

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DÉPARTEMENT D'AGRONOMIE



Réf : ...../UAMOB/FSNVST/DSA/2022

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences biotechnologique

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

Chilali Ouafia

*Thème*

**Etude de l'effet des plantes sur la coagulation de lait**

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mr. Aberkan Boubker</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme. Djouahra Djamila</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme. Bensmail Souhila</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2021/2022

## *Remerciements*

*D'abord je remercie dieu le tout puissant et miséricordieux  
qui ma donné la force et la patience d'accomplir ce travail.*

*En second lieu, je donne un grand merci*

*À mon encadreur Djouahra Djamila,*

*À Mme Bensmail Souhila,*

*À Mr Aberkan Boubker.*





*Dédicace*

À ma sœur Ilham



## Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
<i>Chapitre I :Généralités sur le lait</i>	
I.1. Définition.....	3
I.2.Composition du lait.....	3
I.2.1 Caractéristiques organoleptiques.....	3
I.2.2 Caractéristique Physico-chimiques.....	4
I.2.3 Caractéristiques microbiologiques du lait.....	4
I.2.4. Les protéines du lait.....	5
I.3. Généralités sur les caséines.....	5
I.3.1. Composition et structure chimique.....	5
I.3.2. Micelles de caséine.....	6
<i>CHAPITRE II :La coagulation du lait</i>	
II.1. Mécanisme de coagulation.....	8
II.2. Coagulation acide.....	8
II.3. Coagulation enzymatique.....	8
II.3.1. Phase primaire de coagulation.....	9
II.3.2. Phase secondaire.....	9
II.3.3. Phase tertiaire.....	9
II.4. Principales enzymes coagulant le lait.....	10
II.5. Coagulation mixte.....	12
II.6.Coagulation par les extraits des plantes.....	12
II.7. Facteurs affectant la coagulation.....	12
<i>Chapitre III :Les plantes à protéases coagulant le lait</i>	
III.1. Introduction.....	14
III.2.Protéases végétales.....	14
III.3. Les critères de l'enzyme végétale qui remplace la présure dans la coagulation de lait: ..	16

## Résumés

---

III.4. Exemples des plantes qui ont la capacité de coaguler le lait.....	16
III.4.1. Le Cardon ( <i>Cynara cardunculus</i> ).....	16
III.4.2. Le Figuier .....	18
III.4.3. Le papayer .....	19
III.4.4. Le <i>Calotropis procera</i> Description de la plante .....	21
III.5. Comparaison de la capacité coagulante des plantes avec les autres procédés enzymatiques.....	22
III.7. Intérêt industriel.....	23

### *CONCLUSION*

Conclusion .....	26
Références bibliographiques	
Résumé .....	34

# Liste des Abréviation

---

## Liste des abréviations

AA: Acide Amine

Ala : Alanine

Arg : arginine

CMP: caséinomacropéptide

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

His : histidine

KDa : Kilo Dalton

Lys: Lysine

MCA : l'activité coagulante du lait (milk clothing activity).

Met: méthionine

PA : peptide amers

PH : potentiel d'hydrogène

Phe : phénylalanine

Ser : sérine

Thr : thréonine

# Liste des figures

---

## Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de la formation d'une micelle hétérogène de caséine.....	7
Figure 2: Dégradation des caséines par l'enzyme de coagulation et développement de peptide amers dans le mécanisme de coagulation .....	9
Figure 3: Phases de la coagulation enzymatique du lait .....	10
Figure 4: Aspect morphologique du cardon .....	17
Figure 5: plante de figuier ( <i>ficus carica</i> ) .....	18
Figure 6:l'extraction du ficine à partir du latex du figuier .....	19
Figure 7 : Photographie d'un Papayer .....	20
Figure 8 : photo de <i>Calotropisprocera</i> .....	21

## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du lait chez différentes espèces animales .	3
Tableau 2 : caractéristique physiques du lait	4
Tableau 3: Caractéristiques chimiques du lait	4
Tableau 4: Composition et distribution moyennes des protéines du lait	5
Tableau 5: Caractéristiques physiochimiques dse caséines du lait..	6
Tableau 6 : Distribution des caséine des laits (%)	7
Tableau 7: Quelques exemples des espèces végétales à protéases coagulant le lait	15
Tableau 8: quelques plantes locaux et leur enzymes coagulantes	16



## Introduction

La coagulation du lait est un processus indispensable dans la fabrication du fromage.

Les enzymes de coagulation sont utilisées depuis des siècles dans la fabrication de ce produit. Les coagulants enzymatiques traditionnelles étaient dérivés de sources animales, principalement des estomacs de veau, bien que les coagulants produits à partir d'une gamme d'espèces végétales et microbiennes ont été proposés comme coagulants de remplacement **(Broome., 1998)**.

Ce mécanisme consiste à la formation d'un gel ou caillé, suite à des modifications complexes, tant physiques que chimiques, des constituants du lait, principalement, les caséines. Le premier agent coagulant est la présure. Cette enzyme se trouve dans les caillottes de jeunes ruminants, à l'allaitement. Il faut, en moyenne 4 caillottes de veaux pour produire une tonne de fromage **(Alais., 1984)**.

En ce qui concerne l'Algérie, le secteur de l'industrie laitière connaît beaucoup de problèmes parmi lesquels l'insuffisance de la quantité de lait produite localement. En effet, la consommation de lait est la plus importante du Maghreb. De ce fait, nous importons plus d'un milliard de litres de lait par an **(Ministère de l'agriculture., 2014)**.

La chymosine est la principale protéase de coagulation du lait présente dans la présure naturelle de veau et est utilisée depuis longtemps. D'autre part, dans les fermes laitières, des bactéries bien cultivées sont utilisées pour fabriquer des yaourts et les deux bactéries les plus couramment ajoutées au lait sont *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophiles*. Bien que le processus de coagulation du lait puisse être réalisé au fil du temps par fermentation **(Desta et al., 2020)**.

De ce fait, la gélification par l'extrait des plantes sera indispensable dans l'industrie, ainsi que certaines plantes ont une quantité suffisante d'enzymes protéolytiques dans leurs tissus et peuvent coaguler le lait dans des conditions optimales. Leur utilisation comme coagulants dans la fabrication du fromage représente une pratique traditionnelle dans de nombreuses régions du monde. Au cours des dernières années, la recherche et les connaissances sur les protéases végétales ont augmenté et traversé les frontières, élargissant leur utilisation dans les processus biotechnologiques et la production de nouveaux fromages exquis **(Miguel et al., 2018)**.

# Introduction

---

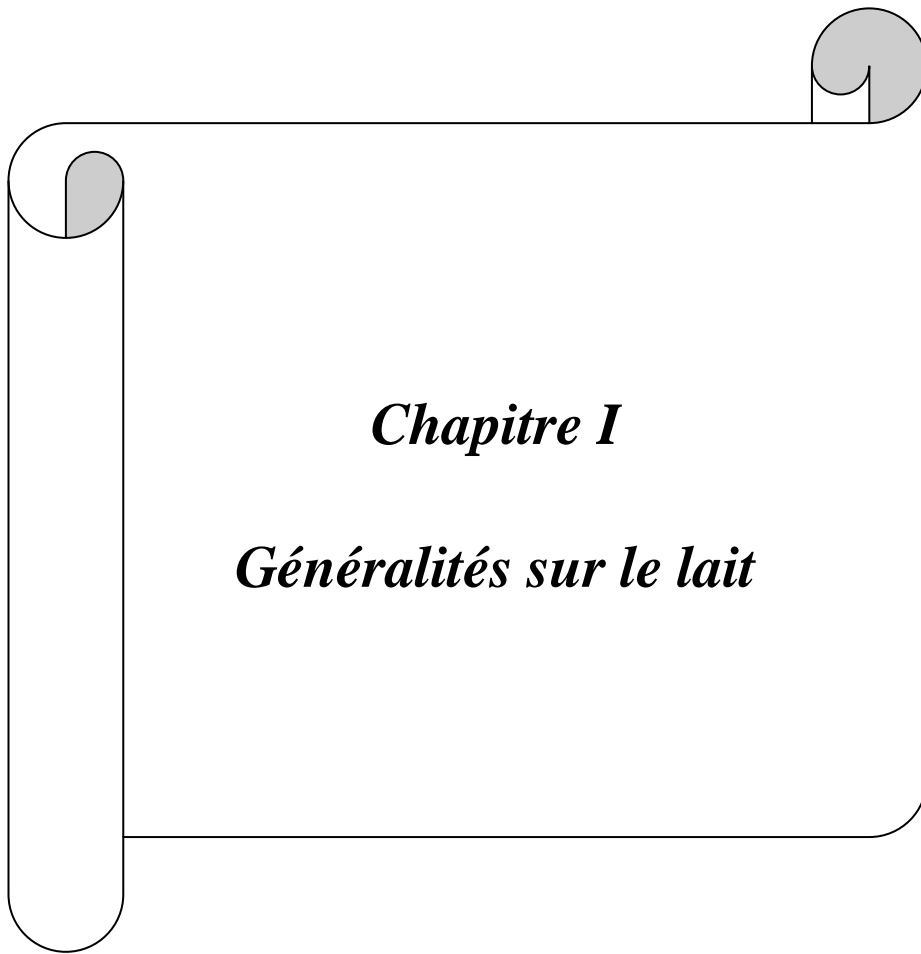
Mon travail rentre dans cette perspective et l'objectif fixé est de répondre via une investigation bibliographique à plusieurs questions autour de cette problématique, parmi lesquelles : Quel sont ces sources végétaux ? Peuvent-ils remplacer la présure? comment sera l'effet de ces enzymes végétaux sur la coagulation de lait?

Cette étude théorique est présentée sous trois chapitres :

Chapitre I : Généralités sur le lait

Chapitre II : La coagulation du lait

Chapitre III : Les plantes à protéases coagulant le lait



***Chapitre I***

***Généralités sur le lait***

### **I.1. Définition**

Le lait est un aliment blanchâtre généralement, légèrement visqueux, sa saveur est douce et son odeur faible mais identifiable, produit par les cellules sécrétoires mammaires des femelles dans un processus appelé lactation; c'est l'une des majeurs caractéristiques des mammifères. La qualité du lait est primordiale. Donc, il faut être correctement stocké et transporté dans des conditions optimales de température et d'humidité (**Guétouache., et al ., 2014**).

### **I.2.Composition du lait**

La composition générale du lait est représentée aux niveaux du tableau n°1. Les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation, état de santé et l'âge de l'animal, période de lactation, ainsi que la saison. De manière générale, le lait comprend quatre types de constituants importants qui sont : les lipides, constitués essentiellement de graisses ordinaires (triglycérides), les protéines (caséine, albumine et globuline), les glucides (essentiellement le lactose) et les sels minéraux. (**Vignola, 2002**).

