



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

*ONOPORDUM TAURICUM:*  
VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ  
COAGULANTE SU LATTI DI SPECIE  
DIVERSE

*ONOPORDUM TAURICUM:* EVALUATION  
OF THE CLOTTING PROPERTIES IN MILK  
OF DIFFERENT SPECIES

TIPO TESI: sperimentale

Studente:  
CARLA MESSINA

Relatore:  
DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:  
DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

*A mis abuelos.  
Ai miei nonni.*

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE .....	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	8
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI .....	9
CAPITOLO 1 MATERIALI & METODI.....	14
1.1 Preparazione del materiale vegetale e degli estratti liofilizzati.....	14
1.2 Preparazione del latte caprino e ovino. ....	16
1.3 Determinazione del contenuto proteico totale degli estratti.....	17
1.4 Analisi dell'attività coagulante degli estratti.....	18
1.4.1 Preparazione delle soluzioni con CaCl <sub>2</sub> . ....	19
1.4.2 Preparazione del substrato. ....	19
CAPITOLO 2 RISULTATI.....	21
2.1 Contenuto proteico totale degli estratti (metodo Bradford). ....	21
2.2 Analisi dell'attività coagulante degli estratti.....	22
2.2.1 Comportamento degli estratti alle diverse concentrazioni di CaCl <sub>2</sub> . ....	22
2.2.2 Risultati del disegno sperimentale per l'analisi dell'attività coagulante.....	24
2.2.3 Ottimizzazione dei tempi di coagulazione secondo l'analisi RSM.....	32
CAPITOLO 3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI .....	33
3.1 Considerazioni iniziali. ....	33
3.2 Influenza della concentrazione dell'estratto acquoso. ....	34
3.3 L'origine del latte e la sua composizione.....	34
3.4 Influenza della temperatura del latte. ....	35
3.5 Influenza del pH del latte. ....	36
3.6 Influenza della concentrazione di calcio nel latte. ....	36
3.7 L'uso di proteasi purificate. ....	37
3.8 Differenze tra caglio animale e caglio vegetale. ....	38
3.9 Considerazioni finali.....	38

CONCLUSIONI .....	40
BIBLIOGRAFIA .....	42
RINGRAZIAMENTI .....	45

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Resa dei fiori freschi di <i>Onopordum tauricum</i> .....	14
Tabella 2-1: Contenuto proteico totale di <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria (0,1 g/ml).....	22
Tabella 2-2: Contenuto proteico totale di <i>O. tauricum</i> ecotipo Marche (MC1 e MC2) e di <i>O. tauricum</i> selvatico Marche (MS1 e MS2) (0,1 g/ml). ....	22
Tabella 2-3: Attività coagulante di <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria (0,1 g/ml) a 30°C. Il tempo di coagulazione è espresso in secondi.....	23
Tabella 2-4: Attività coagulante di <i>O. tauricum</i> ecotipo Marche (0,1 g/ml) a 30°C. Il tempo di coagulazione è espresso in secondi.....	24
Tabella 2-5: Attività coagulante (MCT, espresso in secondi) di <i>O. tauricum</i> (0,1 g/ml)...	25
Tabella 2-6: Condizioni ritenute ottimali dall'analisi RSM per minimizzare la MCT. Si comparano i tempi realmente ottenuti con quelli predetti dal sistema. ....	32

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Infiorescenze di <i>Onopordum tauricum</i> ; (a) interi;(b) interno. Fonte: Mozzon, M. et al. (2020). .....	13
Figura 2: Prime fasi di estrazione; (a) fiori di <i>Onopordum tauricum</i> in acqua distillata dopo la macerazione di 24h; (b) fase liquida separata dai fiori, andrà successivamente centrifugata. ....	15
Figura 3: Risultato dopo la centrifugazione degli estratti acquosi di <i>O. tauricum</i> . In giallo, l'estratto acquoso grezzo (il surnatante). In viola, il residuo solido dei fiori (precipitato). ...	15
Figura 4: Estratti liofilizzati di <i>Onopordum tauricum</i> ecotipo Marche e <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria. ....	16
Figura 5: Estratto acquoso di <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria ricostituito (ER). ....	16
Figura 6: Soluzioni a concentrazione crescente di BSA (indicata con i valori in figura), da sinistra a destra, usate per la retta di taratura. ....	17
Figura 7: Preparazione del latte di pecora in soluzioni con 15mM, 20 mM e 30 mM di $\text{CaCl}_2$ per le prove preliminari di coagulazione. ....	19
Figura 8: Provette con latte ricostituito. ....	20
Figura 9: Retta di taratura per l'analisi del contenuto proteico degli estratti con il metodo di Bradford. ....	21
Figura 10: Illustrazione grafica della tabella 2-3 sull'andamento della coagulazione di <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria al variare della concentrazione di $\text{CaCl}_2$ . ....	23
Figura 11: Illustrazione grafica della tabella 2-4 sull'andamento della coagulazione di <i>O. tauricum</i> ecotipo Marche al variare della concentrazione di $\text{CaCl}_2$ . ....	24
Figura 12: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria in latte ovino. ....	26
Figura 13: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di <i>O. tauricum</i> ecotipo Umbria in latte caprino. ....	27

Figura 14: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Marche in latte ovino. .... 28

Figura 15: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Marche in latte caprino..... 29

Figura 16: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* selvatico Marche in latte ovino. .... 30

Figura 17: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* selvatico Marche in latte caprino. .... 31

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

BSA	Bovine Serum Albumin (Sieroalbumina Bovina)
DOP	Denominazione d'origine protetta
C.	Cynara
EA	Estratto acquoso
ER	Estratto ricostituito
MCA	Milk-clotting activity (attività coagulante)
MCT	Milk-clotting time (tempo di coagulazione)
O.	Onopordum
PA	Proteolytic activity (attività proteolitica)
RSM	Response Surface Methodology (Metodologia delle Superfici di Risposta)
SELV.	Selvatico
SS	Sostanza secca

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Il processo biochimico più importante durante la caseificazione è la coagulazione del latte, ovvero la trasformazione di quest'ultimo in cagliata attraverso l'azione del caglio (coagulazione enzimatica o presamica) e/o la fermentazione di batteri lattici (coagulazione acida) (Coïsson, D.J. 2004).

Fin dall'antichità i casari hanno utilizzato, per la coagulazione presamica, enzimi proteolitici estratti dall'abomaso di animali lattanti, da cui anche oggi si ricava il caglio animale (Liburdi, K. et al. 2019). Nonostante nell'ultimo cinquantennio il consumo di formaggi sia aumentato drasticamente, la domanda e l'offerta di caglio animale sono calate a favore di coagulanti alternativi, tra cui estratti enzimatici di origine microbica e vegetale. Il crescente interesse verso l'uso nuovi cagli derivò principalmente dalla poca disponibilità di abomaso per l'estrazione del caglio animale e dall'insorgere di nuove richieste di mercato dovute a motivi religiosi, nuove abitudini alimentari, restrizioni sull'uso di presame e al diffondersi dell'encefalopatia spongiforme bovina (Roseiro, L.B. et al. 2003). Oggigiorno molti formaggi sono prodotti con caglio microbico o con chimosina ricombinante. Il primo consiste in proteasi sintetizzate da funghi (*Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria parasitica*) mentre le chimosine ricombinanti vengono prodotte sfruttando l'ingegneria genetica, clonando in microrganismi, come *Escherichia coli* e *Aspergillus niger*, il gene codificante la chimosina animale (il principale enzima con azione coagulante nel caglio animale). In Italia questi due metodi sono vietati per legge per la produzione di formaggi a denominazione d'origine protetta (DOP) (Coïsson, D.J. 2004).

Le reazioni alla base della coagulazione acida sono diverse da quelle che regolano la coagulazione enzimatica e anche le varie tipologie di caglio agiscono diversamente sulle proteine del latte a seconda della loro derivazione (animale, vegetale o microbica) (Coïsson, D.J. 2004). Per capire come si svolge questo processo, bisogna prima conoscere la composizione del latte. Quest'ultimo è una soluzione acquosa in cui troviamo:

- Zuccheri (lattosio in gran parte);
- Proteine:

- Caseine ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) in dispersione colloidale: sono organizzate in sub-micelle, attraverso interazioni idrofobiche, e in micelle (fosfo-caseinato di calcio), attraverso ponti ionici (calcio e fosfato di calcio colloidale mantengono aggregate le sub-micelle) e legami idrogeno. Questi ultimi sono dati dalla coda glucidica idrofila della  $\kappa$ -caseina, la quale permette una forte idratazione superficiale e l'equilibrio nell'ambiente acquoso circostante;
- Proteine del siero idrofile ( $\beta$ -lattoglobuline,  $\alpha$ -lattoalbumine, immunoglobuline e siero albumine);
- Lipidi organizzati in globuli (trigliceridi circondati da glicoproteine e fosfolipidi), in emulsione;
- Enzimi (lisozima, lattoferrina, lipasi e proteasi, ecc.);
- Sostanze azotate non proteiche (urea, amminoacidi liberi, nucleotidi, ecc.);
- Sali minerali (Ca, P, Na, K, Cl, ecc.) e vitamine.

**(Corradini, C. et al. 2004)**

La coagulazione acida consiste nel raggiungimento di un pH 4.6 del latte attraverso la fermentazione omolattica di batteri lattici (naturalmente presenti o aggiunti sotto forma di colture starter) ad una temperatura adeguata al loro sviluppo. A pH 4.6 si arriva al punto isoelettrico delle caseine del latte (le principali proteine che formeranno la cagliata), le quali tendono a destabilizzarsi perdendo gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e il fosfato di calcio colloidale che mantenevano stabili ponti ionici tra le sub-micelle di caseina. Queste ultime, trovandosi libere in un ambiente idrofilo, andranno ad aggregarsi per interazioni idrofobiche. Si otterrà così un gel lattico demineralizzato e lasso, caratteristico di formaggi molli e freschi **(Coisson, D.J. 2004; Corradini, C. et al. 2004)**.

Nella coagulazione presamica la temperatura, il pH e la concentrazione di calcio e fosfato hanno un'azione importante sull'attività enzimatica e sulle caratteristiche finali della cagliata. Per questo tipo di coagulazione si va ad aggiungere al latte (a 30-37°C) il caglio d'interesse. Prendiamo in esempio l'azione della chimosina (o rennina), l'enzima del caglio animale con un'elevata attività coagulante. La chimosina è in grado di idrolizzare con un'alta specificità la k-caseina del latte, separando a livello del legame Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> il caseino macropeptide (CMP) dalla para-caseina. La perdita del peptide colloidale-protettore (il CMP), che permetteva alle micelle caseiniche di mantenersi stabili nell'ambiente idrofilo, provoca la loro destabilizzazione e successiva aggregazione con altre micelle per interazioni idrofobiche. Grazie alla presenza degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , si forma un reticolo tridimensionale in grado di trattenere

i globuli lipidici e il siero in piccola parte (quest'ultimo è composto da acqua, sieroproteine, sali, vitamine e lattosio). Attraverso la coagulazione presamica si ottiene un coagulo sodo e mineralizzato, che tenderà lentamente a contrarsi e ad espellere gran parte del siero rimasto (Coïsson, D.J. 2004; Corradini, C. et al. 2004).

Nell'industria casearia si è visto un crescente interesse verso cagli di origine vegetale dopo la scoperta di enzimi proteolitici con attività coagulante in differenti parti anatomiche come foglie, fiori e lattice (Roseiro, L.B. et al. 2003). I principali enzimi trovati nei tessuti vegetali, che potrebbero sostituire la chimosina animale, sono delle proteasi aspartiche, seriniche e cisteiniche (Amira, B. et al. 2017). Una delle piante maggiormente usate per l'ottenimento di estratti acquosi per la produzione di cagli vegetali è il cardo. In particolare, dalla famiglia Asteraceae si trovano i generi *Cynara*, *Carlina*, *Centaurea*, *Silybum*, *Cirsium* e *Onopordum*. Questi sono utilizzati da secoli, a livello artigianale, per la caseificazione di latti di capra e pecora in paesi mediterranei e in Africa occidentale. Oggi, la produzione artigianale di formaggi ovini e caprini DOP, con l'utilizzo del cardo come agente coagulante è molto diffusa in Spagna e Portogallo (Mozzon, M. et al. 2020). Oltre al cardo, altre piante e frutti come kiwi, melone, rizomi di zenzero (Mazorra-Manzano, A.M. et al. 2013), lattice di fico (*Ficus carica*) (Liburdi, K. et al. 2019) e frutti di tamarillo (Li, Z. et al. 2018) sono stati soggetti di studio per l'analisi dell'attività coagulante dei loro estratti enzimatici.

