



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πηκτικά ένζυμα στην Τεχνολογία Παρασκευής Τυριών

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Τσάκαλη Ευσταθία

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

**Τζαφέρου Ελένη
Α.Μ. : 17183**

ΑΘΗΝΑ 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «Πηκτικά ένζυμα στην Τεχνολογία Παρασκευής Τυριών» που παρουσιάσθηκε από την Τζαφέρου Ελένη και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

α/α	Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα/ Ιδιότητα	Ψηφιακή Υπογραφή
1.	Ευσταθία Τσάκαλη	Επίκουρη Καθηγήτρια Επιβλέπουσα	
2.	Ανθιμία- Αικατερίνη Μπατρίνου	Επίκουρη Καθηγήτρια Μέλος	
3.	Σπυρίδων Κοντελής	Επίκουρος Καθηγητής Μέλος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τζαφέρου Ελένη του Κων/νου, με αριθμό μητρώου 17183 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ελένη Τζαφέρου



Στους Γονείς Μου...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετατροπή του γάλατος σε τυρί, ένα από τα βασικότερα τρόφιμα για τον άνθρωπο, ήταν ήδη γνωστή από την αρχαιότητα με τις ρίζες της να βρίσκονται στις πρώτες ανθρώπινες κοινότητες, ενώ η τέχνη της τυροκομίας εδραιώθηκε στη θέση που κατέχει σήμερα ήδη από τον 18^ο αιώνα μ.Χ. Στις μέρες μας η τυροκομία έχει σημαντική θέση στην παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων, με παραγωγή περίπου 22×10^6 τόνους τυριού ετησίως.

Για την παρασκευή τυριού απαιτείται η πήξη του γάλακτος η οποία μπορεί να γίνει μια διαφορετικές κατά περίπτωση προσεγγίσεις. Αρχικά με αργή οξύνιση του γάλακτος με οξέα ή οξυγαλακτικές καλλιέργειες-εκκινητές μέχρι το pH ~5.0, μεθοδολογία η οποία αφορά την παραγωγή κρεμωδών τυριών όπως το τυρί cottage κλπ ή με συνδυασμό οξύνισης και θέρμανσης του γάλακτος, μεθοδολογία κατάλληλη για την παραγωγή άλλου τύπου τυριών. Ο παλαιότερος, αποδοτικότερος και ευρύτερα διαδεδομένος έως σήμερα τρόπος, είναι με την προσθήκη ενζύμων της ομάδας των ασπαρατικών πρωτεασών στο γάλα της τυροκόμισης. Το 80% της συνολικής παραγωγή τυριού παρασκευάζεται με τον τρόπο αυτό, με τυριά όπως το cheddar και το gouda να παράγονται με την προσέγγιση αυτή.

Τα ένζυμα για την πήξη του γάλακτος, μπορεί να είναι ζωικής προέλευσης, όπως συνέβαινε για εκατοντάδες χρόνια, αλλά πλέον σχολαστική έρευνα δεκαετιών στο συγκεκριμένο πεδίο, έχει φέρει στο φως χρηστικά μόρια μικροβιακής, φυτικής αλλά και βιοτεχνολογικής προέλευσης. Από αυτά, η χυμοσίνη θεωρείται ως το πλέον κατάλληλο, λόγω της εξειδικευμένης δράσης της στην κ-καζεΐνη του γάλακτος αλλά και της περιορισμένης πρωτεόλυσης στις λοιπές πρωτεΐνες του γάλακτος (συμβάντα που μπορούν να επηρεάσουν δραστικά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος ως προς τη γεύση και την υφή).

Το προϊόν της εκχύλισης των ενζύμων χυμοσίνη και πεψίνη, που εκκρίνονται 4^ο στομάχι (ήνυστρο) των νεαρών μηρυκαστικών (μοσχάρι αρνί και κασίκι), καλείται πυτιά και είναι το μέσο με το οποίο το γάλα πήζει κατά την τυροκόμηση. Αντικείμενο της παρούσας διατριβής, είναι η ανασκόπηση των ενζυμικών αλλά και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της παραδοσιακής πυτιάς καθώς επίσης και της τρέχουσας κατάστασης στην τεχνολογία ενζύμων πήξης γάλακτος με τα υποκατάστατα της πυτιάς προερχόμενα από μια ποικιλία οργανισμών και διεργασιών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	7
1.1 Θεωρητικό υπόβαθρο-Ιστορική Αναδρομή	7
1.2 Σκοπός της εργασίας	10
1.3 Ασπαρτικές Πρωτεάσες	13
1.3.1 Γαστρικές Πρωτεάσες	19
Κεφάλαιο 2: Πυτιά	22
2.1 Γενικές πληροφορίες	22
2.2 Χαρακτηριστικά και δομή της πυτιάς.....	23
2.2.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	23
2.2.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά.....	24
2.2.3 Δομή.....	25
2.3 Πεψίνη.....	27
2.4 Παρασκευή πυτιάς	29
2.4.1 Συλλογή.....	29
2.4.2 Παρασκευή πυτιάς από ήνυστρα μοσχαριών.....	29
2.4.3 Παρασκευή πυτιάς από ήνυστρα αρνιών και κατσικιών.....	30
2.4.4 Παραδοσιακή Παρασκευή πυτιάς	31
2.5 Ο ρόλος της πυτιάς στην τυροκομεία.....	32
2.5.1 Πήξη του γάλακτος για παρασκευή τυριών – Πηκτική δύναμη.....	32
2.5.3 Ωρίμανση των τυριών.....	36
2.6 Είδη της πυτιάς και η χρήση τους στην τυροκομεία	37
2.7 «Κρίση» της πυτιάς.....	38
2.8 Πυτιά και τυριά Π.Ο.Π.....	39
Κεφάλαιο 3: Υποκατάστατα Μοσχαρίσις Πυτιάς.....	40
3.1 Γενικές Πληροφορίες	40
3.2 Υποκατάστατα ζωικής προέλευσης.....	43
3.3 Υποκατάστατα φυτικής προέλευσης.....	45
3.4 Υποκατάστατα μικροβιακής προέλευσης	49
3.5 Υποκατάστατα βιοτεχνολογικής προέλευσης.....	53
3.6 Ακίνητοποιημένα Πηκτικά Μέσα.....	56
Βιβλιογραφία	59

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Θεωρητικό υπόβαθρο-Ιστορική Αναδρομή

Η παρασκευή και κατανάλωση τυριού και τυροκομικών προϊόντων είναι τόσο παλιά όσο και η ιστορία του σύγχρονου ανθρώπου, με τις ρίζες της να εντοπίζονται μέχρι το 8.000 π.Χ. όταν τα πρώτα αιγοπρόβατα εξημερώθηκαν από τους τότε ανθρώπους.

Τα διαθέσιμα αρχεία που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής τους αναφέρουν πως χρησιμοποιούσαν δέρματα ζώων αλλά και φουσκωμένα εσωτερικά όργανα ως μέσα αποθήκευσης, κατευθύνοντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η ανακάλυψη της τυροκομίας ήταν όπως όλα δείχνουν προϊόν τύχης. Η αποθήκευση γάλακτος στους παραπάνω «αποθηκευτικούς χώρους» θεωρείται πιθανό πως έφερε το γάλα σε επαφή με έναν συνδυασμό ενζύμων όπως χυμοσίνη (ή ρεννίνη), η πεψίνη, η τρυψίνη και άλλα (ένα σύνολο πρωτεϊνικών παραγόντων που σήμερα καλείται τυτιά) η οποία θα μετατρέψει γρήγορα το γάλα σε τυρόπηγμα και ορό γάλακτος (Scott et al., 1998).

Οι παλαιότερες αρχαιολογικές αποδείξεις ύπαρξης τυριού χρονολογούνται στο 5.500 π.Χ., με την πρώτη οπτική ένδειξη να καταγράφεται σε τοίχους αιγυπτιακών τάφων πριν από περίπου 4 χιλιάδες χρόνια. Τα πρωτόλεια αυτά τυριά που παρασκευάζονταν εκείνη την εποχή στην Αίγυπτο και τη Μέση Ανατολή ήταν πιθανότατα πολύ αλμυρά, με έντονη γεύση και εύθρυπτα, χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά που έχει στις μέρες μας το τυρί φέτας αλλά και το τυρί τύπου cottage. Τα χαρακτηριστικά αυτά, οφείλονταν σε μεγάλο βαθμό στην ανάγκη προσθήκης μεγάλης ποσότητας φυσικών συντηρητικών όπως το αλάτι, προκειμένου τα τυριά αυτά να διατηρούνται αναλλοίωτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στις αυξημένες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας των περιοχών αυτών.

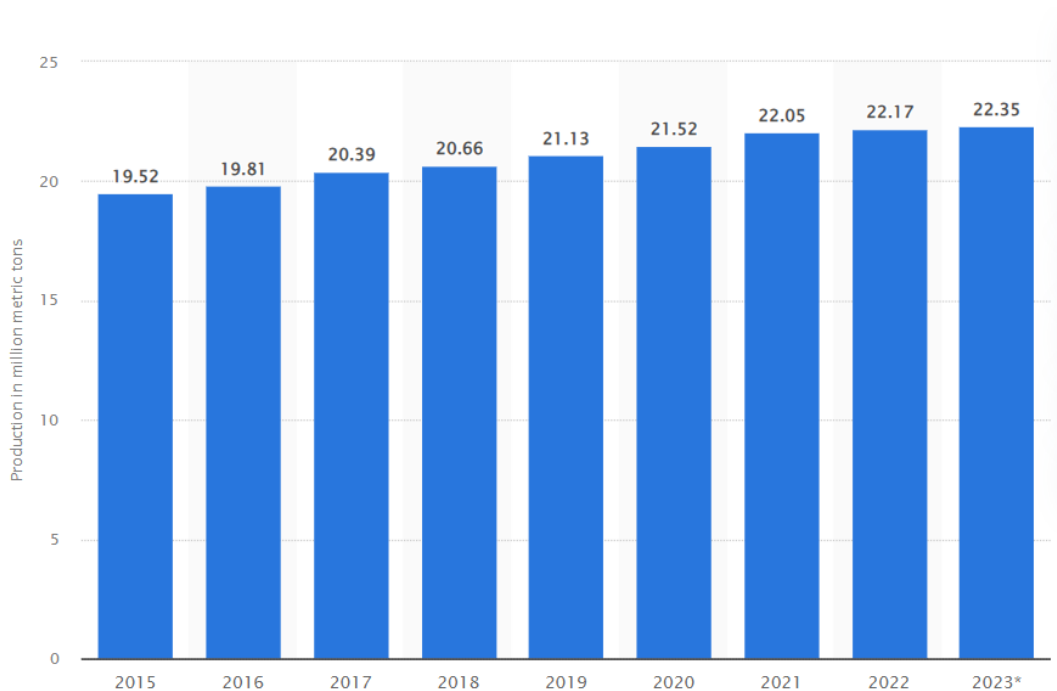
Καθώς η τέχνη της παρασκευής τυριού εξαπλώθηκε από την Αίγυπτο και την Μ.Ανατολή προς τα βόρεια, η Ελλάδα και η Ρώμη έγιναν γενέτειρες πολλών περισσότερων τύπων τυριού, όπου η χαμηλότερη θερμοκρασία επέτρεψε στους τυροκόμους να πειραματιστούν όχι μόνο με την πυτιά και άλλους όξινους παράγοντες που μπορούσαν να μετατρέψουν το γάλα σε τυρί, αλλά και με πολλά άλλα είδη βακτηρίων που μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μεγαλύτερης σκληρότητας τυριών. Με λιγότερο αλάτι και συντηρητικά, τα ευρωπαϊκά τυριά είχαν πολύ πιο ευχάριστη γεύση και ξεχωριστά αρώματα που τα έκαναν πολύ γρήγορα εξαιρετικά δημοφιλή (Scott et al., 1998).

Ιδιαίτερα αποκαλυπτικός είναι ένας μεγάλος αριθμός ιστορικών τεκμηρίων της εποχής, τα οποία καταδεικνύουν ότι στα χρόνια της ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, το τυρί παρασκευάζονταν και καταναλώνονταν ως καθημερινό έδεσμα τόσο από πλούσιους όσο και από φτωχούς, με την τυροκομία να γίνεται μια ευρύτατα διαδεδομένη τέχνη που εγκωμιάστηκε από τους τότε γευσιγνώστες και εραστές του καλού φαγητού. Με την πτώση της αυτοκρατορίας και την συνακόλουθη κατάρρευση των εμπορικών δρόμων ανά την Ευρώπη, η ανταλλαγή πληροφοριών και αγαθών έγινε εξαιρετικά δύσκολη, με την τυροκομία να αποκτά έναν ισχυρά τοπικό χαρακτήρα. Αυτό έκανε τα τυριά από μεμονωμένες χώρες αντιπροσωπευτικά της χώρας αυτής, με τη Γαλλία, την Ιταλία και την Αγγλία να πρωτοστατούν με από 400 έως 700 τύπους τυριών η κάθε μία. Πολλά από τα σημερινά δημοφιλή τυριά παρασκευάζονταν πριν από την άφιξη της Αναγέννησης και την καθιέρωση νέων εμπορικών οδών, για παράδειγμα το Cheddar γύρω στο 1200 μ.Χ και η παρμεζάνα στα τέλη του 16ου αιώνα.

Με τον ερχομό της Αναγέννησης και την ταχύτατη ανάπτυξη νέων θαλάσσιων οδών εμπορίου, η Παρασκευή τυριού μεταλαμπαδεύτηκε από τις ακτές της Ευρώπης σε όλο τον κόσμο, από τη Β. Αμερική έως και τις ασιατικές χώρες, όπου πολλοί ντόπιοι

πολιτισμοί δεν γνώριζαν έως τότε τα μυστικά της τυροκομίας (χωρίς να υπολογίζουμε την Ινδία, η οποία είχε μακρά παράδοση παρασκευής τυροκομικών προϊόντων) (Scott et al., 1998).

Η βιομηχανία χονδρικής παραγωγής και πώλησης τυριού γεννήθηκε στις ΗΠΑ στα μέσα του 19ου αιώνα με την ανάπτυξη του κλάδου να είναι αλματώδης τις επόμενες δεκαετίες. Μέχρι το 1880 υπήρχαν 3.923 γαλακτοκομικά εργοστάσια σε όλη τη χώρα, τα οποία αναφέρθηκε ότι παρήγαγαν ~100.000 τόνους τυριού εκείνο το έτος αξίας 17 εκατομμυρίων δολαρίων, ποσότητα που αντιπροσώπευε σχεδόν το 90% της παγκόσμιας παραγωγής τυριού. Καθώς η ζήτηση συνέχισε να αυξάνεται και να εξαπλώνεται γρήγορα, η παραγωγή βιομηχανοποιημένου και επεξεργασμένου τυριού αυξήθηκε δραματικά. Η συνολική παραγωγή αυξήθηκε από ~200.000 τόνους το 1920 σε 22,17 εκατομμύρια μετρικούς τόνους σήμερα, σε μια παγκόσμια αγορά αξίας δισεκατομμυρίων δολαρίων (<https://www.idfa.org/history-of-cheese>).



Εικόνα 1: Η παγκόσμια παραγωγή τυριού την οκταετία 2015-2022 καθώς και η εκτίμηση για φέτος (Πηγή: <https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide/>).

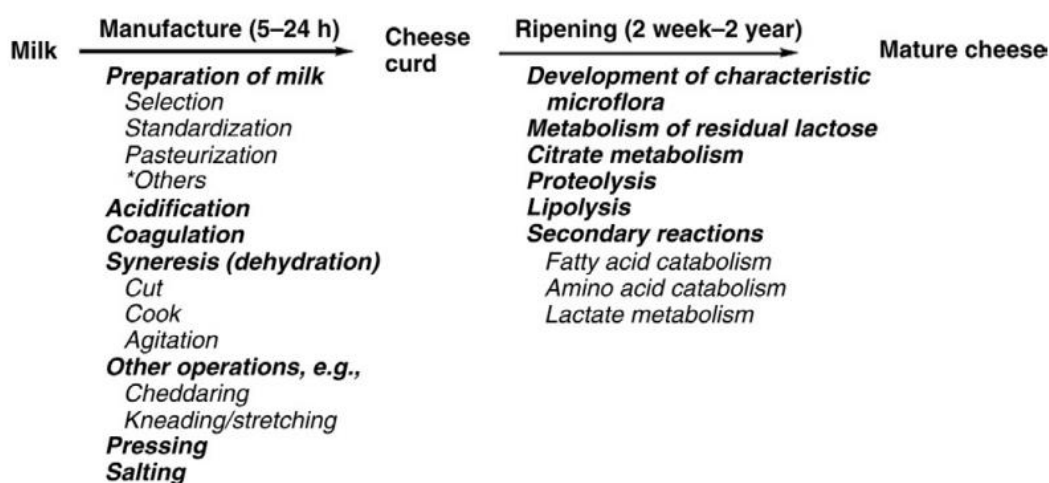
1.2 Σκοπός της εργασίας

Το τυρί είναι η πιο ποικιλόμορφη ομάδα γαλακτοκομικών προϊόντων και είναι, αναμφισβήτητα, το πιο ενδιαφέρον και προκλητικό ακαδημαϊκά μεταξύ αυτών. Ενώ πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα, αν παρασκευάζονται σωστά και αποθηκεύονται, είναι βιολογικά, βιοχημικά, χημικά, και σωματικά πολύ σταθερά, τα τυριά είναι, αντίθετα, βιολογικά και βιοχημικά δυναμικά και, κατά συνέπεια, είναι εγγενώς ασταθή. Καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας και της ωρίμανσης, η παραγωγή τυριού είναι μια λεπτομερώς ενορχηστρωμένη σειρά από διαδοχικά και συνακόλουθα βιοχημικά βήματα τα οποία, εάν πραγματοποιηθούν συγχρονισμένα και ισορροπημένα, οδηγούν σε προϊόντα υψηλής γευστικής και διατροφικής αξίας με πλούσια αρώματα και γεύσεις, κάτι όπως που μπορεί εύκολα να ανατραπεί με λίγους μονάχα λάθους χειρισμούς και αστοχίες (Fox and McSweeney, 2017).

Ένα από τα πλέον μοναδικά και αξιοθαύμαστα χαρακτηριστικά της τυροκομίας είναι πως από μια βασική πρώτη ύλη (γάλα από λίγα μόνο είδη) και ένα πρωτόκολλο κατεργασίας αυτής με κοινές γενικές αρχές και άξονες αναφοράς, μπορεί να παραχθεί με τεράστια ποικιλία μοναδικών προϊόντων. Δεν μπορεί να παραλειφθεί επίσης το γεγονός πως η μελέτη της τυροκομίας και η ωρίμανση των τελικών προϊόντων περιλαμβάνει άπτεται μιας ευρύτατης γκάμας επιστημονικών κλάδων: τη χημεία και τη βιοχημεία των συστατικών του γάλακτος, την κλασματοποίηση και χημικός χαρακτηρισμός των συστατικών του τυριού, μικροβιολογία, ενζυμολογία, μοριακή γενετική, χημεία γεύσης, διατροφολογία, τοξικολογία, ρεολογία και χημική μηχανική.

Δεν είναι περίεργο, ως εκ τούτου, ότι πολλοί επιστήμονες έχουν εμπλακεί στην μελέτη των διαδικασιών της τυροκομίας και ωρίμανσης.