**Tableau 1** : Composition du lait chez différentes espèces animales (**Guétouache et al., 2014**).

<b>Les espèces</b>	<b>Eau</b>	<b>Protéins</b>	<b>Matière grasse</b>	<b>Lactose</b>
<b>Vache</b>	87,2	3,5	3,7	4,9
<b>Chèvre</b>	86,5	3,5	6,4	4,7
<b>Chameau</b>	87,7	3,5	3,4	4,7
<b>Brebis</b>	82,7	5,5	4	5,1

#### **I.2.1 Caractéristiques organoleptiques**

La qualité organoleptique d'un produit est transformée au cour du temps. La durée de stockage, la température et leur action combinée affectent sur la qualité sensorielle globale. Un lait de bonne qualité organoleptique présente des caractéristiques particulières qui concernent la couleur, l'odeur, la saveur, la viscosité, etc (**Luquet,1990 ; Raynaud, 2006**).

### **I.2.2 Caractéristique Physico-chimiques**

Le lait possède de nombreuses propriétés et valeur nutritive. Divers chercheur ont étudié sa composition chimique et ses caractéristiques physiques; du fait que ces changements de composition peuvent altérer la qualité de transformation du lait. L'aptitude d'un lait à la transformation fromagère est étroitement liée à la nature de ses constituants. Il faut noter que plus la matière sèche totale du lait est élevée, plus ce lait est riche et meilleur, avec un bon rendement fromager (**Vignola, 2002**).

Les caractères physiques et chimiques du lait sont représentés dans les tableau 2et 3:

**Tableau 2** : caractéristique physiques du lait (**Bourgeois et al ., 1999**)

Caractéristiques physiques	Valeurs
pH	6,6 - 6,8
Densité (°D)	1,03 - 1,033
Température de congélation (°C)	0,53

Tableau 3: Caractéristiques chimiques du lait (**Bourgeois et al., 1999**).

Caractéristiques chimiques	Valeurs (g/100g)
Extrait sec total	12,7
Taux de matière azoté	3,3
Teneur en cendres	0,9
Teneur en caséines	2,8
Teneur en lactose	4,9
Teneur en albumines et glubilines	0,5

### **I.2.3 Caractéristiques microbiologiques du lait**

Le lait contient peu de microorganismes (moins de  $10^3$  germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain. Il s'agit essentiellement des microcoques mais aussi des "Streptocoques lactiques" (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) qui sont des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées "Lacténines". D'autres microorganismes peuvent se

trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade et ils sont généralement dangereux de point de vue sanitaire (**Guignard., 1998**).

#### **I .2.4. Les protéines du lait**

Les protéines du lait sont classées en deux catégories selon leur solubilité dans l'eau et leur stabilité. Ainsi, on distingue d'un côté les différentes caséines qui sont en suspension colloïdale dans la phase aqueuse du lait et les protéines du lactosérum dites protéines solubles ou protéines du petit lait. Les caséines sont celles qui sont impliquées dans le processus de gélification du lait. Les protéines du lait sont indispensables car ils sont de haute qualité, elles contiennent tous les acides aminés essentiels, des éléments que l'organisme ne peut pas produire (**Ilboudo et al., 2012 ; Konte, 1999**).

**Tableau 4:** Composition et distribution moyennes des protéines du lait (**FAO, 1998**)

<b>Protéine du lait</b>	<b>Moyenne absolue (g/l)</b>	<b>Moyenne (g/l)</b>
<b>Protéines insolubles (caséine entière)</b>	36	82
<b>Protéines solubles</b>	6	18
$\alpha$ -lactoglobuline	2,7	45
$\beta$ -lactalbumine	1,5	25
<b>Albumine sérique</b>	0,3	5
<b>Immunoglobuline</b>	0,7	12

### **I.3. Généralités sur les caséines**

#### **1.3.1. Composition et structure chimique**

Le terme de caséine désigne un mélange hétérogène de protéines phosphorylée . Elles sont des macro-molécules (3,2% du lait) contenant environ 209 acides aminés. Elles sont composées d'une longue chaîne carbonée et azotée qui est lipophile et d'une chaîne hydrophile, on dit que cette molécule est amphiphile, c'est un tensioactif (**Jouhan, 2002 ; Travernier et al., 2014**). Le tableau 5 résume les caractéristiques physiques et chimiques de caséines.

**Tableau 5:** Caractéristiques physiochimiques des caséines du lait. (Brulé *et al.*, 1997).

Les paramètres	Caséine $\alpha_1$	Caséine $\alpha_2$	Caséine $\beta$	Caséine kappa
Résidu d'AA	199	207	209	169
Poid moléculaire (Da)	23600	25200	24000	19000
Résidu de cystéine	-	2	-	2
Groupe phosphorylant	8-9	10-13	5	1-2
Les glucides	-		-	+
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

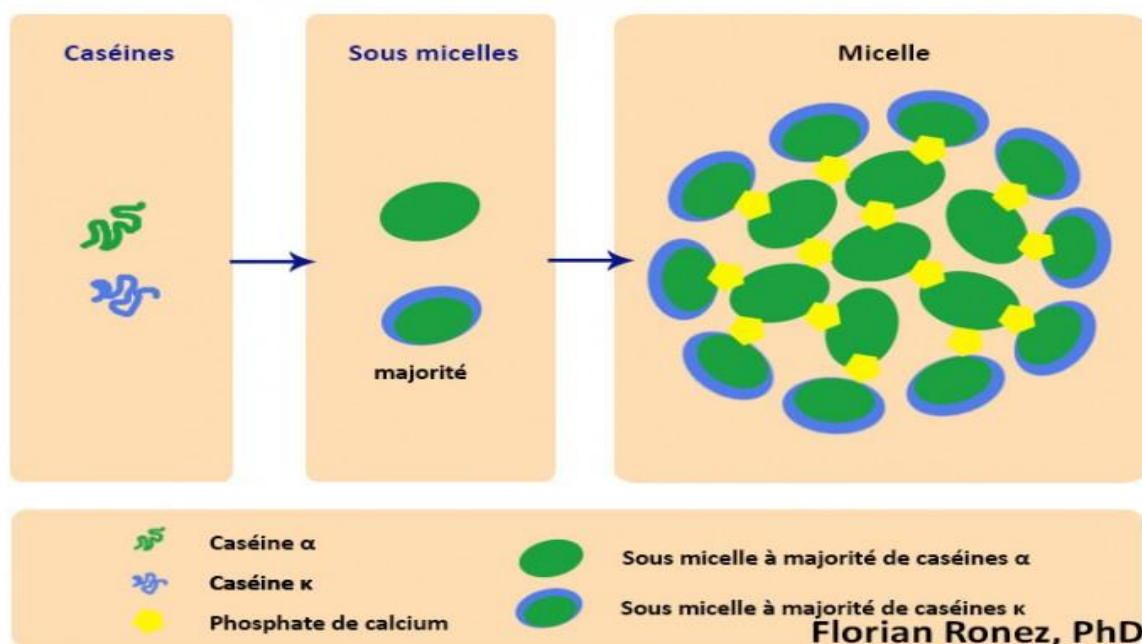
(-): Absence, (+): présence

### I.3.2. Micelles de caséine

La micelle de caséines est un constituant déterminant dans la fonctionnalité biologique et technologique du lait. Elles sont des complexes colloïdaux caséine/calcium, sont au cœur de l'organisation moléculaire du lait (Phoebe, 2007). Elles sont composées de différents composants salins et des caséines, du lactosérum et des enzymes (lipase et plasmine) incorporées. Les proportions exactes des composants sont variables et influencent la qualité du lait (Guétouache *et al.*, 2014). Ces particules sphériques (180nm) constituant des submicelles de 8 à 20 nm, composent par trois types de caséine (tableau 6) : caséine  $\alpha$ , caséine  $\beta$  et caséine kappa. Elles sont riches en caséine kappa, qui se trouve dans leur surface (hydrophile) (Figure 01). Elle joue un rôle essentiel dans la coagulation du lait (Guétouache *et al.*, 2014 ; Ilboudo *et al.*, 2012). Ce dernier se produit une agrégation des micelles de caséine qui étaient à l'état natif en suspension stable dans le lait. La stabilité de la micelle semble résulter de différents types d'interactions. D'une part, des forces d'attraction entre les constituants micellaires seraient responsables de la structure micellaire et de sa cohésion, d'autre part, des forces de répulsion dues à l'existence d'un potentiel de surface favoriseraient la stabilité en

solution. On considère actuellement que la caséine Kappa, localisée à la périphérie de la micelle, est responsable de cette charge superficielle. Elle aurait par ailleurs un rôle de « colloïde protecteur », dont la nature n'est pas encore bien définie.

Le mécanisme de la stabilisation est certainement en relation avec les propriétés polaires de cette caséine sans que l'on sache si le rôle prépondérant doit être attribué à la polarité hydrophile-hydrophobe ou à la polarité de charge (Pierre, 1983).



**Figure 1:** Représentation schématique de la formation d'une micelle hétérogène de caséine (d'après le modèle de Schmidt & Walstra) (Florian, 2012).

Le tableau suivant représente la distribution de types de caséine

**Tableau 6 :** Distribution des caséine des laits (%) (Phoebe, 2007)

	Caséine $\alpha_1$	Caséine $\alpha_2$	Caséine $\beta$	Caséine Kappa
Chameau	5-17	6-20	50	15
Vache	38	10	40	12
L'homme	Trace	Trace	70	27





## ***CHAPITRE II***

### ***La coagulation du lait***

## Chapitre II

---

La coagulation ou gélification de lait est une étape fondamentale dans la fabrication de fromage. Elle peut être obtenue soit par voie fermentaire à l'aide des bactéries lactiques, soit par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, ou par action mixte.

### II.1. Mécanisme de coagulation

La coagulation du lait résulte un gel appelé le coagulum. Le lait passe de l'état liquide à l'état semi solide appelé gel ou coagulum (**Cecchinato et al., 2012**). Ils s'agit de l'étape la plus importante pour réussir un fromage . En effet, les caractéristiques physico-chimiques du gel obtenu conditionnent l'aptitude à l'égouttage et les caractéristiques finales du fromage, aussi; l'action d'enzyme ou bien l'effet de l'acidification induit la différence dans les mécanismes de la formation de coagulum (**Hsieh et Pan, 2012**).

