

## **PROTEASE KELOR (*Moringa Oleifera*) SEBAGAI KOAGULAN SUSU DALAM PEMBUATAN KEJU**

**Abdul Manab<sup>1</sup>, Manik Eirry Sawitri<sup>1</sup>, Khotibul Umam Al Awwaly<sup>1</sup>, Ria Dewi Andriani<sup>1</sup> dan**

**Gisma Mutiara Putri<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

<sup>2</sup>Mahasiswa Pasca Sarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

\*Korespondensi email: manabfpt@ub.ac.id

**Abstrak.** Protease kelor (*Moringa oleifera*) sebagai koagulan susu dalam pembuatan keju dalam bentuk ekstrak kasar atau murni. Koagulan dari kelor digunakan sebagai alternatif pengganti rennet anak sapi karena ketersediaannya terbatas, harganya mahal atau masalah status halal bagi konsumen muslim. Koagulan dari kelor ditemukan di daun dan biji kelor menggunakan berbagai metode ekstraksi untuk menghasilkan koagulan susu sebagai peptidase sitein. Protease kelor memiliki aktifitas koagulasi, proteolitik dan *caseinolytic* yang berbeda dengan rennet sapi. Aktifitas proteolitik yang berlebih dari kebanyakan protease tanaman menjadi faktor pembatas kebanyakan koagulan tanaman dalam aplikasi pembuatan keju terkait rendahnya rendemen, flavor pahit dan tekstur yang kurang bagus. Kelor (*Moringa oleifera*) potensial dikembangkan sebagai koagulan susu dalam pembuatan keju dalam rangka untuk memenuhi permintaan pasar global untuk menghasilkan keju berkualitas.

**Kata kunci:** protease kelor, koagulan, susu, keju

**Abstract.** Moringa (*Moringa oleifera*) proteases as milk coagulants in cheese manufacturing as crude extracts or purified form. Moringa coagulants as the alternative of calf rennet due to the limited availability, high price of rennet, and halal status for moslem consumer. These proteases can obtained in leaves and seeds of moringa plants. These proteases used for milk coagulation as cysteine peptidase. Moringa proteases different with calf rennet in coagulation, proteolytic and caseinolytic activity. Moringa proteases have excessive proteolytic activity similar with most plant coagulants. Higher proteolytic activity of moringa protease become limitation in cheese manufacturing due to decreasing cheese yields, bitter flavors and soften texture. Moringa proteases (*Moringa oleifera*) still potential as milk coagulant in cheese manufacturing to produce qualified cheese to meet global demand.

**Keywords:** Moringa protease, coagulant, milk, cheese

### **PENDAHULUAN**

Koagulasi susu merupakan salah satu tahapan kunci dalam pembuatan keju, dan enzim pengkoagulasi susu memiliki peran penting dalam proses tersebut. Rennet merupakan kompleks enzim pengkoagulasi susu yang paling banyak digunakan dalam pembuatan keju, yang diperoleh dari abomasum anak sapi (Alihanoğlu *et al.*, 2018) dengan komponen utama berupa kimosin. Lambung ternak ruminansia, khususnya sapi, merupakan sumber rennet yang mengandung kimosin (EC 3.4.23.4) sebagai komponen enzim utama dan paling banyak digunakan dalam industri keju, untuk menghasilkan curd yang stabil dan flavor yang baik terkait tingginya spesifitasnya terhadap  $\kappa$ -kasein (Rao *et al.*, 1998). Namun, meningkatnya permintaan keju di seluruh dunia, tingginya harga rennet, masalah keamanan (penyakit sapi gila, flu burung, virus H1N1 dan toksin mikroba), alasan diet (vegetarian, organisme yang dimodifikasi secara genetik) atau masalah status halal membatasi penggunaan rennet anak sapi (Narwal *et al.*, 2016; Salehi *et al.*, 2017), sehingga dibutuhkan alternatif rennet baru dengan sifat selektif pengkoagulasi susu.

Enzim yang potensial sebagai pengganti rennet harus memenuhi persyaratan untuk pembuatan ketoksin mikrobaju diantaranya enzim dari mikroba, rekombinan dan dari tanaman. Enzim dari mikroorganisme dan mikroorganisme yang dimodifikasi genetiknya terbukti sesuai sebagai pengganti rennet ternak ruminansia, namun saat ini terdapat peningkatan perhatian terhadap enzim koagulan susu dari tanaman. Hampir semua enzim yang digunakan sebagai koagulan susu termasuk dalam protease aspartat, namun beberapa enzim dari kelompok lainnya seperti protease sistein dan serin juga digunakan.