Diversi autori (Amira, B. et al. 2017; Liburdi, K. et al. 2019; Mozzon, M. et al. 2020; Shah, M.A. et al. 2014) affermano che la qualità del formaggio prodotto con caglio vegetale può essere influenzata da molti fattori:

- La variabilità delle condizioni climatiche può avere effetto sulla crescita della pianta e sulla produzione delle proteasi e influenzare conseguentemente la resa della caseificazione.
- La tipologia di proteasi coinvolte agisce in modo diverso sulle caratteristiche organolettiche e reologiche del formaggio.
- L'origine del latte e la sua composizione condizionano la coagulazione.

Di conseguenza, come afferma Amira, B. et al. (2017), per ottenere dei buoni risultati è fondamentale avere sotto controllo le variabili sopra menzionate, così come le condizioni ottimali per l'attività coagulante di ogni enzima (temperatura, pH, concentrazione dell'estratto enzimatico, concentrazione di  $\text{CaCl}_2$ ). Tutto questo spiega la difficoltà di utilizzo del cardo e di altre piante a livello industriale, dove è necessaria una certa standardizzazione del prodotto.

Shah, M.A. et al. (2014) afferma che un caglio idoneo alla caseificazione dovrebbe contenere enzimi con un'elevata specificità per la k-caseina, quindi un'ottima attività

coagulante (MCA = milk-clotting activity), e una bassa attività proteolitica (PA) generale, poiché quest'ultima, se eccessiva, può portare alla liberazione di peptidi amari durante la maturazione del formaggio. A causa dell'elevata PA dei cagli vegetali, i formaggi ottenuti sono solitamente più morbidi e amari se comparati a quelli prodotti con caglio animale o microbico.

In *Cynara cardunculus*, i principali enzimi responsabili della coagulazione sono delle proteasi chiamate Cardosina A e Cardosina B (Carrascosa, C. *et al.* 2020). Alavi, F. *et al.* (2020) afferma che *C. cardunculus* è la specie di cardo più utilizzata per la produzione di estratti enzimatici impiegati nella produzione di formaggi e molti studi sono già stati svolti allo scopo di ricercare le migliori condizioni per il suo utilizzo; mentre per altre specie vegetali sono stati effettuati pochi studi. Infatti, il potere coagulante delle proteasi aspartiche in semi, fiori e foglie di *Onopordum* spp. (*O. acanthium* L., *O. turcicum*, *O. tauricum*) è stato verificato solo in poche ricerche (Brutti, C.B. *et al.* 2012; Mozzon, M. *et al.* 2020; Tamer, I. 1993).

Brutti, C.B. *et al.* (2012) hanno isolato da fiori di *O. acanthium* un estratto enzimatico chiamato "Onopordosina" costituito principalmente da proteasi aspartiche con capacità coagulanti simili alla chimosina e migliori di quelli derivati da *C. cardunculus*. Lo studio condotto ha dimostrato che con questo estratto enzimatico è stato possibile ottenere dei formaggi che, pur avendo un sapore più amaro e pungente, sono molto simili a quelli semi-duri ottenuti con caglio animale. Inoltre, per ridurre il particolare sapore dato dal caglio vegetale sono stati utilizzati in combinazione degli starter batterici che hanno permesso di limitare la liberazione di peptidi amari.

Per quanto riguarda *Onopordum tauricum*, l'unica ricerca disponibile relativa alle sue proprietà coagulanti è stata svolta da Mozzon, M. *et al.* (2020). Per ricavare l'estratto enzimatico è stata usata l'infiorescenza di *O. tauricum*, composta da fiori tubulari di colore rosa-violaceo (diametro 4-6 cm, lunghezza 3 cm) (figura 1). Vari studi hanno dimostrato l'assenza di attività coagulanti in altre parti anatomiche della pianta. (Mozzon, M. *et al.* 2020). Nello studio condotto da Mozzon, M. *et al.* (2020) si è analizzata la MCA dell'estratto attraverso la metodologia delle superfici di risposta (RSM, Response Surface Methodology) con tre variabili discrete (temperatura, pH e volume di estratto usato per la coagulazione). Secondo l'analisi delle superfici di risposta di secondo ordine, le condizioni ottimali per massimizzare la MCA dell'estratto acquoso di *O. tauricum* sono state 55°C, pH 4.9 (latte caprino) – pH 5.7 (latte ovino) e volume di estratto di 300-500µL (in 5 mL di latte). L'analisi è stata realizzata anche al pH naturale del latte e a una temperatura di 35°C, mantenendo gli

stessi volumi di estratto enzimatico. I valori di MCA di *O. tauricum* sono stati inferiori a quelli ottenuti con caglio animale nelle stesse condizioni.

Lo scopo della tesi è quello di analizzare l'attività coagulante di estratti acquosi di fiori di *Onopordum tauricum* con latte caprino e ovino, in modo da ricercare le migliori condizioni tecnologiche per massimizzare la MCA.

I valori di temperatura, pH e concentrazione di estratto utilizzati per le analisi dell'attività coagulante sono stati scelti in seguito ai risultati ottenuti da **Mozzon, M. et al. (2020)**, mentre il  $\text{CaCl}_2$  è stato utilizzato a varie concentrazioni per trovare i valori ottimali per la coagulazione.



**Figura 1: Infiorescenze di *Onopordum tauricum*; (a) interi; (b) interno. Fonte: Mozzon, M. et al. (2020).**

# Capitolo 1

## MATERIALI & METODI

### 1.1 Preparazione del materiale vegetale e degli estratti liofilizzati.

Sono stati raccolti fiori di *Onopordum tauricum* da tre luoghi differenti:

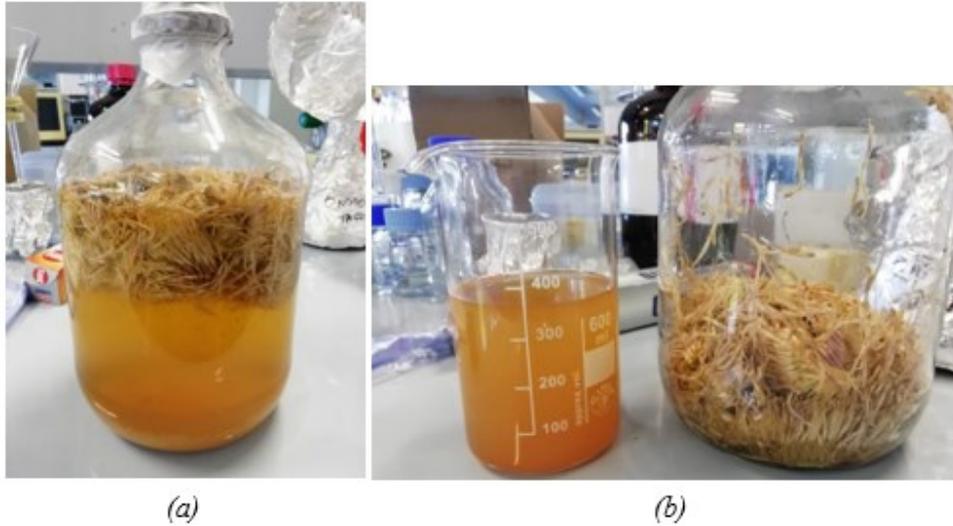
- *O. tauricum* coltivato in Umbria (Azienda “Pasquale Rosati”, Agugliano, Italia - 43°32’N13°22’E a 100 m sul livello del mare);
- *O. tauricum* coltivato nelle Marche dall’Università Politecnica delle Marche (Azienda “Pasquale Rosati”, Agugliano, Italia - 43°32’N13°22’E a 100 m sul livello del mare);
- *O. tauricum* selvatico raccolto nelle Marche (Parco Nazionale Monti Sibillini).

I fiori, una volta rimossi manualmente dai capolini, sono stati pesati e lasciati macerare in becher con acqua distillata (1:10 p/V) per 24h a temperatura ambiente, al buio e coperti. La fase liquida è stata poi separata dai fiori (figura 2) con un setaccio a maglia fine e distribuita in tubi falcon da 50 ml, successivamente centrifugati (4000 RPM x 5 min) (figura 3). Il surnatante è stato filtrato con carta da filtro (Ø 130 mm), distribuito in becher tarati e nominati e conservato a -20°C per 24h. Successivamente, l’estratto acquoso *grezzo* (EA) è stato liofilizzato (VirTis Advantage benchtop freeze dryer, Steroglass S.r.l., Perugia, Italia), raccolto, pesato per calcolare la resa dei fiori (tabella 1) e conservato a -20°C fino all’utilizzo.

Al momento d’uso gli estratti liofilizzati (figura 4) sono stati ricostituiti con acqua distillata a una concentrazione di 0,1 g/ml (estratto ricostituito, ER) in tubi falcon (figura 5). Ogni estratto (ecotipo Umbria, ecotipo Marche e selvatico Marche) è stato utilizzato separatamente.

**Tabella 1: Resa dei fiori freschi di *Onopordum tauricum*.**

<i>Onopordum tauricum</i>	<i>Resa</i>
<b>Ecotipo Umbria</b>	6,46 g estratto liofilizzato / 100 g fiori
<b>Ecotipo Marche</b>	4,36 g estratto liofilizzato / 100 g fiori
<b>Selvatico Marche</b>	4,60 g estratto liofilizzato / 100 g fiori



**Figura 2: Prime fasi di estrazione; (a) fiori di *Onopordum tauricum* in acqua distillata dopo la macerazione di 24h; (b) fase liquida separata dai fiori, andrà successivamente centrifugata.**



**Figura 3: Risultato dopo la centrifugazione degli estratti acquosi di *O. tauricum*. In giallo, l'estratto acquoso grezzo (il surnatante). In viola, il residuo solido dei fiori (precipitato).**



**Figura 4: Estratti liofilizzati di *Onopordum tauricum* ecotipo Marche e *O. tauricum* ecotipo Umbria.**



**Figura 5: Estratto acquoso di *O. tauricum* ecotipo Umbria ricostituito (ER).**

## 1.2 Preparazione del latte caprino e ovino.

Il latte di capra è stato ottenuto da un'azienda agricola di Murcia (Spagna). All'Università Cattolica Sant'Antonio di Murcia (UCAM) è stato poi scremato e liofilizzato, per essere spedito all'UNIVPM.

Il latte di pecora è stato ottenuto da un'azienda locale (Caseificio Martarelli, Camerata Picena, Italia) ed è stato scremato e liofilizzato all'Università Politecnica delle Marche.

Il latte liofilizzato di capra si è conservato a temperatura ambiente mentre il latte liofilizzato di pecora si è mantenuto a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento di utilizzo. Quando necessario, i lattini sono stati ricostituiti in funzione della loro sostanza secca di partenza:

- Latte di capra all'11%
- Latte di pecora al 14%

Sono poi stati misurati i pH dei lattini liofilizzati ricostituiti in acqua distillata, con un pHmetro (Eutech Instruments pH 6+) con elettrodo a vetro:

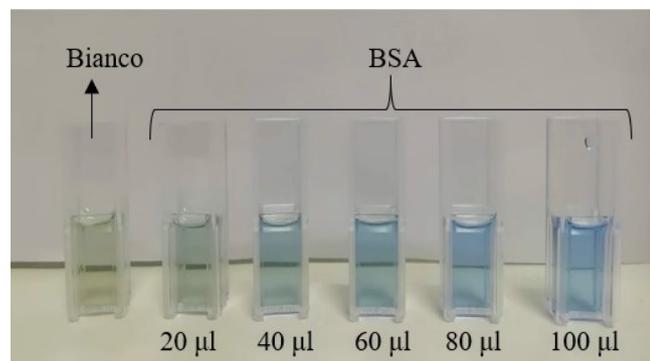
- pH latte capra: 6.66
- pH latte pecora: 6.79

### 1.3 Determinazione del contenuto proteico totale degli estratti.

Il contenuto proteico totale degli estratti ricostituiti è stato determinato seguendo il metodo di Bradford (**Bradford, M.M., 1976**), utilizzando il reattivo Blue Coomassie (Sigma). Questo è un metodo colorimetrico per la quantificazione delle proteine totali. Il colorante agisce legandosi alle catene laterali degli amminoacidi basici e aromatici, cambiando colore da rossiccio a blu con il massimo di assorbimento a 595 nm. È un'analisi rapida e molto sensibile.