### II.2. Coagulation acide

La coagulation acide est de nature électrochimique. Elle est induite par les ferments lactiques. Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, et *Streptococcus* sont les plus utilisés tout en variant en fonction des fromages et des technologies. Les ferments transforment le lactose en acide lactique. Le pH du lait de fromagerie diminue avec production d'acide lactique (**Mietton, 1995**).

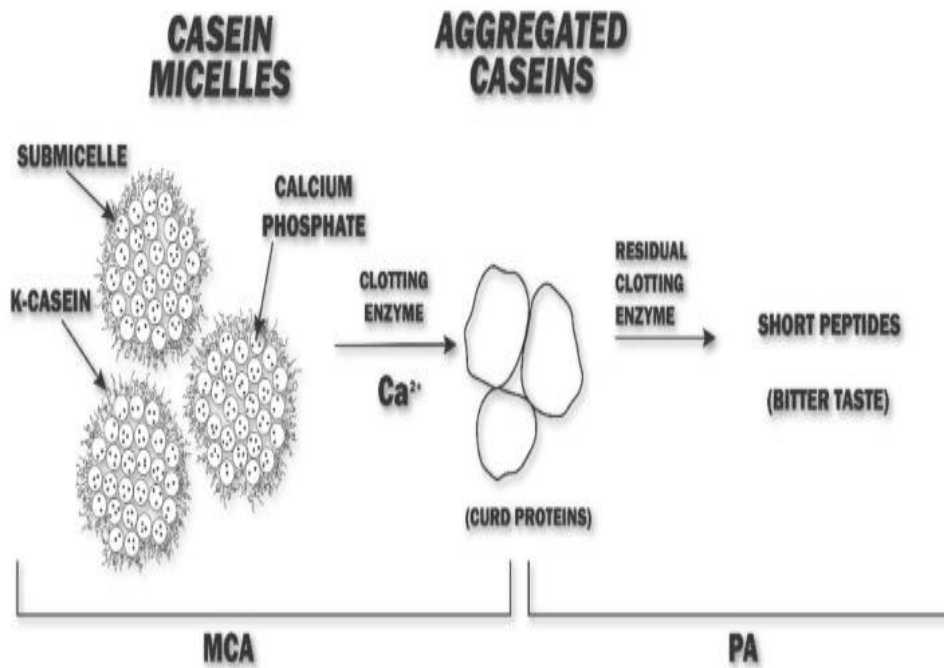
La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose pour produire de l'acide lactique. Ce dernier est libéré lors de la croissance des microorganismes et neutralise progressivement les charges électronégatives des caséines- $\kappa$ . La répulsion électrostatique entre les micelles de caséine diminue au fur et à mesure de l'enrichissement du milieu en ions  $H^+$ , puis disparaît , provoquant ainsi un rapprochement et une agrégation des micelles de caséine (**Florian, 2012**).

### II.3. Coagulation enzymatique

La coagulation enzymatique est assurée par un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbiene. Il faut aussi tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur permet d'hydrolyser les caséines  $\alpha$  et  $\beta$ avec libération de peptides (**Mietton, 1995**). Le processus de coagulation enzymatique est résumé dans trois phases :

### II .3.1. Phase primaire de coagulation

Le caséinomacropeptide (CMP) se détache de la caséine kappa au PH 6,6 (90 % de l'hydrolyse de caséine) au niveau de la liaison Phe (105) et Met (106). Ensuite la caséinomacropeptide est libérée, cette dissociation résulte un diminution de l'hydratation. Après les micelles vont établie entre elles des liaisons électrostatiques hydrophiles et salins, ce qui résulte la formation de gel contenant la caséine kappa minéralisé (Eck, 1990 ; Lenoir *et al.*, 1985 ; Mahaut *et al.*, 2000).



**Figure 2:** Dégradation des caséines par l'enzyme de coagulation et développement de peptide amers dans le mécanisme de coagulation (Nicosier *et al.*, 2022).

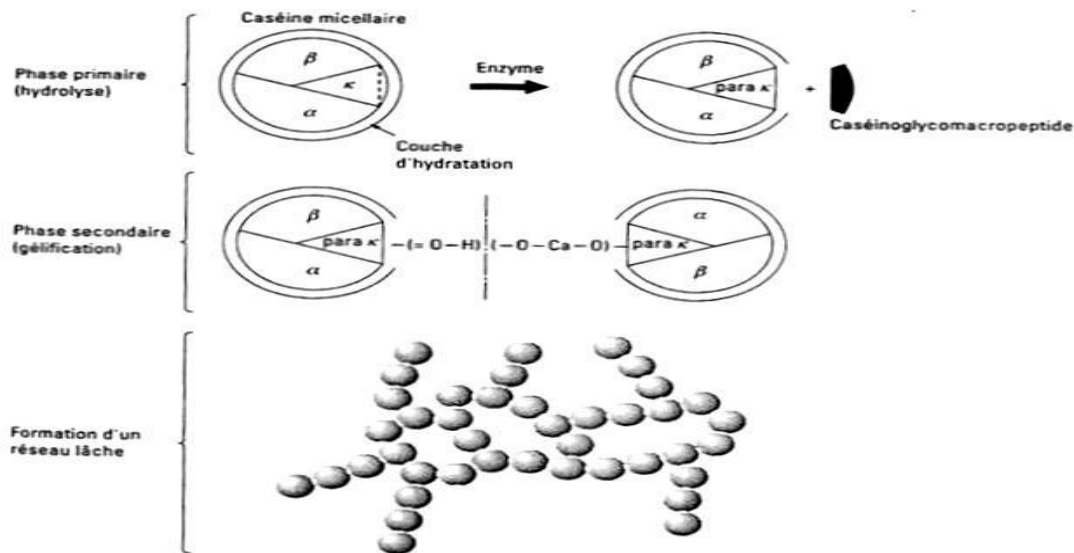
### II .3.2 . Phase secondaire

Les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes par intervention des ions calcium qui s'unissent à la partie chargée négativement des micelles diminuant ainsi les forces de répulsion électrostatiques auxquelles elles sont soumises ce qui favorise leur agrégation. Le démarrage de cette phase nécessite qu'au moins 85 à 90% de la caséine- $\kappa$  soit hydrolysée. Le CMP se détache de la caséine- $\kappa$  et la micelle perd son caractère hydrophile. Il y a diminution de son degré d'hydratation et de son potentiel de surface. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent alors entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel (Iboudo *et al.*, 2012).

### II .3.3 .Phase tertiaire (réticulation de gel)

## Chapitre II

Au cours de laquelle la protéolyse est générale, la mise en place de liaisons phosphocalciques réorganisent les micelles agrégées (Ilboudo *et al.*, 2012), qui vont subir de profondes réorganisations par la mise en place des liaisons phosphocalciques (Figure 3), qui peuvent former des ponts disulfures entre les para caséines, qui résulte la synérèse du coagulum qui est une phase physico-chimique s'accompagnant de la rétraction et de l'expulsion du lactosérum (Brulé *et al.*, 1997 ; Mahaut *et al.*, 2000).



**Figure 3:** Phases de la coagulation enzymatique du lait (Mietton, 1994).

### II.4. Principales enzymes coagulant le lait

Les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le secteur industriel à cause de leurs propriétés. Dans plusieurs procédés industriels, les enzymes sont privilégiées car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés. Également, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental : biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (Barnabé, 2003).

La principale enzyme utilisée dans le caillage du lait c'est la protéase (ou peptidase), est une enzyme qui coupe les liaisons peptidiques des protéines. Les protéases sont variées et ont des rôles biologiques bien différents. Leurs structures sont donc variées. Toute fois, elles possèdent toutes, comme les enzymes en général, un site actif qui assure l'activité d'hydrolyse des liaisons peptidiques, et un site de reconnaissance du substrat pour n'agir que sur la protéine cible.

#### II.4.1. Protéases d'origine animale

## Chapitre II

---

Les enzymes coagulantes d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure (constitué principalement de chymosine), les pepsines bovine...etc. Pour La présure elle contient deux enzymes chymosine et pepsine, mais la chymosine et la principale protéinase présente dans la présure traditionnelle utilisée dans la fabrication de fromage (**Mahaut *et al.*, 2000**).

### 1) La chymosine

La chymosine bovine est l'enzyme majeure responsable de la coagulation du lait dans la caillette de veaux allaitants. Elle est sécrétée sous forme de 365 acides aminés inactives (précurseur), qui peut être convertie en chymosine active dans le milieu acide de l'estomac par élimination protéolytique d'un pro-peptide de 42 acides aminés à l'extrémité N-terminal.

La chymosine est l'une des enzymes les plus importantes du processus de fabrication du fromage en raison de sa grande spécificité pour la caséine. Il y a deux formes commerciales de présure : chymosine A et chymosine B (**Luerce *et al.*, 2014**). La chymosine se produit spontanément par l'hydrolyse de l'extrémité N-terminal de la molécule au pH inférieur à 5.0 (**Mahaut *et al.*, 2000**).

### 2) La pepsine

C'est une enzyme sécrétée par la caillette des ruminants. L'optimum pour l'activité protéolytique est voisin de 2,0. Elle coupe de préférence entre 2 acides aminés hydrophobes et aromatiques (**Oner et Akar, 1993**).

## II.4.2. Protéases d'origine végétale

Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (**Ramet, 1997**).

Les recherches ont trouvé plusieurs espèces végétales capable de cailler le lait, par exemple : Figuier (donne la protéase du ficine qui est détaillée dans le chapitre III), Papayer (la papaïne), Cardon (cardosine) (**Macedo *et al.*, 1993**).

## II.4.3. Protéases d'origine microbienne

On distingue ;

1) **Protéases d'origine bactérienne:** De multiples espèces de bactéries ont été étudiées notamment dans les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa* et *Bacillus subtilis*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La

protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du Cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présentait une saveur acceptable. Cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive (**Ramet, 1997**).