Saat ini, protease pengkoagulasi susu dari tanaman, memiliki potensi aplikasi dalam pembuatan keju karena ketersediaannya melimpah dan kelayakannya dalam proses ekstraksi (Jacob *et al.*, 2011). Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan spesies yang banyak dibudidayakan dari family Monogeneric, yang berasal dari sub-Himalayan seperti Pakistan, Bangladesh and Afghanistan. *Moringa oleifera* banyak mengandung kalsium, potassium dan antioxidants ( $\alpha$  dan  $\gamma$ - tocopherol), dan digunakan dalam diet manusia (Lo Piero *et al.*, 2002). Biji *Moringa oleifera* banyak mengandung karbohidrat, protein, vitamin C, vitamins B dan mineral (Uchikoba, 1996).

Biji kelor (*Moringa oleifera*) banyak mengandung protease (Munoz *et al.*, 2017). Protease tanaman merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida yang berperan dalam berbagai proses biologis, meliputi mobilisasi protein simpanan, degradasi protein kloroplast oleh cahaya, sistem pertahanan terhadap serangan fitopatogen dan diferensiasi jaringan (Pontual *et al.*, 2012). *M. oleifera* digunakan untuk koagulasi susu karena memiliki aktifitas kaseinolitik dan aktifitas koagulasi susu (Pontual, *et al.*, 2012).

### **Jenis Protease dari Tanaman**

Protease diperlukan oleh tanaman dalam berbagai aspek dalam siklus hidupnya. Protease terlibat dalam mobilisasi protein cadangan selama germinasi biji (Schaller 2004). Protease dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan mekanisme katalitiknya yang digunakan selama proses hidrolitik. Jenis katalitik utama berupa aspartat, serin, sistein dan metalloprotease (Bah *et al.* 2006). Katalitik protease serin dan sistein sangat berbeda dari aspartat dan metalloprotein dimana nukleofil dari sisi katalitiknya merupakan bagian dari asam amino, jenis enzim ini diaktifasi oleh molekul air (Bruno *et al.* 2006). Secara umum, protease dari berbagai sumber menghasilkan sisi pemecahan yang berbeda pada  $\kappa$ -CN, yang memicu perbedaan waktu koagulasi susu dan spesifitasnya (Wang *et al.*, 2022).

#### **1. Protease aspartat**

Protease aspartat mempunyai dua residu aspartat pada sisi katalitiknya. Protease ini paling aktif pada kondisi pH asam dan menunjukkan spesifitasnya untuk pemecahan ikatan peptida diantara residu asam amino hidrofobik (Domingos *et al.* 2000). Protease aspartat dengan aktifitas koagulasi susu ditemukan di artichoke (*Cynara scolymus* L.) (Llorente *et al.* 1997); milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) (Vairo-Cavalli *et al.* 2005); *Onopordum turcicum* (Tamer 1993); rice kernels (Asakura *et al.* 1997); *Centaurea calcitrapa* (Domingos *et al.* 2000).

#### **2 Protease sistein**

Protease sistein, disebut juga protease thiol, mekanisme katalitiknya melibatkan gugus sistein di sisi aktifnya. Protease ini memiliki aktifitas pada kisaran suhu dan pH yang luas.

### 3 protease serin

Protease serin memiliki residu serin di sisi aktifnya. Protease serin ditemukan di beberapa tanaman, kebanyakan dari buah-buahan (Rawlings and Barrett 2004). Cucumis dari Cucumis melo (Uchikoba and Kaneda 1996) dan lettuce dari *Lactuca sativa* (Lo Piero *et al.* 2002) sudah digunakan sebagai koagulan susu.

Peptidase biji *Moringa oleifera* yang digerminasi diidentifikasi sebagai peptidase sistein, yang memiliki aktifitas terhadap K-kasein, aktifitas hidrolitiknya lebih tinggi dibandingkan dengan rennet sapi, namun aktifitas hidrolisis terhadap  $\alpha$ -casein and  $\beta$ -casein lebih rendah, sehingga protease dari potensial dikembangkan sebagai koagulan dalam pembuatan keju dan dapat menghasilkan berbagai peptida fungsional (Wang *et al.*, 2022)

Peptidase sistein yang diperoleh dari biji *M. oleifera* yang digerminasi menunjukkan aktifitas koagulasi yang baik, stabilitas yang tinggi di kondisi asam dan termostabilitas yang baik sebagai rennet tanaman (Wang *et al.*, 2021). Sisi pemecahan pada  $\kappa$ -CN oleh *M. oleifera* pada residu Ile129-Pro130 sangat berbeda dengan rennet anak sapi (Thr94-Met95). Menghasilkan peptida dengan berat molekul 14,895.37 Da (Wang *et al.*, 2022).