Σχεδόν όλα τα τυριά, είτε αυτά έχουν πήξει μεσώ οξίνισης, είτε με συνδυασμό οξίνισης-θέρμανσης, αλλά και σε κάποια τυριά που παράγονται με τη χρήση πυτιάς, καταναλώνονται φρέσκα, δηλαδή η γεύση, η υφή και η εμφάνιση του τυριού βρίσκονται στην τελική τους μορφή στο τέλος της παραγωγής τυροπήγματος και τα τυριά αυτά δεν είναι υποβάλλονται σε περίοδο ωρίμανσης. Η παραγωγή των περισσότερων ποικιλιών τυριού που στηρίζονται στη χρήση πυτιάς μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δύο σαφώς καθορισμένες φάσεις, την παρασκευή και την ωρίμανση, οι οποίες περιλαμβάνουν μια σειρά από διαδικασίες:



* E.g., bactofugation, microfiltration, addition of color (annato)

Εικόνα 2: Διαδικασίες παραγωγής τυριών με τη χρήση πυτιάς (Fox and McSweeney, 2017)

Ως φάση παραγωγής μπορούν να οριστούν οι διεργασίες εκείνες που εκτελούνται κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών, αν και ορισμένες από αυτές, για παράδειγμα, αλάτισμα και αφυδάτωση, μπορεί να συνεχιστούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αν και το πρωτόκολλο παραγωγής διαφέρει σε λεπτομέρειες για κάποιες μεμονωμένες ποικιλίες, τα βασικά βήματα είναι κοινά για τις περισσότερες. Αυτά είναι:

οξίνιση, πήξη, αφυδάτωση (κόψιμο του πήγματος, μαγείρεμα, ανάδευση, συμπίεση, αλάτισμα και άλλες εργασίες που προάγουν τη συναίρεση του τυροπήγματος), διαχωρισμός τυροπήγματος και ορού γάλακτος, διαμόρφωση (καλούπωμα και συμπίεση) και αλάτισμα.

Η τυροκομία θα μπορούσε σε αδρές γραμμές να περιγραφεί ως μια διαδικασία αφυδάτωσης κατά την οποία τόσο η καζεΐνη όσο και το λίπος του γάλακτος, συμπυκνώνονται 6-12 φορές, ανάλογα με την ποικιλία. Ο βαθμός αφυδάτωσης ρυθμίζεται από την έκταση και τον συνδυασμό των βασικών βημάτων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, εκτός από τη χημική σύνθεση του γάλακτος. Πολυάριθμοι παράγοντες όπως τα επίπεδα υγρασίας και αλατιού, το pH και η μικροχλωρίδα του τυριού, ρυθμίζουν με τη σειρά τους και ελέγχουν τις βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την ωρίμανση των τελικών προϊόντων της τυροκομίας και ως εκ τούτου καθορίζουν τη γεύση, το άρωμα, την υφή και τη λειτουργικότητά του. Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως καθώς η φύση και η ποιότητα του τελικού τυριού καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τα στάδια παρασκευής η διαδικασία της ωρίμασης είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση και υφή των επιμέρους ποικιλιών τυριού (Fox and McSweeney, 2017).

Η σημαντικότερη ίσως διεργασία από τις παραπάνω είναι εκείνη της πήξης, που πραγματοποιείται από έναν συνδυασμό ενζύμων όπως χυμοσίνη (ή ρεννίνη), η πεψίνη, η τρυψίνη και άλλα· ένα σύνολο πρωτεϊνικών παραγόντων που όπως αναφέρθηκε ήδη καλείται πυτιά. Για χιλιάδες χρόνια και έως και τις αρχές τις δεκαετίας του 1960, χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο βόεια πυτιά, με την προσέγγιση αυτή να μην είναι ο κανόνας σήμερα, όπου η παραδοσιακή μοσχάρισια πυτιά έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από άλλες πυτιές ζωικής, μικροβιακής ή ακόμα και φυτικής προέλευσης.

Αιτία αυτής της αλλαγής στάθηκε η διαρκώς αυξανόμενη σπανιότητα και το κόστος της μοσχαρίσιας πυτιάς. Οι συνέπειες είναι πολύπλοκες. Αν και τα εναλλακτικά παρασκευάσματα ενζύμων πήξης του γάλακτος αποδίδουν ικανοποιητικά σε ένα ευρύ φάσμα παραγωγής τυριού, η χρήση τους έχει δημιουργήσει μια σειρά από σημαντικά και ενδιαφέροντα ερωτήματα που απασχολούν την ερευνητική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες. Το ενδιαφέρον γύρω από τα ερωτήματα αυτά είναι μεγάλο καθώς οι απαντήσεις τους και η άμεση εφαρμογή καινοτόμων προσεγγίσεων στη βιομηχανική παραγωγή, αναμένεται να επηρεάσουν σημαντικά μια από τις μεγαλύτερες αγορές τροφίμων παγκοσμίως (Nelson, 1975).

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι η παρουσίαση των πηκτικών ενζύμων που αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο της τεχνολογίας της τυροκομίας, με την πυτιά και τα βασικά χαρακτηριστικά αυτής καθώς και των επιμέρους συστατικών της να παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 2, αλλά και την τρέχουσα κατάσταση της τεχνολογίας ενζύμων πήξης γάλακτος με τα υποκατάστατα της πυτιάς προερχόμενα από μια ποικιλία οργανισμών και διεργασιών να παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3. Πριν παρουσιαστούν τα επιμέρους χαρακτηριστικά των ενζύμων πήξης, κρίνεται απαραίτητη μια γενική εισαγωγή στα χαρακτηριστικά των μορίων αυτών που ανήκουν στην οικογένεια των (ασπαρτικών) πρωτεασών.

1.3 Ασπαρτικές Πρωτεάσες

Η διαδικασία της διάσπασης πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε μικρότερα πεπτίδια ή αμινοξέα, καλείται πρωτεόλυση. Πραγματοποιείται μέσω της υδρόλυσης ενός πεπτιδικού δεσμού είτε από ένζυμα που ονομάζονται πρωτεολυτικά ένζυμα, πρωτεϊνάσες, πρωτεάσες ή πεπτιδάσες είτε και από φυσικοχημικούς παράγοντες όπως η δράση ανόργανων οξέων και θερμότητας. Όλοι οι οργανισμοί, τα κύτταρα και οι ιστοί απαιτούν πρωτεόλυση για τον έλεγχο του μεταβολισμού και της ανάπτυξης (Dunn,

2011). Η πρωτεόλυση εξυπηρετεί πολλούς σκοπούς. Για παράδειγμα, τα πεπτικά ένζυμα διασπούν τις πρωτεΐνες στα τρόφιμα για να παρέχουν αμινοξέα, ενώ η πρωτεολυτική επεξεργασία μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας μετά τη σύνθεσή της μπορεί να είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενός ενεργού ενζύμου. Η πρωτεόλυση είναι σημαντική στη ρύθμιση ορισμένων φυσιολογικών και κυτταρικών διεργασιών, καθώς και στην πρόληψη της συσσώρευσης ανεπιθύμητων ή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών στα κύτταρα.

Οι όροι, πρωτεολυτικό ένζυμο, πρωτεϊνάση, πρωτεάση ή πεπτιδάση, συχνά πιστεύεται ότι είναι συνώνυμοι, αλλά στην πραγματικότητα δεν συμβαίνει αυτό. Οι Grassmann και Dyckerhoff (1928) πρότειναν τη χρήση του όρου «πρωτεϊνάση» για όλες τις πρωτεάσες που εμφανίζουν ειδικότητα για ανέπαφες πρωτεΐνες και ο όρος «πεπτιδάση» να είναι συνώνυμος με την εξωπεπτιδάση, δηλαδή να αναφέρεται σε μια «υδρολάση πεπτιδικού (δεσμού)», η οποία δρα ειδικά κοντά στο άμινο- ή στο καρβοξυτελικό άκρο ενός πολυπεπτιδίου (Barrett and McDonald, 1986). Σήμερα, οι πεπτιδάσες ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες με βάση το πρότυπο διάσπασής τους: ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες διασπούν εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς και εξωπεπτιδάσες, οι οποίες διασπούν τους N- ή O-τελικούς πεπτιδικούς δεσμούς μιας πρωτεΐνης ή πολυπεπτιδίου.

Όλα τα πρωτεολυτικά ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τον τύπο κατάλυσης που πραγματοποιούν βάσει του οποίου υπάρχουν έξι κατηγορίες καθώς και μια έβδομη κατηγορία η οποία μελετάται και δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως (Rawlings, 2013). Ο τύπος κατάλυσης βοηθά στον προσδιορισμό του pH στο οποίο λειτουργεί βέλτιστα η πεπτιδάση και των αναστολέων που μπορούν δυνητικά να την απενεργοποιήσουν. Η υδρόλυση από μια πεπτιδάση μπορεί να περιγραφεί ως αντίδραση οξέος-βάσης. Οι θέσεις κατάλυσης μπορεί να είναι το υδροξύλιο μιας

σερίνης ή θρεονίνης ή η θειόλη μιας κυστεΐνης και με τις πρωτεάσες αυτές να ονομάζονται αντίστοιχα. Ένα μόριο νερού μπορεί είτε να ενεργοποιηθεί από τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων (ασπαρτικά ή γλουταμινικά), είτε από ένα ιόν μετάλλου που συνδέεται με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων. Έτσι, οι τύποι κατάλυσης είναι γνωστοί ως ασπαρτύλ-, γλουταμυλ- ή μεταλλο-πεπτιδάσες.

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες, αντικείμενο αυτής της εργασίας, είναι όλες ενδοπεπτιδάσες, επομένως, για λόγους απλότητας, ο όρος «πρωτεάση» χρησιμοποιείται παντού και ο όρος «πεπτιδάση» όταν γίνεται αναφορά σε οποιαδήποτε άλλη υδρολάση πεπτιδικού δεσμού. Στην ονοματολογία των ενζύμων, όλες οι υδρολάσες είναι Κατηγορίας 3 και εκείνες που υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς είναι της Υποκατηγορίας 3.4. Οι ασπαρτικές πρωτεάσες ορίζονται ως EC 3.4.23 εντός του οποίου η πεψίνη είναι EC 3.4.23.1 και η χυμοσίνη είναι EC 3.4.23.4 (Rawlings, 2013).

Όλες οι ασπαρτικές πρωτεάσες έχουν ένα βέλτιστο όξινο pH και αναστέλλονται από την πεπστατίνη. Για να διασπαστεί ένας πεπτιδικός δεσμός μέσα σε μια πρωτεΐνη ή ένα πολυπεπίδιο, μια πρωτεάση πρέπει να αναγνωρίσει και να δεσμεύσει μια περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που περικλείει τον σχιζόμενο πεπτιδικό δεσμό (δηλαδή τον δεσμό που πρόκειται να διασπαστεί). Οι πρωτεάσες ποικίλλουν ως προς τον αριθμό των αμινοξέων που απαρτίζουν την αλληλουχία που αναγνωρίζουν και δρουν, αλλά οι περισσότερες δεσμεύουν πολλά υπολείμματα αμινοξέων στο ενεργό τους κέντρο.

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Εμφανίζονται σε θηλαστικά, πουλιά, ψάρια, φυτά, μύκητες, βακτήρια και ιούς. Στην Εικόνα 3 παρατίθενται παραδείγματα πολλών σημαντικών ασπαρτικών πρωτεασών και τις βιολογικές τους λειτουργίες. Καθώς οι ασπαρτικές πρωτεάσες είναι σημαντικές στην

ιατρική και τη βιομηχανία, ήταν από τα πρώτα ένζυμα που μελετήθηκαν, που χρονολογούνται από την εργασία του Schwann στην ανθρώπινη πεψίνη το 1836. Η βιομηχανική παραγωγή των ασπαρτικών πρωτεασών χρονολογείται από το 1874 όταν ο Christian Hansen εξήγαγε χυμοσίνη από το στομάχι μοσχαριών και τη χρησιμοποίησε για την παρασκευή τυριού (Nielsen et al., 2000). Είναι βέλτιστα ενεργές στην περιοχή pH 2-4, είναι εξαιρετικά σταθερές σε pH 2-6, αλλά υφίστανται σταδιακή αυτόλυση σε αυτές τις τιμές pH. Σε ουδέτερο και αλκαλικό pH, υφίστανται γρήγορα μη αναστρέψιμη μετουσίωση. Όλες οι ασπαρτικές πρωτεάσες είναι επιρρεπείς στην αναστολή από την πεπστατίνη, ένα τροποποιημένο πενταπεπτίδιο που παράγεται από το μυκητιακό στέλεχος *Streptomyces spp.* (Umezawa et al., 1970).

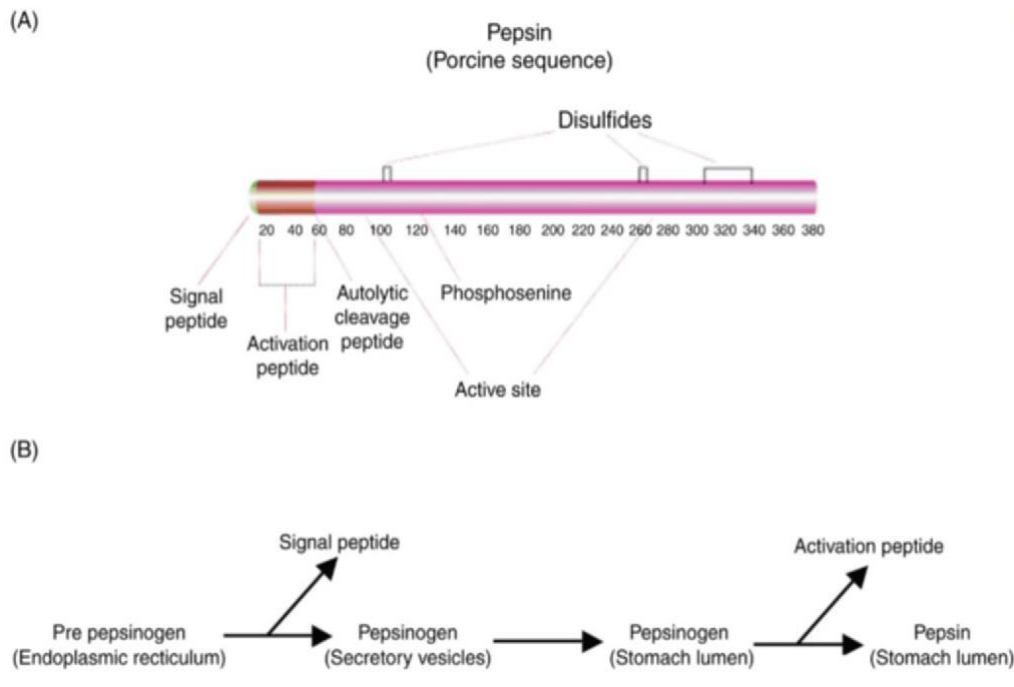
TABLE 4.1 Examples of Aspartyl Proteinases and Their Biological Functions

EC Number	Name	Source	Examples of Species	Biological Function
3.4.23.1	Pepsin A	Gastric juice	Human, pig, Japanese macaque, Rhesus macaque, rabbit, chicken, bovine, black bear, tuna.	Protein digestion in the stomach
3.4.23.2	Pepsin B	Gastric juice	Bovine, pig	Protein digestion in the stomach
3.4.23	Pepsin F	Stomach	Rabbit	Protein digestion in the stomach
3.4.23.3	Pepsin C (gastricsin)	Gastric juice, seminal plasma	Human, guinea pig, rat, frog	Protein digestion in the stomach and seminal plasma; immunofertility
3.4.23.B1	Napsin	Renal tubules; lung tissue	Human	Function unknown
3.4.23.B8	HTLV-1	Human T-cells	Human	Oncovirus of <i>Retroviridae</i> family; processes viral polyproteins for virion assembly
3.4.23.B24	Signal peptide peptidase (SPP)	Intramembrane proteinase	Human	Cleavage of signal peptides
3.4.23.4	Chymosin	Neonatal gastric juice of some mammals	Cow, sheep, goat, pig, buffalo, camel, some monkeys, cat, rat, and seal	Protein digestion in the stomach
3.4.23.5	Cathepsin D	Intracellular vesicles (lysosomes, endosomes)	Human, pig, mouse, rat, chicken	Proteolysis in lysosomes. Postnatal tissue homeostasis; mediator of induced-apoptosis; stimulates cancer cell growth.
3.4.23.12	Nepenthesin I, II	Plant leaves	<i>Nepenthes distillatoria</i> (pitcher plant or badura)	Digestion of prey, for example, insects
3.4.23.15	Renin	Kidney; plasma	Human, mouse, rat	Renin-angiotensin aldosterone system (RAAS)—regulates arterial blood pressure
3.4.23.16	Retropepsin (HIV-1)	Retroviruses	Human	Life cycle of HIV
3.4.23.17	Proopiomelanocortin converting enzyme (yapsin A) (Yap3 or yapsin 1 in yeast)	Pituitary gland; <i>S. cerevisiae</i>	Bovine	Prohormone-converting enzyme
3.4.23.18	Aspergillopepsin I	Various <i>Aspergillus</i> sp.		Hydrolysis of proteins with broad specificity; activation of trypsinogen; nonmilk-clotting
3.4.23.19	Aspergillopepsin II	<i>Niger</i> var. <i>macrosporus</i>		Nonpepsin type and pepstatin insensitive aspartyl proteinase with broad hydrolytic specificity (Huang et al., 2000)
3.4.23.20	Penicillopepsin	<i>P. janthinellus</i> ; <i>P. roqueforti</i>		Hydrolysis of proteins with broad specificity similar to that of pepsin A,

Εικόνα 3: Παραδείγματα ασπαρτικών πρωτεασών και βιολογικές τους λειτουργίες (Uniacke-Lowe and Fox, 2017)

Οι περισσότερες ασπαρτικές πρωτεάσες είναι πρωτεΐνες που αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 32 έως 39 kDa και αποτελούνται από περίπου 330 αμινοξέα. Οι ασπαρτικές πρωτεάσες έχουν δύο ενεργά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στην καταλυτική τους θέση που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία τους. Τα δύο αυτά αμινοξέα βρίσκονται μέσα σε δύο χαρακτηριστικές αλληλουχίες, **Asp32**-Thr-Gly-Ser στην αμινο-τελική περιοχή και ένα αντίστοιχο **Asp215**-Thr-Gly-Ser/Thr στην καρβόξυ-τελική περιοχή. Αυτά τα κατάλοιπα ασπαρτικού είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση ενός μορίου νερού, το οποίο μεσολαβεί στην πυρηνόφιλη επίθεση στον πεπτιδικό δεσμό που πρόκειται να διασπαστεί (Yegin and Dekker, 2013).

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες συντίθενται ως προπροένζυμα (ζυμογόνο), τα οποία είναι ανενεργοί πρόδρομοι των ενζύμων που έχουν σχεδιαστεί για να προστατεύουν το ένζυμο από την πρωτεόλυση. Το ζυμογόνο μετατρέπεται αυτοκαταλυτικά σε δύο στάδια σε όξινο pH στο ενεργό ένζυμο με απομάκρυνση του πεπτιδίου σήματος και του αμινο-τελικού τμήματος (Davies, 1990) (Εικόνα 4). Επίσης, σταθεροποιώντας την ανενεργή μορφή του ενζύμου, το τμήμα των περίπου 50 αμινοξέων (τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά) είναι υπεύθυνο για την αποτροπή εισόδου του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο των ενζύμων και για τον έλεγχο της αναδίπλωσης, της στόχευσης και ενεργοποίηση ζυμογόνων (Koelsch et al., 1994).



Εικόνα 4: Προπροένζυμο πεψίνης χοίρου (ζυμογόνο) που δείχνει τη θέση της αυτοκαταλυτικής διάσπασης για μετατροπή σε ενεργή πεψίνη (A) και σχηματική αφαίρεση του πεπτιδίου σήματος (20 αμινοξέα) ακολουθούμενη από αφαίρεση του πεπτιδίου ενεργοποίησης (44 αμινοξέα) (B) για την απελευθέρωση ενεργής πεψίνης στον αυλό του στομάχου (Uniacke-Lowe and Fox, 2017).