Si preparano due bianchi (per lo spettrofotometro a doppio raggio) con 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O + 500  $\mu$ l Bradford ciascuno, in tubi eppendorf. Per creare la retta di taratura si è utilizzata come standard una soluzione di sieralbumina bovina (BSA) (Sigma) a concentrazioni note (2-10  $\mu$ g/ml) partendo da uno stock madre di BSA 0,1 mg/ml. In tubi eppendorf si pipetta prima l'H<sub>2</sub>O (480  $\mu$ l, 460  $\mu$ l, 440  $\mu$ l, 420  $\mu$ l, 400  $\mu$ l), poi il reattivo di Bradford (500  $\mu$ l in tutti) e infine la BSA (20  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 60  $\mu$ l, 80  $\mu$ l, 100  $\mu$ l). L'ordine sarà lo stesso anche per gli estratti da analizzare. Quindi, per i campioni si pipettano in eppendorf sempre 500  $\mu$ l di [H<sub>2</sub>O + ER] + 500  $\mu$ l Bradford. I microlitri di estratto (ER) utilizzati sono visibili nelle tabelle 2-1 e 2-2. Una volta pronte, sia le soluzioni standard che i campioni vengono lasciati reagire al buio, a temperatura ambiente, per 5 min, dopodiché si passano in cuvette per l'analisi spettrofotometrica. L'assorbanza dello standard e dei campioni si è misurata a 595 nm in uno spettrofotometro UV-1800 Shimadzu (Kyoto, Giappone).

Nella figura 6 si può vedere come cambiano le soluzioni standard all'aumentare della concentrazione di BSA. L'assorbanza aumenterà all'aumentare della concentrazione di proteina presente nella soluzione.



**Figura 6: Soluzioni a concentrazione crescente di BSA (indicata con i valori in figura), da sinistra a destra, usate per la retta di taratura.**

#### 1.4 Analisi dell'attività coagulante degli estratti.

Inizialmente, per gli estratti di *O. tauricum* ecotipo Umbria e *O. tauricum* ecotipo Marche si sono svolte delle prove di coagulazione preliminari a temperatura e pH costanti (30°C e pH proprio di ciascun latte) e a concentrazioni variabili di CaCl<sub>2</sub> (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Questa prima analisi è stata fatta per selezionare le concentrazioni di CaCl<sub>2</sub> da inserire successivamente nel piano sperimentale, realizzato con il software JMP-Due Version 11.00.

Per il disegno sperimentale sono state scelte 3 variabili discrete (temperatura, pH e concentrazione di CaCl<sub>2</sub>) e 3 valori per ciascuna variabile:

- Temperatura (T°): 35°C, 40°C, 45°C;
- pH: 5, 5.5, 6;
- Concentrazione di CaCl<sub>2</sub> ([CaCl<sub>2</sub>]): 5 mM, 10 mM, 15 mM.

I valori di temperatura e pH sono stati selezionati alla base dello studio condotto da **Mozzon, M. et al. (2020)**, mentre i valori di CaCl<sub>2</sub> sono stati scelti in seguito ai risultati ottenuti dalle prove preliminari.

Il software ha fornito il disegno sperimentale costituito da 13 combinazioni T°, pH e [CaCl<sub>2</sub>] per ottenere ed analizzare i tempi di coagulazione (MCT=milk clotting time) di ogni estratto. L'analisi è stata svolta per ogni ER su entrambe le tipologie di latte. Vedi i paragrafi 1.4.1 e 1.4.2 per la preparazione del substrato.

Per l'analisi dell'attività coagulante secondo il disegno sperimentale e per l'analisi RSM si preparano dei tamponi (pH 5, 5.5, 6) con acetato di sodio (100 mM) e acido acetico per aggiustare il pH (Ac. acetico glaciale (Reag. Ph. Eur.) PA-ACS-ISO, AppliChem Panreac). A queste soluzioni tampone si aggiungono i corrispettivi grammi di CaCl<sub>2</sub> per raggiungere le concentrazioni descritte dal disegno sperimentale (5 mM, 10 mM, 15 mM; vedi paragrafo 2.2.2) o dall'analisi RSM (11 mM, 12 mM; vedi paragrafo 2.2.3).

Una volta ottenuti i valori di MCT seguendo il disegno sperimentale, si è utilizzata l'analisi RSM (Response Surface Methodology) per calcolare le condizioni ottimali al fine di minimizzare i tempi di coagulazione (MCT). Applicando il modello di risposta di secondo grado è stato possibile ottenere, massimizzando la desiderabilità, le condizioni ottimali ed i relativi tempi di coagulazione. Sono state, quindi, provate queste combinazioni in modo da confrontare i tempi realmente ottenuti con quelli predetti dal sistema. *O. tauricum* selvatico Marche non è stato utilizzato per quest'ultima analisi.

In generale, per l'analisi dell'attività coagulante si pipettano in ogni provetta 5 ml di latte ricostituito (vedi paragrafi 1.4.1 e 1.4.2 per la preparazione del substrato). Prima di aggiungere

l'estratto ER si lasciano le provette in un bagno termostato (M20 Lauda-Königshofen, Germania) per 5 min in modo da portare il substrato alla temperatura prevista per l'analisi. Al tempo 0 si aggiungono 500  $\mu$ l di estratto ER (0,1 g/ml) (concentrazione selezionata da studi preliminari). Cercando di mantenere la temperatura costante, si osserva il substrato ruotando lentamente la provetta in posizione obliqua, osservando la formazione di piccoli fiocchi sul vetro della stessa. A quel punto si annota il tempo.

#### 1.4.1 Preparazione delle soluzioni con $\text{CaCl}_2$ .

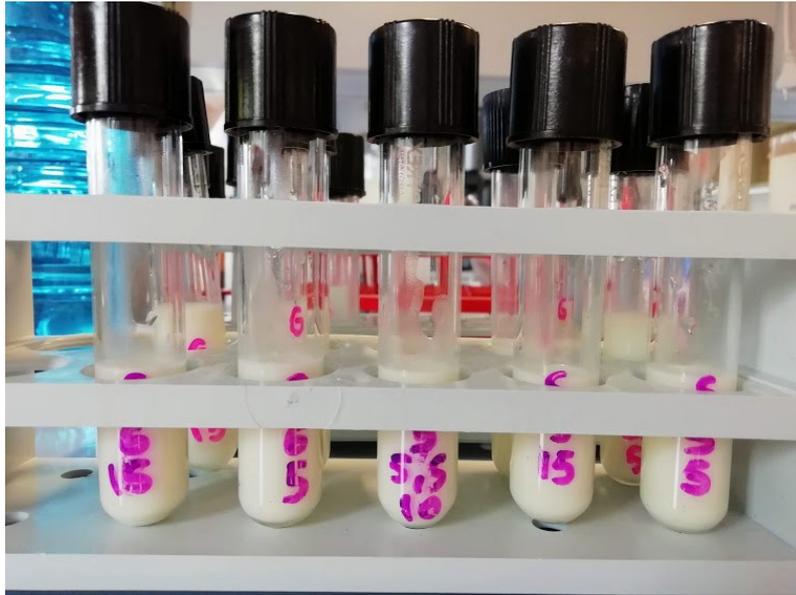
Al fine di selezionare le concentrazioni idonee da utilizzare nella creazione del piano sperimentale, diverse soluzioni di  $\text{CaCl}_2$  a varie concentrazioni (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM) sono state preparate a partire da una soluzione stock di 45000 mM  $\text{CaCl}_2$ . Si misura e si aggiusta il pH di ogni soluzione di  $\text{CaCl}_2$  con acido cloridrico (HCl), fino a raggiungere il pH di ciascun latte (vedi 1.2).

#### 1.4.2 Preparazione del substrato.

A ciascun tampone di  $\text{CaCl}_2$  si aggiungono i corrispettivi grammi di latte liofilizzato (figura 7) per arrivare alle concentrazioni espresse al paragrafo 1.2. Si mescola con agitatore magnetico per sciogliere il latte e si misura il pH del substrato per verificare che si sia mantenuto costante. In seguito, si pipettano 5 ml di latte ricostituito in ogni provetta da analizzare (figura 8) e si mettono a termostatare 5 min alla temperatura scelta per l'analisi dell'attività coagulante.



**Figura 7: Preparazione del latte di pecora in soluzioni con 15mM, 20 mM e 30 mM di  $\text{CaCl}_2$  per le prove preliminari di coagulazione.**



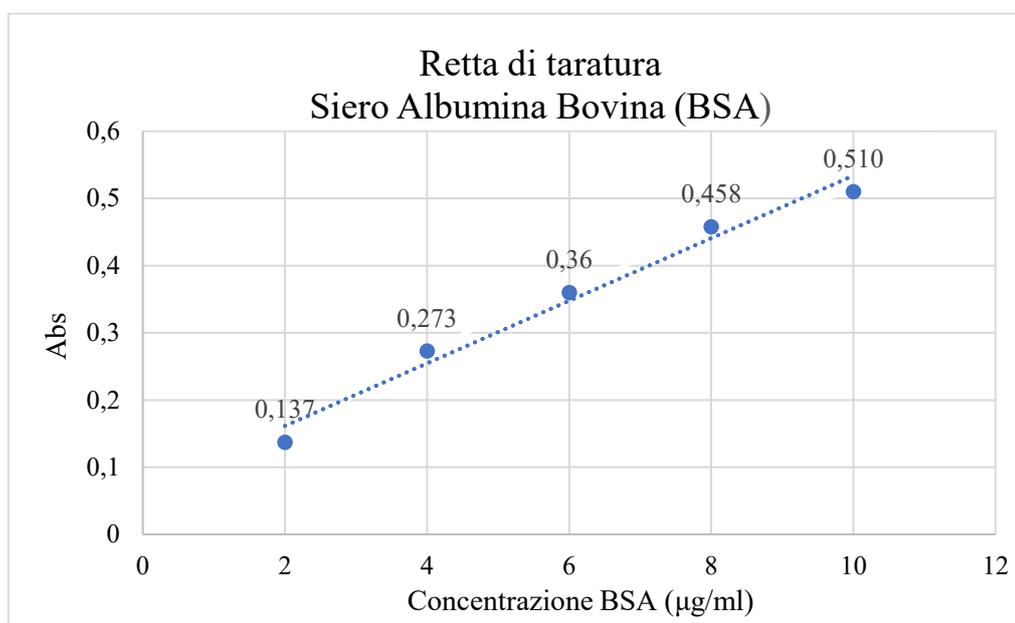
*Figura 8: Provette con latte ricostituito.*

## Capitolo 2

### RISULTATI

#### 2.1 Contenuto proteico totale degli estratti (metodo Bradford).

Per ottenere la retta di taratura (figura 9) si è costruito un grafico con la concentrazione di BSA ( $\mu\text{g/ml}$ ) nell'ascissa e l'assorbanza (Abs), letta allo spettrofotometro a 595 nm, sull'ordinata.



**Figura 9: Retta di taratura per l'analisi del contenuto proteico degli estratti con il metodo di Bradford.**

Dall'analisi della BSA si è ottenuta la retta di taratura con la seguente equazione:

$$y = 0,0466 x + 0,0683$$

$$R^2 = 0,9779$$

Se [Abs = y] e [ $\mu\text{g/ml}$  proteina = x] allora, per calcolare i  $\mu\text{g/ml}$  di proteina contenuti nei nostri estratti, dobbiamo determinare la x:

$$x = (\text{Abs} - 0,0683) / 0,0466$$

Nelle tabelle 2-1 e 2-2 si riportano i risultati dell'analisi di Bradford per i tre estratti di *O. tauricum*.