### **Koagulan Susu Dari Tanaman**

Beberapa ekstrak tanaman sudah digunakan sebagai koagulan susu dalam pembuatan keju di beberapa negara Mediteranian, Afrika barat dan Eropa selatan. Spanyol dan Portugal menggunakan *Cynara sp.* sebagai koagulan susu untuk pembuatan keju Serpa dan Serra di Portugis (Macedo *et al.* 1993) serta keju Torta del Casar, Spanish Los Pedroches, dan La Serena di Spanyol (Fernández-Salguero 1999; Sanjuán *et al.* 2002). Namun, sifat proteolisis yang berlebihan dari kebanyakan koagulan tanaman menjadi pembatas penggunaannya dalam pembuatan keju terkait rendemen yang rendah dan terbentuknya flavor dan tekstur yang tidak diinginkan (Lo Piero *et al.* 2002). Oleh karena itu, pencarian enzim koagulan susu dari tanaman terus berlanjut dalam rangka pemenuhan permintaan pasar global terhadap produk keju yang bermutu dan diversifikasi produk keju (Hashim *et al.* 2011).

### **Koagulan Susu Dari Kelor (*M. Oleifera*)**

Aktifitas koagulasi susu merupakan sifat paling penting dari enzim yang digunakan dalam pembuatan keju. Kemampuan enzim dalam koagulasi susu terutama spesifik dalam hidrolisis  $\kappa$ -CN (Jacob *et al.* 2011). Lebih dari 95% kasein dalam susu sapi, ditemukan dalam bentuk misel berupa dispersi koloid;  $\kappa$ -CN terletak pada permukaan misel, sedangkan  $\alpha$ -CN and  $\beta$ -CN terdistribusi di bagian dalam terkait sifat hidrofobiknya (McMahon and Oommen, 2008; Li and Zhao, 2019). Selama fase awal koagulasi susu, rennet menghidrolisis  $\kappa$ -CN dan mendestabilisasi misel kasein, sehingga membentuk gelasi susu (Yegin *et al.*, 2011). Protease pengkoagulasi susu yang berbeda akan memiliki perbedaan spesifitas terhadap  $\kappa$ -CN dan fraksi kasein lainnya, contohnya kimosin yang ada di rennet anak sapi

memiliki spesifitas memecah  $\kappa$ -CN pada ikatan peptida Phe105-Met106 selama koagulasi susu dan ikatan peptida tersebut menjadi sisi pemecahan kebanyakan enzim yang digunakan dalam pembuatan keju (Galan *et al.*, 2008; Yegin *et al.*, 2011).

Tingkat aktifitas protease *M. oleifera* lebih kuat terhadap  $\kappa$ -CN dan lemah terhadap  $\alpha$ -CN dan  $\beta$ -CN, Protease pengkoagulasi susu memiliki kemampuan hidrolisis yang kuat terhadap  $\kappa$ -CN dan relatif lemah kemampuan hidrolisis terhadap  $\alpha$ -CN dan  $\beta$ -CN, yang kondusif dalam pembuatan keju (An *et al.*, 2014; Kethireddipalli and Hill, 2015). Hidrolisis  $\alpha$ -CN dan  $\beta$ -CN berpengaruh positif bagi sifat sensori dan mekanis keju, seperti kekerasan, tekstur dan flavor selama pemeraman keju. Disamping itu, hidrolisis lemah terhadap  $\alpha$ -CN dan  $\beta$ -CN mencegah pelepasan peptida pahit selama pembuatan keju (An *et al.*, 2014).