Η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση άλατος είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργοποίηση των ζυμογόνων. Για την ενεργοποίηση της προχυμοσίνης απαιτούνται 2-3 ημέρες σε pH 5,0 και 25°C, αλλά συμβαίνει σε 5-10 λεπτά σε pH 2,0 και 25°C και ιοντική ισχύ 0,1 (Chitpintyol and Crabbe, 1998). Η χυμοσίνη ενεργοποιείται σε όξινο pH με πρωτεολυτική διάσπαση των 42 αμινοοξικών κατάλοιπων του αμινο-τελικού άκρου του προπεπτιδίου της (Pedersen and Foltmann, 1975). Σε τιμές pH κάτω από 2,5 ωστόσο, ο μηχανισμός ενεργοποίησής της διαφοροποιείται από αυτό των άλλων ασπαρτικών πρωτεασών καθώς σχηματίζει ένα μόριο ψευδοχυμοσίνης (15 αμινοξέα μεγαλύτερη από την ώριμη χυμοσίνη). Η ώριμη χυμοσίνη σχηματίζεται μετά την απομάκρυνση ενός πεπτιδίου 15 αμινοξέων από την

ψευδοχυμοσίνη σε pH 4-5 (Barkholt Pedersen et al., 1979). Γενικά, το βέλτιστο pH για πρωτεολυτική δραστηριότητα είναι χαμηλότερο για τις πεψίνες (σε ~ pH 2) από ότι για τη γαστρισίνη ή τη χυμοσίνη (βέλτιστο pH 3-4). Στα ενήλικα θηλαστικά, η πέψη στη γαστρεντερική οδό λαμβάνει χώρα μέσω της συντονισμένης δράσης πολλών πρωτεασών, η καθεμία με διαφορετική ειδικότητα και διαφορετικό pH βέλτιστης δραστηριότητας. Ενώ η πεψίνη έχει μέγιστη δράση σε pH 2, η γαστρική πέψη λαμβάνει χώρα από pH 3 έως 5. Η υψηλή πρωτεολυτική δραστηριότητα της πεψίνης σε pH 2 οδηγεί σε μη αναστρέψιμη ενεργοποίηση του πεψινογόνου ενώ, σε αυτό το pH, η χυμοσίνη έχει ασθενή πρωτεολυτική δράση αν και περιορισμένη πρωτεόλυση της προχυμοσίνης συνεχίζει να συμβαίνει (Foltmann, 1993).

1.3.1 Γαστρικές Πρωτεάσες

Οι γαστρικές πρωτεάσες, οι καλύτερα χαρακτηρισμένες από τις ασπαρτικές πρωτεάσες, περιλαμβάνουν πέντε ένζυμα: Την πεψίνη A (EC 3.4.23.1, η οποία έχει απομονωθεί από πολλά είδη, ειδικά από τον χοίρο και τον άνθρωπο, αλλά και από βοοειδή, πρόβατα και αρουραίους), την πεψίνη B [EC 3.4.23.2, η οποία έχει πολύ χαμηλότερη γενική πρωτεολυτική δράση από την πεψίνη A και έχει βρεθεί μόνο σε εκχυλίσματα από χοίρους (Nielsen and Foltmann, 1995; Ryle, 1970; Tang, 1970)] και στο γαστρικό βλεννογόνο του σκύλου (Narita et al., 2002), την γαστρισίνη (gastricsin, EC 3.4.23.3, που ονομάζεται επίσης πεψίνη C), την χυμοσίνη (EC 3.4.23.4) και τέλος τις πεψίνες F και M [που παράγονται μόνο κατά την πρώιμη στάδια ανάπτυξης του κουνελιού (Kageyama et al., 1990)]. Τα τελευταία φαίνεται να φέρουν παρόμοια

φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες με τη χυμοσίνη χωρίς ωστόσο να τους έχει αποδοθεί αριθμός EC.

Η πεψίνη A είναι η καλύτερα μελετημένη γαστρική πρωτεάση (Kageyama et al., 2010; Kageyama, 2002; Ryle, 1970). Η πεψίνη C απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από τους Foltmann και Jensen (1982) ενώ η χυμοσίνη περιγράφεται σε αρκετά άρθρα που αναφέρονται αργότερα. Μικροετερογένεια, λόγω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, εμφανίζεται συχνά εντός της κύριας ομάδας γαστρικών πρωτεϊνών, για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί πέντε ηλεκτροφορητικά διαφορετικές αλλά ανοσοχημικά παρόμοιες ανθρώπινες πεψίνες (Foltmann, 1981). Η πεψίνη χοίρου φωσφορυλιώνεται στο αμινοξικό κατάλοιπο της θέσης 68 (σερίνη) αλλά έχει επίσης εντοπισθεί και μη φωσφορυλιωμένη πεψίνη (πεψίνη D) (Foltmann et al., 1981). Εκτός από φωσφορυλίωση, μπορεί να συμβεί γλυκοζυλίωση, όπως έχει αναφερθεί στην περίπτωση του πεψινογόνου πιθήκου, το οποίο έχει μια ομάδα υδατανθράκων συνδεδεμένη με ένα υπόλειμμα ασπαραγίνης.

Τα χαρακτηριστικά των γαστρικών πρωτεασών εξετάστηκαν διεξοδικά και παρουσιάστηκαν με λεπτομέρεια από τον Kageyama (2002). Εκτός από το ρόλο τους στην κατάποση τροφής, τα ακατέργαστα παρασκευάσματα γαστρικών πρωτεϊνών έχουν μεγάλη βιομηχανική σημασία ως πηκτικά γάλακτος (πυτιά) στην παραγωγή τυριού – η παγκόσμια αγορά πυτιάς ανέρχεται περίπου 300 εκατομμύρια ευρώ ετησίως (σύμφωνα με δεδομένα του 2018) ενώ περίπου το 75% της συνολικής παραγωγής τυριού (~ 18×10^6 τόνοι) είναι ποικιλίες με πυτιά, με το μεγαλύτερο μέρος της υπόλοιπης να είναι με πήξη μέσω οξίνισης. Πολλές πρωτεάσες πήζουν το γάλα κάτω από κατάλληλες συνθήκες, αλλά οι περισσότερες είναι πολύ πρωτεολυτικές σε σχέση με τη δράση τους στην πήξη του γάλακτος. Κατά συνέπεια, υδρολύουν τις καζεΐνες στο πήγμα πολύ γρήγορα, προκαλώντας μειωμένη απόδοση τυριού. Η υπερβολική

πρωτεόλυση ή η εσφαλμένη εξειδίκευση οδηγεί σε ελαττώματα στη γεύση (αφήνουν μια χαρακτηριστική πικρή επίγευση), αλλά και στην υφή του τυριού. Αν και οι φυτικές πρωτεάσες φαίνεται να έχουν χρησιμοποιηθεί ως πυτιά από τους προϊστορικούς χρόνους, οι γαστρικές πρωτεάσες από μόσχους, κατσίκια ή αρνιά έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως πυτιά, με πολύ λίγες εξαιρέσεις.

Κεφάλαιο 2: Πυτιά

2.1 Γενικές πληροφορίες

Πυτιά ονομάζεται ο συνδυασμός ενζύμων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην τυροκομία για την πήξη του γάλακτος και, κατά συνέπεια, στην παρασκευή τυριών και αποτελείται από την χυμοσίνη (ή ρεννίνη), την πεψίνη και σε πολύ μικρότερες ποσότητες την τρυψίνη και τις πεπτιδάσες και λαμβάνεται με εκχύλιση από το 4^ο στομάχι (ήνυστρο) των μηρυκαστικών. Το κύριο ένζυμο πήξης του γάλακτος που υπάρχει στην ακατέργαστη πυτιά σε μεγάλες ποσότητες είναι η ρεννίνη ή αλλιώς χυμοσίνη η οποία ανήκει στην ομάδα των όξινων ασπαρτικών πρωτεασών (Garg and Johri, 1994) και είναι το ένζυμο με την μεγαλύτερη πηκτική δύναμη συγκριτικά με άλλες ασπαρτικές πρωτεϊνάσες.

Για την παρασκευή τυριού χρησιμοποιείται πυτιά από νεαρά μηρυκαστικά (μικρότερα των 3 μηνών) και θα πρέπει, μέχρι την ημέρα της σφαγής τους, να έχουν τραφεί μόνο με μητρικό γάλα και ο λόγος είναι γιατί όσο μεγαλώνει το ζώο η χυμοσίνη αντικαθίσταται από την πεψίνη η οποία μπορεί να επιφέρει υψηλές απώλειες λίπους λόγω της χαλαρής δομής του τυροπήγματος που σχηματίζεται με την χυμοσίνη (Garg and Johri, 1994) και μπορεί να επηρεάσει και την ποιότητα του προϊόντος. Ανακαλύφθηκε τυχαία όταν, στο παρελθόν, κάποιος μετέφερε γάλα μέσα σε δοχείο φτιαγμένο από στομάχι μοσχαριού ή αρνιού και τότε αυτό άρχισε να πήζει. Το όνομα χυμοσίνη χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1840 από τον Γάλλο φαρμακοποιό Jean Baptiste Deschamps (Andrén, 2011) ενώ ο άνθρωπος που την παρασκεύασε πρώτος με τη διαδικασία της εκχύλισης ήταν ο Christian Ditlev Ammentorp Hansen το 1870. Η ορολογία «πυτιά» είναι η εμπορική ονομασία της χυμοσίνης, η πήξη όμως του

γάλακτος οφείλεται κατά κύριο λόγο στο ένζυμο «χυμοσίνη» γι' αυτό πολλοί συγγέουν τους δύο αυτούς όρους.

2.2 Χαρακτηριστικά και δομή της τυτιάς

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και τη Διεθνή Ομοσπονδία Γάλακτος η τυτιά πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις: να είναι διαλυτή στο νερό ώστε να διασπάται ομοιόμορφα στο γάλα, να μην επηρεάζεται από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ώστε να μην προσδίδει ανεπιθύμητη γεύση και οσμή στο τυρί, να μην είναι τοξικό, να μην έχει περιορισμούς στην πρωτεολυτική και λιπολυτική δράση και να μην έχει αντιβιοτική δράση.

2.2.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

- **pH:** Οι τιμές του pH της, ανάλογα με το αν είναι κατσικίσια, αρνίσια, βοδινή κτλ. ή είναι εμπορίου ή παραδοσιακή, ποικίλλουν. Το pH της εμπορικής τυτιάς είναι περίπου 5,5 ενώ όσον αφορά την παραδοσιακή τυτιά οι τιμές της εξαρτώνται από τον τρόπο παραγωγής τους. Αν σε μια παραδοσιακή παραγωγή αρνίσιας και κατσικίσιας τυτιάς χρησιμοποιηθεί η ίδια μεθοδολογία παρασκευής τότε το pH της αρνίσιας τυτιάς έχει εύρος από 5,2 έως 5,3 ενώ της κατσικίσιας 4,2 έως 4,3 (Ανυφαντάκης 1976).
- **NaCl, πρωτεΐνες και λιπαρά:** η αλατότητα (NaCl) ποικίλλει ανάλογα τη χημική σύνθεση και κυμαίνεται από 6,5% σε 13,46%, οι πρωτεΐνες έχουν εύρος από 1,5% έως και 1,99% και τα λιπαρά από 3,22% έως 3,65% (Moschoroulou, 2011) (Moschoroulou et al., 2009).
- **Χρώμα:** Ανάλογα με τη διατροφή που κάνει το ζώο, το χρώμα της τυτιάς ποικίλλει και μπορεί να είναι λευκό, κιτρινωπό ή και σκούρο. Αν το ζώο

τρέφεται αποκλειστικά με μητρικό γάλα τότε το χρώμα της πυτιάς είναι λευκό ενώ αν τρέφεται με χόρτα τότε είναι πρασινωπό (Piredda and Addis 1998).

- **Υφή:** Η υφή της πυτιάς εξαρτάται από την μέθοδο παραγωγής της, για παράδειγμα η υφή της βιομηχανικής πυτιάς είναι συνήθως κολλώδης (Foltmann, 1993).

2.2.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα με τον Animal-derived Food Enzymes (A.M.A.F.E.) για την διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή, η εμπορική πυτιά έχει κάποιους μικροβιολογικούς περιορισμούς με ανώτατο όριο: 30 cfu/g κολοβακτηρίδια, 5×10^4 cfu/g ολική μεσόφιλη χλωρίδα, 3 ppm αρσενικό, 10 ppm μόλυβδο, 40 ppm βαρέα μέταλλα (Pérols et al., 1997), στα 25g δείγματος να μην υπάρχει καθόλου E. coli και Salmonella sp. καθώς επίσης να στερείται μυκοτοξινών και αντιβακτηριακής δράσης. Βέβαια, εκτός από τα προαναφερόμενα, η μικροβιολογική ποιότητα της εμπορικής πυτιάς εξαρτάται και από τις συνθήκες αποθήκευσης, προετοιμασίας καθώς επίσης και την ποιότητα της πρώτης ύλης (Moschoroulou, 2011). Οι παλαιότερες παραδοσιακές πυτιές είχαν χαρακτηριστεί επικίνδυνες για την υγεία κι αυτός ήταν ένας λόγος που κατά καιρούς απέκτησε το ενδιαφέρον των ερευνητών.

1. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε το 2007 από τους E. Moschoroulou, I. Kandarakis, E. Anifantakis, πάρθηκαν δείγματα ρευστής βιομηχανικής πυτιάς που χρησιμοποιείται για την παρασκευή φέτας από 20 διαφορετικά τυροκομεία της Ελλάδος δύο διαφορετικών περιοχών (πυτιά Α και πυτιά Β) και αναλύθηκαν ως προς τη χημική τους σύσταση, την μικροβιολογική τους ποιότητα και τις ενζυμικές τους ιδιότητες. Βασικό τους συμπέρασμα ήταν πως τα περισσότερα χαρακτηριστικά των δύο αυτών δειγμάτων πυτιάς διαφέρουν ανάλογα την περιοχή χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι δεν είναι μικροβιολογικά

σταθερές, αντιθέτως το πείραμα αυτό έδειξε πως οι πυτιές αυτές ήταν ποιοτικά αποδεκτές. Όσον αφορά την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, η πυτιά Α είχε 7.2×10^4 cfu/ml και η πυτιά Β 2.45×10^4 cfu/ml με την πυτιά Α να έχει μεγαλύτερο αριθμό ΟΜΧ κι αυτό οφείλεται στο ότι περιείχε λιγότερο αλάτι.

2. Σε άλλο πείραμα που πραγματοποιήθηκε το 1983 από τους Cossedu & Pisanu αποδείχθηκε ότι ανάλογα με τον τρόπο αλατίσματος, παρεμποδίζεται πλήρως η ανάπτυξη σταφυλόκοκκων σε αρνίσια πυτιά φτιαγμένη από ήνυστρα εμβολιασμένα με παθογόνους σταφυλόκοκκους μετά την 2^η ή 67^η μέρα διατήρησής της. Επίσης, το 1982 συμπέραναν πως η διάρκεια επιβίωσης των *Salmonella abortus onis* και *Brucella melitensis* μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία συντήρησης της πυτιάς.
3. Απ' την άλλη, οι βιομηχανικές πυτιές περιέχουν διάφορους μικροοργανισμούς και μάλιστα μερικοί βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες όπως αναφέρει η **E. Moschopoulou** σε άρθρο της το **2011**, όπως κολοβακτηρίδια, λακτοβάκιλλους, εντερόκοκκους, προπιονοβακτήρια, μικροοργανισμούς που σχηματίζουν σπόρια και πολλά άλλα.

2.2.3 Δομή

Η χυμοσίνη ανήκει στις όξινες ασπαρτικές πρωτεΐνάσες όπως και άλλα πηκτικά ένζυμα και συγκεκριμένα η μοσχαρίσια χυμοσίνη (η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη) έχει μοριακό βάρος 35,6 kDa στην πρωτογενή δομή της, ενώ οι υπόλοιπες ασπαρτικές πρωτεΐνάσες κυμαίνονται στα 32-39 kDa (Andrén, 2011). Υπάρχουν δύο μορφές της

βοδινής χυμοσίνης, η χυμοσίνη Α και η χυμοσίνη Β (η οποία είναι και πιο άφθονη) και διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα αμινοξύ στην θέση 254 (Donnelly et al., 1984). Ο καταλυτικός μηχανισμός των πηκτικών ενζύμων και κατά συνέπεια της χυμοσίνης είναι να υδρολύσει στην επιφάνεια του μικκυλίου της καζεΐνης τον δεσμό ανάμεσα στα Phe – Met στις θέσεις 105 – 106 με σκοπό να αποσταθεροποιήσει τα μικκύλια της καζεΐνης τα οποία πήζουν παρουσία Ca^{2+} .

Η πυτιά των μικρών μηρυκαστικών αποτελείται σε μεγάλες ποσότητες από την χυμοσίνη και σε μικρότερες ποσότητες από την πεψίνη Α και την γαστρίσίνη. Η προχυμοσίνη, το πεψινογόνο και η προγαστρίσίνη είναι ανενεργά ένζυμα (ζυμογόνα) και είναι οι πρώιμες μορφές της χυμοσίνης, της πεψίνης και της γαστρίσινης αντίστοιχα, βρίσκονται στο ήνυστρο νεαρών μηρυκαστικών στο οποίο και συντίθεται η προχυμοσίνη και, στη συνέχεια, με τον διαχωρισμό ενός πεπτιδίου απελευθερώνεται η χυμοσίνη (Διδακτορική διατριβή Γιαννόγλου, 2016). Η έκκριση της προχυμοσίνης στον γαστρικό βλεννογόνο επηρεάζεται σημαντικά από τη διατροφή και την ηλικία του ζώου, όσο πιο μικρό είναι το ζώο που τρέφεται με γάλα, τόσο περισσότερη προχυμοσίνη παράγεται. Αυτός είναι και ο λόγος που μοσχάρια μικρότερα των 3 μηνών που τρέφονται με γάλα έχουν περιεκτικότητα σε προχυμοσίνη περίπου 70-80% (Andrén and Björck, 1986). Τα ζυμογόνα αυτά μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα κάτω από όξινες συνθήκες λόγω της περιορισμένης πρωτεόλυσης και έτσι δεν πραγματοποιείται καμία διαδικασία ενεργοποίησης κατά τη διάρκεια παρασκευής πυτιάς από μικρά μηρυκαστικά (Moschoroulou, 2011).

Σε ένα μηρυκαστικό το οποίο έχει απογαλακτιστεί ή τρέφεται με συμπυκνώματα γάλακτος, το ποσοστό της χυμοσίνης μειώνεται κατά 30% όταν ακόμη αυτό είναι 6 μηνών. Γενικότερα, όσο μεγαλώνει το ζώο τόσο μειώνονται και τα

ποσοστά της χυμοσίνης στο ήνυστρό του γεγονός που συνδέει όλο και πιο πολύ τον θηλασμό με τα υψηλά ποσοστά της χυμοσίνης (Andrén, 2011).