**2) Protéases d'origine fongique:** Elles sont contrairement à celles d'origine bactérienne, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure; les préparations commerciales employées actuellement proviennent de trois genres de moisissures; *Cryphonectria parasitica* (les plus connues), *Rhizomucor pusillus* et *Rhizomucor Miehei* (**Rao et al., 1998**)

### II.5. Coagulation mixte

Elle est réalisée par jonction de l'acide lactique avec la présure qui est dominante dans la formation de coagulum, le caillé acquiert les caractères lactiques. Il y a deux techniques à réaliser :

- Soit emprésurant un lait au cours de l'acidification. La majorité de coagulation est plus rapide et le gel ainsi obtenu offre des caractères intermédiaires entre un gel présure et un gel lactique.
- Soit en laissant s'acidifier naturellement un caillé emprésuré qui permet à ce dernier d'acquérir progressivement les caractères lactiques (**Veisseyre, 1979**)

### II.6. Coagulation par les extraits des plantes

Les extraits de plantes sont utilisés comme coagulants du lait dans la fabrication du fromage depuis l'Antiquité. Les fromages à coagulant végétal se trouvent principalement en Méditerranée, Pays d'Afrique de l'Ouest et d'Europe du Sud. L'Espagne et le Portugal ont la plus grande variété de fabrication de fromages à partir de *Cynara* sp. comme coagulant végétal. Les protéases utilisées comme coagulants du lait ont été identifiées et étudiées dans presque toutes les parties de la plante, qu'il s'agisse de graines, de fleurs ou de latex. Ces enzymes peuvent être obtenues à partir de leur source naturelle ou par culture *in vitro* pour assurer un approvisionnement continu en protéases végétales (**Manzoor et al., 2013**).

### II.7. Facteurs affectant la coagulation

De nombreux facteurs modifient la coagulation du lait et les caractéristiques physiques des coagulum. Parmi lesquels on trouve:

## Chapitre II

---

- 1) **Le taux de protéines** dont le facteur de variation est lié à l'alimentation et composition chimique. Les variations de la composition chimique et de l'aptitude à la coagulation des laits de Vaches (n = 271) ont été étudiés pendant 18 mois chez 6 producteurs de fromage fermier (reblochon) du département de la Haute-Savoie (France). Elles ont été mises en relation avec les caractéristiques physiologiques et génétiques des animaux et les pratiques d'alimentation hivernales et estivales. Il ont constaté que la variabilité du temps de gélification des laits a également été associée à la nature des aliments et aux modalités de leur distribution (**Coulon et Martin, 1995**).
- 2) **L'effet de la température** : le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température (**Dybowska et Fujio, 1996**). Au-dessous de 10°C, la coagulation du lait ne se produit pas. La vitesse de formation du coagulum augmente progressivement de 20 à 40-42 °C, mais à des températures plus élevées, le processus de coagulation ralentit et au dessus de 65°C, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme est inactivée (**Brulé et al., 2006 ; Dybowska et Fujio, 1996**).
- 3) **Le pH initial du lait et de sa teneur en éléments minéraux** (**Coulon et Martin, 1994**). En technologie laitière, la coagulation enzymatique est généralement réalisée sur un lait dont le pH est préalablement ajusté à une valeur définie, caractéristique du type de pâte à fabriquer. Selon l'importance accordée à l'une des 2 voies (acide et enzymatique), le coagulum formé aura une aptitude fromagère spécifique (**Banon et al., 2000**). À pH supérieur à 7, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée. À pH entre 7 et 5,2 cause la diminution de temps de coagulation (**Humme, 1972 ; Lenoir et al., 2006**).
- 4) **L'influence de Calcium**: l'ajout de calcium soluble entraîne l'augmentation de phosphate de calcium colloïdal lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude de lait à la coagulation par la présure (**Brulé et Lenoir, 1990**). Selon **Najera et al., (2003)**, cette addition provoque une diminution de temps de coagulation. Le calcium joue un rôle positif dans la coagulation du lait par la présure. L'addition des sels de calcium augmente considérablement la fermentation et la vitesse de formation du caillé, alors que le temps de coagulation va diminuer jusqu'à des concentrations en chlorure de calcium d'environ 0,01M. Ces améliorations sont dues à l'augmentation de la taille des micelles, l'abaissement du pH et à la dissociation des groupements phosphoriques et carboxyliques des protéines (**Vignola, 2002; Mahaut et al., 2002**).



***Chapitre III***

***Les plantes à protéases  
coagulant le lait***



### **III.1. Introduction**

Les présures végétales occupent une place importante parmi les différents coagulants utilisés en technologie fromagère. Il est important de s'intéresser de développer et de rechercher des coagulants végétales afin de couvrir la demande de marché (**Ben Amira et al., 2017**).

### **III.2. Protéases végétales**

Les présures végétales occupent une place importante parmi les différents coagulants utilisés en technologie fromagère (**Ben Amira et al., 2017**). On peut les trouver dans la majorité des tissus de plantes (**Shah et al., 2013**).

Il y a deux techniques de production de protéases:

- Production à partir de sources naturelles: généralement, ces enzymes ont été extraites de leur source naturelle par la technique du macération de divers organes végétaux tels que fleurs, graines, racines et feuilles (**Shah et al., 2013**)
- Production *in vitro*

Des protéases de coagulation du lait ont été produites par des techniques *in vitro*. *Callus* et les cultures en suspension cellulaire ont été étudiées par plusieurs auteurs par exemple, **Dompteur et Mavituna (1997)** ont utilisé la culture de *Mirabilis jalapa* pour produire des protéases. Ils ont trouvé que le rendement protéolytique était plus élevé avec des protéases produites *in vitro* par rapport aux protéases de la plante intacte (**Shah et al., 2013**)

Toutes les enzymes commerciales utilisées comme coagulant du lait sont des protéinases aspartiques, qui sont plus actives à pH acide et clivent préférentiellement les liaisons peptidiques entre les résidus avec des chaînes latérales hydrophobes.

Les protéases sont classées en fonction des résidus d'acides aminés simplifiés dans les sites catalytiques (**Nicosia et al., 2022**). Les principales classes de protéases de coagulation du lait sont les protéases aspartiques, à sérine et à cystéine. Le nombre et le type d'enzymes varient d'une espèce à l'autre, et dépendent de la partie de plante (**Ben Amira et al., 2017**).

De nombreuses protéases végétales hydrolysent sélectivement la liaison Phe105-Met106 de la caséine k, tandis que d'autres hydrolysent différents sites, tels que est la protéase l'actinidine qui extraite de la plante : *Actinidia chinensis*. Elle hydrolyse la liaison de Ser104- Phe105 de caséine bovine. De plus, l'extrait du rhizome de gingembre (*Zingiber officinale*) peut hydrolyser

de la  $\kappa$ -caséine à deux sites différents: Ala90-Glu91 et His102-Leu103. Les protéases de Schneider de *Cynanchum otophyllum* sont spécialement spécifiques de la liaison Ser132-Thr133, et elles affectent directement l'activité de coagulation du lait (MCA) de l'enzyme (Nicosia *et al.*, 2022).

Les coagulants végétaux ont de nombreuses caractéristiques similaires à la chymosine. Ce sont des protéinases aspartiques et ont des spécificités similaires dans les sites de clivage, car ils hydrolysent la liaison Phe105-Met106 de la caséine (Bornaz *et al.*, 2010)

Les différentes plantes et leurs enzymes coagulantes sont résumées dans le tableau suivant:

**Tableau 7:** Quelques exemples des espèces végétales à protéases coagulant le lait (Roseiro *et al.*, 2003 ; Shah *et al.*, 2014)

Type de protéase	Nom de protéase	Les plantes
Aspartique	Cardosine et cyprosine	<i>Cynara cardunculus</i> (cardon)
	Cynarase	<i>Cynara scolymae</i> (artichaut)
	Cardon	<i>Cynara humilié</i>
	Extrait de proteins	<i>Silybum marianum</i>
	Onopordosine	<i>Onopordum acanthium</i>
	Extrait de protein	<i>Onopordum turcicum</i> (riz)
	Orzasine	<i>Oryza sativa</i>
	Pprocirsine	<i>Cirsium vulgaire</i>
	Extrait de protein	<i>Solanum eleagnifolium</i>
Cystéine	Ficine	<i>Ficus racemosa</i> ; <i>Ficus glaberab</i> ;; <i>Ficus religiosal</i>
	Coagulante caprifig	<i>Ficus carica sylvestre</i>
	Extrait de protein	<i>Allizia lebbeck</i>
	Extrait de protein	<i>Helianidaia annuus</i>
	Actinidine	<i>Actinidia chinensis</i>
	Papayer	<i>Carica papaya</i>
Sérine	Cuisine	• <i>Cucumis mélo</i>
	Nériifoline S	• <i>Euphorbia nériifolia</i>
	Dubiumine	• <i>Solanum dubium frisen</i>
	Religiosine (B C)	• <i>Ficus religieux</i>
	Streblin	• <i>Streblus asper</i>
	Laitue	• <i>Laituca sativa</i>

**III. 3. Les critères de l'enzyme végétale qui remplace la présure dans la coagulation de lait:**

Les présures végétales sont caractérisés par la solubilité dans l'eau, ainsi qu'ils doivent être de faible odeur et faible couleur pour avoir une bonne qualité de produit laitière. Aussi ils ne doivent pas contenir des toxines, la qualité et temps de l'activité coagulante de ces enzymes ont un rôle important dans le processus de gélification (Boudier, 1974).

**III.4. Exemples des plantes qui ont la capacité de coaguler le lait**

**Tableau 8:** quelques plantes locaux et leur enzymes coagulantes (Roseiro *et al.*, 2003)

Nom vulgaire	Nom spécifique	Nom d'enzymes
Cardon	<i>Cynara cardunculus</i>	Cynarase
Chardon	<i>Cynara humillis</i>	Cardosine (A,B)
Figuier	<i>Ficus glaberab</i> <i>Ficus carica</i> <i>Ficus religiosal</i>	Ficine
Papayer	<i>Carica papaya</i>	Papaïne

**III.4.1. Le Cardon (*Cynara cardunculus*)**

Le cardon est une plante herbacée, cultivée comme plante potagère pour ses « côtes » charnues, consommées comme légume. Son nom scientifique est *Cynara cardunculus L. subsp. cardunculus*, de la famille des *Astéracées*. Cette espèce est originaire des régions méditerranéennes. C'est un plante bisannuelle vit de Juin à Octobre (Foury, 1997) (Figure 05).

**1. Description du cardon**

*Cynara cardunculus* est une plante au rhizome vivace, mais dont chaque rosette a un développement bisannuel. C'est-à-dire que les rosettes de feuilles grossissent durant une année avant de fleurir l'été suivant, laissé à son développement naturel. Le cardon devient large de 1 mètre et fleurit à près de 2 m de hauteur, produisant une plante impressionnante et ornementale. Les feuilles sont très découpées, quelque peu épineuses, grises vertes au revers tomenteux, et

bien sûr au pétiole charnu qui est appelé cardes. Les fleurs, regroupées en capitule énorme, sont semblables à celle du chardon, mais d'une couleur vif violette (**Jean-Noel Plagères, 2014**).