Protease *M. oleifera* memiliki tingkat hidrolisis terhadap  $\kappa$ -CN yang lebih kuat dibandingkan rennet anak sapi, meskipun kemampuan hidrolisis terhadap  $\alpha$ -CN dan  $\beta$ -CN lebih lemah daripada rennet anak sapi (Wang *et al.*, 2022). Secara menyeluruh, protease *M. oleifera* dapat menghidrolisis 3 kasein pada tingkat yang lebih tinggi dibandingkan dengan rennet sapi, sehingga dibutuhkan protease *M. oleifera* dalam jumlah sedikit untuk koagulasi susu. Hidrolisis  $\kappa$ -CN oleh protease *M. oleifera* memicu pembentukan peptida 15-kDa dari 5 menit reaksi, mengindikasikan spesifitas peptidase untuk hidrolisis  $\kappa$ -CN. Pola hidrolisis  $\kappa$ -CN dari aktifitas *M. oleifera* sangat mirip dengan protease yang berasal dari tanaman lainnya (Wang *et al.*, 2022)..

Rasio aktifitas koagulasi susu terhadap aktifitas proteolitik enzim menjadi indikator kesesuaian sebagai pengganti rennet untuk pembuatan keju. Enzim dengan rasio aktifitas koagulasi susu terhadap aktifitas proteolitik enzim yang lebih tinggi lebih baik dalam pembentukan curd, rendemen dan pembentukan rasa pahit yang lebih rendah selama pembuatan keju, sebaliknya rasio yang lebih rendah dapat menurunkan rendemen curd, firmness curd lemah dan terbentuknya peptida pahit yang mempengaruhi sifat sensori produk akhir (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; Tajalsir *et al.*, 2014).

Ekstrak kasar biji *M. oleifera* menghasilkan rasio aktifitas koagulasi terhadap aktifitas proteolitik yang lebih tinggi daripada rennet anak sapi, yang mengindikasikan bahwa biji kelor sangat aktif dibandingkan dengan rennet anak sapi (Tajalsir *et al.*, 2014). Rasio aktifitas koagulasi terhadap aktifitas proteolitik dari protease tanaman lebih rendah daripada rennet, sehingga menghasilkan rasa pahit selama pemeraman keju (Sousa *et al.*, 2001).

Kemampuan ekstrak kasar *M. oleifera* untuk mengkoagulasi susu dan membentuk curd yang lembut dikombinasikan dengan rasio aktifitas koagulasi terhadap aktifitas proteolitik yang tinggi, membuat *M. oleifera* potensial untuk substitusi rennet di industri keju (Tajalsir *et al.*, 2014).

### **Aktifitas Koagulasi Berbagai Bagian Tanaman Kelor**

Aktifitas koagulasi susu dari berbagai bagian *M. oleifera* (daun, stemp, bunga, buah dan biji) hanya terdeteksi pada ekstrak biji, sedangkan dari bagian lainnya tidak menunjukkan aktifitas koagulasi pada suhu 35°C selama lebih dari 5 jam (Tajalsir *et al.*, 2014; Sánchez-Muñoz *et al.*, 2017). Daun *M. olifera*

pada berbagai nilai pH menunjukkan aktifitas protease paling tinggi pada pH 7 dan aktifitas paling rendah pada pH 3 (Derso and Dagneu, 2018). Aktifitas koagulasi susu dari ekstrak daun dan biji *M. oleifera* terdeteksi hanya dalam ekstrak kasar dari biji yang diekstrak sebelum fraksinasi menggunakan ammonium sulfat sedangkan ekstrak kasar daun tidak menunjukkan adanya aktifitas koagulasi susu (Terefe *et al.*, 2017)

Ekstrak biji *M. oleifera* memiliki aktifitas koagulasi susu yang tinggi, dibandingkan dengan ekstrak bunga, aktifitasnya 2 kali lebih tinggi daripada ekstrak bunga *M. oleifera* (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2017). Ekstrak biji *M. oleifera* terdiri dari 4 band protein (43.6, 32.2, 19.4, and 16.3 kDa), memiliki tingkat degradasi kasein yang tinggi (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2017).