**Tabella 2-1: Contenuto proteico totale di *O. tauricum* ecotipo Umbria (0,1 g/ml).**

Campione	U1	U2	U3	U4
Concentrazione stock estratto (mg/ml)	100	100	100	100
$\mu\text{l}$ di stock usati	1	2	4	5
Abs	0,211	0,340	0,553	0,695
Proteina ( $\mu\text{g/ml}$ ) nella cuvetta <sup>a</sup>	3,062	5,830	10,401	13,448
Proteina ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) <sup>b</sup>	3,062	2,915	2,600	2,689
<b>Media proteine totali (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>2,817</b>			

$$^a x = (\text{Abs} - 0,0683) / 0,0466$$

$$^b \text{Proteina } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \mu\text{g/ml proteina cuvetta} * 1 \text{ ml } (V_{\text{cuvetta}}) / \mu\text{l stock usati}$$

**Tabella 2-2: Contenuto proteico totale di *O. tauricum* ecotipo Marche (MC1 e MC2) e di *O. tauricum* selvatico Marche (MS1 e MS2) (0,1 g/ml).**

Campione	MC1	MC2	MS1	MS2
Concentrazione stock estratto (mg/ml)	100	100	100	100
$\mu\text{l}$ di stock usati	2	4	5	10
Abs	0,134	0,186	0,261	0,471
Proteina ( $\mu\text{g/ml}$ ) nella cuvetta <sup>a</sup>	1,410	2,526	4,135	8,642
Proteina ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) <sup>b</sup>	0,705	0,631	0,827	0,864
<b>Media proteine totali (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>0,668</b>		<b>0,846</b>	

$$^a x = (\text{Abs} - 0,0683) / 0,0466$$

$$^b \text{Proteina } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \mu\text{g/ml proteina cuvetta} * 1 \text{ ml } (V_{\text{cuvetta}}) / \mu\text{l stock usati}$$

Dall'osservazione delle tabelle 2-1 e 2-2 si può vedere che il contenuto medio di proteina è molto maggiore nell'estratto derivato da *O. tauricum* ecotipo Umbria, mentre *O. tauricum* Marche ecotipo e selvatico hanno un contenuto proteico simile.

## 2.2 Analisi dell'attività coagulante degli estratti.

### 2.2.1 Comportamento degli estratti alle diverse concentrazioni di $\text{CaCl}_2$ .

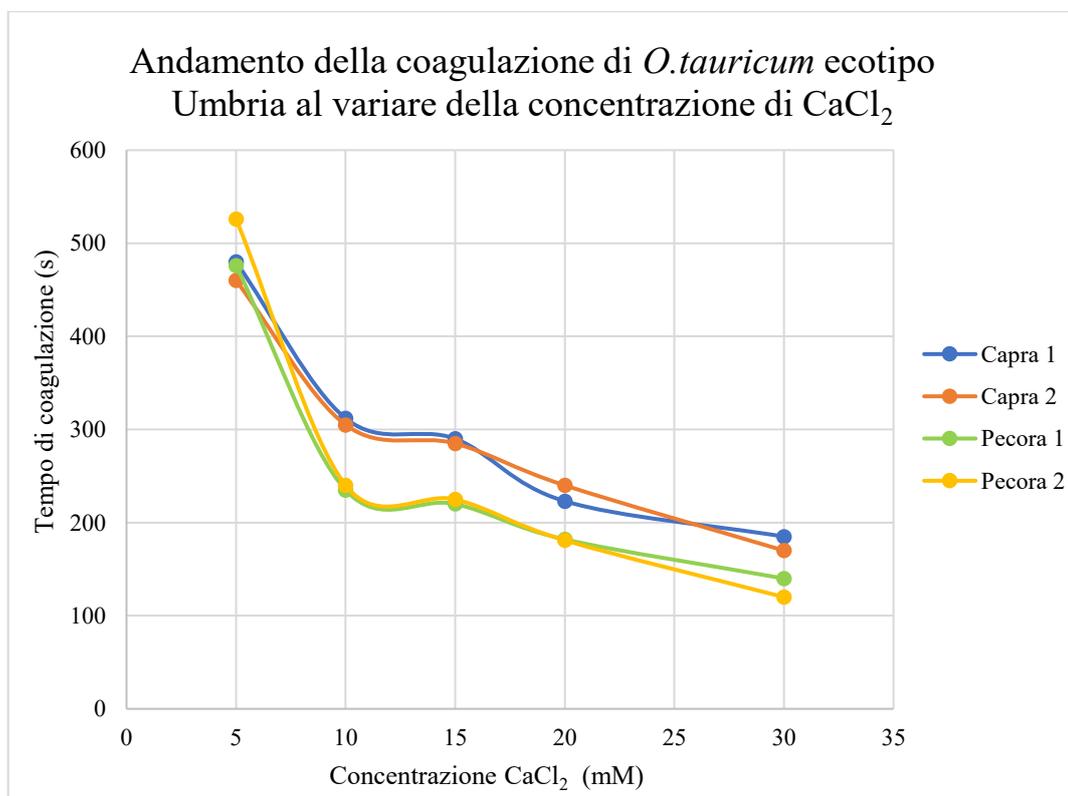
L'analisi preliminare sull'attività coagulante è stata svolta con *O. tauricum* ecotipo Umbria e *O. tauricum* ecotipo Marche. I tempi di coagulazione sono visibili nelle tabelle 2-3 e 2-4, mentre le immagini 10 e 11 illustrano graficamente l'andamento della coagulazione al variare della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$ .

Si può osservare da queste ultime immagini che il latte di pecora coagula più velocemente di quello caprino, a prescindere dalla concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  e dal tipo di estratto enzimatico. Inoltre, all'aumentare della concentrazione di calcio, si riducono i tempi di coagulazione. Nel capitolo 3 si andrà a spiegare il perché di questi risultati.

I valori riportati nelle tabelle 2-3 e 2-4 sono stati inseriti nel software JMP per ottenere il disegno sperimentale per l'analisi dell'attività coagulante dei tre estratti.

**Tabella 2-3: Attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Umbria (0,1 g/ml) a 30°C. Il tempo di coagulazione è espresso in secondi.**

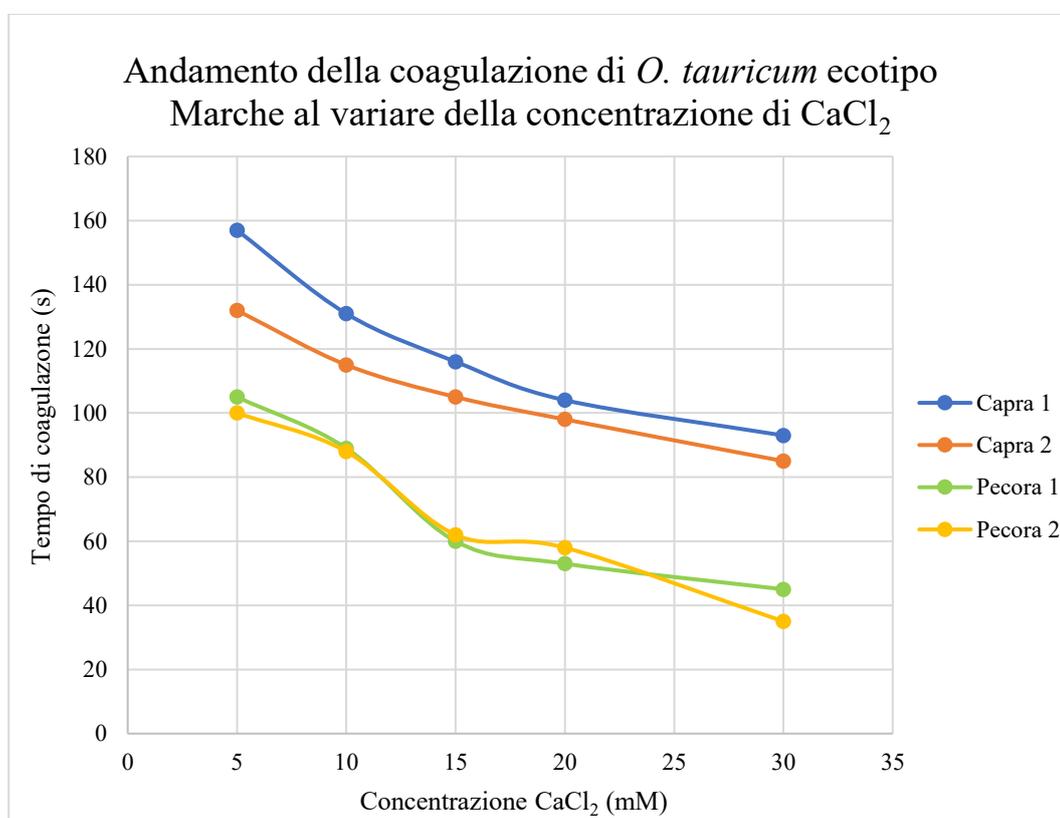
CaCl <sub>2</sub> (mM)	Latte di capra 11% pH 6.66		Latte di pecora 14% pH 6.79	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
5	480	460	476	526
10	312	305	235	240
15	290	285	220	225
20	223	240	182	181
30	185	170	140	120



**Figura 10: Illustrazione grafica della tabella 2-3 sull'andamento della coagulazione di *O. tauricum* ecotipo Umbria al variare della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$ .**

**Tabella 2-4: Attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Marche (0,1 g/ml) a 30°C. Il tempo di coagulazione è espresso in secondi.**

CaCl <sub>2</sub> (mM)	Latte di capra 11% pH 6.66		Latte di pecora 14% pH 6.79	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
5	157	132	105	100
10	131	115	89	88
15	116	105	60	62
20	104	98	53	58
30	93	85	45	35



**Figura 11: Illustrazione grafica della tabella 2-4 sull'andamento della coagulazione di *O. tauricum* ecotipo Marche al variare della concentrazione di CaCl<sub>2</sub>.**

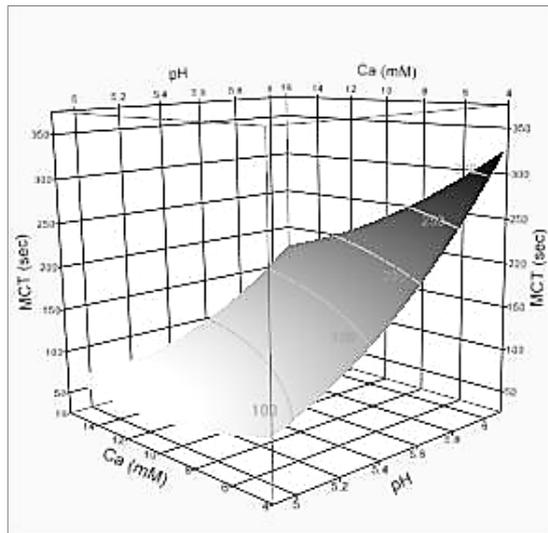
### 2.2.2 Risultati del disegno sperimentale per l'analisi dell'attività coagulante.

Il software JMP ci ha fornito 13 combinazioni "random" di temperatura, pH e concentrazione di CaCl<sub>2</sub> (tabella 2-5) per l'analisi dell'attività coagulante di *O. tauricum*.