2.3 Πεψίνη

Εκτός από την χυμοσίνη, από τα μηρυκαστικά εκκρίνεται και η πεψίνη η οποία έχει την ικανότητα να υδρολύει δεσμούς με υπολείμματα Phe, Tyr, Leu ή Val (Agudelo et al., 2004). Η πεψίνη ανήκει επίσης στην ομάδα των όξινων ασπαρτικών πρωτεϊνών, αποτελείται από μία πολυπεπτιδική ενζυματική αλυσίδα με 324 υπολείμματα αμινοξέων, έχει βέλτιστο pH 1,0 στο ισοηλεκτρικό της σημείο, έχει μοριακό βάρος 35 kDa, είναι το κύριο πρωτεολυτικό ένζυμο του γαστρικού υγρού των σπονδυλωτών (Spelzini et al., 2006) και βρίσκεται και αυτή στο ήνυστρο των μηρυκαστικών σε μικρότερες ποσότητες από την χυμοσίνη (περίπου 6-12%) καθώς επίσης κατέχει ισχυρή πρωτεολυτική δραστηριότητα στις όξινες συνθήκες του στομαχιού (Andrén, 2011). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όσο μεγαλώνει το μηρυκαστικό ζώο, τόσο μειώνεται η χυμοσίνη γεγονός μη επιθυμητό όταν πρόκειται να παρασκευασθεί τυρί. Ο Andrén, 2011 έφτιαξε έναν πίνακα που αναφέρει τον τρόπο που τράφηκε ένα μοσχάρι, σε τι ηλικία βρισκόταν και τι ποσοστά χυμοσίνης και πεψίνης εκχυλίστηκαν:

Διατροφή	Ηλικία (σε μήνες)	Χυμοσίνη (%)	Πεψίνη (%)
Μοσχάρι που θηλάζει ή τρέφεται με γάλα	<3	90	10

Μοσχάρι που τρέφεται με τροφή και θηλάζει	6	75	25
Μοσχάρι που τρέφεται με συμπυκνώματα	6	30	70
Αγελάδα που τρέφεται με συμπύκνωμα και σανό	>24	Ίχνη	100

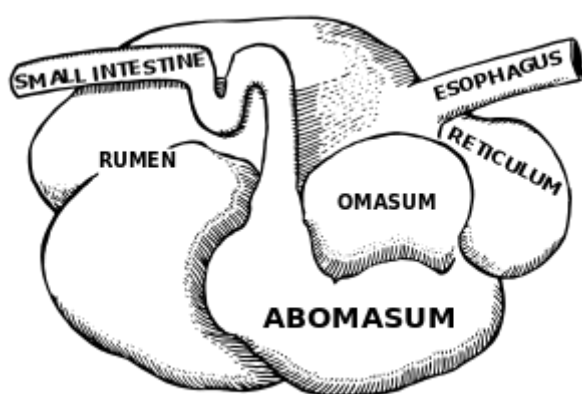
Η πεψίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της σαν πηκτικό ένζυμο λόγω της χαμηλής ειδικής δραστηριότητάς της που μπορεί να επιφέρει χαμηλή απόδοση και ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά στο τυρί, μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την χυμοσίνη σαν πηκτικό μέσο (περίπου 80% πεψίνη και 20% χυμοσίνης) σε προϊόντα που απαγορεύεται η χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (Leite Júnior et al., 2016). Επίσης, σε αντίθεση με την χυμοσίνη, δεν προκαλεί υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών που περιλαμβάνουν αρωματικά αμινοξέα (Rolet-Répecaud et al., 2013) αλλά στο πείραμα των **Leite Junior, Tribst & Cristianini το 2014**, αποδείχθηκε ότι τα αποτελέσματα της HPH διαδικασίας (High Pressure Homogenization, αναφέρεται στο **2.5.1 Πηκτική δύναμη**) μειώνουν την πρωτεολυτική δράση του κλάσματος της πεψίνης χωρίς να συμβάλλουν αρνητικά στην πήξη του ενζύμου (Leite Júnior et al., 2014). Υπάρχουν αρκετοί τρόποι διαχωρισμού των ενζύμων χυμοσίνης και πεψίνης, κάποιιοι από αυτούς είναι η χρωματογραφία ανιοανταλλαγής σε στήλη Mono Q HR 5/5 με FPLC σύστημα (Rauch et al., 1988), μια ανοσοχημική μέθοδος από τους (Beránková et al., 1989) και μια μέθοδος διαφορικής θερμικής αδρανοποίησης των (Turk et al., 1990).

2.4 Παρασκευή πυτιάς

2.4.1 Συλλογή

Όπως προαναφέρθηκε, η πυτιά είναι ένας συνδυασμός των ενζύμων που βρίσκεται στο 4^ο στομάχι (ήνυστρο) των νεαρών μηρυκαστικών η οποία λαμβάνεται με εκχύλιση. Το ζώο που προορίζεται για την παρασκευή πυτιάς αφήνεται να θηλάσει περίπου 20 μέρες πριν τη σφαγή και αξίζει να σημειωθεί πως η πυτιά θεωρείται υποπροϊόν αφού το νεαρό μηρυκαστικό δεν σφάζεται με μοναδικό σκοπό την παραλαβή της πυτιάς. Το σφάγιο προορίζεται για πώληση ή κατανάλωση και η πυτιά προκύπτει σαν υποπροϊόν της παραγωγής μοσχαρίσιου κρέατος. Στην περίπτωση που το ζώο είναι ενήλικο τότε η χυμοσίνη μπορεί να υπάρχει σε πολύ μικρές ποσότητες στο ήνυστρο ή να μην υπάρχει καθόλου, όπως επίσης και στην περίπτωση που το νεαρό έχει απογαλακτιστεί, τότε η περιεκτικότητα της χυμοσίνης έχει μειωθεί.

2.4.2 Παρασκευή πυτιάς από ήνυστρα μοσχαριών



[Αυτή η φωτογραφία](#) από Άγνωστος συντάκτης με άδεια χρήσης [CC BY-SA](#)

Αρχικά λαμβάνεται ένα στομάχι νεαρού και μη απογαλακτισμένου ζώου. Σύμφωνα με τη φωτογραφία στα αριστερά, το στομάχι χωρίζεται σε 4 μέρη, πέραν του οισοφάγου και του

λεπτού εντέρου, την κοιλία, το 2^ο στομάχι των μηρυκαστικών (reticulum), το 3^ο στομάχι των μηρυκαστικών (omasum) και το 4^ο στομάχι (ήνυστρο, abomasum) (AI

Masri et al., 2018). Είναι εύκολο να τα ξεχωρίσει κανείς καθώς το 2^ο στομάχι έχει κυκλικό σχήμα και είναι εμφανές με γυμνό μάτι, το ήνυστρο είναι συνδεδεμένο με το έντερο και η κοιλιά είναι συνδεδεμένη με τον οισοφάγο. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι για την παρασκευή μοσχαρίσιας πυτιάς με παραδοσιακό τρόπο. Ένας από αυτούς είναι ο εξής:

1. Αρχικά κόβεται το στομάχι και διαχωρίζεται το ήνυστρο από τα υπόλοιπα μέρη του.
2. Στη συνέχεια τρίβουμε την επιφάνεια του ήνυστρου με αλάτι, για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών, και το αφήνουμε να ξεραθεί.
3. Αφού ξεραθεί, κόβεται σε κομματάκια και τοποθετείται σε αλάτι για μακροχρόνια συντήρηση.
4. Για να χρησιμοποιήσουμε την, πλέον, πυτιά τοποθετούνται λίγα κομμάτια της σε νερό και αφήνεται για περίπου 12 ώρες μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Όταν έρθει η ώρα να χρησιμοποιηθεί, ρίχνεται το μίγμα της πυτιάς με το νερό στο υπάρχων γάλα και χρησιμοποιείται σίτα ή σουρωτήρι για να κρατήσουν τα στερεά συστατικά τα οποία μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πηκτικά. Όλες οι διαδικασίες παρασκευής πυτιάς έχουν πολλά κοινά μεταξύ τους, ο βιομηχανικός τρόπος όμως έχει αρκετές συμπληρωματικές διαδικασίες όπως διηθήσεις και τελική υπερδιήθηση για καλύτερη διαύγεια του προϊόντος και την τυποποίηση των ιδιοτήτων του. Η μοσχαρίσια πυτιά διατίθεται στο εμπόριο σε υγρή μορφή ή σκόνη (Addis et al., 2008).

2.4.3 Παρασκευή πυτιάς από ήνυστρα αρνιών και κατσικιών

Παγκοσμίως για την πήξη του γάλακτος χρησιμοποιείται πυτιά από νεαρά μοσχάρια, σε πολλές όμως χώρες ή περιοχές όπως η Μεσόγειος χρησιμοποιείται σε

μεγάλο βαθμό η τυτιά από αρνί ή κατσίκι και η κάθε χώρα έχει διαφορετική τεχνική παρασκευής. Στην Ισπανία τα αιγοπρόβατα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή τυτιάς επιλέγονται μόνον αν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους έπιναν μόνο μητρικό γάλα και οδηγούνται σε σφαγή την 4^η εβδομάδα της ηλικίας τους. Στη συνέχεια συλλέγονται τα στομάχια τους, ξηραίνονται για περίπου 45 μέρες, αφαιρείται το εξωτερικό λίπος τους και καθαρίζονται εσωτερικά από τυχόν υπολείμματα, έπειτα αλέθονται, προστίθεται αλάτι και αλέθονται ξανά για να δημιουργηθεί ο πολτός. Αφού δημιουργηθεί ο πολτός, συντηρείται για 1 περίπου χρόνο στους 4 °C (Addis et al., 2008).

2.4.4 Παραδοσιακή Παρασκευή τυτιάς

Παραδοσιακή παρασκευή τυτιάς νοείται η Παρασκευή τυτιάς από ήνυστρα αρνιών ή / και κατσικιών η οποία φτιάχνεται μέχρι και σήμερα με εμπειρικό τρόπο από χρήστες για την παρασκευή ελληνικών τυριών όπως η Φέτα για οικιακή κατανάλωση. Όσον αφορά την μικροβιολογική της ποιότητα, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε το **2004** από τους Μοάτσου και συνεργάτες (Moatsou et al., 2004) αποδείχθηκε πως η παραδοσιακή τυτιά επηρεάζει σημαντικά την πλειοψηφία των εντερόκοκκων και των κολοβακτηριδίων των τυριών που έχουν ωριμάσει μόλις 3 ημέρες ενώ όσες πιο πολλές μέρες έχει αφεθεί το τυρί να ωριμάσει, η επίδραση των βακτηρίων αυτών εξαλείφεται. Η διαδικασία παρασκευής της έχει ως εξής:

1. Τα ήνυστρα αφήνονται να αποξηραθούν
2. Ενυδατώνονται με την προσθήκη αλμυρού νερού ή ορού γάλακτος
3. Προκαλείται μείωση του pH με την προσθήκη κρασιού ή ξυδιού για να αποτραπεί η σήψη και η ανάπτυξη μικροοργανισμών
4. Γίνεται διήθηση του διαλύματος για την έναρξη της εκχύλισης

Σύμφωνα, βέβαια, με τον **Ανυφαντάκη (1976)** (Anifantakis, 1976), τα ήνυστρα συλλέγονται αμέσως μετά τη σφαγή του ζώου, πλένονται καλά και αφήνονται σε ξηρό και αεριζόμενο χώρο για να ξηραθούν. Υποστηρίζει επίσης πως η παραδοσιακή πυτιά μπορεί να παρασκευασθεί είτε από ολόκληρο το ήνυστρο, είτε από τον ιστό του, είτε από το πηγμένο γάλα και το γαστρικό υγρό στο εσωτερικό του.

2.5 Ο ρόλος της πυτιάς στην τυροκομεία

2.5.1 Πήξη του γάλακτος για παρασκευή τυριών – Πηκτική δύναμη

2.5.1.1 Μηχανισμός πήξης

Η πήξη του γάλακτος πραγματοποιείται με τη βοήθεια των ενζύμων πήξης, κυρίως της χυμοσίνης που είναι γνωστή για την ικανότητά της να διασπά το καζεΐνομακροπεπτίδιο από την κ-καζεΐνη (Jacob et al., 2011), και γίνεται σε δύο φάσεις: στην πρώτη φάση διασπάται ο δεσμός μεταξύ Phe105 – Met106 της κ-καζεΐνης (ειδική ενζυματική υδρόλυση) και στην δεύτερη φάση συσσωρεύεται η παρα-κ-καζεΐνη, παρουσία ιόντων ασβεστίου, που σχηματίστηκε από τα διασπασμένα μικκύλια καζεΐνης (Fox et al., 2004). Τα γάλατα με υψηλή περιεκτικότητα σε κ-καζεΐνες έχουν καλύτερη αντιδραστικότητα με πυτιά και την ικανότητα καλύτερων σχηματισμών πηκτωμάτων με αποτέλεσμα να έχουν μεγαλύτερη απόδοση (**Mariani et al., 2002**).

2.5.1.2 Πηκτική ικανότητα και μέθοδοι προσδιορισμού της πηκτικής δύναμης

Η πηκτική δύναμη της πυτιάς είναι και η δραστικότητά της (Milk Clotting Activity), η ικανότητά της δηλαδή να πήξει το γάλα και ορίστηκε από έναν Αυστριακό φαρμακοποιό, τον **Franz Soxhlet** το **1877** ως ο όγκος του νωπού γάλακτος που μπορεί να πήξει μία μονάδα όγκου ή μάζας του ενζύμου στους 35 °C σε 40 λεπτά και εκφράζεται ως αναλογία, για παράδειγμα 1:5000 (1 mL πυτιάς πήξει 5000 mL γάλακτος) (Law and Tamime, 2010; McSweeney and McNamara, 2022; Shetty, 2006; Tabayehnejad et al., 2012). Πιο σύγχρονοι τρόποι προσδιορισμού των ιδιοτήτων πήξης του γάλακτος (Milk Coagulation Properties – MCP) είναι ο Latodinamografo (LAT; Foss-Italy) ο οποίος καταγράφει φυσικές και χημικές μεταβολές που συμβαίνουν στο γάλα κατά τη διάρκεια της πήξης και όταν προκαλούνται αλλαγές στο ιξώδες και την ελαστικότητα του γάλακτος από την κ-καζεΐνη και ο Computerized Renneting Meter (CRM; Polo Trade, Italy) (Annibaldi et al., 1977; Zannoni & Annibaldi, 1981; Dadousis et al., 2016).

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε το **2014** από τους **Leite Junior, Tribst & Cristianini** με σκοπό να προσδιορίσουν τις πρωτεολυτικές και τις πηκτικές δραστικότητες μοσχαρίσιας πυτιάς με υψηλής πίεσης ομογενοποίηση (High Pressure Homogenization ή HPH), αποδείχθηκε ότι η επεξεργασία αυτή (HPH) προκάλεσε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας (πρωτεολυτική απόδοση) αλλά όχι της ειδικής πρωτεόλυσης η οποία είναι υπεύθυνη για την πήξη του γάλακτος. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι αφού μπορούν να μειώσουν την πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος χωρίς να επηρεάζεται η δραστηριότητα πήξης του γάλακτος, μπορεί να παραταθεί η διάρκεια ζωής των τυριών γεγονός υψηλής σημαντικότητας για βιομηχανίες. Σύμφωνα με τους ίδιους, υποστηρίζεται πως παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η πηκτική ικανότητα της πυτιάς στην

τεχνολογία παρασκευής τυριών καθώς ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αλλαγή στην ποιότητα της τυτιάς και εν συνέχεια στο τυρί βάσει των αποτελεσμάτων του πειράματος που πραγματοποίησαν.

2.5.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την πηκτική δύναμη της τυτιάς (ενδογενείς, εξωγενείς)

Η πηκτική ικανότητα της τυτιάς μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η χημική σύνθεση, το pH, η οξύτητα του γάλακτος, η θερμοκρασία συντήρησης της τυτιάς, η πηγή και η συγκέντρωση του πηκτικού ενζύμου, ο αριθμός των σωματικών κυττάρων (Ikonen et al., 2004), η ποιότητα του γάλακτος ακόμα και ο τρόπος χειρισμού της. Κατά την παραγωγή του τυριού η απόδοση μπορεί να ποικίλλει από αγελάδα σε αγελάδα από 30 έως 40% λόγω γενετικής διαφοράς (Cassandro et al., 2008; Ikonen et al., 2004). Σε πείραμα που πραγματοποίησαν οι **Kozelkova, Jizl, Luzova, Sustova & Bubenickova** το 2012 με σκοπό να παρατηρήσουν τυχόν αλλαγές στην ποιότητα των τυτιών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, έχοντας 6 διαφορετικά δείγματα υγρών τυτιών παρατήρησαν τις περισσότερες αλλαγές στο δείγμα 2 (χυμοσίνη με πηκτική δύναμη 1:5000) όπου εκτός από την φυσιολογική, κατά τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, αύξηση του pH, πρόσεξαν πως η δραστηριότητα της τυτιάς μειωνόταν σημαντικά κατά την αποθήκευση (Kozelková et al., 2013). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η δραστηριότητα της τυτιάς πρέπει να μειώνεται κατά μέσο όρο 1-2% μηνιαίως, τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν σχεδόν διπλάσια απόκλιση από αυτά με την δραστηριότητα να έχει μειωθεί κατά 16% μέσα σε 3 μήνες και μέχρι 26% μέσα σε 6 μήνες (McSweeney and McNamara, 2022; Tsarouhas et al., 2009). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στον κακό χειρισμό της τυτιάς κατά την ανάλυσή της ή ακόμα και από την ποιότητα του γάλακτος που

χρησιμοποιήθηκε ενώ αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα της μεθόδου του Soxhlet δίνονται κατά προσέγγιση οπότε μπορούν να επηρεαστούν εύκολα σε συνδυασμό με τις προαναφερόμενες θεωρίες (Kozelková et al., 2013). Σύμφωνα με τους **Pettinau et al., 1977**, ο πολτός αρνίσιας πυτιάς φτιαγμένος από ήνυστρα αποξηραμένα στον αέρα και αλατισμένα διατήρησε την πηκτική του δύναμη μέχρι και 12 μήνες συγκριτικά με πολύ κατασκευασμένο από νωπά και αλατισμένα ήνυστρα. Σημαντικό ρόλο, επίσης, στην διατήρηση της πηκτικής δύναμης της πυτιάς παίζει και η θερμοκρασία συντήρησής της. Σύμφωνα με τον **Ramet, 1997**, για να αποφευχθεί η μείωση της πηκτικής δύναμης της πυτιάς οι ιδανικές θερμοκρασίες συντήρησης είναι οι θερμοκρασίες ψύξης (0 - 5 °C) και όχι θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

2.5.2 Πρωτεολυτική δραστικότητα

Η κύρια πρωτεολυτική θέση της χυμοσίνης στην τεχνολογία παρασκευής τυριού είναι ο δεσμός μεταξύ Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ και η πρωτεολυτική της δραστικότητα υπολογίζει τα πεπτίδια που απελευθερώνονται κατά την ενζυμική διάσπαση κλασμάτων μικκυλίων καζεΐνης και μπορεί να υπολογιστεί με αρκετούς τρόπους. Δύο από τους τρόπους προσδιορισμού της είναι η Page ουρίας και η φασματοφωτομετρία των προϊόντων που απελευθερώνονται από πρωτεΐνες γάλακτος ή υποστρώματα συνθετικών πεπτιδίων (Goptar' et al., 2007; Raymond et al., 1973; Trujillo et al., 2000). Το **1997** σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τον Reid και τους συνεργάτες του, υπέβαλλαν σε υδρόλυση την παραλλαγή A της κ-καζεΐνης και το μακροπεπτιδίό της με συνδυασμένη χυμοσίνη σε pH 6.6 – 2.6 με την μέθοδο SDS – Page με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες της κ-καζεΐνης να παραμείνουν άπεπτες σε όλα τα δείγματα στα 2 λεπτά, ενώ στις 3 ώρες υδρολύθηκαν πλήρως (Reid et al., 1997). Το υπόστρωμα της κ-

καζεΐνης σε pH 4,6 αποικοδομήθηκε σχετικά γρήγορα σε σύγκριση με την αργή αποικοδόμησή του σε pH 2,6, ενώ στο pH 6,6 εκτός από μακρπεπτίδιο και παρα-κ-καζεΐνη, ανιχνεύθηκαν ελάχιστα προϊόντα υδρόλυσης. Η δράση των γαστρικών ασπαρτικών πρωτεϊνών και κατά συνέπεια της χυμοσίνης, αναστέλλεται από την πεπστατίνη A η οποία είναι εξαπεπτίδιο και προέρχεται από το είδος *Actinomyces*. Ο Purushothaman και συνεργάτες, σε μελέτη τους πάνω στον μηχανισμό θερμικής αδρανοποίησης μιας ασπαρτικής πρωτεΐνης με παρουσία αναστολέα (πεπστατίνη A), απέδειξαν πως η πεπστατίνη A έχει τη δυνατότητα να σταθεροποιεί την ασπαρτική πρωτεΐνη, αυξάνοντας τον αριθμό των γεφυρών αλατιού και αναδιατάσσοντας τα υδρόφοβα υπολείμματα χωρίς να προηγηθεί αυτόλυση. Επίσης υποστηρίζουν ότι ο αναστολέας αυτός προκαλεί αναστολή σε σχεδόν όλες τις γνωστές ασπαρτικές πρωτεΐνες αλλά όχι σε όλες τις πρωτεΐνες (Purushothaman et al., 2021).