Bunga *M. oleivera* memiliki aktifitas caseinolytic dan koagulasi susu, mengandung protease aspartat, sistein, serin serta protease Ca<sup>2+</sup>-dependent. Aktifitas caseinolytic dan koagulasi susu menunjukkan perbedaan sensitifitas terhadap perlakuan pH. Aktifasi aktifitas proteolitik yang heat-dependent dari perspektif food treatment and engineering, menunjukkan PP dari bunga *M. oleifera* potensial dikembangkan dalam produksi keju, karena dapat memicu hidrolisis  $\kappa$ -kasein secara ekstensif dan tingkat degradasi  $\alpha$  dan  $\beta$  kasein yang rendah (Pontual *et al.*, 2012)

#### **Faktor Yang Mempengaruhi Aktifitas Koagulasi Protease Kelor (*M. oleifera*)**

Aktifitas koagulasi susu sangat dipengaruhi suhu, pH dan konsentrasi ekstrak kasar protease daun dan biji *M. oleifera*. Aktifitas koagulasi ekstrak kasar daun dan biji *M. oleifera* meningkat seiring meningkatnya suhu dari 55- 65°C. Aktifitas koagulasi ekstrak kasar daun dan biji *M. oleifera* pada suhu 65°C dua kali lebih tinggi daripada pada suhu 55°C (Terefe *et al.*, 2017). Peningkatan aktifitas koagulasi pada suhu lebih tinggi dikaitkan dengan agregasi protein dan rearrangement molekuler dalam struktur protein (Terefe *et al.*, 2017). Sebaliknya, aktifitas koagulasi cenderung mengalami penurunan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak kasar daun dan biji *M. oleifera* (Terefe *et al.*, 2017).

Pengaruh suhu terhadap aktifitas katalitik pada ekstrak kasar enzim *M. oleifera* pengkoagulan susu menunjukkan hubungan aktifitas spesifik-suhu enzim. Perubahan konformasi dalam struktur protein pada suhu tinggi dapat membuat protein rentan terhadap proteolisis, karena protein terekspos sisi pemecahan baru terhadap hidrolisis enzimatis (Tajalsir *et al.*, 2014).

Aktifitas koagulasi susu ekstrak daun dan biji *M. oleifera* meningkat pada pH 5,0 dan menurun pada pH 5,5 (Terefe *et al.*, 2017). Aktifitas koagulasi tertinggi pada pH 5, suhu 65°C dan konsentrasi 10% ekstrak kasar daun dan biji *M. oleifera*, aktifitas koagulasi terendah pada pH 5,5, suhu 55°C dan konsentrasi 40% dari volume susu (Terefe *et al.*, 2017).

Flokulasi antara protease *M. oleifera* dan  $\kappa$ -CN menghasilkan partikel yang lebih besar pada menit ke 30 reaksi, dan jumlah partikel meningkat seiring berjalannya reaksi, jadi jumlah dan ukuran partikel terflokulasi yang dihasilkan oleh protease *M. oleifera* terus meningkat selama reaksi. Partikel terflokulasi menjadi lebih kecil ukuran dan jumlahnya diantara 30 dan 90 menit sejak reaksi dimulai, yang mengindikasikan bahwa protease *M. oleifera* menghasilkan produk sekunder dari hidrolisis secara

enzimatis terhadap  $\kappa$ -CN, produk hidrolisis secara parsial setelah 30 menit reaksi enzimatis, dan tingkat hidrolisis meningkat secara progresif, menghasilkan hidrolisis partikel terflokulasi secara bertahap menjadi peptida dengan berat molekul rendah dan lebih larut. Hasil ini membuktikan bahwa flokulasi yang paling efektif terjadi pada menit ke 30, setelah 30 menit terjadi enzimolisis yang berkelanjutan (Wang *et al.*, 2022).