**Figure 4:** Aspect morphologique du cardon (**Abbache et al., 2017**)

## **2. Rôle dans le mécanisme de coagulation du lait**

L'extrait de fleurs séchées de *Cynara cardunculus* a été employé avec succès depuis plusieurs siècles au Portugal et dans quelques régions d'Espagne pour la fabrication de fromages traditionnels (**Sousa, 2002**).

Les feuilles de cardon est une source de protéase aspartique s'appelle "le cardosin", elle est la plus répandue et la plus utilisée. Parmi les protéases cardosin on distingue les plus abondants qui sont Cardosin A et Cardosin B (**Mohamed, 2021**), qui sont des glycoprotéines hétérodimères composées d'un chaîne lourde (31 et 34 kDa) et d'un chaîne légère (15 et 14 kDa), le nucléophile dans la réaction d'hydrolyse lors de première étape de coagulation Cette protéase qui s'appelle la cardosine, hydrolyse la caséine kappa dans le site phe105-Met106 (**Nicosia et al., 2022**).

Le coagulant de *Cynara* a été extrait selon la méthode décrite par **Esteve et al.(2001)**. Les fleurs de *Cynara* ont été mélangés avec de l'eau distillée (80 g/l), homogénéisées puis

centrifugées à  $3000 \times g$  pendant 10 min. Le surnageant a été filtré à travers un papier filtre Whatman n°1. L'extrait brut a été utilisé pour l'emprésurage du lait à une concentration de 50 ml/litre , qui a donné une bonne coagulation. Ces coagulants végétaux étaient légèrement plus protéolytiques que la chymosine .

### **III.4.2.Le Figuier**

#### **Définition et description:**

Le figuier est un arbre nommé au passé mythique *Ficus carica*, à un qualificatif générique qui signifie verrue pour *Ficus* (par rapport au latex du figuier qui soigne la verrue) et *carica* fait allusion à une région en Turquie (**Oukabli, 2003**). Il est classé dans l'embranchement de Phanérogames et sous embranchement d'Angiospermes, et appartient à la famille de *Moraceae* (**Joseph et Raj, 2011**).

Le figuier est un arbre des pays chauds atteignant plus de 12 mètres de hauteur et entrant en production dès la 4ème ou la 5ème, le figue c'est leur fruit rond (**Breetaudeau, 1964**).

Les fleurs rencontrées dans la figue peuvent être de deux types, soit mâles, soit femelles. Selon leur distribution, l'individu qui les porte sera qualifié de mâle ou constitué uniquement de fleurs femelles. L'extrémité de toute la tige présente un bourgeon terminal qui contient tous les éléments de la future tige, ainsi que le méristème terminal qui assure la fabrication de nouvelles parties de la plante (**Vidaud, 1997**).



**Figure 5:** plante de figuier (*ficus carica* ) (Giovanna Nicotra et al, 2010)



Le rameau est constitué d'un ensemble d'entre nœuds représentant le point d'insertion d'une feuille et des bourgeons axillaires. Leur disposition alternée, rarement opposée sur le rameau, est une spécificité de la famille des moracées (Bachi, 2011).

### Rôle dans la coagulation de lait

La ficine est une protéase à cystéine extraite du latex du figuier (*Ficus carica*), il a un poids moléculaire de 23,1 kDa. Il a une forte activité catalytique qui dépend du pH (Mohamed, 2021).

Le latex brut de figue a été utilisé sans autre traitement à une dose de 500 µl/litre de lait (Estève et al., 2001). Il est utilisé comme agent coagulant pour la préparation d'un fromage nommé AGUGLI ou IGUISSI dans la région de la kabyl, (Öner et Akar, 1993 ; estève et al., 2001). L'enzyme est active au PH neutre, et son inactivation complète se produit à pH inférieure à 3,0

Le ficine hydrolyse les liaisons contenant l'acide aminé non chargés, aromatiques et hydrophobes. Leur mécanisme d'action est similaire au chymosine.

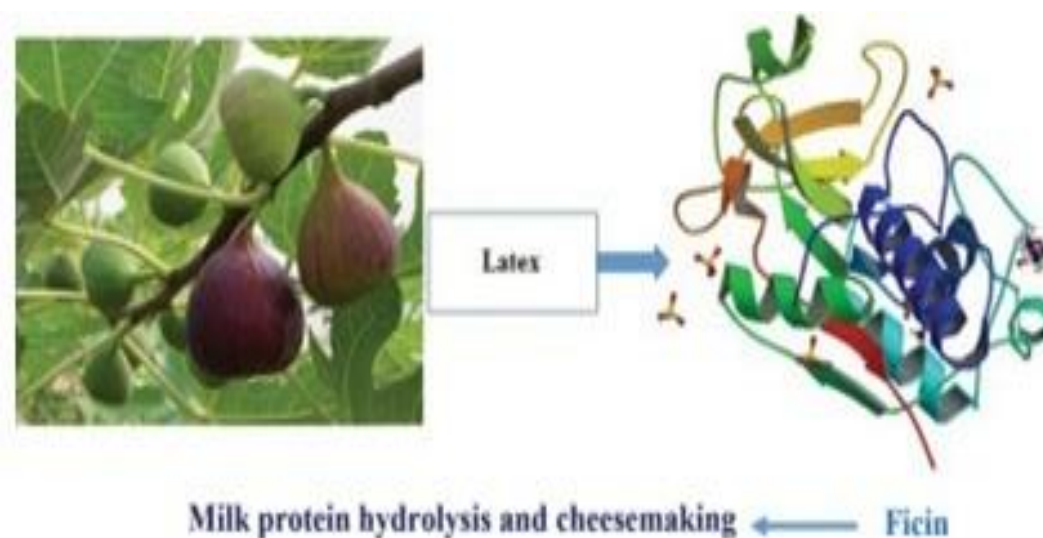


Figure 6: l'extraction du ficine à partir du latex du figuier (Estève et al., 2001)

### III.4.3. Le papayer

- Description de la plante

Le papayer (ou *Carica papaya L.*) est un arbre fruitier à feuillage persistant qui se développe dans les régions tropicales et équatoriales. Son fruit, la papaye, se présente comme

une baie de 1kg environ semblable aux melons et exploitée pour la papaïne qui se trouve dans le latex (**Permanne, 1964**). C'est un arbuste de 3 à 7 m de haut et est en général non ramifié. Les feuilles rassemblées au sommet du tronc, sont portées par un long pétiole de 40-60 cm. Le limbe palmatilobé, de pourtour subcirculaire de 50 cm de diamètre est profondément divisé en 7 lobes, eux-mêmes lobés. La face supérieure est vert clair mate, la face inférieure à pruite blanchâtre. Le feuillage qui contient de la papaïne (enzyme protéolytique) est utilisé dans bien de pays pour attendrir la viande.

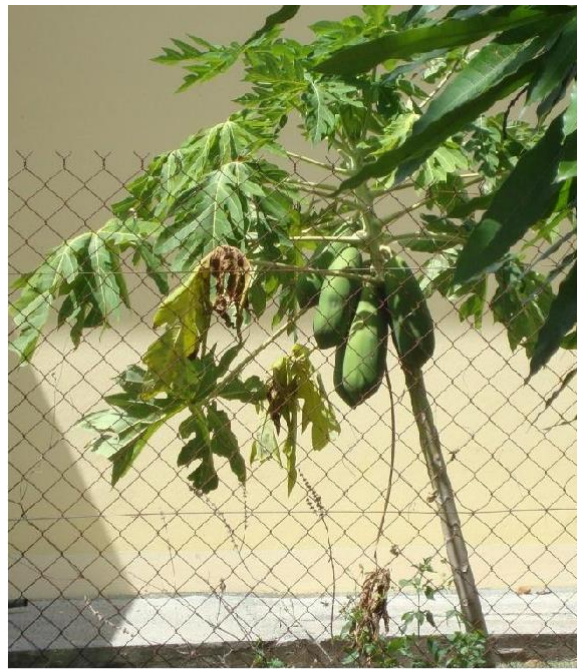


Figure 7 : Photographie d'un Papayer (Claire-Marie FABERT, 2011).

#### **Rôle de papaye dans la coagulation:**

En pratique, les feuilles de papayer sont incisées avant maturation de papayer, ce qui laisse égoutter le latex qui apparaît sous forme d'un jus blanchâtre. L'extraction de la papaïne s'apparente à celle d'une enzyme microbienne extracellulaire : filtration sur silice et /ou centrifugation pour éliminer les insoluble, filtration stérile, concentration (sous vide) et atomisation (**Scriban *et al.*, 1975**).

c'est un thiol protéase(cystéine),il est spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles les liaisons des l'acides aminés sont hydrolysés(**Hinkel, 1951; Permanne, 1964**).Il a un mécanisme catalytique qui implique un groupe de cystéine dans le site actif spécifique par l'hydrolyse des liaisons contenant l'acide aminé basique, aromatique ou apolaire, aussi et il est

essentiel de limiter le plus possible l'oxydation de l'enzyme à l'air libre(Hinkel, 1951; Manzoor et al.,2013) .

#### **III.4.4. Le *Calotropis procera***

##### **Description de la plante**

Le *Calotropis procera* aussi appelé « arbre à soie » ou « pommier de Sodome » est une plante de la famille des Asclépiadacées qui pousse naturellement dans les zones arides et semi-arides d'Afrique et d'Asie (Afrique de l'Ouest, Pakistan, Arabie Saoudite(Gupta et al., 2012; Mossa et al., 1991).

Ils s'agit d'un arbuste à bois mou qui ne dépasse pas 6 m de hauteur (Kareem et al., 2008).Les tiges sont cylindriques et les feuilles sont vert foncés. Elles sont opposées, légèrement charnues, et recouvertes d'une légère mousse blanche lorsqu'elles sont jeunes. Les fleurs sont groupées en cime dense et ont une position axillaire ou terminale. Elles sont pédonculées, pentamères et bicolores (violet et blanc). Les fruits sont verts et ovoïdes. Les graines sont aplaties, de couleur grise ou noire et surmontées d'un fin duvet blanc. Toutes les parties de la plante exsudent un latex blanc (Mainasara et al., 2012) .



Figure 8 : photo de *Calotropisprocera* (Ben Hassen ,2014)

##### **Rôle de *Calotropis procera* dans la coagulation**

L'extrait de l'arbuste *Calotropis procera* est bien connu des populations de ouest africaines pour ses propriétés coagulantes. Ses feuilles sont utilisées dans la fabrication du fromage Wagashi dans quelques pays tels que le Bénin, le Nigéria, le Togo et le Ghana (Mainasara et al., 2012). C'est une plante arbustive de la famille des *Asclepiadaceae* caractérisée par la production d'un latex blanc. Ses différentes parties (feuilles, tiges, fruits, latex) sont utilisées



pour cailler le lait de vache dans un procédé traditionnel de fabrication de fromage (**Baba-Moussa et al., 2007**).