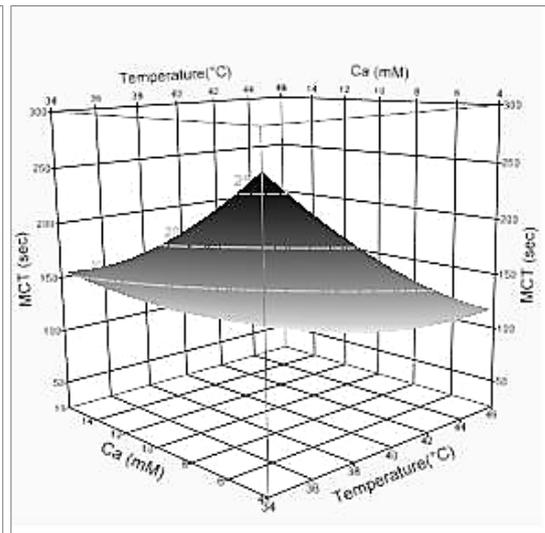
L'estratto che ha dimostrato di avere una maggiore "forza" di coagulazione è *O. tauricum* ecotipo Marche poiché ha avuto sempre i tempi di coagulazione più brevi, considerando ogni tipo di latte separatamente. *O. tauricum* ecotipo Umbria è stato poco più rapido di *O. tauricum* selv. Marche. Si osserva una netta differenza tra i tempi ai massimi valori di temperatura e CaCl<sub>2</sub> (45°C e 15 mM CaCl<sub>2</sub>) e bassi valori di pH (5, il più basso), rispetto ai tempi ottenuti in condizioni opposte (minore temperatura, minore concentrazione di CaCl<sub>2</sub> e pH più elevato). Nel capitolo 3 si andranno ad approfondire gli effetti che hanno queste tre variabili sull'attività del caglio. Di seguito (figure 12, 13, 14, 15, 16, 17) vengono illustrati i grafici delle superfici di risposta ottenuti con il software JMP, per poter visualizzare gli effetti combinati delle tre variabili sull'attività coagulante di *O. tauricum*.

**Tabella 2-5: Attività coagulante (MCT, espresso in secondi) di *O. tauricum* (0,1 g/ml).**

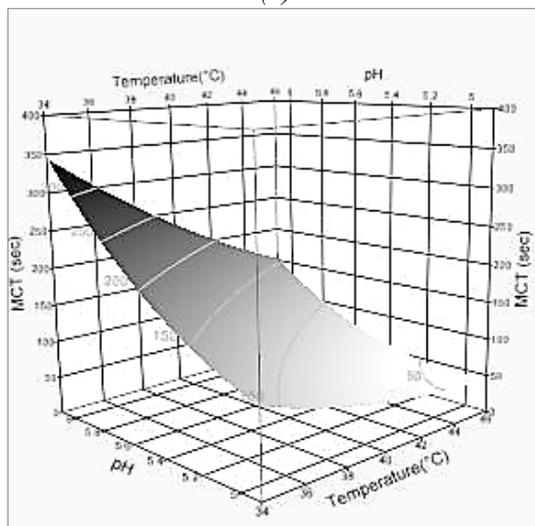
	T (°C)	pH	CaCl <sub>2</sub> (mM)	<i>O. t. ecotipo Umbria</i>		<i>O. t. ecotipo Marche</i>		<i>O. t. selvatico Marche</i>	
				Latte capra	Latte pecora	Latte capra	Latte pecora	Latte capra	Latte pecora
MCT (s)									
<b>1</b>	35	5.5	5	278	218	140	117	290	216
<b>2</b>	45	5	5	97	63	74	55	224	110
<b>3</b>	45	5.5	10	114	84	78	53	142	113
<b>4</b>	35	5	15	134	99	83	68	233	60
<b>5</b>	45	6	5	211	207	114	92	280	210
<b>6</b>	45	6	15	140	110	85	72	161	113
<b>7</b>	35	6	5	400	393	194	140	432	298
<b>8</b>	40	6	10	215	200	90	83	245	163
<b>9</b>	35	6	15	255	240	126	100	305	212
<b>10</b>	35	5	5	181	147	83	90	327	180
<b>11</b>	40	5	5	129	96	93	73	340	160
<b>12</b>	40	5.5	15	141	99	69	55	180	120
<b>13</b>	45	5	15	70	48	60	43	149	86



(a)

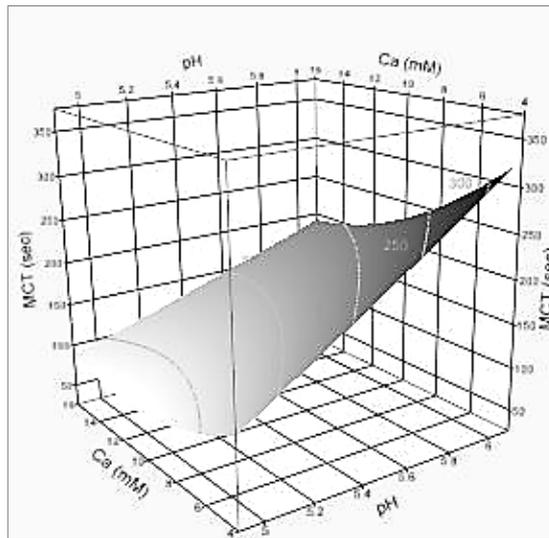


(b)

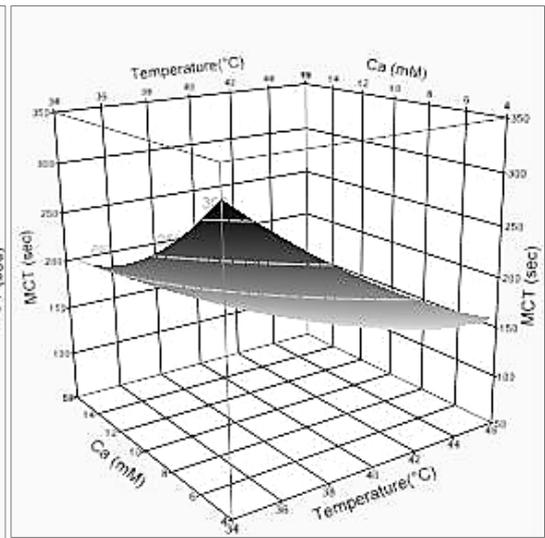


(c)

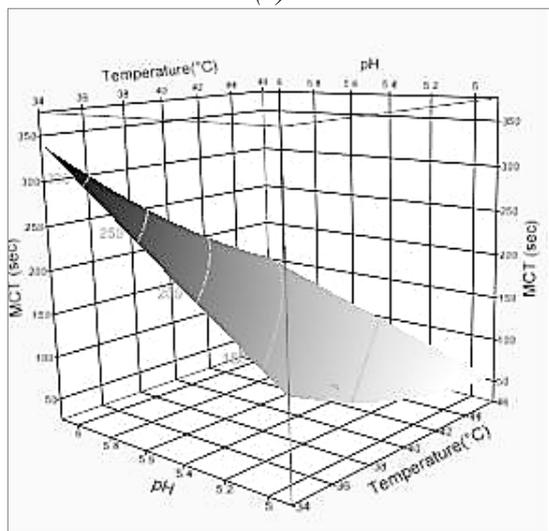
**Figura 12: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Umbria in latte ovino.**



(a)

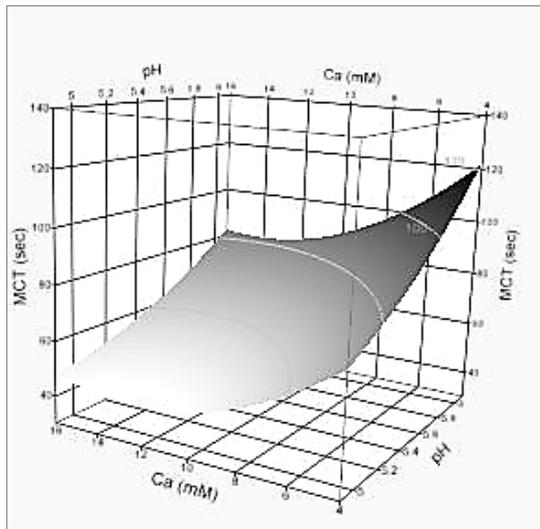


(b)

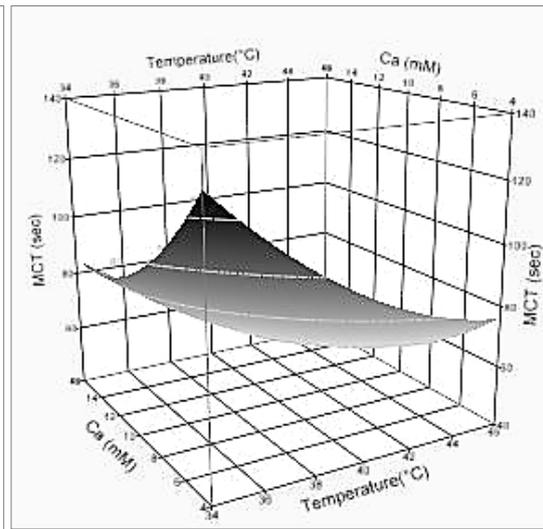


(c)

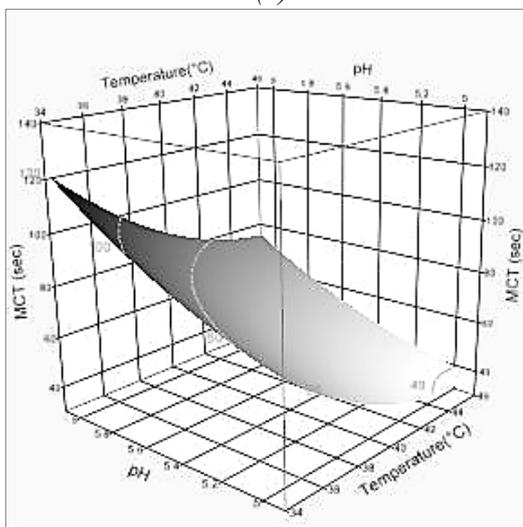
**Figura 13: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Umbria in latte caprino.**



(a)

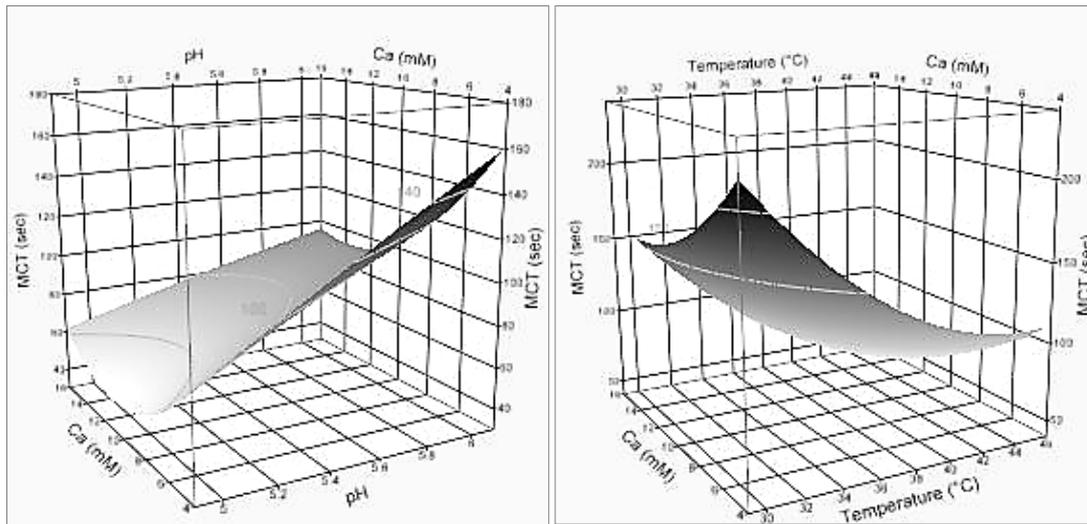


(b)



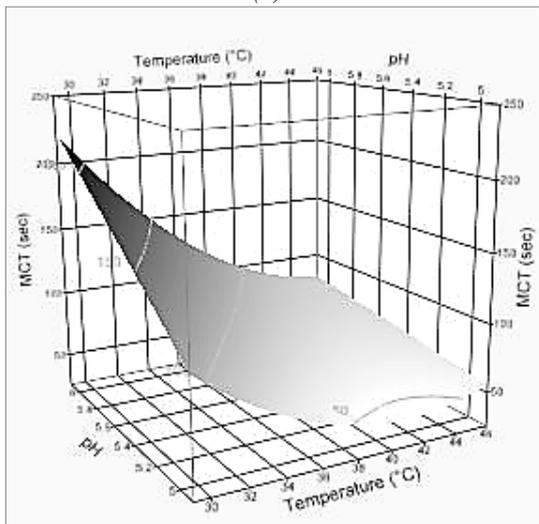
(c)