2.5.3 Ωρίμανση των τυριών

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών πραγματοποιούνται βιοχημικές και χημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες δημιουργούνται διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τυρί όπως πικάντικο και αλμυρό καθώς επίσης τα κύρια συστατικά του (πρωτεΐνες, λιπίδια και λακτόζη) διασπώνται προς κύρια και εν συνέχεια προς δευτερεύοντα. Η πρωτεόλυση επηρεάζει την υφή και την γεύση του ωριμασμένου τυριού, με την υφή να ρυθμίζεται μέσω της υδρόλυσης των πρωτεϊνών, της αύξησης του pH και της αύξησης κατακράτησης νερού από τις αμινομάδες και καρβοξυλομάδες που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση πρωτεϊνών και την γεύση να επηρεάζεται από την αύξηση των αμινών, των θειόλων και θειοεστέρων (Prieto et al., 2004). Η υφή του τυριού μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την χρήση πηκτικών εκτός της χυμοσίνης

καθώς επίσης και την προσθήκη ουδέτερων πρωτεασών και πρωτεϊνών ορού γάλακτος ενώ αλλάζει αισθητά τις πρώτες 2 περίπου εβδομάδες ωρίμανσης (Lawrence et al., 1987). Αξίζει να σημειωθεί πως η τυτιά είναι επιρρεπής στο φως και τη θερμότητα και μειώνεται η δυναμικότητά της όσο είναι εκτεθειμένη σε αυτά τα φαινόμενα γι' αυτό, το τυρί που θα παρασκευασθεί πρέπει να ωριμάσει σε τελείως κλειστό και σκοτεινό μέρος και σε χαμηλή σχετικά θερμοκρασία (κάτω από 10 °C) (Arvanitoyannis, 2009).

2.6 Είδη της τυτιάς και η χρήση τους στην τυροκομία

Η τυτιά διατίθεται σε τρεις μορφές: σε υγρή, σε σκόνη ή σε πάστα. Η υγρή μορφή και η σκόνη που είναι και οι πιο διαδεδομένες μορφές της τυτιάς, παράγονται από τα ήνυστρα των μοσχαριών κυρίως για βιομηχανική χρήση σε αντίθεση με την τυτιά σε μορφή πάστας που παράγεται κυρίως χειροποίητα από τυροκόμους ή ερασιτέχνες από ήνυστρα αιγοπροβάτων. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η τυτιά από πρόβατα και κατσίκια παράγεται σε μεγάλο ποσοστό σε χώρες της Νότιας Ευρώπης (Μεσόγειο) όπως Ελλάδα, Ιταλία και Ισπανία με τη χρήση της πάστας αρνίσιας τυτιάς να είναι πιο διαδεδομένη σε προϊόντα Π.Ο.Π. αυτών των χωρών όπως είναι τα τυριά Idiazabal και Roncal της Ισπανίας, Fiore Sardo, Romano και Pecorino της Ιταλίας και φυσικά η Φέτα και το Κεφαλοτύρι της Ελλάδας (Addis et al., 2008; Anifantakis and Green, 1980). Αξίζει να σημειωθεί πως η Φέτα παραδοσιακά παρασκευάζεται με τη χρήση αρνίσιας ή κατσικίσιας τυτιάς ενώ βιομηχανικά φτιάχνεται με τυτιά από βοοειδή.

Στην Ποτέντσα της Ιταλίας και συγκεκριμένα στο Πειραματικό Ζωοτεχνικό Ινστιτούτο ανέπτυξαν έναν διαφορετικό τρόπο παρασκευής πάστας κατσικίσιας τυτιάς (Candarelli et al., 1997). Αφήνουν το ήνυστρο να αποξηραθεί σε χώρο με σχετική

υγρασία 60-70% και θερμοκρασία 15°C για περίπου 13 ημέρες, στη συνέχεια τα αλατίζουν και τα διατηρούν σε αυτή την κατάσταση για 15 μέρες και τα κρεμάνε στις ίδιες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας για 2 μήνες (60 μέρες). Έπειτα καθαρίζουν καλά εσωτερικά και εξωτερικά το ήνυστρο, το κόβουν σε λωρίδες και το αλέθουν. Αφού αλεσθεί και γίνει πάστα, αλατίζεται ξανά με αναλογία 150 g αλατιού/kg πάστας και αποθηκεύεται σε διαφανή δοχεία. Από την άλλη, στη Σαρδηνία τα αρνιά σφάζονται σε ηλικία περίπου 30 ημερών, αφαιρείται από τα ήνυστρά τους το λίπος, στη συνέχεια αλατίζονται, τοποθετούνται σε δοχεία που ευνοούν την αποστράγγιση του οργανικού υγρού και τέλος, αποξηραίνονται και αφήνονται να ωριμάσουν για τουλάχιστον 3 μήνες. Αφού ωριμάσουν, αλέθονται και μετατρέπονται σε πάστα (Pettinau et al., 1977). Γενικότερα η μέθοδος παρασκευής της πάστας πυτιάς ποικίλλει ανάλογα την χώρα στην οποία παρασκευάζεται.

2.7 «Κρίση» της πυτιάς

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε η χυμοσίνη μέχρι και σήμερα έχει συμβάλει σε πολύ μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη της γαλακτοκομίας καθώς είναι το ένζυμο που κατέχει πρωταρχικό ρόλο στην πήξη του γάλακτος για την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων. Από το 1850 και μετά, που ξεκίνησαν να ανοίγουν όλο και πιο πολλά τυροκομεία, η ζήτηση για την μοσχαρίσια χυμοσίνη αυξήθηκε με αποτέλεσμα να μειώνεται όλο και πιο πολύ η ποσότητά της και να αυξάνεται το κόστος της. Η τεράστια ζήτηση που είχε πλέον η χυμοσίνη, οδήγησε τις βιομηχανίες στην παρασκευή βιομηχανικής μοσχαρίσιας πυτιάς την οποία παρασκεύασε πρώτος ο Αυστριακός φαρμακοποιός Franz Soxhlet στα τέλη του 19ου αιώνα με τυποποιημένη ενζυμική δραστηριότητα (Andrén, 2011). Εκτός από την παρασκευή βιομηχανικής μοσχαρίσιας πυτιάς, άρχισαν να αναζητούνται και άλλοι τρόποι πήξης του γάλακτος λόγω της

τεράστιας απήχησης που απέκτησε η χυμοσίνη με αποτέλεσμα να ανακαλυφθούν κι άλλα πηκτικά μέσα, όπως χυμοσίνη προερχόμενη από ζύμωση, μικροβιακής, βιοτεχνολογικής ή και φυτικής προελεύσεως, εκχυλισμένη χυμοσίνη από άλλα ζώα όπως γουρούνι, κοτόπουλα, καμήλα και αιγοπρόβατα ακόμα και χυμοσίνη σε συνδυασμό με βοδινή πεψίνη (τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες των υποκατάστατων αυτών θα συζητηθούν περαιτέρω στο επόμενο κεφάλαιο). Η «κρίση» αυτή της τυτιάς έφερε στο φως και άλλα πηκτικά μέσα και μεθόδους πήξης του γάλακτος για την παρασκευή τυριών καθώς επίσης η παρασκευή φυτικής τυτιάς έχει ευνοήσει τους χορτοφάγους (γνωστούς και ως vegetarian).

2.8 Τυτιά και τυριά Π.Ο.Π.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η «κρίση» της τυτιάς προήλθε από την μεγάλη της ζήτηση καθώς επίσης και από την ευαισθητοποίηση του κόσμου για τα ζώα, γι' αυτό και ξεκίνησαν οι αναζητήσεις για νέα πηκτικά μέσα. Ωστόσο υπάρχουν τυριά που φτιάχνονται αποκλειστικά και μόνο από ζωική τυτιά και αυτά είναι ορισμένα που έχουν τη σήμανση Π.Ο.Π. (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης). Μερικά παραδείγματα είναι τα τυριά Μεσογειακών χωρών όπου και χρησιμοποιείται αρκετά η αρνίσια και η κατσικίσια τυτιά: Idiazabal, Manchego, Roncal, Zamorano κτλ. της Ισπανίας, η Φέτα, η Γραβιέρα Κρήτης, το Γαλοτύρι, η Φορμαέλλα Αράχωβας – Παρνασσού, το Μανούρι, το Ξύγαλο Σητείας, το Μετσοβόνε, το Λαδοτύρι Μυτιλήνης και πολλά άλλα της Ελλάδας και τα Parmigiano – Reggiano, Pecorino Romano, Gorgonzola, Provolone Valpadana κτλ. της Ιταλίας. Τα προαναφερθέντα τυριά Π.Ο.Π. φτιάχνονται από συγκεκριμένες φυλές μηρυκαστικών, σε συγκεκριμένες τοποθεσίες και με ζωική τυτιά.

Κεφάλαιο 3: Υποκατάστατα Μοσχαρίσιας Πυτιάς

3.1 Γενικές Πληροφορίες

Λόγω της αυξανόμενης παγκόσμιας παραγωγής τυριού (~2–3 % ετησίως τα τελευταία 30 χρόνια), παράλληλα με τη μειωμένη προσφορά βοοειδών (λόγω της μείωσης του αριθμού των βοοειδών και της τάσης για σφαγή βοοειδών σε μεγαλύτερη ηλικία), η διαθεσιμότητα βόειας πυτιάς ήταν ανεπαρκής εδώ και πολλά χρόνια. Τα παραπάνω γεγονότα έφεραν συνακόλουθα μια αύξηση της τιμής της πυτιάς ενώ παράλληλα οδήγησαν στην εντατικοποίηση των προσπαθειών εντοπισμού λειτουργικών και εμπορικά αξιοποιήσιμων υποκατάστατων αυτής. Σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών (IDF) η αυθεντική ονομασία των υποκατάστατων της πυτιάς είναι «πηκτικά μέσα» καθώς «πυτιά» ονομάζεται μόνο το προϊόν που προκύπτει από την εκχύλιση του ηνύστρου των μηρυκαστικών.

Παρά τη διαθεσιμότητα πολυάριθμων δυνητικά χρήσιμων πηκτικών μέσων, μόνο κάποια από αυτά λογίζονται ως επαρκή υποκατάστατα πυτιάς (όλα ασπαρτικές πρωτεΐνες) και έχουν βρεθεί ότι είναι αποδεκτά για την παραγωγή τυριού, με τα πιο διαδεδομένα από αυτά να είναι: πεψίνες βοοειδών, χοίρων και κοτόπουλου και οι όξινες πρωτεΐνες από *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* και *Cryphonectria parasitica*.

Τα υποκατάστατα βόειας πυτιάς οφείλουν να πληρούν σαφή κριτήρια όπως αυτά έχουν οριστεί εδώ και περισσότερο από μια δεκαετία και σχετίζονται με την καθαρότητα, την ασφάλεια και την απουσία αντιβιοτικών (IDF). Επιπρόσθετα,

οφείλουν να διαθέτουν και τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Guinee and Wilkinson, 1992).

1. Υψηλή αναλογία δραστικότητα πήξης γάλακτος προς πρωτεολυτική δραστικότητα, όμοια με αυτήν που διαθέτει για παράδειγμα η τυτιά βοός, η οποία δρα αποτρεπτικά στην υπερβολική μη ειδική πρωτεόλυση κατά την τυροκομία που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή τυροπήγματος με χαμηλή συνοχή, υψηλές απώλειες πρωτεΐνης και λίπους στον ορό γάλακτος και μειωμένες αποδόσεις στην παραγωγή στερεών τυριών. Επιπλέον, καθώς αποφεύγεται η υπερβολική πρωτεόλυση κατά την ωρίμανση, εξασφαλίζεται τη σωστή ισορροπία ως προς την ποσότητα των πεπτιδίων οδηγώντας έτσι σε επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως το άρωμα, το σώμα αλλά και γενικότερα λειτουργικά χαρακτηριστικά του ώριμου τυριού και την καταλληλότητά του για ορισμένες εφαρμογές (π.χ. παραγωγή σκόνης τυριού). Είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες πως σε πλείστες περιπτώσεις, η πικρή γεύση στο τελικό προϊόν, οφείλεται σε υπερβολική πρωτεόλυση, ειδικά της β-καζεΐνης.
2. Δραστηριότητα πήξης γάλακτος που δεν εξαρτάται πολύ από το pH στην περιοχή 6,5–6,9 (μια απότομη μείωση της δραστικότητας πήξης του γάλακτος με την αύξηση του pH μπορεί να οδηγήσει σε αργή ζελατινοποίηση και παραγωγή τυροπήγματος με χαμηλή συνοχή ιδιαίτερα κατά την κοπή, ειδικά δε εάν το pH του γάλακτος κατά την πήξη είναι υψηλό 6,7–6,8, όπως μπορεί να συμβεί είτε στην όψιμη γαλουχία ή όταν η συγκέντρωση καζεΐνης είναι χαμηλή (π.χ. <2,4 %, w/w). Αυτές οι συνθήκες ευνοούν τη χαμηλή ανάκτηση του λίπους και τη μειωμένη απόδοση στην παραγωγή τυριού, μπορεί να συμβούν σε

μεγάλα εργοστάσια όπου η διάρκεια ωρίμανσης του γάλακτος είναι μικρή (ειδικά με τη χρήση εκκινητών της διαδικασίας απευθείας στο κάδο) ενώ αντίστοιχα τα στάδια παραγωγής (συμπεριλαμβανομένου του τεμαχισμού) πραγματοποιούνται σύμφωνα με ένα σταθερό χρονοδιάγραμμα. Τα εμπόδια αυτά, μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου ή διαφόρων μέσων οξίνισης (π.χ. γλυκονικού οξέος-δ-λακτόνης)

3. Τα υπό μελέτη υποκατάστατα τυτιάς οφείλουν να επιδεικνύουν σταθερότητα και λειτουργικότητα σε τιμές pH και θερμοκρασίας που χρησιμοποιούνται κατά την τυροκομία, συγκρίσιμες με αυτή της τυτιάς βοοειδών. Αυτό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το επίπεδο πρωτεόλυσης, υφής και λειτουργικότητας του τυριού κατά την ωρίμανση σε τυριά όπως το Emmental, το Pecorino Romano, το Provolone και η Mozzarella χαμηλής υγρασίας.
4. Τα υπό μελέτη υποκατάστατα τυτιάς, δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν υψηλή θερμοσταθερότητα κατά την επεξεργασία ορού γάλακτος. Διαφορετικά, η τυτιά στον ορό γάλακτος (~ 90 % αυτής που προστίθεται στο τυρογάλα) μπορεί να οδηγήσει σε πήξη των παρασκευασμένων γαλάτων κατά την ανασύσταση, τα οποία συνήθως περιλαμβάνουν ορό γάλακτος (π.χ. βρεφικά παρασκευάσματα, υποκατάστατο γάλακτος μοσχαριού).
5. Να οδηγούν στην παραγωγή τελικού προϊόντος με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά γεύσης, σώματος και υφής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί εδώ η χρήση της πεψίνης κοτόπουλου. Χρησιμοποιήθηκε ευρέως μόνο στο Ισραήλ, όπου και οδήγησε στην παραγωγή προϊόντων τυριού χαμηλής

ποιότητας τόσο ως προς το σώμα όσο και ως προς τη γεύση, γεγονός που οδήγησε στην αντικατάστασή της από τη χυμοσίνη ζύμωσης. Λόγω της υψηλής αναλογίας πρωτεολυτικής δραστηριότητας προς δραστικότητα πήξης γάλακτος, η πεψίνη κοτόπουλου προάγει την εκτεταμένη αποικοδόμηση τόσο της α1- όσο και της β-καζεΐνης, οδηγώντας στην ανάπτυξη ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών γεύσης (π.χ. πικρίας) και υφής (μαλακό σώμα και λιπαρότητα) κατά την ωρίμανση. Η δραστηριότητα της πεψίνης χοίρου είναι πολύ ευαίσθητη σε $\text{pH} > 6,6$ και μπορεί να μετουσιωθεί εκτενώς κατά την τυροκομία και κατά συνέπεια η πρωτεόλυση κατά την ωρίμανση του τυριού μπορεί να επηρεαστεί. Ένα μείγμα 50:50 πεψίνης χοίρου και πυτιάς βοός έδωσε γενικά αποδεκτά αποτελέσματα, αλλά η πεψίνη χοίρου έχει αποσυρθεί από τις περισσότερες αγορές. Το πιο αποδοτικό έως σήμερα υποκατάστατο της πυτιάς είναι η βόεια πεψίνη η οποία δίνει γενικά εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση και την ποιότητα του τυριού.

3.2 Υποκατάστατα ζωικής προέλευσης

Το πρώτο υποκατάστατο πυτιάς (πηκτικό μέσο) δημιουργήθηκε την δεκαετία του 1950 και δεν ήταν άλλο από την πεψίνη χοίρων, βοδινών και σε περιορισμένη ποσότητα κοτόπουλων και ψαριών (Kelly and Larsen, 2021) με την πεψίνη των χοίρων και των βοοειδών να επηρεάζονται αρνητικά σε τιμές pH άνω των 6,5 (Nelson, 1975) ενώ αξίζει να σημειωθεί πως το καταλληλότερο υποκατάστατο της μοσχαρίσιας πυτιάς είναι η αρνίσια χυμοσίνη με μοριακή μάζα 36 kDa (Baudyš et al., 1988) και πολλά κοινά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές λειτουργίες στα ήνυστρά τους (Liu et al., 2021; Vacca et al., 2020) καθώς επίσης και η μοσχαρίσια πεψίνη που χρησιμοποιείται ευρέως σαν υποκατάστατο μοσχαρίσιας πυτιάς (Garg and Johri, 1995). Στη συνέχεια

ακολούθησαν κι άλλα ζωικά υποκατάστατα όπως είναι τα πηκτικά ένζυμα από καμήλα, βουβάλι, τάρανδο, κουνέλι (Liu et al., 2021), γουρούνια και συνδυασμοί πεψίνης βοοειδών ή χοιρινών με πεψίνη προβάτων ή ορνίθων ή χυμοσίνη μοσχαριών. Οι Stanley et al., 1980 σε πείραμά τους για την παρασκευή τυριού Cheddar απέδειξαν ότι ο συνδυασμός μοσχαρίσιας χυμοσίνης και πεψίνης χοίρου δίνει πηκτική ικανότητα πάνω από 100% με την δύναμη της μοσχαρίσιας χυμοσίνης να ανέρχεται στα 55% και της πεψίνης χοίρου στα 53% αιτιολογώντας πως αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ενός θερμοσταθερού ενζύμου που προέρχεται από το *Mucor miehei*.

Ο **John H. Nelson, 1974** αναφέρει πως στα εργαστήρια του έγινε ψυχρή εκχύλιση ώριμων μοσχαρίσιων στομαχιών με αλατούχο διάλυμα ώστε να παραχθεί μίγμα ρεννίνης και βοδινής πεψίνης στο οποίο η πεψίνη, τελικά, καταλάμβανε το 50-65% της συνολικής δραστηριότητας πήξης του γάλακτος (Nelson, 1975) ενώ το **1997** οι **Folegatti et al.** παρασκεύασαν τυρί τύπου Brazilian Prato με μίγμα από βοδινή πεψίνη και χυμοσίνη σε 80:20 αναλογία και συμπέραναν ότι η πυτιά αυτή είναι πιο πρωτεολυτική, ως προς την α_{s1} -καζεΐνη, από την κλασική.