#### **III.4.5. *Ananas comosus* :**

L'ananas est une monocotylédone herbacée pérenne autostérile, de la famille des *Bromeliacées* et originaire d'Amérique du Sud. Sa distribution à l'état spontané est assez large, allant des sols pauvres et secs du cerrados brésilien (*A. ananassoïdes*) à l'ambiance plus ombragée des forêts (*A. bracteatus*). Son nom proviendrait des *tribus Tupi-Guaranis* : « a » signifiant fruit et « nana » savoureux (**C. Py, 1984**).

#### **Rôle de l'*Ananas comosus* dans la coagulation du lait**

La broméline est extraite à partir de *Ananas comosus*, elle est découverte dès 1876. Elle tire son nom de « broméliacées », la famille botanique à la quelle appartient l'ananas. Elle peut être extraite du jus de l'ananas frais ou, ce qui est le cas de celle qui se trouve sous forme de supplément, de la tige de la plante. Elle est constituée d'un groupe d'enzymes présentes dans l'ananas (*Ananas comosus*). Elle fait parti des cystéylprotéases, qui inclut notamment la trypsine et la papaïne. Ces enzymes ont la propriété de faire cailler le lait et, lorsqu'elles sont prises en même temps qu'un repas, de digérer les protéines. Les bromélaïnes sont extraites aussi bien des fruits que des tiges d'ananas, elles ressemblent à la papaïne et à la ficine ; elles existent sous plusieurs formes, la fraction majeure se trouve dans les fruits et se nomme "bromélaïne de fruits" (EC.3.4.22.33) de 23KDa. Les autres fractions sont, la " bromélaïne de tige " ou ananase (EC. 3.4.22.32) de 23,8 KDa, l'ananaïne (EC 3.4.22.31) et la comosaïne (**Napper et al., 1994**).

#### **III.5. Comparaison de la capacité coagulante des plantes avec les autres procédés enzymatiques**

Beaucoup de travaux également été faits pour comparer certaines propriétés rhéologiques et sensorielles des produits laitiers fins, issus de certaines présures végétales et animales. En effet, certains coagulants comme l'actinidine ou la dubiumine produisent des fromages aux qualités sensorielles similaires à celles produites par la présure animale. D'autres, comme le gingembre, la cucumisine ou les protéases hiéronymes contribuent à développer des textures et des saveurs très différentes, due à une activité protéolytique excessive et à la production de peptides amers

**Sidrach et al. (2007)** ont mis en évidence trois protéases des fleurs d'artichaut ayant une activité de coagulation. Elles ont été identifiées comme des cynarases A, B et C. Elles ont été classées comme protéases aspartiques et ont eu la même activité protéolytique que la chymosine. Cependant, ils ont révélé des différences principalement dans l'hydrolyse des caséines. La constatation a été observée avec les fleurs de *Cyatnara cardunculus L.*

Cependant, **Bornaz et al. (2001)** a étudié l'effet des coagulants d'origine végétale et de la chymosine, La cinétique de coagulation a été affectée par les deux coagulants. Le coagulant végétal induisait un temps de gélification plus court par rapport à la chymosine mais nécessitait un temps de restructuration plus long (fin de coagulation)

Parallèlement **Piero et al. (2011)** ont montré que l'extrait de Kiwi (*Actinidia deliciosa*) a une activité coagulante sur la protéolyse spécifique par rapport la chymosine. Le caillé produit à partir d'extraits de kiwi avait des propriétés texturales comparables à celles obtenues avec de la présure commerciale, tandis que les extraits de melon produisaient un gel fragile et un faible rendement en caillé. Le comportement de coagulation du lait des deux extraits de plantes était lié à la spécificité de la protéase présente dans ces extraits. Les protéases de kiwi ont montré des propriétés de type chymosine et détiennent donc le meilleur potentiel d'utilisation comme coagulant du lait dans la production de fromage (**Miguel et al., 2013**).

L'activité protéolytique des enzymes du chardon, du ficus (*Ficus spp*) et de la papaye (*Carica papaya*) a été comparée sur du lait écrémé régulier et du lait écrémé ultra filtré (**Low et al., 2006**). Bien qu'il soit légèrement plus protéolytique que la présure, seul l'extrait de chardon a donné des résultats proches de cette dernière. Tandis que pour la ficine, c'est surtout avec du lait ayant une concentration en protéines d'au moins quatre fois celle du lait régulier qu'elle se révèle prometteuse. Quant à la papaïne, elle a été jugée trop protéolytique dans les deux types du lait et donnait des rendements de coagulation variables. **Solorza-Feria et al**, ont démontrés que la papaïne hydrolyse moins bien la caséine que la broméline (extraite d'*Ananas comosus*), qui, à son tour, donne des résultats nettement plus faibles que la chymosine (**Solorza-Feria et al., 2011**)

#### III.7.Intérêt industriel

Depuis longtemps, les besoins protéiques dans l'alimentation ont déterminé une forte demande de produit fromagère (**Rotonel et Equi., 1972**). Les présures végétales sont devenues

un sujet d'intérêt croissant dans l'industrie fromagère, en raison de leur disponibilité facile et de leurs procédés de purification simples. Aussi l'utilisation de protéases végétales dans la fabrication du fromage favorise une plus grande acceptabilité par les végétariens et peut améliorer leur apport nutritionnel (**Ben Amira et al., 2017**). En effet, l'utilisation des enzymes protéolytiques extraites des matières végétales est une voie prometteuse pour assurer la pérennité de l'industrie alimentaire. Cela est particulièrement vrai pour l'industrie laitière, en particulier dans la fabrication du fromage et la production de différents hydrolysats de protéines de lait pour des applications alimentaires spéciales, en particulier la nutrition des nourrissons, des personnes âgées et des personnes souffrant d'allergies alimentaires (**Mohamed, 2021**).

Plusieurs travaux ont été menés sur les produits laitiers fabriqués avec les extraits végétaux.

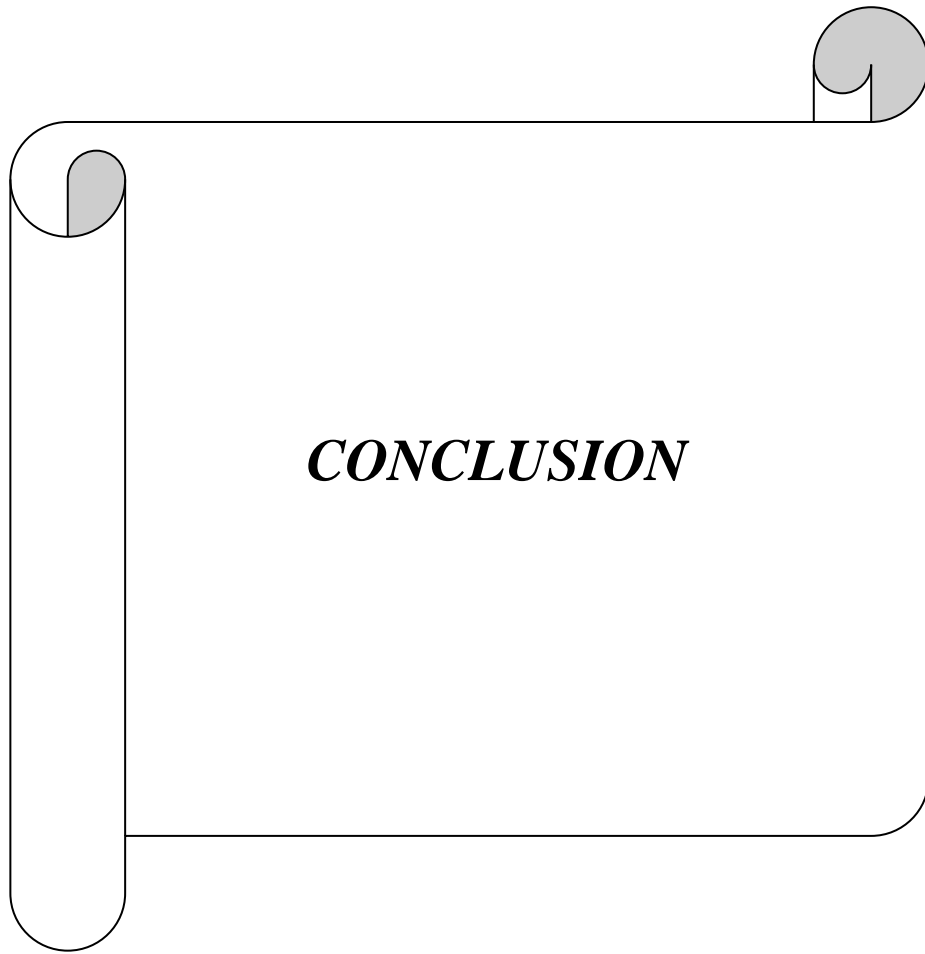
Parmi lesquels le projet de **Dupas-Farrugia et al.,(2018)** qui a ciblé une amélioration de la qualité sanitaire des produits laitiers et parmi leur stratégies l'utilisation des sources végétales dans la fabrication de fromage pour mieux protéger le lait cru contre la contamination microbienne et améliorer leur conservation, avant la consommation directe ou la fabrication de fromages. Il est fréquents dans les pays chauds de manière durable grâce à des conservateurs naturels.

Aussi, **Amadou et al.(2019)**, qui ont réalisé une étude sur la transformation du lait en fromage traditionnel Tchoukou, par les coagulants des extraits des organes de *Calotropis procera*, ont démontré que ce produit est le mieux apprécié par la population.

Une nouvelle préparation enzymatique (*hieronymain*), obtenue à partir de fruits non murs de *Bromelia hieronymimez* (*Bromeliaceae*) a été observée pour sa capacité à coaguler le lait et hydrolyser la caséine bovine et les protéines de lactosérum. En parallèle, des fromages miniatures ont été fabriqués à la fois avec la chymosine et de *hieronymain* et analysés par un jury de dégustation, qui ont trouvé les deux fromages acceptables. *Hieronymain* pourrait convenir à la fabrication de fromage, ainsi qu'à la production d'hydrolysats de protéines de lait (**Bruno et al.,2010**).