## DAFTAR PUSTAKA

- Alihanoglu, S., D. Ektiren, C. Akbulut Cakır, H. Vardin, A. Karaaslan, and M. Karaaslan. 2018. Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food Sci. Nutr.* 6:1100–1108.
- An, Z., X. L. He, W. D. Gao, W. Zhao, and W. B. Zhang. 2014. Characteristics of miniature cheddar-type cheese made by microbial rennet from *Bacillus amyloliquefaciens*: A comparison with commercial calf rennet. *J. Food Sci.* 79: M214–M221.
- Asakura, T., H. Watanabe, K. Abe, and S. Arai. 1997. Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization and application to milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45: 1070–1075.
- Bah S, B.S. Paulsen, D. Diallo and H.T. Johansen. 2006. Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 107:189–198
- Bruno MA, SA. Trejo, XF. Aviles, NO. Caffini and LMI. Lopez LMI. 2006. Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Protein J.* 25:224–231
- Derso A.G. and G. G. Dagnew. 2019. Isolate and Extract for Milk Clotting Enzymes from the leaves of *Moringa Oleifera*, *Carica Papaya* and *Mangifera Indica* and Use in Cheese Making: The Case of Western Hararage Region, Ethiopia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(3): 244-254
- Domingos A, PC. Cardos, ZT Xue, A. Clemente, PE. Brodelius, and MS Pand ais. 2000. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur J Biochem.* 267:6824–6831
- Fernandez-Salguero, J. 2009. Proteolysis during the ripening of goats’ milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Res. Int.* 42:324–330.
- Galan, E., F. Prados, A. Pino, L. Tejada, and J. Fernandez-Salguero. 2008. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *Int. Dairy J.* 18:93–98.
- Hashim, M.M., M. Dong, M.F. Iqbal and X. Chen. 2011. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry.* 72: 458–464.
- Jacob, M., D. Jaros, and H. Rohm. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* 64:14–33.
- Kethireddipalli, P., and A. R. Hill. 2015. Rennet coagulation and cheesemaking properties of thermally processed milk: Overview and recent developments. *J. Agric. Food Chem.* 63:9389–9403.
- Li, Q., and Z. Zhao. 2019. Acid and rennet-induced coagulation behavior of casein micelles with modified structure. *Food Chem.* 291:231–238.
- Llorente BE, CB. Brutti, CL. Natalucci, and NO. Caffini. 1997. Partial characterization of a milk clotting proteinase isolated from artichoke (*Cynara scolymus* L., Asteraceae). *Acta Farm Bonaer* 16:37–42
- Lo Piero AR, I. Puglisi and G. Petrone. 2002. Characterization of “lettucine”, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *J Agric Food Chem* 50:2439–2443
- Macedo, I. Q., C.J. Faro, and E.M. Pires, 1996. Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine Rs- and  $\alpha$ -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 42–47

- Mazorra-Manzano, M.A., T.C. Perea-Gutiérrez, M.E. Lugo-Sánchez, J.C. Ramirez-Suarez, M.J. Torres-Llanez, A.F. González-Córdova and B. Vallejo-Cordoba. 2013. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chem.* 141: 1902–1907.
- McMahon, D. J., and B. S. Oommen. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 91:1709–1721.
- Narwal, R. K., B. Bhushan, A. Pal, A. Panwar, and S. Malhotra. 2016. Purification, physico-chemical characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. *Lebensm. Wiss. Technol.* 65:652–660.
- Pontual, E. V., B.E. Carvalho, R.S. Bezerra, L.C. Coelho, T.H. Napoleão, and P.M. 2012. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, 135(3): 1848-1854.
- Rao, M. B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 597–635.
- Rawlings ND, and AJ. Barrett 2004. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* 244:19–61
- Salehi, M., M. R. Aghamaali, R. H. Sajedi, S. M. Asghari, and E. Jorjani. 2017. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *Int. J. Biol. Macromol.* 98:847–854.
- Sanjuán E, R. Millán, P. Saavedra, MA Carmona, R. Gómez, and J. 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
- Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183–197
- Terefe, M.A., A. Kebede, and M. Kebede. 2017. Clotting Activities of Partially Purified Extracts of *Moringa oleifera* L. on Dromedary Camel Milk. *East African Journal of Sciences.* 11 (2): 117-128
- Uchikoba T, and M. Kaneda. 1996. Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. *Appl Biochem Biotechnol* 56:325–330
- Sousa, M. J., and F. X. Malcata. 1998. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flower of *Cynara cardunculus*. *Enzyme Microb. Technol.* 22:305–314.
- Tajalsir, A.E., A.S. Ebraheem, A.M. Abdallah, F.J. Khider, M.O. Elsamani, and A.M. Ahmed, 2014. Partial purification of milk-clotting enzyme from the seeds of *Moringa oleifera*. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 4, 58–62.
- Tamer MI. 1993. Identification and partial purification of a novel milk-clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnol Lett* 13:427–432
- Vairo-Cavalli S, S. Claver, N. Priolo and C. Natalucci. 2005. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *J Dairy Res* 72:271–275
- Wang, X., Q. Zhao, L. He, Y. Shi, J. Fan, Y. Chen, and A. Huang. 2022. Milk-clotting properties on bovine caseins of a novel cysteine peptidase from germinated *Moringa oleifera* seeds. *J. Dairy Sci.* 105:3770–3781.
- Yegin, S., M. Fernandez-Lahore, A. J. Gama-Salgado, U. Guvenc, Y. Goksungur, and C. Tari. 2011. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:949–960.