Ένα ακόμη πηκτικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και έχει μεγάλη πηκτική ικανότητα αλλά μειωμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα είναι η χυμοσίνη καμήλας. Οι καμήλες σφάζονται σπάνια σε βρεφική ηλικία οπότε η χυμοσίνη καμήλας δεν παράγεται τόσο συχνά από εκχύλιση ηνύστρου, αλλά κατά κύριο λόγο από ζύμωση μικροοργανισμών (Kappeler et al., 2006) παρόλα αυτά, η ζυμωμένη χυμοσίνη καμήλας έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα πήξης γάλακτος από την μοσχαρίσια χυμοσίνη κατά 70% και αυτό οφείλεται στην υψηλή ειδικότητα που έχει η χυμοσίνη καμήλας στον δεσμό Phe₁₀₅-Met₁₀₆ συγκριτικά με τη μοσχαρίσια χυμοσίνη. Επίσης, τα τυριά που παρασκευάζονται με χυμοσίνη καμήλας έχουν πιο σκληρή υφή από τα τυριά που παρασκευάζονται με κλασική πυτιά (μοσχαρίσια χυμοσίνη) όμως η σκληρότητα

μειώνεται κατά την ωρίμανση (Gumus and Hayaloglu, 2019). Η χυμοσίνη καμήλας μπορεί να συνδυαστεί και με την μοσχαρίσια χυμοσίνη για την παρασκευή τυριών και μάλιστα σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε το **2019** από τους **Gumus & Hayaloglu**, αποδείχθηκε ότι όταν προστίθεται μεγαλύτερη ποσότητα μοσχαρίσιας χυμοσίνης από χυμοσίνη καμήλας, το τυρί που παρασκευάζεται έχει μεγαλύτερες τιμές pH και αλλαγές στη χημική σύσταση του τυριού συγκριτικά με τυριά που παρασκευάστηκαν από διαφορετικές αναλογίες (μεγαλύτερα ποσοστά χυμοσίνης) στις 90 ημέρες ωρίμανσης.

Άλλο ένα υποκατάστατο μοσχαρίσιας χυμοσίνης είναι και η πεψίνη από κοτόπουλο που χρησιμοποιείται κυρίως για θρησκευτικούς λόγους (Andrén, 2011) (**Andren, 2011**) . Το **1980** οι Stanley et al., παρασκεύασαν τυρί Cheddar με χρήση πεψίνης κοτόπουλου αντί για μοσχαρίσιας χυμοσίνης και συμπέραναν πως η πεψίνη κοτόπουλου ήταν αρκετά πιο σταθερή από άλλα ένζυμα και σχεδόν το ίδιο σταθερή με το ένζυμο Mucor αλλά όσον αφορά την απόδοση και την ποιότητα του τυριού, ήταν απογοητευτικές. Πιστεύεται ότι για την απόδοση του τυριού και την πικρή γεύση του προϊόντος οφείλεται η εκτεταμένη πρωτεόλυση που προκαλείται από την πεψίνη του κοτόπουλου (Findlay et al., 1984).

3.3 Υποκατάστατα φυτικής προέλευσης

Τα τελευταία χρόνια έχουν κινήσει πολύ το ενδιαφέρον των επιστημόνων τα πηκτικά ένζυμα φυτικής προέλευσης. Όσο περνούν τα χρόνια, ο κόσμος ευαισθητοποιείται όλο και περισσότερο με τα ζώα και αυτός είναι ένας λόγος που υπάρχουν ομάδες ανθρώπων με ιδιαίτερες διατροφικές συνήθειες όπως την κατάργηση κατανάλωσης κρέατος. Αυτή η ομάδα ανθρώπων ονομάζεται “Vegetarians” και έχουν βγάλει από τη διατροφή τους το κρέας, όχι όμως τα προϊόντα που παράγονται από αυτό. Πολλοί πιστεύουν,

λανθασμένα, πως το τυρί είναι κατάλληλο για κατανάλωση από τους vegetarians ενώ όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, τα περισσότερα τυριά έχουν παραχθεί από γάλα που έχει πήξει με ζωική πυτιά γεγονός που τα καθιστά ακατάλληλα για αυτούς. Οι ιδεολογίες κάποιων θρησκειών και οι Vegetarians είναι δύο από τους σημαντικότερους λόγους που η επιστήμη και οι τεχνολόγοι έχουν στραφεί στην αναζήτηση φυτικών πηγών που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην πήξη του γάλακτος και εν συνέχεια στην παρασκευή τυριών.

Σύμφωνα με τους (Liu et al., 2021) κατηγορίες πηκτικών ενζύμων φυτικής προέλευσης είναι οι εξής: *Lactuca sativa*, *Thistle*, *Solanum*, *Streblus asper*, *Carica papaya*, *Actinidin*, *Ginger*, *Ficus carica L.*, *Ficus johannis*, *Cynanchum otophyllum*, *Morinda citrifolia* και *Solanum tuberosum*. Επίσης οι ίδιοι υποστηρίζουν πως μερικά πηκτικά ένζυμα που προέρχονται από μικρά φυτά έχουν μεγάλη δραστηριότητα ενώ έχουν μειωμένη ευαισθησία στη θερμότητα. Εκχυλίσματα από σύκα, μούρα, παπάγια, πιπερόριζα, ανανά, αγκινάρα και άλλα φυτικά προϊόντα έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια ώστε να ανακαλυφθούν κι άλλοι τρόποι πήξης του γάλακτος χωρίς να χρησιμοποιούνται πηκτικά ένζυμα ζωικής προέλευσης.

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους García et al., το 2012 αποδείχθηκε πως το φυτικό πηκτικό ένζυμα του γένους *Cynara* έχουν παρόμοιο χρόνο πήξης με την μοσχαρίσια πυτιά αλλά χαμηλότερο από το μικροβιακό πηκτικό μέσο *Mucor miehei* ενώ όσον αφορά την σκληρότητα και το έντονο λευκό χρώμα του τυριού, τα φυτικά πηκτικά ένζυμα είχαν χαμηλότερες τιμές από το μικροβιακό αλλά υψηλότερη πικράδα.

Δύο αρκετά ενδιαφέροντα φυτικά πηκτικά ένζυμα με αρκετές κοινές ιδιότητες είναι η παπαΐνη που προέρχεται από την παπάγια και η βρομελίνη που προέρχεται από τον ανανά. Είναι πρωτεολυτικά, έχουν δηλαδή τη δυνατότητα να διασπούν μόρια αμινοξέων, η παπαΐνη είναι αρκετά ανθεκτική σε όξινες και βασικές συνθήκες καθώς

και σε υψηλές θερμοκρασίες (με άριστη τους 50 °C ενώ της βρομελίνης οι 55 °C) και το σημαντικότερο είναι ότι δεν είναι όσο ακριβή είναι η μοσχαρίσια χυμοσίνη (Arlene et al., 2015). Και τα δύο αυτά ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να σπάνε τους πεπτιδικούς δεσμούς και να πήζουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος λόγω της πρωτεολυτικής τους ικανότητας (Arlene et al., 2015). Το 2022 οι **Li, Chen, Lu, Gong & Xiao** στην προσπάθειά τους να παρασκευάσουν μαλακό τυρί με τη χρήση παπαΐνης, οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως ο συνδυασμός μεγαλύτερης ποσότητας παπαΐνης και μεγαλύτεροι χρόνοι πήξης συμβάλλουν στο να αποκτήσει το τυρί σκληρότερη υφή ακόμη και από την πρώτη μέρα ωρίμανσης ενώ αποκάλυψαν πως η μείωση της υγρασίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης αύξησε τον χρόνο ωρίμανσης με συνέπεια να αυξηθεί η σκληρότητα του τυριού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Li et al., 2022).

Επιτυχής εφαρμογή στην τυροκομία τα τελευταία χρόνια έχει και η πρωτεάση πιπερόριζας (τζίντζερ) η οποία εκχυλίζεται από τα ριζώματα του τζίντζερ, ανήκει στην οικογένεια C1 των πεπτιδασών (δηλαδή της παπαΐνης), έχει μοριακό βάρος 31 kDa, χρησιμοποιείται, πλέον, σαν υποκατάστατο της μοσχαρίσιας πυτιάς και με την πηκτική ικανότητα που έχει, θεωρείται ο κύριος παράγοντας για την παρασκευή του κινέζικου τυριού Jiangzhinai το οποίο φτιάχνεται με ζεστό γάλα και χυμό από τζίντζερ και η τελική του μορφή είναι τζελώδης με λεία υφή (Huang et al., 2011). Η μέγιστη πηκτική ικανότητα του ενζύμου αυτού παρουσιάζεται στους 70°C (**Sonali et al., 2018**). Το 2011 οι **Hashim, Dong, Iqbal, Li & Chen** σύγκριναν τις ιδιότητες της πρωτεάσης από τζίντζερ με αυτές της μοσχαρίσιας πυτιάς σε τυριά που παρασκεύασαν με τη χρήση των δύο αυτών πηκτικών ενζύμων. Κατασκεύασαν ένα τυρί Peshawari με πρωτεάση από τζίντζερ και ένα με μοσχαρίσια πυτιά και συμπέραναν πως δεν δημιουργήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την πρωτεΐνη, το λίπος, την οξύτητα, το pH και τη λακτόζη η οποία άρχισε να μειώνεται σταδιακά όσο ωρίμαζε (Hashim et al., 2011). Τα

οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού που παρασκευάστηκε με πρωτεάση από τζίντζερ ενισχύθηκαν χωρίς να υπάρξει πικρία στη γεύση ενώ παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά αζώτου και χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας συγκριτικά με το τυρί που παρασκευάστηκε με την προσθήκη μοσχαρίσιας πτυιάς.

Εκτεταμένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για τις πρωτεάσες γαϊδουράγκαθου (*Cynara cardunculus* L.) και αγκινάρας (*Cynara scolymus* L.). Η πρωτεάση γαϊδουράγκαθου χρησιμοποιείται για την πήξη κατσικίσιου και αρνίσιου γάλακτος και όχι αγελαδινού, γιατί καθιστά το παραγόμενο προϊόν πικρό (Sanjuán et al., 2002) και διεξήχθη από τον Verissimo et al., (1996) με όξινη εκχύλιση, απομονώνοντας δύο δραστικές πρωτεάσες του *Cynara cardunculus* (γαϊδουράγκαθου) τις οποίες ονόμασε καρδοσίνη Α και καρδοσίνη Β που είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ Phe₁₀₅-Met₁₀₆ της κ-καζεΐνης και ανέφερε επίσης πως έχουν σταθερό pH σε εύρος 2-7. Οι πρωτεάσες αυτές, έχει αποδειχθεί ότι δρουν στην κ-καζεΐνη με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που δρα η χυμοσίνη (Silva and Malcata, 2005). Το εκχύλισμα του γαϊδουράγκαθου χρησιμοποιείται, επίσης, στην Ιβηρική Χερσόνησο για την παρασκευή τυριού από πρόβειο γάλα (Jacob et al., 2011). Σύμφωνα με τους (Silva et al., 2006), τα άνθη των γαϊδουράγκαθων συλλέγονται τους καλοκαιρινούς μήνες από ώριμα φυτά και ξηραίνονται σε σκιερό μέρος πριν τη χρήση τους. Παρόλο που η αποξήρανση επιφέρει πολλά οφέλη στις ιδιότητες του γαϊδουράγκαθου έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει την πηκτική ικανότητα του εκχυλίσματος κι αυτό αποδείχθηκε το 1996 από τους **Martins, de Vasconcelos & De Sousa**. Συγκεκριμένα πραγματοποίησαν μετρήσεις σε αποξηραμένα γαϊδουράγκαθα που είχαν διαφορετικό βαθμό ξηρότητας με περιεκτικότητα υγρασίας από 6,15% έως 47,32% με αποτέλεσμα η πηκτική τους ικανότητα να κυμαίνεται από 47,64 έως 77,71 RU/g άνθους αντίστοιχα (Louro Martins et al., 1996). Από τους (García et al., 2015) παρατηρήθηκε πως το

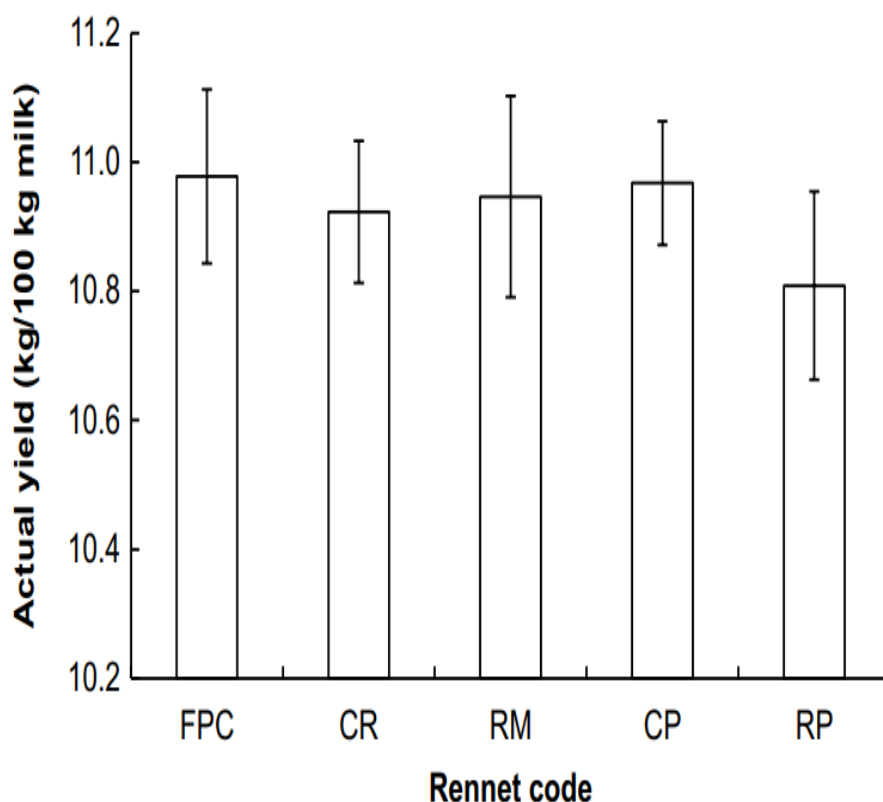
πηκτικό ένζυμο του γαϊδουράγκαθου έδρασε γρηγορότερα από αυτό της αγκινάρας, γεγονός που συμπίπτει με τα λεγόμενα της **Mendiola, 2000** σχετικά με το ότι το εκχύλισμα του γαϊδουράγκαθου έχει μεγαλύτερη πηκτική ικανότητα από της αγκινάρας. Όσον αφορά το εκχύλισμα της αγκινάρας (*Cynara scolymus* L.), σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε το **2004** από τους **Llorente et al.**, διαπιστώθηκε αρχικά πως οι ώριμες αγκινάρες έχουν υψηλότερη πηκτική ικανότητα από τις μη ώριμες, γι' αυτό και επικεντρώθηκαν σε αυτές (Llorente et al., 2004). Επίσης, παρατήρησαν ότι οι πρωτεάσες της αγκινάρας απενεργοποιούνται σε μέτρια θέρμανση γεγονός που αποτρέπει την εμφάνιση πικρών πεπτιδίων στο τελικό προϊόν (τυρί), μειώνοντας την πρωτεολυτική δραστικότητα της αγκινάρας κατά την ωρίμανση. Συγκριτικά με το εκχύλισμα της αγκινάρας (*Cynara scolymus* L.), το εκχύλισμα του γαϊδουράγκαθου έχει υψηλότερη πηκτική ικανότητα (**Mendiola, 2000**) όπως προαναφέρθηκε, ενώ δεν έχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις τεχνολογικές παραμέτρους στην παρασκευή πρόβειου τυροπήγματος με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η αγκινάρα ως εναλλακτικό πηκτικό ένζυμο έναντι του γαϊδουράγκαθου (García et al., 2015).

3.4 Υποκατάστατα μικροβιακής προέλευσης

Αρκετά δημοφιλής τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει επίσης τα πηκτικά ένζυμα μικροβιακής προέλευσης καθώς παράγονται εύκολα με ζύμωση, γεγονός που τα καθιστά οικονομικά, και δεν έχουν περιορισμό στην περιοχή παραγωγής (da Silva et al., 2019). Παράγονται κυρίως από μύκητες και βακτήρια με τα πιο διαδεδομένα μυκητιακά πηκτικά ένζυμα να είναι τα: *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Mucor baciliformis*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *White rot fungi*, *Aspergillus usamil*, *Penicillium oxalicum* και *Rhizopus microspores* εκ των

οποίων το *Rhizomucor miehei* χρησιμοποιείται ως μικροβιακό υποκατάστατο της πυτιάς για πάνω από 40 χρόνια (Jacob et al., 2011) και τα πιο διαδεδομένα βακτηριακά πηκτικά ένζυμα να είναι τα: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis natto*, *Bacillus methanolicus*, *Myxococcus xanthus*, *Aureobasidium leucospermi*, *Enterococcus faecalis* και *Nocardiosis sp* (Liu et al., 2021). Μάλιστα το 1967 ο FDA (Food and Drug Administration), επέτρεψε τη χρήση του ενζύμου που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Endothia parasitica* ως πηκτικό μέσον για το γάλα καθώς επίσης και τα ένζυμα των *Mucor russilus* και *Mucor miehei* το 1969 και το 1972 αντίστοιχα (Nelson, 1975). Ωστόσο, σε άρθρο του **Sardinas (1968)** αναφέρεται πως ο μικροοργανισμός *Endothia parasitica* καταστράφηκε πλήρως όταν θερμάνθηκε για πάνω από 5 λεπτά στους 60°C (Sardinas, 1968).

Η πρωτεολυτική ειδικότητα των τριών πιο διαδεδομένων μυκητιακών μέσων πήξης οδηγεί στην παραγωγή ιδιαίτερα ικανοποιητικών τελικών προϊόντων σε ένα ευρύ φάσμα ποικιλιών τυριού, παρά το γεγονός πως η υψηλότερη πρωτεολυτική τους δράση οδηγεί σε χαμηλότερες αποδόσεις τυριού (Εικ. 5). Οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής υπήρξαν πρωτοπόρες στη χρήση των πυτιών μικροβιακής προέλευσης, προσέγγιση που δεν ήταν ο κανόνας τόσο στην ευρωπαϊκή ήπειρο όσο και σε χώρες του νότιου ημισφαιρίου όπως η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία, με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία να είναι αρκετά εκτενής (Jacob et al., 2011).