Cependant, **Estève et al.(2001)** qui ont effectué des études sur des extraits de cardon, ils ont révélé que des fromages à pâte mi-dure de bonne qualité peuvent être fabriqués à partir de lait de brebis. Cependant, les coagulants d'origine végétale ne sont généralement pas très appropriés pour la fabrication de fromage en raison du faible rendement, de la saveur désagréable (par exemple l'amertume) et de la texture douce des fromages affinés suite à l'activité

excessivement protéolytiques par rapport à l'activité de coagulation du lait. De façon générale, les résultats ont montré que les coagulants végétaux ont une activité protéolytique très élevée.



***CONCLUSION***

### Conclusion

Le lait est consommé généralement à l'état frais mais il est aussi largement consommé à l'état transformé. Comme le yaourt qui est transformé par les microorganismes et le fromage qui est transformé par coagulation. Donc, le processus de coagulation joue un rôle déterminant dans la technologie fromagère. Elle est induite par action conjuguée d'un agent acidifiant et d'une enzyme protéolytique, indispensable à la phase initiale de fabrication de la grande majorité des fromages (FAO, 1998).

C'est dans ce contexte que rentre notre modeste recherche bibliographique, à travers laquelle, nous avons tenté d'apporter une contribution à la possibilité de substituer la présure par des protéases extraites à partir des différentes plantes.

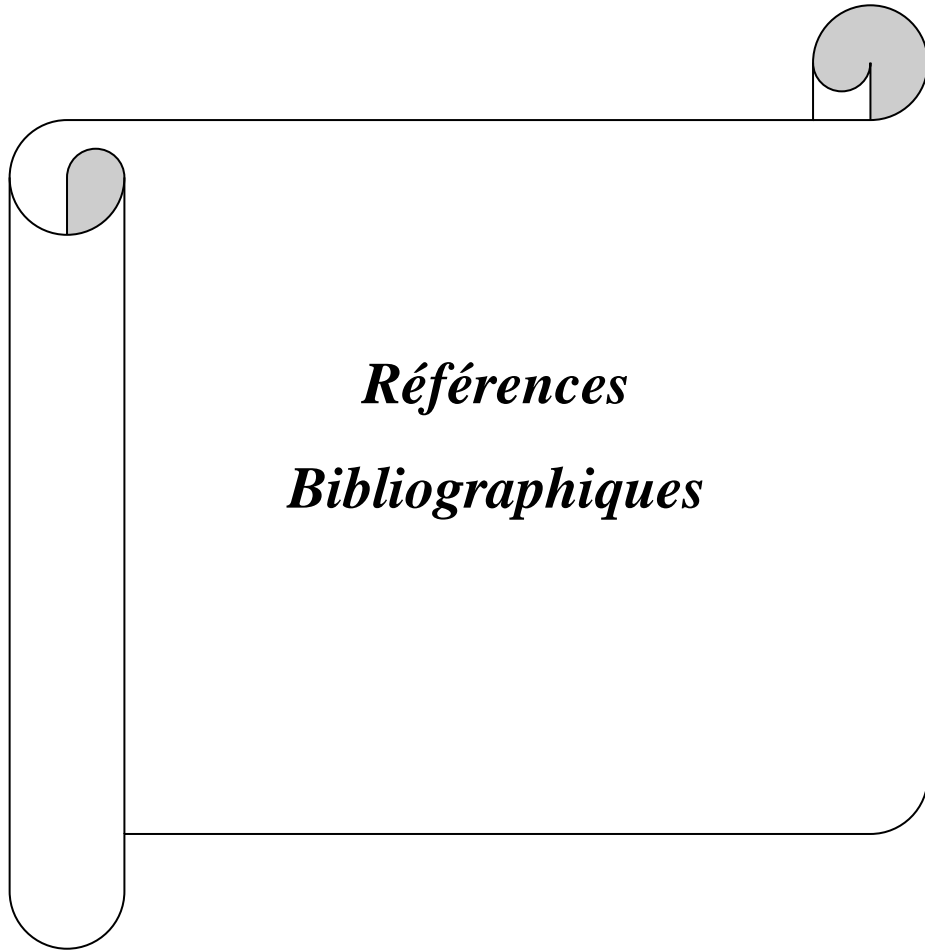
Ce travail nous a permis de mieux connaître l'effet des agents coagulants et il a prouvé que l'utilisation des protéases végétales pourraient intervenir, comme remplaçants de certaines protéases d'origine animale ou microbienne.

De façon générale, les résultats de plusieurs études ont montré que les coagulants végétaux ont une activité protéolytique très élevée et les enzymes extraites à partir des plantes sont des molécules à forte valeur ajoutée en agroalimentaire lors de la coagulation de lait.

Mais malheureusement, et d'après d'autres études, cette activité protéolytique peut se manifester par une diminution du rendement fromager et des défauts de texture et de goût.

Ce travail reste préliminaire et en guise de perspective on souhaite :

- Réaliser une étude expérimentale sur les différentes variétés de plantes, sur tout nos plantes locales
- Réaliser des tests de coagulation sur plusieurs types de lait ( vache, brebis et chèvre)
- Etudier les paramètres influençant l'activité de l'enzyme afin d'améliorer la qualité et le rendement fromager.
- Poursuivre la recherche afin d'éliminer ou de réduire les effets indésirables du coagulant utilisé.
- Développer les procédés de séparation et de purification des enzymes obtenues à partir des extraits végétaux afin d'éviter l'amertume des fromages.



***Références***  
***Bibliographiques***

### Références bibliographiques

1. **Abbache M., AlilatL., & Boulekbachel. E. (2017).** Effet de la cuisson sur la composition phénolique et l'activité antioxydante de *Cynara cardunculus* (le cardon): Optimisation par les plans d'expérience (mémoire de master).
2. Forest & Kim Starr Photo Ananas\_comosus\_slices.jpg: U.S. federal government
3. **Alais A.,1984** : Sciences du lait. Principes des techniques laitières 4<sup>e</sup>d Paris : SEPAIC, 814p .Broome MC
4. **Amado I., Oumarou S., Abdou G . et Adamou. (2019).**Transformation du lait en fromage traditionnel «Tchoukou» par les coagulants des extraits des organes de *Calotropis procera*,7:(1).
5. **Baba-Moussa L. , Baba-Moussa F., Ahissou H ., Bokossa I. , Capo-Chichi B.,Toucourou F. et Sanni .A.(2007).**Propriétés coagulantes de calotrope procéder et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire, Revue CAMES Série.05, 7-12.
6. **BACHI K., (2012).** Etude de l'infestation de différentes variétés de figuier (*Ficus carica*L.) par la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis Capitata* (Diptera, trypetidae.Effets des huiles essentielles sur la longévité des adultes. Thèse de magistère, Tizi-OUZOU
7. **Ben Amira A ., Besbes S ., Hamadi A & Blecker C. (2017).**Propriétés de coagulation du lait des présures végétales et leur rôle enzymatique, rhéologique et sensoriel dans la fabrication du fromage, International Journal of Food Properties, 20:76- 93.
8. **Ben Hassen ,(2014) .** Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques Evaluation de l'activité insecticide des extraits éthanoliques de *Calotropis procera* et de *Artemisia judaica* sur *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Orthoptera : Acrididae) le 22 /06 /2014.
9. **Bornaz S., Guizani N., Fella N., Sahli A., Slama MB., Attia H.(2010) .** Effet des coagulants d'origine végétale et de la chymosine sur la coagulation du lait ovine ,Int. J. Food Prop, 13 : p. 10 – 22
10. **Boudier J.F.,( 1974).**Présure et succédanés de présure .Ed Technique et Documentation .APRIA .France.74p.



11. **Bourgeois C, Mexle JF et Zucan., (1990).**Microbiologie Alimentaire, Aspect microbiologique de la sécurité de la qualité alimentaire . Paris, Lavoisier : Technique et Documentation,422p .
12. **BRETAUDEAU J. (1964) .** Atlas d'arboriculture fruitière, Vol 4, Tec&doc, Lavoisier, 255 p
13. **Brulé G., Lenoir J., Reneuf F., (1997).**Les micelles de Caséine et la coagulation du lait. Dans le fromage: de la science à d'assurance qualité .ECRA et gillis J-C(Ed), lavoisier TES .DOC, Paris:89.
14. **Bruno A M., Lazza C. M., Errasti M.E., López L M.I., Caffini N .O. et Pardon F.M., (2010).**Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits.LWT, Food Science and technologie.43:(695-701).
15. **Ccchinato A ., Penasa M., Cipolat Gotet C., De Marchi M. et Bittante G. (2012).** Short communication: Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. J. Dairy Sci.; 95:1709-1713.
16. **Claire-Marie FABERT, (2011).** Le papayer, carica papayer L.,de la médecine traditionnelle la médecine actuelle. Etude botanique et pharmaco gnosique ;Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, présentée et soutenu publiques le 18 mars 2011.
17. **Coulon JB., Martin B. (1995).**"Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages, Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux, 75, 61-80.
18. **Destaw., Shumbahri M., Gebrehiwot S.(2020).** Application des extraits de Ficus carica L. et Solanum incanum L. dans la coagulation du lait : le cas de la pratique traditionnelle dans la région d'Ab'ala, État régional d'Afar, Éthiopie, Biochemistry Research International ,2020 :1- 7 pages
19. **Dupas-Farrugia C ., Adt I., El Hatmi H., Mahgoub A . S. et Dumas E.,( 2018)** Projet AROMATIC : vers une amélioration de la qualité sanitaire des produits laitiers dans les pays chauds de manière durable grâce à des conservateurs naturels.
20. **Dybowska E. and Fujio Y.(1996).** Effect of temperature and gluconod- lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. Milch wissenschaft, 51 : 557–560
21. **Eck A.(1990).** Le fromage, Ed .Tec & Doc. Lavoisier Paris, 2eme éd, 539P

