60	80
Umidità	CC	49.61±2.30	48.70±1.99	46.30±1.99	44.55±2.74	40.86±2.48	38.08±1.35
Grassi		24.75±4.68	24.92±5.34	26.83±6.21	26.75±5.85	29.00±5.77	29.25±5.06
Proteine		21.39±2.58	21.26±2.53	22.15±2.42	22.88±2.49	23.98±2.96	25.32±3.28
Acido lattico		0.99±0.16	0.98±0.14	1.09±0.15	1.27±0.12	1.42±0.10	1.66±0.23
NaCl		0.95±0.29	1.12±0.11	1.32±0.17	1.55±0.05	1.76±0.04	1.70±0.14
pH		5.29±0.23	5.11±0.11	5.15±0.12	5.14±0.16	5.19±0.21	5.17±0.30
Aw		0.985±0.004	0.98±0.005	0.971±0.003	0.964±0.003	0.958±0.003	0.948±0.001
Umidità	CH	51.41±1.62	48.52±1.43	46.42±1.52	44.32±1.62	40.73±2.30	38.21±2.35
Grassi		23.83±2.10	24.17±3.25	24.50±2.75	25.83±3.36	27.08±2.63	28.92±3.02
Proteine		20.16±0.36	22.07±1.32	23.53±0.98	24.84±1.43	25.79±1.37	26.73±1.02
Acido lattico		0.87±0.10	0.92±0.11	0.90±0.07	0.94±0.04	1.24±0.05	1.24±0.09
NaCl		1.08±0.08	1.27±0.27	1.48±0.16	1.49±0.29	1.71±0.27	1.91±0.41
Ph		5.39±0.21	5.21±0.17	5.29±0.09	5.32±0.13	5.39±0.15	5.41±0.18
Aw		0.980±0.005	0.976±0.004	0.970±0.009	0.967±0.012	0.960±0.009	0.948±0.012

**Tabella 4. Valori medi e deviazione standard dell’umidità, contenuto in grassi, proteine, acido lattico, NaCl (g/100 g di formaggio), pH, Aw nei lotti di formaggio ottenuti con *C.cardunculus* (CC) o *C.humilis* (CH) durante la maturazione.**

Nello stesso studio è stata effettuata anche un'analisi sensoriale dei due formaggi.

characteristics	days after manufacture	type of coagulant	
		CC	CH
flavor	60	5.37 ± 0.23	5.74 ± 1.53
	90	6.54 ± 0.29	6.80 ± 0.00
aroma	60	5.37 ± 0.34	5.04 ± 0.74
	90	6.31 ± 0.17	5.70 ± 0.66

**Tabella 5. Caratteristiche sensoriali dei lotti di formaggio ottenuti con *C. cardunculus* (CC) o *C. humilis* (CH) a 60 e 90 giorni di maturazione.**

La tabella 5 mostra i valori medi e la deviazione standard per i punteggi degli aromi e dei sapori a 60 e 90 giorni di maturazione dei formaggi prodotti con *C. cardunculus* e *C. humilis*. I punteggi di sapore e aroma aumentano con l'età dei formaggi, e non sono state osservate differenze significative.

Riassumendo, l'uso delle due specie di cardo *C. cardunculus* e *C. humilis* non ha avuto effetti significativi sulla maggior parte dei componenti analizzati e sulle caratteristiche sensoriali (sapore e aroma), né sull'attività dell'acqua dei formaggi durante la maturazione, sebbene siano stati osservati contenuti di acido lattico più elevati, quindi tutto ciò suggerisce che gli estratti acquosi di *C. humilis* potrebbero essere usati come alternativa commerciale al *C. cardunculus* nella produzione di formaggio di pecora.

## CONCLUSIONI

Il caglio contiene un complesso di enzimi importanti nella coagulazione presamica e che agiscono sulle caseine, più specificamente sulla k-caseina. Il caglio tradizionalmente è di origine animale, ma ne esistono varie tipologie, tra cui quello vegetale.

In Portogallo e in Spagna vengono prodotti formaggi DOP e DOC ottenuti dall'estratto acquoso dei fiori del genere *Cynara*, in particolare il formaggio Serra de Estrela è economicamente e organoletticamente la varietà più importante di formaggio tradizionale prodotto in Portogallo. Il problema principale che emerge dall'utilizzo del caglio vegetale, è la difficoltà a livello industriale di standardizzare la preparazione dell'estratto floreale di *Cynara cardunculus* o *Cynara humilis*. Questo dipende dalla variabilità dell'attività enzimatica in questi estratti e dalla limitata disponibilità dei fiori.