**Figura 14:** Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Marche in latte ovino.



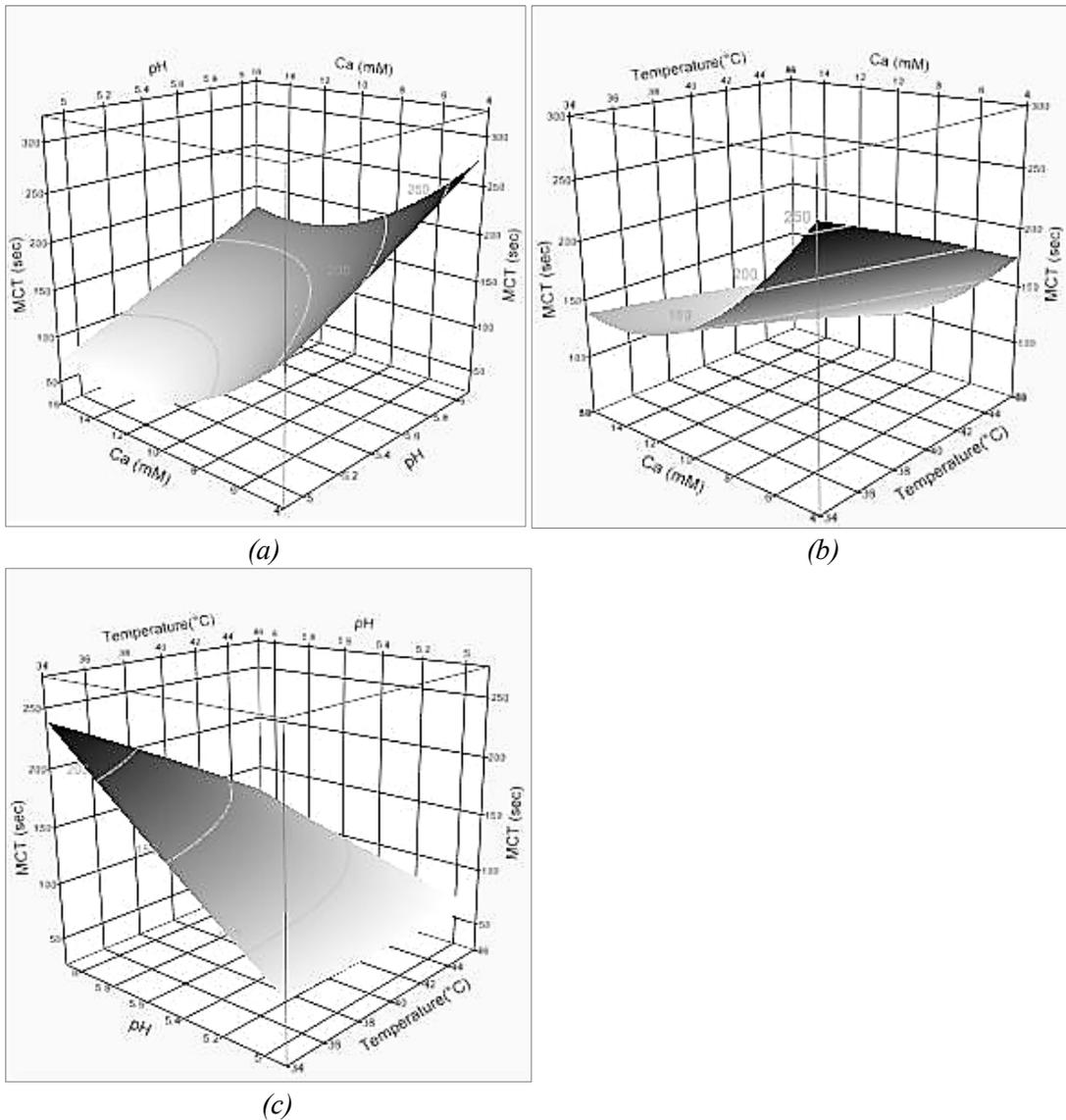
(a)

(b)

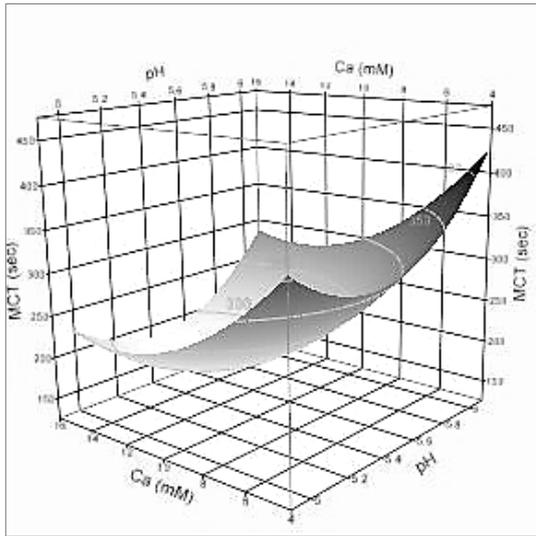


(c)

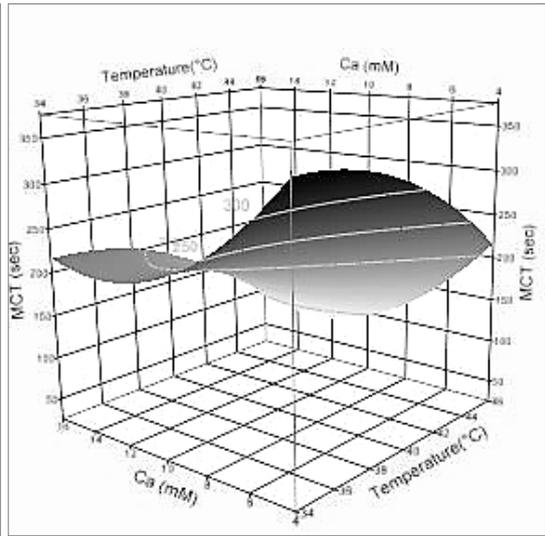
**Figura 15: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* ecotipo Marche in latte caprino.**



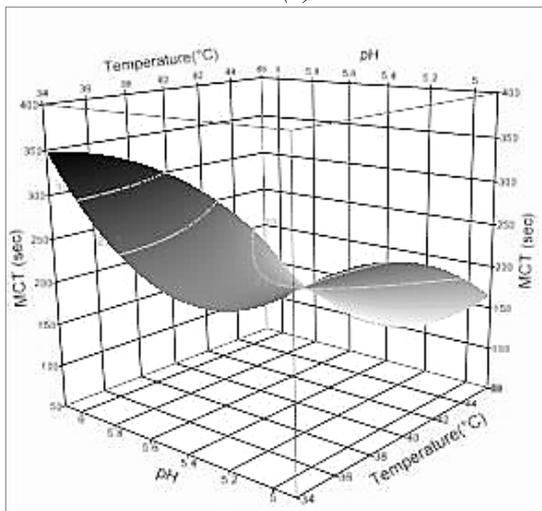
**Figura 16:** Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di Calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum* selvatico Marche in latte ovino.



(a)



(b)



(c)

**Figura 17: Grafici delle superfici di risposta per effetto di (a) pH e concentrazione di Ca; (b) temperatura e concentrazione di calcio; (c) temperatura e pH, sull'attività coagulante di *O. tauricum selvatico Marche* in latte caprino.**

### 2.2.3 Ottimizzazione dei tempi di coagulazione secondo l'analisi RSM.

Nella tabella 2-6 sono indicate in corsivo le combinazioni di temperatura, pH e concentrazione di CaCl<sub>2</sub> ritenute ideali dall'analisi RSM e sono descritti i valori predetti di MCT con la rispettiva desiderabilità.

**Tabella 2-6: Condizioni ritenute ottimali dall'analisi RSM per minimizzare la MCT. Si comparano i tempi realmente ottenuti con quelli predetti dal sistema.**

ER + latte	T (°C)	pH	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Desiderabilità	MCT predetto (s)	MCT ottenuto (s)	
						Prova 1	Prova 2
<i>O. t. ecotipo Umbria + latte caprino</i>	45	5	11	0,9456	64,979	67	66
<i>O. t. ecotipo Umbria + latte ovino</i>	45	5	11	0,868	46,651	41	42
<i>O. t. ecotipo Marche + latte caprino</i>	41	5	11	0,987	48,87	70	75
<i>O. t. ecotipo Marche + latte ovino</i>	45	5	12	0,9876	39,03	39	37

Quest'analisi è stata svolta allo scopo di minimizzare la MCT, cercando di velocizzare quanto più possibile la coagulazione, tenendo conto dei risultati raggiunti in precedenza.

Le concentrazioni di CaCl<sub>2</sub> (11-12 mM) scelte dal sistema sono simili a quelle utilizzate da altri autori (10 mM) (Brutti, C.B. *et al.* 2012; Carrascosa, C. *et al.* 2020; Llorente, B.E. *et al.* 2004; Mozzon, M *et al.* 2020; Silva, S.V. *et al.* 2005) con altri cagli vegetali. Il valore di pH selezionato è il più basso tra quelli impiegati nelle analisi precedenti.

I valori di MCT ottenuti sono molto vicini a quelli predetti dal sistema per quanto riguarda *O. tauricum* Umbria con latte sia caprino (MCT predetto = 64,979 s, MCT ottenuto = 66,5 s) che ovino (MCT predetto = 46,651 s, MCT ottenuto = 41,5 s) e per *O. tauricum* ecotipo Marche con latte ovino (MCT predetto = 39,03 s, MCT ottenuto = 38 s). Quest'ultimo estratto ha dato, con il latte caprino, dei valori leggermente diversi da quelli predetti. Ciò potrebbe essere stato causato da un errore manuale durante la preparazione del substrato poiché con il latte ovino ha dato dei tempi ottimi.

## Capitolo 3

### DISCUSSIONE DEI RISULTATI

#### 3.1 Considerazioni iniziali.

È difficile confrontare i risultati dell'attività coagulante con quelli già presenti in letteratura scientifica non solo perché è presente una sola pubblicazione sull'attività coagulante di *O. tauricum* (**Mozzon, M et al. 2020**), ma anche perché come spiega quest'ultimo:

- fino ad ora, gran parte degli autori (**Albuquerque de Farias, A.V. et al. 2020; Anusha R. et al. 2014; Liburdi, K. et al. 2019; Pontual, E.V. et al. 2012; Silva, A.C. et al. 2013**) ha utilizzato un metodo univariato (studio di una sola variabile per volta) per l'analisi dei cagli vegetali, mentre in questo studio si è utilizzato un metodo multivariato, analizzando perciò più variabili contemporaneamente (temperatura, pH e concentrazione di CaCl<sub>2</sub>) e le relazioni tra di esse;
- vari studi (**Chazarra, S. et al 2007; Guiama, D.V. et al. 2010; Silva, S.V. et al. 2005**) sono stati svolti su latte vaccino e non su quello ovino o caprino. Inoltre, il latte in questa analisi è stato utilizzato crudo (e centrifugato per la sua scrematura); mentre altre ricerche, ad esempio **Silva, S.V. et al. 2005**, hanno analizzato l'attività coagulante in latti trattati termicamente, cosa che può influenzare la successiva coagulazione. Proteine del siero ( $\alpha$ -lattoalbumine e  $\beta$ -lattoglobuline) e altre componenti del latte (come vitamine idrosolubili) possono essere denaturate dal calore ed interagire in modo diverso con le micelle caseiniche e i globuli lipidici. (**Corradini, C. et al. 2004**);
- la MCA può essere misurata in diversi modi, ad esempio, con il metodo Soxhlet, la tecnica Berridge o il metodo standard internazionale (**Shah, M.A. et al. 2014**).

Tenendo in considerazione quanto detto sopra, di seguito si andranno comunque a comparare i tempi di coagulazione degli estratti di *O. tauricum* con quelli di altri cagli vegetali e si andrà ad analizzare l'effetto che ha avuto ciascuna variabile sulla coagulazione.