Εικόνα 5: Απόδοση παραγωγής τυριού Cheddar (σε kg/100kg γάλακτος) που παρασκευάζεται με χρήση διαφορετικών μέσων πήξης: FPC (fermentation chymosin /χυμοσίνη ζύμωσης); CR (calf rennet/πυτιά μόσχου), RM (*Rhizormucor miehei*), CP (*Cryphonectria parasitica*), RP (*Rhizormucor pusillus*). Η διαδικασία παραγωγής τυριού πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις επαναλήψεις, κάτω από σχολαστικά ελεγχόμενες και αυστηρά τυποποιημένες συνθήκες (π.χ αναλογία πυτιάς/καζεΐνης, pH, σταθερότητα του τυροπήγατος κατά την κοπή κ.α). (Fox et al., 2017)

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους **Garcia, Rovira, Teruel, Bouthoial, Rodriguez, Roa & Lopez** το **2012** αποδείχθηκε πως το μικροβιακό πηκτικό ένζυμο *Mucor miehei* έχει μεγαλύτερο χρόνο πήξης από τα φυτικά πηκτικά μέσα του γένους *Cynara* (García et al., 2012) και την μοσχαρίσια πυτιά και προτιμάται γενικότερα από τις βιομηχανίες έναντι άλλων πηκτικών μικροβιακών μέσων λόγω της υψηλής του πηκτικής ικανότητας και χαμηλής πρωτεολυτικής δραστηριότητας (Şeker et

al., 1998) χρησιμοποίησαν ένζυμο ρεννίνης που καλλιεργήθηκε σε μελάσα (διάλυμα από ζαχαροκάλαμο ή ζαχαρότευτλο σε ζάχαρη) με πίτουρο ρυζιού από τον μικροοργανισμό *Mucor miehei* για την παρασκευή του τυριού Mozzarella και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η πρωτεΐση του *Mucor miehei* μπορεί ικανά να αντικαταστήσει την ρεννίνη μόσχου ως υποκατάστατό της για την παρασκευή του τυριού Mozzarella καθώς προσδίδει στο τυρί καλύτερη απόδοση, μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης και ελαστικότητας αλλά τα ποσοστά υγρασίας και τηκτικότητας δεν διαφέρουν πολύ. Το συγκεκριμένο τυρί μπορεί να ικανοποιήσει καταναλωτές που ενδιαφέρονται για ένα τυροκομικό προϊόν με χαμηλά λιπαρά αλλά πλούσιο σε πρωτεΐνη καθώς επίσης και τους χορτοφάγους (vegetarians) εφόσον χρησιμοποιείται πηκτικό μέσο μικροβιακής κι όχι ζωικής προέλευσης.

Ωστόσο, το τεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί αρκετά στα ένζυμα βακτηριακής προέλευσης γιατί είναι φθηνότερα από τα ένζυμα μυκητιακής προέλευσης, αναπτύσσονται γρηγορότερα, είναι πιο σταθερά και μπορούν πολύ πιο εύκολα να τροποποιηθούν γενετικά. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε το 2011 από τους **Ding, Liu, Gu, Liang Zhang, Kechang Zhang & Shi** στο πλαίσιο της παρασκευής πηκτικού ενζύμου από τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*, αποδείχθηκε πως ο *Bacillus subtilis* B1 έχει υψηλή πηκτική ικανότητα και χαμηλή πρωτεολυτική δραστηριότητα καθιστώντας το, έτσι, ως ασφαλές (για χρήση ως πηκτικό ένζυμο στην τεχνολογία παρασκευής τυριών) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration) (Zhongyang et al., 2011). Η βέλτιστη θερμοκρασία για τον *Bacillus subtilis* είναι οι 70°C και η χαμηλή του πρωτεολυτική δραστηριότητα είναι ο λόγος που εμφανίζει χαμηλότερη πικρία από το ένζυμο του *Bacillus polymyxa* (Narwal et al., 2016). Βέβαια συγκριτικά με την μοσχαρίσια πυτιά, λόγω της επαναλαμβανόμενης πρωτεόλυσης από τις βακτηριακές πρωτεάσες, οι

μικροοργανισμοί *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* και *Bacillus megaterium* παράγαν χαμηλότερες αποδόσεις τυριού (Krishna Rao and Mathur, 1979).

3.5 Υποκατάστατα βιοτεχνολογικής προέλευσης

Προκειμένου να αποκτηθούν καλύτερα χαρακτηριστικά κατάλληλα για τυροκομία, τα ένζυμα πήξης του γάλακτος κλωνοποιούνται και τροποποιούνται. Η παραγωγή και απομόνωση των ενζύμων αυτών επιτυγχάνεται μέσω προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης. Η παραγωγή με τη χρήση προκαρυωτικών οργανισμών επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των συστημάτων έκφρασης *E. coli* και *Bacillus* (Peng et al., 2019). Τα συστήματα αυτά, έχουν τα πλεονεκτήματα της γρήγορης ανάπτυξης, της εύκολης καλλιέργειας, της απλής λειτουργίας και της υψηλής αποδοτικότητας κατά τα στάδια της απομόνωσης των παραγόμενων ενζύμων μέσω βημάτων καθαρισμού. Επιπρόσθετα, η ανασυνδυασμένη έκφραση στο βακτηριακό σύστημα του γένους *Bacillus* έχει τα πλεονεκτήματα της εύκολης βελτιστοποίησης των συνθηκών για τη καλύτερη απόδοση των βακτηριακών καλλιιεργειών, της απλής εξωκυτταρικής έκφρασης των ενζύμων πήξης του γάλακτος και της υψηλής απόδοσης έκφρασης. Επί του παρόντος, ορισμένα βιομηχανικά ένζυμα (π.χ. αμυλάση και οξειδάση) έχουν παραχθεί με επιτυχία από το σύστημα αυτό (Ariyaei et al., 2019).

Η ευκαρυωτική ανασυνδυασμένη έκφραση επιτυγχάνεται συνήθως μέσω των μυκητιακών συστημάτων έκφρασης της *Pichia pastoris* και του *Aspergillus oryzae*. Χρησιμοποιούνται για την έκφραση των ενζύμων πήξης του γάλακτος προερχόμενων από άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως των ενζύμων που προέρχονται από θηλαστικά, φυτά αλλά και άλλους μύκητες. Έχουν τα πλεονεκτήματα της υψηλής πυκνότητας ζύμωσης, της καλής ενσωμάτωσης των γονιδίων-στόχων στο γονιδίωμα

τους, της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των παραγόμενων ενζύμων μέσω γλυκοζυλίωσης καθώς και του χαμηλό κόστος (Wu et al., 2013). Το 2018, οι Kangwa κατάφεραν να εκφράσουν επιτυχώς την ασπαρτική πρωτεάση του μύκητα *Mucor circinelloides* στο σύστημα της *Pichia pastoris* (Kangwa et al., 2018).

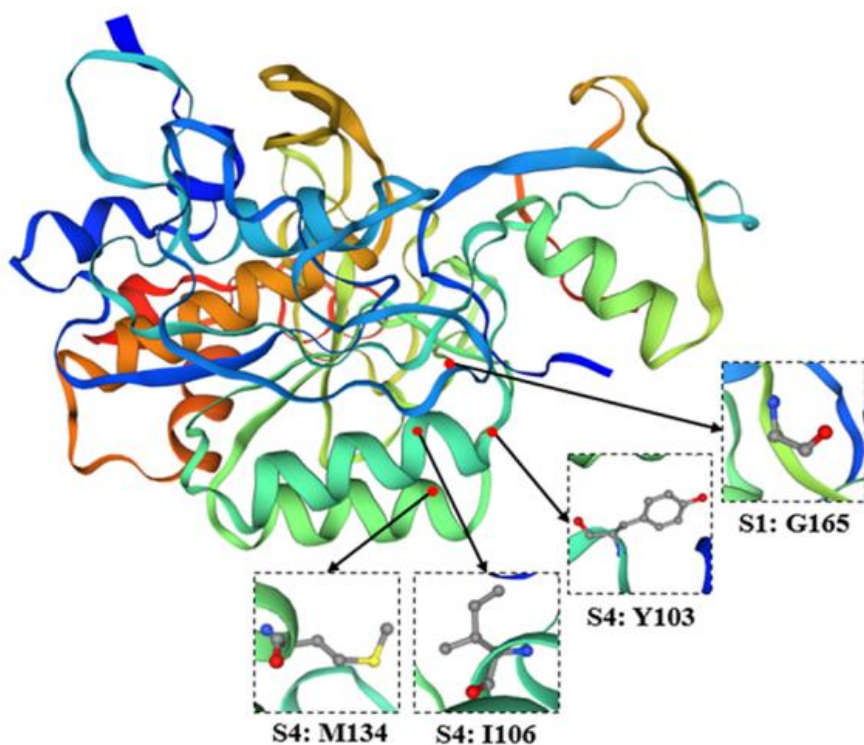
Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά των εκφραζόμενων σε ευκαρυωτικά συστήματα πρωτεϊνών, μπορούν να αλλάξουν σε μεγάλο βαθμό εξαιτίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και για το λόγο αυτό τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να αποσαφηνιστούν με επιπλέον (Tian et al., 2017). Τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο η τεχνητή δημιουργία μεταλλάξεων. Χρησιμοποιούνται κυρίως φυσικοί ή χημικοί παράγοντες προκειμένου να προκληθούν γονιδιακές μεταλλάξεις στα στελέχη εκείνα που παράγουν ένζυμα πήξης του γάλακτος προς την κατεύθυνση της δημιουργίας ενζύμων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Αυτή η μέθοδος είναι απλή και χρήσιμη. Τα ένζυμα πήξης του γάλακτος που παράγονται από τα στελέχη μέσω αυτής της μεθόδου ενδέχεται να έχουν υψηλότερη δραστικότητα πήξης αλλά και βελτιωμένη αναλογία δραστικότητα πήξης / πρωτεολυτικής δραστικότητας (Guo et al., 2019).

Έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ότι μέσω μεταλλάξεων που πραγματοποιήθηκαν με την παραπάνω προσέγγιση (εν προκειμένω χρήση μικροκυμάτων) στην πρωτεάση του στελέχους *Mucor racemosus*, παρήχθησαν, ανάμεσα σε δεκάδες άλλα, δυο μεταλλάγματα με εξαιρετικά βελτιωμένη αναλογία δραστικότητα πήξης / πρωτεολυτικής δραστικότητας (κατά 80% και 65% κατά περίπτωση). Η προσέγγιση αυτή, αν και μπορεί δυνητικά να φέρει εξαιρετικά αποτελέσματα, έχει σημαντικές αδυναμίες καθώς είναι μια μέθοδος τυφλή και εν πολλοίς τυχαία, εξαιρετικά χρονοβόρος και κατ' επέκταση κοστοβόρος, στερείται επαρκούς μοντελοποίησης ως προς τη διαδικασία διαλογής και είναι τέλος δύσκολο να

προβλεφθεί. Αυτά τα ζητήματα έχουν ωθήσει τους επιστήμονες να συνδυάσουν αυτή τη μέθοδο με την τεχνολογία της μοριακής προσομοίωσης και τροποποίησης με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων, για να αποκτήσουν αποδοτικότερα ένζυμα πήξης του γάλακτος.

Οι περισσότερες αναφορές στοχεύουν στη βελτίωση του επιπέδου έκφρασης και της θερμικής σταθερότητας των μικροβιακών ενζύμων. Το 2013, οι Li και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι το επίπεδο ανασυνδυασμένης έκφρασης της αλκαλικής πρωτεάσης σερίνης (keratinase Sfp2) του στρεπτομύκητα *Streptomyces fradiae* αυξήθηκε σημαντικά (έως και 9 φορές σε ένα από τα μεταλλάγματα) μέσω τροποποίησης του πρόδρομου πεπτιδίου, στις αμινοξικές θέσεις P1 και P2 (Li et al., 2013). Με παρόμοια λογική το 2013 οι Hong και συνεργάτες χρησιμοποίησαν μια δέσμη ιόντων N^+ για να επιτύχουν σημειακές μεταλλάξεις στο στέλεχος XC-1 του *Bacillus subtilis*. Από τα πολυάριθμα μεταλλάγματα που παρήχθησαν εξετάστηκε σχολαστικά ένα (XCYPB-6) το οποίο εμφάνισε δραστικότητα πήξης γάλακτος σχεδόν διπλάσια από εκείνη του αρχικού στελέχους XC-1, με την πρωτεολυτική του δραστικότητα να καταγράφεται στα 2,53 U/mL και η αναλογία δραστικότητα πήξης γάλακτος προς πρωτεόλυση να φτάνει στο 862,38 (Hong et al., 2013).

Τέλος, το 2019 οι Zhang και συνεργάτες, τροποποίησαν την πρωτεάση BL312 του στελέχους *Bacillus licheniformis* μέσω σημειακών μεταλλάξεων στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος. Το μεταλλαγμένο ένζυμο με κωδικό MCE-G165A έδειξε πρωτεολυτική δραστικότητα $49,4 \pm 2,4$ U/mL και αναλογία δραστικότητα πήξης γάλακτος προς πρωτεόλυση 18,2, τιμές οι οποίες ήταν 1,9 φορές χαμηλότερες και 2,0 φορές υψηλότερες από αυτές του ελέγχου, αντίστοιχα (Zhang et al., 2019).



Εικόνα 6: Ανάλυση της περιοχής δέσμευσης υποστρώματος του της πρωτεάσης BL312 και οι θέσεις των σημειακών μεταλλάξεων (Zhang et al., 2019).

3.6 Ακίνητοποιημένα Πηκτικά Μέσα

Το μεγαλύτερο μέρος (>90 % για το Cheddar) της πυτιάς που προστίθεται στο τυρόγαλο χάνεται στον ορό γάλακτος, γεγονός που αποτελεί μεγάλη οικονομική ζημία και δημιουργεί πιθανά προβλήματα στους μεταποιητές ορού γάλακτος. Η χρήση ακίνητοποιημένων μέσων πήξης, θα μπορούσε να συνδράμει σημαντικά προς την επίλυση αυτών αλλά και άλλων εγγενών δυσκολιών της τυροκομίας. Ένα επιπλέον κίνητρο για την ακινητοποίηση της πυτιάς είναι η δυνατότητα συνεχούς παραγωγής τυροπήγματος (χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση ψυχρής τυροπηξίας στους ~10 °C που επιτρέπει την εμφάνιση της πρωτογενούς, αλλά όχι της δευτερεύουσας φάσης), η οποία θα διευκολύνει τον έλεγχο της διαδικασίας. Η συνεχής παραγωγή τυροπήγματος σε χαμηλή θερμοκρασία έχει δειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες πως είναι εφικτή, πλην

όμως έως σήμερα δεν έχει βρει βιομηχανική εφαρμογή. Ωστόσο, καθώς η κατακράτηση της χυμοσίνης (ή του εκάστοτε υποκατάστατου πυτιάς) στο τυρόπηγμα παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του τυριού, γίνεται αντιληπτό πως εάν χρησιμοποιηθεί ακινητοποιημένη πυτιά για την πήξη του γάλακτος, θα ήταν απαραίτητο να προστεθεί ποσότητα χυμοσίνης (ή παρόμοιας πρωτεΐνης) στο τυρόπηγμα και η ομοιόμορφη ενσωμάτωση αυτού του ενζύμου(ων) θα ήταν προβληματική, όπως έχει καταγραφεί εξάλλου στη χρήση εξωγενών πρωτεϊνών για να επιταχυνθεί η ωρίμανση του τυριού.

Στη σύγχρονη τυροκομία, όπου οι περισσότερες εργασίες είναι σε μεγάλο βαθμό συνεχείς, η πήξης είναι η μόνη σημαντική λειτουργία που πραγματοποιείται μαζικά, αν και η χρήση μικρών «παρτίδων» γάλακτος, όπως στη διαδικασία Alpm για το Camembert, καθιστά ακόμα και την πήξη, στην πραγματικότητα, μια συνεχή διαδικασία. Ωστόσο, στα σύγχρονα, μεγάλα τυροκομεία Cheddar και Gouda χρησιμοποιούνται πολύ μεγάλες δεξαμενές (20–30.000 L). Υπάρχει ενδιαφέρον για την παρασκευή τυροπήγματος χωρίς πυτιά για μελέτες σχετικά με τη συμβολή ενζύμων από διαφορετικές πηγές στην ωρίμανση του τυριού. Ένας αριθμός προσεγγίσεων έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τυροπήγματος χωρίς πυτιά αλλά μια εντελώς ακινητοποιημένη, αποτελεσματική πυτιά θα ήταν πολύ χρήσιμη (Fox and Stepaniak, 1993).

Αρκετοί ερευνητές έχουν ακινητοποιήσει διαφορετικές πυτιές σε μια σειρά από υποστρώματα και έχουν ισχυριστεί ότι αυτές μπορούν να πήξουν το γάλα. Ωστόσο, παρά τον αρχικό ενθουσιασμό που προκαλεί μια τέτοια παρατήρηση, γίνεται γρήγορα αντιληπτό πως για την παρατηρούμενη παραγωγή τυροπήγματος ευθύνεται κάποιο ένζυμο που εκπλύθηκε από το υπόστρωμα. Αν και μπορεί να υδρολύσει τη μη μικκυλιακή καζεΐνη, μια μη αναστρέψιμα ακινητοποιημένη πυτιά δεν είναι σε θέση να

πήξει το γάλα, πιθανώς, η κ-καζεΐνη στην επιφάνεια των μικκυλίων καζεΐνης δεν είναι σε θέση να εισέλθει στη σχισμή της ενεργού θέσης του ακινητοποιημένου ενζύμου λόγω στερικών παραγόντων (Fox et al., 2017).

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Η βιομηχανία χονδρικής παραγωγής και πώλησης τυριού που γεννήθηκε στις ΗΠΑ πριν από περίπου δυο αιώνες, συνεχίζει να γνωρίζει ως τις μέρες μας μια τρομερή άνθηση, με όλους τους χρηματοοικονομικούς δείκτες να καταδεικνύουν πως αυτή θα συνεχιστεί και τις επόμενες δεκαετίες.

Στο επίκεντρο της αλματώδους ανάπτυξης της βιομηχανίας των δισεκατομμυρίων δολαρίων, βρέθηκε και συνεχίζει να βρίσκεται ο συνδυασμός εκείνος πρωτεϊνικών παραγόντων που όπως αναφέρθηκε καλείται πυτιά. Όπως έγινε φανερό από την εργασία αυτή και την παρατιθέμενη βιβλιογραφία, η συνεχιζόμενη έρευνα των τελευταίων 5 δεκαετιών πάνω στον εντοπισμό πιθανών υποκατάστατων της ευρύτατα έως τότε χρησιμοποιούμενης βόειας πυτιάς αλλά και οι προοπτικές βελτίωσης των ήδη γνωστών ενζύμων, έχει φέρει σήμερα στο φως μια πληθώρα εναλλακτικών επιλογών, όπως πυτιές ζωικής, μικροβιακής ή ακόμα και φυτικής προέλευσης, ενώ ταχύτατα αναπτύσσεται και ο κλάδος των γενετικά τροποποιημένων μορίων, ειδικά σχεδιασμένων για τις ανάγκες της σύγχρονης τυροκομίας.

Με το βλέμμα στο αύριο και με γνώμονα την επιθυμία για διαρκή εξέλιξη προς την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος, χιλιάδες επιστήμονες ταυτοποιούν εναλλακτικά παρασκευάσματα ενζύμων πήξης του γάλακτος που αποδίδουν ικανοποιητικά σε ένα ευρύ φάσμα παραγωγής τυριού, Το ενδιαφέρον γύρω από τις εξελίξεις είναι μεγάλο και αναμένεται να ενταθεί περαιτέρω τα επόμενα χρόνια, όπως

γίνεται φανερό από την ολοένα αυξανόμενη διαθέσιμη βιβλιογραφία, καθώς κάθε καινοτόμος προσέγγιση αναμένεται να βρει άμεση εφαρμογή στη βιομηχανική παραγωγή, επηρεάζοντας σημαντικά μια από τις μεγαλύτερες αγορές τροφίμων παγκοσμίως.