22. **Esteves C.L.C., Lucey J.A. et Pires E.M.V. (2001)** . Modélisation mathématique de la formation de gels induits par la présure par les coagulants végétaux et la chymosine. *Journal of Dairy Research*, 68(3): 499 – 510
23. **FAO (1998)**. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO:Alimentation et nutrition.P28.
24. **Florian Ronez., 2012**. Le lait et sa coagulation, thèse de doctorat, Paris
25. **Giovanna Nicotra et al, (2010)**. Giovanna Nicotra\*, Silvia Vicentini, Angelica Mazzolari ; *Ficus carica* ,Research and development of a dry extract, NUTRA FOODS,2010.
26. **Guétouache M.Guessas B., Medjekal S.,(2014)**. Composition and nutritional value of raw milk *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*1,2(10),pp .115-122
27. **Guignard J.L. (1998)** .Botanique. 11<sup>ème</sup> Ed. Masson, 278p.
28. **Gupta S., Gupta, B., Kapoor, K., Sharma P.( 2012)**. Ethno pharmacological potential of *Calotropis Procera*: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 19-22.
29. **Hinkel J.R.(1951)**. Papain. *Annals of the New York Academy of sciences*,54(2),245-276.
30. **Hsieh J.F. , PAN P.H.( 2012)**. Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin ; *J. Agric. Food Chem.*; 60:2039-2045
31. **Humme H.E.( 1972)**. The optimum pH for the limited specific proteolysis of k-casein by rennin (primary phase of milk clotting). *Neth. Milk Dairy J.*, 26, 180–185.
32. **Ilboudoa J., Savadogo A., Seydim.G. et Traorea S.( 2012)**. Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *Int.J.Biol. Chem.Sci.*6(6):6075-6087
33. **Josephjet Raj S. J.(2011)**. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn–An overview. *International Journal of Pharm-Tech Research*. 3: 08-12.
34. **Jouhan P. (2002)**. *Lactoprotéines et lactopeptides*, propriétés biologiques. Paris: INRA,.127p.
35. **Konte M. (1999)**. Le lait et les produits laitiers. Développement de systèmes de productions intensives en Afrique de l'ouest. Université de Nouakchott (R.I.M) Faculté des Sciences et Technologies des aliments, 5026 : 2-25

- 36. Kareem S. O., Akpan, I., & Ojo, O. P.(2008).** Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms. African Journal Biomedical Research, 11, 105-110
- 37. Lapointe-Vignola C.(2002).** Science et technologie du lait transformation du lait, Pressesinter Polytechnique.
- 38. Lenoir J. (1985).** Coagulation du lait pour la présure . Revue lait français, 440: 430\_440.
- 39. Lenoire J., Remeuf F. et Schneid N.( 2006).** Le Lait de Fromagerie in : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3ème Ed., Lavoisier, Paris
- 40. Low, Y. H., Agboola, S., Zhao, J., et Lim, M. Y.(2006).** Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultra filter ed bovine skim milk. International Dairy Journal, 16(4), 335-343.
- 41. Luerce T.D., Azevedo M.S.P ., Guy Le Blanc J. ,Azevedo V., Miyoshi A & Pontes D.S. ,2014 .**Recombinant *Lactococcuslactis* fail secrete bovine chymosine. Bioengineer red .5:6363-370
- 42. Luquet F ., Met-Corrieu.G.(2005).** Bactéries lactiques et probiotiques.Edition Tec8cDoc, Lavoisier. Paris307p.
- 43. Macedo A., Malcataf X., Oliveira J.C. (1993).** The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. Journal of Dairy Science, 76, 1725-1739
- 44. Mahaut M., Jeantet R., Schuck Pet Brulé G.(2000).**Les produits industriels laitiers Ed Tecet Doc.–Lavoisier:pp.26-40.
- 45. Mainassara M., Aliero B. L., Aliero A., & Yakubu M. (2012).** Phytochemical and antibacterial properties of root and leaf extracts of *Calotropis procera*. Nigerian Journal of Basic and Applied Science, 20, 001-006.
- 46. Manzoor A S., Mir SA., Paray M A.(2013).**Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking. Dairy Sci. & Technol,94:5-17
- 47. Mietton B.(1995) .** La typologie des fromages, Symposium organisé par la fondation des Gouverneurs et le centre de recherche et de développement sur les aliments d'agricultures et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.
- 48. Mietton B.(1991).**Transformation du lait en fromage : de Rossart H et Luquet F.M (Coord) Les bacteries lactiques (vol II ) Ed Lorica .uriage. FR .pp-55-133.
- 49. Miguel A ., Mazorra-Manzano ,Teresa C., Perea-Gutiérrez, MaríaE.Lugo-Sánchez.....Vallejo Cordoue B.(2013).**Comparaison des propriétés coagulantes de trois extraits végétaux ,Chimie alimentaire, Tome 141, Numéro 3.

- 50. Mohammed M. (2021).** Potential applications of ficinine the production of traditional cheeses and protein hydrolysates .JDS Communication, 2 : 233-237
- 51. Nàjera A.I., Renobales M., and Barron L.R.(2000).** Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : a multifactorial Study. Food Chem., 80: 345-352
- 52. Mossa, J. S., Tariq, M. A., Mohsin A. M., Ageel, M. A., Al-Yahya, M. S., Al-Said, S., & Rafatullah, S., 1991.** Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. The American Journal of Chinese Medicine, 19, 223-231.
- 53. Napper, A. D., Bennett, S. P., Borowski, M., Holdridge, M. B., Leonard, M. J., Rogers, E. E., Shames, S. L. (1994).** Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine protein a ses ananain and comosain. The Biochemical Journal, 301, 727–35.
- 54. Nicosia F.D, Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. (2022).** Plant Milk-Clotting Enzymes for Cheesemaking. Foods 2022, 11, 871.
- 55. Oner M. D et Akar B.(1993).** Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. Lebensm.-Wiss.U.Technol.,26:pp.318-321.
- 56. Özer B, Akardere E., Çelem EB et Önal S.(2010).** Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. Biochemical Engineering Journal 50:110-115.
- 57. Oukabli A.(2003).** Le Figuier : un patrimoine génétique diversifié à exploiter. L'Institut national de la recherche agronomique (INRA), Transfert de technologie en agriculture, 106(4).
- 58. Permanner L.(1964).** La culture du papayer en vue de la production de papaine. Bull .Doc .Tech .Agric.,4(14),12
- 59. Phoebe X. Qi.(2007).** Studies of casein micelle structure: the past and the present. Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture,600 East Mermaid Lane, Wyndmoor, PA 19038, USA , Lait 87,363-383.
- 60. Pierre L, Ruby F., 2006.** Broméline, Journal scientifique passeport santé.
- 61. Pierre A.(1983)** . Influence de la modification de la charge des micelles de caséine sur le taux de caséinomacropeptide libéré par la présure au moment de la coagulation du Lait, (63):217-229

- 62. Piero A.R.L., Puglisi I. et Petrone G.(2011).** Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233(3), 517-524.
- 63. Py C .J L. (1984).** L'ananas; sa culture, ses produits. *Techniques Agricoles et productions tropicales*.
- 64. Ramet I. D., EL-hisbinys., Abd-el-salamm H., Fahmia.(1970).** Studies on milk clotting enzymes from higher plants. Milk clotting activity of some local plants. *Indian J. dairy sci.*,23 : (13),151-154.
- 65. Rao M.B.,Tanksale A.M., Ghatge M.S et Deshpande V.(1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 60 (3): 597-635.
- 66. Raynaud S.(2006)** . Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Doctorat spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries. Filière Microbiologie et Biocatalyse industrielle. Université Paul Sabatier. Toulouse, France.
- 67. Roseiro L.B., Barbosa M., M Ames J., Wilbey R.A., (2003).** Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.
- 68. Rotional T. et Sewuip.(1972).** Recherche sur l'enzyme coagulante de l'*Endothia parasitica*. *Ann. Techn Agric.*,21(3) : 367-383.
- 69. Scriban R., Hebert J.P., strobbel B. (1975).** La papaïne industrielle. *Bios*, 6 (7-8) 254-265.
- 70. Shah M.A., MIR S. A. et Paray M. A.(2013).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science and Technology*, 94(1), 5-16.
- 71. Sidrach L., Chazarra S., Loppe-molina D. et Rodríguez-López J. N., (2007).**Caractérisation des propriétés coagulantes d'extraits de fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus,L*) . *Journal laitier international*. 17(12),1393-1400.
- 72. Silvas, V. & Malcata, F.X., 1999.** Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research*, 67, 449–457).
- 73. Solorza-Feria, J., Méndez-Montealvo, G., González-Soto, R., Osorio-Díaz, P., et Jiménez-Pérez, A.(2011).** Changes in the apparent viscosity profiles of casein suspensions as affected by plant enzymes. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 414-420.

- 74. Sousa M.J., Malcata F.X.(2002).**Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) *in vitro* and during ripening of cheeses from several milk species .Lait journal 82, 151-170.
- 75. Veisseyre R.(1979).** Technologies du fromage: 3<sup>ème</sup> Ed. Maison Rustique, 714 p.
- 76. VIDOUD J., (1997).** Le figuier. Monographie de CTIFL (Centre international interprofessionnel des fruits et légumes), 267
- 77. Vignola C.L.(2002).** Science et technologie du lait : Transformation du lait – Montréal: Presse internationale polytechnique. 600p.

### Résumés

Le lait est un produit indispensable surtout dans la fabrication du fromage. Il nécessite l'étape de coagulation qui consiste à la formation d'un gel suite à des modifications structurales et physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines du lait. L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau et à cause de son coût cher et de son indisponibilité. Plusieurs industries remplacent la présure par les enzymes d'origines végétales. En effet, certaines plantes ont un effet coagulant efficace dans l'industrie alimentaires, par exemple : le Cardon ,. le papayer et le figuier, grâce à leur activité protéolytique importante et leur rendement élevé à l'échelle industrielle.

**Mots clés :** Lait, présure, caillage, protéase végétale, fromage.

### Abstract:

Milk is an essential product especially in the manufacture of cheese. It requires the coagulation stage which consists in the formation of a gel following structural and physico-chemical modifications intervening on the milk casein micelles. The oldest coagulating agent used in cheese making is rennet. This enzyme is extracted from calf abomasum and because of its expensive cost and no availability ; several industries are replacing rennet with plant-based enzymes. Indeed, some plants have an effective coagulant effect in the food industry, for example: cardoon, papaya, and fig tree thanks to their significant proteolytic activity and their high yield on an industrial scale.

**Key words:** Milk, rennet, coagulation, vegetable protease, cheese.

### المخلص :

يعتبر الحليب منتجًا أساسيًا خاصة في صناعة الجبن ، فهو يتطلب مرحلة التخثر التي تتكون من تكوين مادة هلامية بعد التعديلات الفيزيائية والكيميائية التي تتدخل في مزيلات حليب الكازيين. أقدم عامل تخثر يستخدم في صناعة الجبن هو المنفحة. يُستخرج هذا الإنزيم من روبة العجل وبسبب تكلفته الباهظة وعدم توفره ؛ تقوم العديد من الصناعات باستبدال بفضل :و المنفحة بأنزيمات نباتية. في الواقع ، تتمتع بعض النباتات بتأثير تخثر فعال في صناعة الأغذية ، على سبيل المثال الخرشوف، البابايا ، وشجرة التين ، نظرا لنشاطها نشاطها البروتيني الهام وعاندها المرتفع على النطاق الصناعي .

**الكلمات الدالة:** حليب ، منفحة ، تخثر ، بروتياز نباتي ، جبن .