### 3.2 Influenza della concentrazione dell'estratto acquoso.

La concentrazione degli estratti acquosi influenza molto la velocità di coagulazione del latte. Vari autori (**Carrascosa, C. et al. 2020**; **Chazarra, S. et al. 2007**; **García, V. et al. 2015**; **Silva, S.V. et al. 2005**) affermano che il tempo diminuisce all'aumentare della concentrazione di estratto. **Mozzon, M. et al. (2020)**, invece, ha ottenuto con *O. tauricum* dei valori di MCA non sempre direttamente proporzionali a questa variabile: con il latte vaccino i migliori risultati si sono ottenuti con il massimo volume di estratto analizzato (500 µl), mentre per i latti ovino e caprino i valori ottimali si sono raggiunti con un minor volume di estratto (300-400 µl).

Nel presente documento questa variabile non è stata analizzata, ma si è scelto di usare una sola concentrazione di estratto (500 µl a 0,1 g/ml) a seguito dei risultati ottenuti da **Mozzon, M. et al. (2020)**.

### 3.3 L'origine del latte e la sua composizione.

**Carrascosa, C. et al. (2020)** prende in esame gli effetti che hanno vari tipi di latte (vaccino, caprino e ovino, da soli o in "mix") e diverse concentrazioni di estratto di *C. cardunculus* sull'attività coagulante di quest'ultimo, per la produzione del formaggio iberico DOP Flor de Guía. Questo formaggio prevede la presenza di almeno il 60% di latte ovino, mentre la restante parte dovrà avere al massimo il 40% di latte vaccino e al massimo 10% di latte caprino. Il latte di pecora ha impiegato un tempo minore a coagulare rispetto a quello caprino e vaccino, a prescindere dalla concentrazione di estratto. Tuttavia, si è visto con *C. cardunculus* che, combinando vari tipi di latte a diverse concentrazioni, si possono ottenere dei tempi ancora più brevi rispetto a quello con latte di pecora al 100%. In particolare, comparando i tempi di coagulazione dei mix di latti (con estratto enzimatico all'1%), si è notata un'accelerazione della coagulazione all'aumentare del contenuto di latte ovino fino al 90%, con restante 10% di latte vaccino o caprino.

Così come emerge in **Carrascosa, C. et al. (2020)** per *C. cardunculus*, anche in **Mozzon, M. et al. (2020)** si osservano con *O. tauricum* dei tempi di coagulazione più brevi nel latte ovino rispetto al caprino (35-480 s, 47-1440 s, rispettivamente).

Nel presente studio si hanno delle differenze di circa 20-30 s (in media) tra le due tipologie di latte, a favore di quello di pecora. Queste diversità sono date probabilmente dalla composizione chimico-fisica del latte, che varia a seconda della derivazione animale (**Stocco, G. et al. 2018**; **Selvaggi, M. et al. 2012**). Il contenuto in proteine, grassi e caseine influenza: la coagulazione, i tempi di rassodamento della cagliata e la sineresi. Abbiamo già descritto in

precedenza come queste tre componenti interagiscano tra loro dopo l'aggiunta del caglio e, quindi, come sia importante avere un giusto equilibrio tra questi composti (in particolare un buon rapporto caseine/proteine) (Stocco, G. *et al.* 2018). Solitamente, i latti caprini e vaccini hanno un minor contenuto in caseina e lipidi rispetto a quello ovino. Inoltre, si hanno delle differenze nel tipo di caseine preponderanti in ogni latte (caseine  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) (Selvaggi, M. *et al.* 2012). Si è affermato che latti con un maggior contenuto in grassi permettano di ottenere dei tempi di coagulazione e rassodamento più brevi, rispetto a quelli con un alto contenuto proteico dove, invece, la coagulazione viene ritardata (Stocco, G. *et al.* 2018). Questo spiegherebbe perché il latte di pecora permetta di ottenere tempi di coagulazione più brevi, una cagliata più soda e una maggior resa totale (grazie anche al maggior contenuto in ss e calcio colloidale). D'altra parte, il minor contenuto in caseina del latte caprino porta a dei tempi leggermente più lunghi di coagulazione e alla formazione di una cagliata più molle rispetto a quelli ottenuti con le altre due tipologie di latte (vaccino e ovino) (Selvaggi, M. *et al.* 2012).

### 3.4 Influenza della temperatura del latte.

Chazarra, S. *et al.* (2007) analizza l'attività coagulante di estratti di *Cynara scolymus* L., una specie di carciofo, e gli effetti dati da variazioni di temperatura, pH, concentrazione di calcio e concentrazione di estratto enzimatico (con un metodo univariato). L'autore spiega come la temperatura del latte abbia un effetto sulla coagulazione, in quanto all'aumentare di questo valore (dai 30 ai 60°C) si ha una diminuzione della MCT (mentre tende ad aumentare avvicinandosi a temperature più elevate, per la denaturazione proteica). Ciò sembra essere dato dal complesso che si forma a queste temperature tra k-caseina,  $\beta$ -lattoglobulina e  $\alpha$ -lattoalbumina. Questo parametro (T) influenza sia gli estratti di *Cynara scolymus* L. (in latte vaccino) che quelli di *O. tauricum*. *C. scolymus* L. (1 ml di estratto crudo, contenente 2,59 mg proteina, in 10 ml di latte ricostituito) ha coagulato circa in 100 s a 45°C e in 50 s a 50°C. Nel presente studio, *O. tauricum* ecotipo Marche ha portato a valori simili di MCT:

- 53 s con latte ovino a 45°C (pH 5.5 e 10 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 55 s con latte ovino a 45°C (pH 5 e 5 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 55 s con latte ovino a 40°C (pH 5.5 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 100 s con latte ovino a 35°C (pH 6 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>).

Anche *Onopordum tauricum* ecotipo Umbria ha coagulato in tempi simili:

- 48 s con latte ovino a 45°C (pH 5 e 15 CaCl<sub>2</sub>);
- 97 s con latte caprino a 45°C (pH 5 e 5 mM CaCl<sub>2</sub>);

- 99 s con latte ovino a 35°C (pH 5 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 99 s con latte ovino a 40°C (pH 5.5 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>).

Si osserva che *O. tauricum* è in grado di coagulare, in latte ovino, alla stessa velocità di *C. scolymus*, ma a temperature leggermente inferiori.

Possiamo notare come *O. tauricum* ecotipo Marche abbia una “forza” maggiore di *O. tauricum* Umbria, poiché alle stesse condizioni di T (35°C), CaCl<sub>2</sub> (15 mM) e concentrazione di estratto (0,1 g/ml) riesce a coagulare alla stessa velocità ma ad un pH meno acido (pH 6) rispetto al secondo.

### 3.5 Influenza del pH del latte.

Vari autori come **Brutti, C.B. et al. (2012)**; **Chazarra, S. et al. (2007)**; **Li, Z. et al. (2018)**; **Mozzon, M. et al. (2020)** dimostrano che il pH ha effetti sulla coagulazione del latte: per molti estratti acquosi di origine vegetale (come, ad esempio, di *C. scolymus* L., *O. tauricum*, *O. acanthium* e *Cyphomandra betacea*) la MCA aumenta all’aumentare dell’acidità del substrato. Questo si può osservare anche nel presente elaborato.

Nell’analisi del pH, **Chazarra, S. et al. (2007)** ha ottenuto con *C. scolymus* L., in latte vaccino a pH 5.5, dei tempi di coagulazione di 50-80 s. Questi valori di MCT sono simili a quelli ottenuti allo stesso pH con *O. tauricum* ecotipo Marche (tabella 2-5):

- 53-78 s (latte ovino e caprino rispettivamente) a 45°C e 10mM CaCl<sub>2</sub>;
- 55-69 s (latte ovino e caprino rispettivamente) a 40°C e 15 mM CaCl<sub>2</sub>.

Mentre a pH 5 si è osservata (tabella 2-6) la coagulazione in:

- 66 s con *O. tauricum* ecotipo Umbria in latte caprino a 45°C e 11 mM CaCl<sub>2</sub>;
- 75 s con *O. tauricum* ecotipo Marche in latte caprino a 41°C e 11 mM CaCl<sub>2</sub>.

### 3.6 Influenza della concentrazione di calcio nel latte.

La presenza di ioni calcio nel latte è importante per la coagulazione e per le successive caratteristiche del formaggio. Molti autori (**Albuquerque de Farias, A.V. et al. 2020**; **Anusha, R. et al. 2014**; **Chazarra, S. et al. 2017**; **Mozzon, M. et al. 2020**; **Pontual, E.V. et al. 2012**) dimostrano, infatti, che aggiungendo CaCl<sub>2</sub> al latte si favorisce l’aggregazione delle micelle di caseina, permettendo di velocizzare la coagulazione e di ottenere delle cagliate più sode. **Chazarra, S. et al. (2017)** ritiene che 50 mM di CaCl<sub>2</sub> siano ottimali per avere una buona forza del caglio. Tuttavia, altri autori dimostrano che anche a concentrazioni minori (circa 10 mM) si possono ottenere dei tempi di coagulazione soddisfacenti (**Anusha, R. et al. 2014**;

**Brutti, C.B. et al. 2012; Carrascosa, C. et al. 2020; Llorente, B.E. et al. 2004; Mozzon, M. et al. 2020; Silva, S.V. et al. 2005**), purché si combinino in modo corretto anche le variabili viste in precedenza (concentrazione estratto, temperatura, pH, composizione del latte).

Nello studio di *O. tauricum* si può osservare una riduzione dei tempi di coagulazione all'aumentare della concentrazione di CaCl<sub>2</sub>. La concentrazione ottimale ottenuta dall'analisi RSM è di 11-12 mM CaCl<sub>2</sub>, simile agli ultimi autori citati.

### 3.7 L'uso di proteasi purificate.

Alcuni autori (**Brutti, C.B. et al. 2012; Chazarra, S. et al. 2017; El-Salam, B.A.E.A. et al. 2017; Llorente, B.E. et al. 2004; Silva, S.V. et al. 2005**) utilizzano per l'analisi dell'attività coagulante le proteasi purificate dall'estratto acquoso vegetale (come, ad esempio, Cardosina A, Cardosina B, Onopordosina).

**Mozzon, M. et al. (2020)** sostiene che, a causa dei costi e del tempo che richiede la purificazione, è molto più conveniente utilizzare l'estratto acquoso grezzo. Inoltre, quest'ultimo dà dei risultati non troppo diversi da quelli ottenibili con le proteasi purificate.

**Silva, S.V. et al. (2005)** analizza l'attività coagulante di Cardosina A e Cardosina B estratti da fiori di *Cynara cardunculus*, in latte vaccino scremato (30°C, pH 6.5 e 10mM CaCl<sub>2</sub>). Gli estratti sono stati utilizzati ad una concentrazione finale di 0,00025-0,00500 mg/ml. Si riscontrano delle similitudini tra i tempi di coagulazione di queste proteasi purificate (a 0,00500 mg/ml) e quelli ottenuti con *O. tauricum* (a 0,1 g/ml). Cardosina A ha coagulato in 303 s, mentre *O. tauricum* selv. Marche ha dato i seguenti tempi:

- 298 s in latte ovino (35°C, pH 6 e 5 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 305 s in latte caprino (35°C, pH 6 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>).

Non ci sono tempi comparabili tra quelli di *O. tauricum* e Cardosina B (378 s) (il tempo più vicino è di 393 s con *O. tauricum* ecotipo Umbria in latte ovino a 35°C, pH 6 e 5 mM CaCl<sub>2</sub>).

La miscela 2:1 di Cardosine A/B ha coagulato in 230 s e nel presente studio abbiamo valori di MCT simili:

- 240 s con *O. tauricum* ecotipo Umbria in latte ovino (35°C, pH 6 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 233 s con *O. tauricum* selv. Marche in latte caprino (35°C, pH 5 e 15 mM CaCl<sub>2</sub>);
- 224 s con *O. tauricum* selv. Marche in latte caprino (45°C, pH 5.5 e 5 mM CaCl<sub>2</sub>).