Βιβλιογραφία

1. Addis, M., Piredda, G., Pirisi, A., 2008. The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Rumin. Res.* 79, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.002>
2. Agudelo, R.A., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., Marin, J., Savoie, L., 2004. Kinetics of peptide fraction release during *in vitro* digestion of casein. *J. Sci. Food Agric.* 84, 325–332. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1662>
3. Al Masri, S., Reincke, R., Huenigen, H., Gemeinhardt, O., Richardson, K.C., Plendl, J., 2018. Computed tomography study of the fetal development of the dairy cow stomach complex. *J. Dairy Sci.* 101, 1719–1729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13508>
4. Andrén, A., 2011. Cheese | Rennets and Coagulants, in: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, pp. 574–578. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00069-8>
5. Andrén, A., Björck, L., 1986. Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta Physiol. Scand.* 126, 419–427. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1986.tb07836.x>
6. Annibaldi, S., Ferri, G., & Mora, R. 1977. Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: Tipizzazione lattodinamografica. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 28, 115–126.
7. Anifantakis, E., 1976. Influence d'une présure d'agneau sur la qualité du fromage Kefalotyri. *Le Lait* 56, 76–83. <https://doi.org/10.1051/lait:1976551-5525>
8. Anifantakis, E., Green, M.L., 1980. Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. *J. Dairy Res.* 47, 221–230. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021099>
9. Ariyaei, A., Farhadi, A., Moradian, F., Rahimi Mianji, G., 2019. Cloning, expression and characterization of a novel alkaline serine protease gene from native Iranian *Bacillus* sp.; a producer of protease for use in livestock. *Gene* 693, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.020>
10. Arlene, A., Prima Kristijarti, A., Ardelia, I., 2015. The Effects of the Types of Milk (Cow, Goat, Soya) and Enzymes (Rennet, Papain, Bromelain) Toward Cheddar

Cheese Production. Makara J. Technol. 19, 31.
<https://doi.org/10.7454/mst.v19i1.3028>

11. Arvanitoyannis, I.S., 2009. HACCP and ISO 22000: application to foods of animal origin. Wiley-Blackwell, Chichester, U.K.
12. Barkholt Pedersen, V., Asbaek Christensen, K., Foltmann, B., 1979. Investigations on the Activation of Bovine Prochymosin. *Eur. J. Biochem.* 94, 573–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12927.x>
13. Barrett, A.J., McDonald, J.K., 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.* 237, 935–935. <https://doi.org/10.1042/bj2370935>
14. Baudyš, M., Gan Erdene, T., Kostka, V., Pavlik, M., Foltmann, B., 1988. Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 89, 385–391. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90241-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90241-6)
15. Beránková, E., Rauch, P., Káš, J., 1989. Determination of chymosin and bovine pepsin A activity in combined rennets on the basis of immunochemical inhibition. *J. Dairy Res.* 56, 631–637. <https://doi.org/10.1017/S0022029900029150>
16. Cassandro, M., Comin, A., Ojala, M., Zotto, R.D., De Marchi, M., Gallo, L., Carnier, P., Bittante, G., 2008. Genetic Parameters of Milk Coagulation Properties and Their Relationships with Milk Yield and Quality Traits in Italian Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 91, 371–376. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0308>
17. Chitpinyol, S., Crabbe, M.J.C., 1998. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.* 61, 395–418. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00090-3)
18. da Silva, R.R., Duffeck, C.E., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E., 2019. Milk clotting and storage-tolerant peptidase from *Aureobasidium leucospermi* LB86. *Process Biochem.* 85, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.006>
19. Dadousis, C., Biffani, S., Cipolat-Gotet, C., Nicolazzi, E.L., Rossoni, A., Santus, E., Bittante, G., Cecchinato, A., 2016. Genome-wide association of coagulation properties, curd firmness modeling, protein percentage, and acidity in milk from Brown Swiss cows. *J. Dairy Sci.* 99, 3654–3666. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10078>
20. Davies, D.R., 1990. The Structure and Function of the Aspartic Proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 189–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.19.060190.001201>
21. Donnelly, W.J., O'Callaghan, D.M., Carroll, D.P., McCONNELL, D.J., Gannon, F., 1984. Multiple forms of calf prochymosin and chymosin. *Biochem. Soc. Trans.* 12, 440–441. <https://doi.org/10.1042/bst0120440>
22. Dunn, B.M., 2011. Introduction to the Aspartic Proteinase Family, in: Ghosh, A.K. (Ed.), *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 1–21. <https://doi.org/10.1002/9783527630943.ch1>
23. Findlay, C.J., Stanley, D.W., Emmons, D.B., 1984. Chicken Pepsin as a Rennet Substitute. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 17, 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(84\)72363-7](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(84)72363-7)

24. Foltmann, B., 1993. General and Molecular Aspects of Rennets, in: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Springer US, Boston, MA, pp. 37–68. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_2
25. Foltmann, B., 1981. Gastric proteinases--structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.* 17, 52–84.
26. Foltmann, B., Jensen, A.L., 1982. Human progastricsin. Analysis of intermediates during activation into gastricsin and determination of the amino acid sequence of the propart. *Eur. J. Biochem.* 128, 63–70.
27. Foltmann, B., Jensen, A.L., Lønblad, P., Smidt, E., Axelsen, N.H., 1981. A developmental analysis of the production of chymosin and pepsin in pigs. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 68, 9–13. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90172-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90172-3)
28. Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2017. Enzymatic Coagulation of Milk, in: *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US, Boston, MA, pp. 185–229. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7
29. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2017. Cheese: An Overview, in: *Cheese*. Elsevier, pp. 5–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6>
30. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2004. *Cheese. 1: General aspects*, 3. ed., rev. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam Heidelberg.
31. Fox, P.F., Stepaniak, L., 1993. Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.* 3, 509–530. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90029-Y](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90029-Y)
32. Fuquay, J. W., Fox, P. F., MCSweeney, P. L. H., 2010: *Encyclopedia of Dairy Science*, 2nd ed. Academic Press Title, 4, pp. 281–293. ISBN 978-0- 12-374402-9.
33. 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, 197–208. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0197-y>
34. García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I., López, M.B., 2012. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Sci. Technol.* 92, 691–707. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0086-1>
35. Garg, S.K., Johri, B.N., 1995. Application of Recombinant Calf Chymosin in Cheesemaking. *J. Appl. Anim. Res.* 7, 105–114. <https://doi.org/10.1080/09712119.1995.9706060>
36. Garg, S.K., Johri, B.N., 1994. Rennet: Current trends and future research. *Food Rev. Int.* 10, 313–355. <https://doi.org/10.1080/87559129409541005>
37. Goptar', I.A., Balandina, G.N., Lysogorskaya, E.N., Filippova, I.Yu., 2007. A new approach to the use of fluorogenic dinitrophenyl-containing substrates for determining the proteolytic activity of aspartyl proteinases. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 390–393. <https://doi.org/10.1134/S0003683807040059>
38. Guinee, T.P., Wilkinson, M.G., 1992. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Int. J. Dairy Technol.* 45, 94–104. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1992.tb01791.x>

39. Gumus, P., Hayaloglu, A.A., 2019. Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir. *J. Dairy Sci.* 102, 5945–5956. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15671>
40. Guo, Y., Tu, T., Zheng, J., Bai, Y., Huang, H., Su, X., Wang, Yuan, Wang, Yaru, Yao, B., Luo, H., 2019. Improvement of *Bs* APA Aspartic Protease Thermostability via Autocatalysis-Resistant Mutation. *J. Agric. Food Chem.* 67, 10505–10512. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03959>
41. Hashim, M.M., Mingsheng, D., Iqbal, M.F., Xiaohong, C., 2011. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry* 72, 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.12.002>
42. Hong, F., Wang, Z. G., Mei, L., & Xue, X. H. 2013. Screening high yield mutant from chymosin-producing *Bacillus subtilis* irradiated by N⁺ ion beam. *Food and Fermentation Industries*, 39, 120–125.
43. Huang, X.W., Chen, L.J., Luo, Y.B., Guo, H.Y., Ren, F.Z., 2011. Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases. *J. Dairy Sci.* 94, 2259–2269. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4024>
44. Ikonen, T., Morri, S., Tyrisevä, A.-M., Ruottinen, O., Ojala, M., 2004. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk. *J. Dairy Sci.* 87, 458–467. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73185-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73185-9)
45. Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* 64, 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
46. Kageyama, H., Ueda, H., Tezuka, T., Ogasawara, A., Narita, Y., Kageyama, T., Ichinose, M., 2010. Differences in the P1' substrate specificities of pepsin A and chymosin. *J. Biochem. (Tokyo)* 147, 167–174. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp158>
47. Kageyama, T., 2002. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 288–306. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8423-9>
48. Kageyama, T., Tanabe, K., Koiwai, O., 1990. Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *J. Biol. Chem.* 265, 17031–17038. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44864-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44864-2)
49. Kangwa, M., Salgado, J.A.G., Fernandez-Lahore, H.M., 2018. Identification and characterization of N-glycosylation site on a *Mucor circinelloides* aspartic protease expressed in *Pichia pastoris*: effect on secretion, activity and thermo-stability. *AMB Express* 8, 157. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0691-3>
50. Kappeler, S.R., van den Brink, H. (J.) M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E.B., Johansen, E., 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>

51. Kelly, A.L., Larsen, L.B. (Eds.), 2021. Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products, Food Engineering Series. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8>
52. Koelsch, G., Mareš, M., Metcalf, P., Fusek, M., 1994. Multiple functions of pro-peptides of aspartic proteinase zymogens. FEBS Lett. 343, 6–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80596-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80596-2)
53. Kozelková, M., Jůzl, M., Lužová, T., Šustová, K., Bubeníčková, A., 2013. Changes of quality of rennets during storing. Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun. 60, 189–196. <https://doi.org/10.11118/actaun201260060189>
54. Krishna Rao, L., Mathur, D.K., 1979. Assessment of Purified Bacterial Milk Clotting Enzyme from *Bacillus subtilis* K-26 for Cheddar Cheese Making. J. Dairy Sci. 62, 378–383. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83255-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83255-5)
55. Law, B.A., Tamime, A.Y. (Eds.), 2010. Technology of cheesemaking, 2nd ed. ed, Society of Dairy Technology book series. Blackwell, Malden, MA.
56. Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J., 1987. Texture Development During Cheese Ripening. J. Dairy Sci. 70, 1748–1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
57. Leite Júnior, B.R. de C., Tribst, A.A.L., Cristianini, M., 2016. Comparative effects of high isostatic pressure and thermal processing on the inactivation of *Rhizomucor miehei* protease. LWT - Food Sci. Technol. 65, 1050–1053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.042>
58. Leite Júnior, B.R. de C., Tribst, A.A.L., Cristianini, M., 2014. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 21, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.11.006>
59. Li, J., Chen, D., Yu, Z., Zhao, L., Zhang, R., 2013. Improvement of expression level of keratinase Sfp2 from *Streptomyces fradiae* by site-directed mutagenesis of its N-terminal pro-sequence. Biotechnol. Lett. 35, 743–749. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1139-0>
60. Li, L., Chen, H., Lü, X., Gong, J., Xiao, G., 2022. Effects of papain concentration, coagulation temperature, and coagulation time on the properties of model soft cheese during ripening. LWT 161, 113404. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113404>
61. Liu, X., Wu, Y., Guan, R., Jia, G., Ma, Y., Zhang, Y., 2021. Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. Food Res. Int. 149, 110704. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110704>
62. 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.). J. Agric. Food Chem. 52, 8182–8189. <https://doi.org/10.1021/jf049006o>
63. Louro Martins, A.P., Pestana de Vasconcelos, M.M., de Sousa, R.B., 1996. Thistle (*Cynara cardunculus* L) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. Le Lait 76, 473–477. <https://doi.org/10.1051/lait:1996536>
64. McSweeney, P.L.H., McNamara, J.P., 2022. Encyclopedia of dairy sciences, 3rd ed. ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

65. Moatsou, G., Moschopoulou, E., Georgala, A., Zoidou, E., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Anifantakis, E., 2004. Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chem.* 88, 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.066>
66. Moschopoulou, E., 2011. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Rumin. Res.* 101, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.039>
67. Narita, Y., Oda, S., Moriyama, A., Kageyama, T., 2002. Primary structure, unique enzymatic properties, and molecular evolution of pepsinogen B and pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.* 404, 177–185. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00209-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00209-6)
68. Narwal, R.K., Bhushan, B., Pal, A., Malhotra, S.P., Kumar, S., Saharan, V., 2016. Inactivation thermodynamics and iso-kinetic profiling for evaluating operational suitability of milk clotting enzyme immobilized in composite polymer matrix. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.025>
69. Nelson, J.H., 1975. Impact of New Milk Clotting Enzymes on Cheese Technology. *J. Dairy Sci.* 58, 1739–1750. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84778-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84778-3)
70. Nielsen, P.H., Malmos, H., Damhus, T., Diderichsen, B., Nielsen, H.K., Simonsen, M., Schiff, H.E., Oestergaard, A., Olsen, H.S., Eigtved, P., Nielsen, T.K., 2000. Enzyme Applications, Industrial, in: John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. 0914042114090512.a01. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0914042114090512.a01>
71. Nielsen, P.K., Foltmann, B., 1995. Purification and Characterization of Porcine Pepsinogen B and Pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 417–422. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1483>
72. Pedersen, V.B., Foltmann, B., 1975. Amino-Acid Sequence of the Peptide Segment Liberated during Activation of Prochymosin (Prorennin). *Eur. J. Biochem.* 55, 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02141.x>
73. Peng, Q., Yu, Q., Song, F., 2019. Expression of cry genes in *Bacillus thuringiensis* biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 1617–1626. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9552-x>
74. Pérols, C., Piffaut, B., Scher, J., Ramet, J.P., Poncelet, D., 1997. The potential of enzyme entrapment in konjac cold-melting gel beads. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 57–60. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00083-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00083-X)
75. Pettinau, M., Nuvoli, G., Podda, F., & Ledda, A. 1977. Influenza del metodo di preparazione del caglio di agnello sulla conservazione delle sue proprietà coagulanti, proteolitiche e lipolitiche. *Scienza e Tecnica Lattiero Casaria*, 28, 101–114.
76. Prieto, B., Franco, I., Fresno, J.M., Prieto, J.G., Bernardo, A., Carballo, J., 2004. Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from kid or commercial calf) on proteolysis during the ripening of León cow milk cheese. *Food Chem.* 85, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.016>

77. Purushothaman, K., Bhat, S.K., Siddappa, S., Singh, S.A., Subbaiah, R., Marathe, G.K., Rao G Appu Rao, A., 2021. Aspartic protease-pepstatin A interactions: Structural insights on the thermal inactivation mechanism. *Biochimie* 189, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.06.002>
78. Ramet, J. P. 1997. Les Agents de la transformation du lait. In: A. Eck and J. C. Gillis (Eds.). *Le fromage*. Troisième édition éd. Tech. Doc. Lavoisier, Paris, 165–174.
79. Rauch, P., Beránková, E., Valentová, O., Sajdok, J., Káš, J., 1988. High-performance anion-exchange chromatography of rennet enzymes. *J. Chromatogr. A* 438, 451–453. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90281-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90281-4)
80. Rawlings, N.D., 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action, in: Brix, K., Stöcker, W. (Eds.), *Proteases: Structure and Function*. Springer Vienna, Vienna, pp. 1–36. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0885-7_1
81. Raymond, M.N., Bricas, E., Salesse, R., Garnier, J., Garnot, P., Ribadeau Dumas, B., 1973. A Proteolytic Unit for Chymosin (Rennin) Activity Based on a Reference Synthetic Peptide. *J. Dairy Sci.* 56, 419–422. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(73\)85194-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(73)85194-X)
82. Reid, J.R., Coolbear, T., Ayers, J.S., Coolbear, K.P., 1997. The action of chymosin on κ -casein and its macropeptide: Effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. *Int. Dairy J.* 7, 559–569. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00062-9)
83. Rolet-Répécaud, O., Berthier, F., Beuvier, E., Gavoye, S., Notz, E., Roustel, S., Gagnaire, V., Achilleos, C., 2013. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.021>
84. Ryle, A.P., 1970. [20] The porcine pepsins and pepsinogens, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 316–336. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(70\)19023-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19023-9)
85. Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-Salguero, J., 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chem.* 78, 281–289. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00098-5)
86. Sardinas, J.L., 1968. Rennin Enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.* 16, 248–255. <https://doi.org/10.1128/am.16.2.248-255.1968>
87. Scott, R., Robinson, R.K., Wilbey, R.A., 1998. *Cheesemaking Practice*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5819-4>
88. Şeker, Ş., Beyenal, H., Ayhan, F., Tanyolaç, A., 1998. Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 469–474. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00077-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00077-5)
89. Shetty, K., 2006. *Food biotechnology*, 2nd ed. ed. CRC Press, Taylor & Francis, New York.
90. Silva, S.V., Malcata, F.X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 15, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.009>

91. Silva, S.V., Pihlanto, A., Malcata, F.X., 2006. Bioactive Peptides in Ovine and Caprine Cheeselike Systems Prepared with Proteases from *Cynara cardunculus*. *J. Dairy Sci.* 89, 3336–3344. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72370-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72370-0)
92. Spelzini, D., Picó, G., Farruggia, B., 2006. Dependence of chymosin and pepsin partition coefficient with phase volume and polymer pausidispersity in polyethyleneglycol–phosphate aqueous two-phase system. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 51, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.023>
93. Stanley, D.W., Emmons, D.B., Modler, H.W., Irvine, D.M., 1980. Cheddar Cheese Made with Chicken Pepsin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 13, 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(80\)73326-6](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(80)73326-6)
94. Tabayehnejad, N., Castillo, M., Payne, F.A., 2012. Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method. *J. Food Eng.* 108, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.009>
95. Tang, J., 1970. Amino acid sequence near the amino terminus of porcine pepsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 697–703. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90069-0)
96. Tian, D., Sun, X., An, X., Zhang, L., Liu, Y., Tong, H., Li, T., Shen, Y., Man, F., Yan, W. 2017. Construction and eukaryotic expression of recombinant HSA-TP5 fusion gene expression vector. *Journal of Jilin University Medicine Edition*, 43, 948–952.
97. Trujillo, A.J., Guamis, B., Laencina, J., López, M.B., 2000. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chem.* 71, 449–457. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00170-9)
98. Tsarouhas, P.H., Arvanitoyannis, I.S., Varzakas, T.H., 2009. Reliability and maintainability analysis of cheese (feta) production line in a Greek medium-size company: A case study. *J. Food Eng.* 94, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.011>
99. Turk, R.S., Watkins, A.S., Blair, G.T., 1990. Differential Thermal Inactivation Analysis of Calf Rennets. *J. Dairy Sci.* 73, 2000–2006. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78878-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78878-9)
100. Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M., Takeuchi, T., 1970. PEPSTATIN, A NEW PEPSIN INHIBITOR PRODUCED BY AGTINOMYGETES. *J. Antibiot. (Tokyo)* 23, 259–262. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.259>
101. Uniacke-Lowe, T., Fox, P.F., 2017. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties, in: *Cheese*. Elsevier, pp. 69–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>
102. Vacca, G.M., Stocco, G., Dettori, M.L., Bittante, G., Pazzola, M., 2020. Goat cheese yield and recovery of fat, protein, and total solids in curd are affected by milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 103, 1352–1365. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16424>

103. Verissimo, P., Faro, C., Moir, A.J.G., Lin, Y., Tang, J., Pires, E., 1996. Purification, Characterization and Partial Amino Acid Sequencing of Two New Aspartic Proteinases from Fresh Flowers of *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.* 235, 762–768. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00762.x>
104. Wu, F.-C., Chang, C.-W., Shih, I.-L., 2013. Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by *Bacillus subtilis* natto. *SpringerPlus* 2, 33. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-33>
105. Yegin, S., Dekker, P., 2013. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci. Technol.* 93, 565–594. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0137-2>
106. Zhang, Y., Xia, Y., Liu, X., Xiong, Z., Wang, S., Zhang, N., Ai, L., 2019. High-Level Expression and Substrate-Binding Region Modification of a Novel BL312 Milk-Clotting Enzyme To Enhance the Ratio of Milk-Clotting Activity to Proteolytic Activity. *J. Agric. Food Chem.* 67, 13684–13693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06114>
107. Zhongyang, D., Shuangping, L., Zhenghua, G., Liang, Z., Kechang, Z., Guiyang, S., 2011. Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 9370–9378. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1647>.
108. Zannoni, M., & Annibaldi, S. 1981. Standardization of the renneting ability of milk by Formagraph. Pt. 1. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* (Italy).