Le limitazioni sopra riportate hanno sollecitato la ricerca di strategie alternative per sviluppare forme standardizzate di caglio di origine vegetale. Per il momento l'unica soluzione plausibile sembra essere l'utilizzo di forme ricombinanti di cardosine o ciprosine, le due proteasi ad acido aspartico presenti nei fiori di queste due specie e responsabili della coagulazione del latte. Questi due enzimi hanno caratteristiche simili alla chimosina, ma a differenza di questa oltre ad idrolizzare il legame peptidico tra gli aminoacidi Phe-105 e Met-106 della caseina-k, sono in grado di idrolizzare parzialmente anche le altre caseine del latte ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Gli enzimi che finora sono stati caratterizzati sono in particolare la ciprosina B ricombinante prodotta in *S.cerevisiae* e la cardosina B ricombinante prodotta in *K.lactis*. La ciprosina B per il momento è l'unico enzima di sintesi presente nei portafogli delle aziende lattiero casearie. La necessità di purificazione e la bassa resa dell'enzima prodotto in *S.cerevisiae* hanno un impatto negativo sui costi di produzione di questo enzima ricombinante. Invece, con la produzione di cardosina B ricombinante in *K.lactis*, è possibile ottenere un caglio vegetale di sintesi senza purificazione proteica.

Quindi per il momento la produzione di cardosina B ricombinante in *K.lactis* sembra essere una strategia utile a produrre su larga scala formaggi ottenuti con caglio vegetale.

## BIBLIOGRAFIA

- Almeida, C. M., Gomes, D., Faro, C., & Simões, I. (2014). Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 269–281. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5902-5>
- Almeida, C. M., & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4675–4686. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9032-3>
- Castanheira, P., Samyn, B., Sergeant, K., Clemente, J. C., Dunn, B. M., Pires, E., ... Faro, C. (2005). Activation, proteolytic processing, and peptide specificity of recombinant cardosin A. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 13047–13054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412076200>
- Cordeiro M, Jakob E, Puhan Z, Pais MS, Brodelius PE (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara-Cardunculus*—a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, 47(11):683–687.
- Correia, P., Vítor, A., Tenreiro, M., Correia, A. C., Madanelo, J., & Guiné, R. (2016). Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. *Nutrition and Food Science*, 46(4), 458–475. <https://doi.org/10.1108/NFS-12-2015-0157>
- David L. Nelson, Michael M. Cox: *Introduzione alla biochimica di Lehninger*; (2015), Zanichelli editore S.p.a, Bologna.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., & Gómez, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 464–468. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1066>
- Heimgartner U., M.Pietrzak, R.Geertsen, P.Brodelius, A.C.da Silva Figueiredo, M.S.S.Pais; (1990), Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80090-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80090-4).
- Macedo, A. C., Xavier Malcata, F., & Oliveira, J. C. (1993). The Technology, Chemistry, and

- Microbiology of Serra Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1725–1739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77505-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77505-0)
- Núñez, M., Pozo, B., Rodríguez-Marin, M., Gaya, P., & Medina, M. (1991). Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research*, 58(4), 511-519. doi:10.1017/S0022029900030120
- Sampaio, P. N., Calado, C. R. C., Sousa, L., Bressler, D. C., Pais, M. S., & Fonseca, L. P. (2010). Optimization of the culture medium composition using response surface methodology for new recombinant cyprosin B production in bioreactor for cheese production. *European Food Research and Technology*, 231(2), 339–346. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1281-z>
- Sampaio, P. N., Fortes, A. M., Cabral, J. M. S., Pais, M. S., & Fonseca, L. P. (2008). Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4), 305–312. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.305>
- Sampaio, P. N., Sales, K. C., Rosa, F. O., Lopes, M. B., & Calado, C. R. (2014). In situ near infrared spectroscopy monitoring of cyprosin production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Biotechnology*, 188, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.454>
- Samson Agboola, S. Chen, JZ Zhao (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Lait* 84:567–578.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (1998). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 305–314. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00173-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00173-7)
- Tejada Luis, Montserrat Vioque, Rafael Gomez and Josè Fernandez-Salguero (2008). Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3193>.
- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of Ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 451–456. <https://doi.org/10.1021/jf990326v>



White, P. C., Cordeiro, M. C., Arnold, D., Brodelius, P. E., & John, K. (1999). Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16685–16693. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16685>