Nonostante le condizioni delle due analisi siano molto diverse tra loro, si può vedere come, anche senza la purificazione degli estratti, si possano ottenere dei valori analoghi di MCT.

Secondo **Brutti, C.B. et al. (2012)** le Onopordosine purificate da *O. acanthium* hanno un rapporto MCA/PA (attività coagulante/attività proteolitica) maggiore di quelli di altre proteasi aspartiche derivate da altre piante, tra cui *Cynara Cardunculus*. Questo è utile da tenere in considerazione poiché per ottenere una migliore cagliata, una maggiore resa e un sapore meno amaro nel formaggio, è importante avere a disposizione delle proteasi con rapporto MCA/PA elevato (**Mazorra-Manzano, M.A. et al. 2013**).

### 3.8 Differenze tra caglio animale e caglio vegetale.

**El-Salam, B.A.E.A. et al. (2017); Fernández-Salguero, J. et al. (1999); Li, Z. et al. (2018); Liburdi, K. et al. (2019); Mazorra-Manzano, M.A. et al. (2013); Mozzon, M. et al. (2020)** comparano la MCA dei cagli vegetali con quelli del caglio animale alle stesse condizioni. **Mozzon, M. et al. (2020)** ha riscontrato, in condizioni che minimizzano la MCT, che il caglio animale coagula 6.5 volte meglio di *O. tauricum* in latte caprino e 15 volte meglio in latte ovino. In condizioni di pH naturale e a 35°C, il caglio animale ha sempre un'attività coagulante maggiore a quelli del cardo, in tutti i tipi di latte analizzati (ovino, caprino e vaccino).

Nel presente studio non si sono comparati gli estratti vegetali al caglio animale, ma le numerose ricerche presenti in bibliografia ci dicono già che quest'ultimo ha sempre una migliore attività coagulante.

### 3.9 Considerazioni finali.

Confrontando, infine, la MCT con l'unico altro studio riguardante l'attività coagulante di *O. tauricum* (**Mozzon, M. et al., 2020**), in quest'ultimo le condizioni ottimali per la coagulazione sono state di 55°C, pH 4.9-5.7 e un volume di estratto acquoso di 300-500 µl (a concentrazione 0,1 g/ml). In *O. tauricum* ecotipo Umbria e *O. tauricum* ecotipo Marche (in latte ovino) si riscontrano dei valori di MCT simili a quelli presenti in **Mozzon, M. et al. (2020)** (35-480 s in latte di pecora; 47-1440 s in latte di capra), soprattutto per quanto riguarda le prove di coagulazione effettuate in condizioni ottimali.

I range di MCT della presente analisi sono riassunti di seguito.

- In latte ovino:
  - *O. tauricum* ecotipo Umbria → 41-526 s;

- *O. tauricum* ecotipo Marche → 37-140 s;
- *O. tauricum* selv. Marche → 60-298 s.
- In latte caprino:
  - *O. tauricum* ecotipo Umbria → 66-480 s;
  - *O. tauricum* ecotipo Marche → 60-194 s;
  - *O. tauricum* selv. Marche → 142-432 s.

In generale, i risultati ottenuti da questo lavoro sono in linea con varie ricerche presenti in letteratura scientifica, ma sono necessarie ancora numerose analisi per valutare appieno le attitudini alla caseificazione di *Onopordum tauricum*. In particolare, dovranno essere eseguite ulteriori analisi sull'attività coagulante, date le poche ricerche a riguardo, e analisi sull'attività proteolitica. Queste ricerche saranno importanti per avere informazioni sul rapporto MCA/PA, un parametro che permetterà di valutare ulteriormente le attitudini alla caseificazione di *O. tauricum* (Mazorra-Manzano, M.A. *et al.* 2013). Infine, con questi estratti potrebbero essere realizzati dei formaggi per studiarne le caratteristiche organolettiche e reologiche finali.

## CONCLUSIONI

Cagli di origine vegetale sono stati utilizzati per molto tempo per la produzione di formaggi ovini e caprini DOP in paesi mediterranei, ma non sono ancora molto diffusi per la caseificazione a livello industriale poiché non permettono di ottenere le stesse caratteristiche organolettiche e di texture date dal caglio animale. È, quindi, un ambito che richiede ancora molte ricerche (Amira, B. *et al.* 2017).

I generi di piante più studiati ed utilizzati per la caseificazione appartengono alla famiglia Asteraceae (generi Cynara, Carlina, Centaurea, Silybum, Cirsium e Onopordum) (Mozzon, M. *et al.* 2020).

In questo studio si è andata ad analizzare l'attività coagulante dei fiori di *Onopordum tauricum* (raccolti da tre luoghi diversi) in due tipi di latte (ovino e caprino), con un metodo multivariato. Questo metodo di studio ci ha permesso di analizzare meglio le relazioni tra le tre variabili: T, pH e CaCl<sub>2</sub>. Dopo alcune prove preliminari di coagulazione (per trovare le migliori concentrazioni di CaCl<sub>2</sub> da utilizzare), si è creato un disegno sperimentale con 13 combinazioni random generate dal sistema con il modello quadratico, selezionando come variabile: temperatura (35°C, 40°C, 45°C), pH (5, 5,5, 6) e concentrazione di CaCl<sub>2</sub> (5 mM, 10 mM, 15 mM). I valori di MCT ottenuti sono stati utilizzati per costruire i grafici delle superfici di risposta e ottenere le condizioni ottimali per minimizzare la MCT.

Gli estratti acquosi di *Onopordum tauricum* a concentrazione di 0,1 g/ml necessitano delle seguenti condizioni per una coagulazione ideale: temperatura = 41-45°C; pH = 5; concentrazione di CaCl<sub>2</sub> = 11-12 mM. I valori di MCT (alle rispettive condizioni) sono stati di 66-67 s e 41-42 s per *O. tauricum* ecotipo Umbria (latte caprino e latte ovino rispettivamente); 70-75 s e 37-39 s per *O. tauricum* ecotipo Marche (latte caprino e latte ovino rispettivamente).

Tra i tre estratti analizzati, *O. tauricum* ecotipo Marche è quello che ha sempre coagulato con maggior facilità, nonostante il suo contenuto proteico totale fosse il più basso. Inoltre, i migliori risultati si sono ottenuti nel latte ovino.

I tempi di coagulazione sono in linea con quelli presenti in letteratura scientifica. Tuttavia, date le poche ricerche riguardo gli estratti acquosi di *O. tauricum*, sono necessari ancora

ulteriori studi per verificarne appieno le attitudini alla caseificazione. In particolare, dovranno essere eseguite analisi sull'attività proteolitica per avere maggiori informazioni sul rapporto MCA/PA, un parametro molto importante per valutarne le attitudini casearie, quali proprietà organolettiche, consistenza e texture (**Mazorra-Manzano, M.A. *et al.* 2013**).

## BIBLIOGRAFIA

- Alavi, F. & Momen, S., 2020. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107, pp. 1–11.
- Albuquerque de Farias, V., Dias da Rocha Lima, A., Santos Costa, A., de Freitas, C.D.T., da Silva Araújo, I.M., dos Santos Garruti, D., Altina Teixeira de Figueiredo, E. & de Oliveira, H.D., 2020. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. *Food Research International*, 127, 108689, pp. 1–10.
- Amira, A.B., 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, pp. 76–93.
- 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. *Eur. Food Res. Technol.*, 238, pp. 997–1006.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.
- Brutti, C.B., Pardo, M.F., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L., 2012. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *Food Science and Technology*, 45, pp. 172–179.
- Carrascosa, C., Vega, L., Millán, R., Saavedra, P., Raposo, A., Saraiva, A. & Sanjuán, E., 2020. A study of vegetable (thistle) rennet in the production of Flor de Guà cheese. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1), pp. 20–32.
- Chazarra, S., Sidrach L., López-Molina, D. & Rodríguez-López, J.N., 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, pp. 1393–1400.
- Coisson, D.J., 2004. Formaggi. In: *Chimica degli alimenti*, a cura di P. Cabras & A. Martelli. Padova: Pincin Nuova Libreria s.p.a., pp. 453–471.

- Corradini, C. & Innocente, N., 2004. Latte. In: *Chimica degli alimenti*, a cura di P. Cabras & A. Martelli. Padova: Pincin Nuova Libreria s.p.a., pp. 407–431.
- El-Salam, B.A.E.A., Ibrahim, O.A.E. & El-Sayed, H.A.E., 2017. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Artichoke (*Cynara cardunculus* L.) Flowers as Coagulant on White Soft Cheese. *International Journal of Dairy Science*, 12 (4), pp. 254–265.
- Fernández-Salguero, J. & Sanjuán, E., 1999. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 6, pp. 177–183.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Álvarez, D. & López, M.B., 2015. A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation. *Dairy Sci. & Technol.* 95, pp. 197–208.
- Guiama, V.D., Libouga, D.G, Ngah, E., Beka, R.G., Ndi, K.C., Maloga, B., Bindzi, J.M., Donn, P. & Mbofung, C.M., 2010. Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9 (12), pp. 1797–1802.
- Li, Z., Scott, K., Otter, D., Zhou, P. & Hemar, Y., 2018. Effect of temperature and pH on the properties of skim milk gels made from a tamarillo (*Cyphomandra betacea*) coagulant and rennet. *Journal of Dairy Science*, 101, No 6, pp. 4869–4878.
- Liburdi, K., Bosselli, 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, 600, pp. 1–13.
- Llorente, B.E., Brutti, C.B. & Caffini N.O., 2004. Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, No. 26, pp. 8182–8189.
- Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F. & Vallejo-Cordoba, B., 2013. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141, pp. 1902–1907.
- Mozzon, M. Foligni, R., Mannozi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N. & Aquilanti, L., 2020. Clotting Properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) Aqueous Extract in Milk of Different Species. *Foods*, 9, 692, pp. 1–15.

- Pontual, E.V., Carvalho, B.E.A, Bezerra, R.S., Coelho, L.C.B.B, Napoleão, T.H. & Paiva, P.M.G., 2012. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, 135, pp. 1848–1854.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M. & Wilbey R.A., 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, No 2, pp. 76–85.
- Selvaggi, M & Tufarelli, V., 2012. Caseins of Goat and Sheep Milk: Analytical and technological aspects. In: *Casein: Production, Uses and Health Effects*, a cura di Ventimiglia, A.M. & Birkenhäger, J.M.. Nova Science Publishers, Inc., pp. 1–25.
- Shah, M.A., Mir, S.A. & Paray, M.A, 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. & Technol.*, 94, pp. 5–16.
- Silva, A.C., Nascimento, T.C.E.S, Silva, S.A., Herculano, P.N. & Moreira, K.A., 2013. Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. *Food Science and Technology*, 33(3), pp. 494–499.
- Silva, S.V. & Malcata, F.X., 2005. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89, pp. 19–26.
- Stocco, G, Pazzola, M., Dettori, M.L., Paschino, P., Bittante, G. & Vacca, G.M., 2018. Effect of composition on coagulation, curd firming, and syneresis of goat milk. *Journal of Dairy Science*, Vol. 101, No. 11, pp. 9693–9702.
- Tamer, I.M., 1993. Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, 15, pp. 427–432.

## RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la mia relatrice, la Dott.ssa Roberta Foligni, e la mia correlatrice, la Dott.ssa Cinzia Mannozi, per avermi trasmesso nuove conoscenze durante tutto il lavoro di tesi, per la gran disponibilità nel chiarire i miei dubbi e consigliarmi come migliorare il mio elaborato.

Ringrazio la dottoranda Cindy Bande per avermi aiutato a condurre la fase di sperimentazione in laboratorio e per essere stata sempre disponibile nei miei confronti.

Un enorme grazie va, infine, ai miei migliori amici, alla mia famiglia in Argentina, ai miei genitori e a mio fratello che, anche se da fuori (e alcuni anche da lontano), mi hanno accompagnato in tutto il percorso universitario. Grazie per avermi sostenuto nei periodi di maggiore difficoltà e aver appoggiato ogni mia scelta fatta negli ultimi anni. Con ognuno voi ho trascorso dei momenti importanti per me e senza di voi questo traguardo non sarebbe stato così speciale.