



**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE
LA TERRE DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

KORICHI Ahlem § MEZILI Assala

Thème

**Caractérisation biochimique de l'activité coagulase /protéase
de l'extrait de camomille
*chamaemelum nobile***

Soutenu le : 02 /07/2023

Devant le jury composé de :

M.TIGHRINE Abderrahmane MCB Univ. de Bouira

Président

M.CHERGUI Achour MCB Univ. de Bouira

Promoteur

M.IMESSAOUDENE Ali MAA Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2022/2023



Remerciements

Nous commençons par remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté, l'amour du savoir et surtout le courage et la patience pour effectuer ce modeste travail.

Nous exprimons aussi notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à Monsieur **CHERGUI Achour** qui nous a honoré de proposer et diriger ce travail, pour ses encouragements et ses conseils. Monsieur, nous étions satisfaites de votre qualité d'enseignant, merci de nous avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant de temps pour les corrections de ce manuscrit, nous ne pouvons Monsieur que, sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude.





Dédicace

A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie : A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, ma mère **Amrouche Nacira** qui m'a soutenue durant toutes mes années d'étude, pour ses sacrifices m'ont donné confiance, courage & sécurité.

A mon chère père **Rabeh** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils ses encouragements. A ma grande famille **Amrouche, korichi** et **Bouzini**, mes chers frères et sœurs **Maroua, Issam** et **Youcef** & mon petite ange **Aridje**, à mon mari **Fouad** et ma chère amie **Narimane**. A tous mes Amis et à ma binôme * **Assala*** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail, ainsi qu'à sa famille.

Ahlem





Dédicace

A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie **ma mère** qui m'a soutenue durant toutes mes années d'étude, pour ses sacrifices qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

A mon **chère père** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, grâce à son sacrifice, ses conseils et ses encouragements.

A Mes belles sœurs **Amira** et **Hadjer**.

A toute ma famille (**MEZILI** et **BOUCHAMA**), proche ou éloignée.

A ma binôme ***Ahlem*** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.


Assala



Table des matières :

Liste des abréviations	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux :	10
Introduction générale	11
Chapitre I :	13
I.Généralités sur camomille.....	14
1/ Description	14
2/les constitutions chimiques de la camomille	15
3/Préparation médicale de la camomille	16
4/l'utilisation traditionnelle de la camomille	17
5/ l'utilisation cosmétique de la camomille.....	17
6/Autres usages	18
7/Effet thérapeutique	18
8/Toxicité et contres indications	19
Chapitre II :	21
II.Généralités sur le lait	22
1/ Définition du lait	22
2 /Composition et caractéristiques du lait	22
3/ Généralités sur les caséines	24
4/ La poudre de lait.....	25
5/ Mécanismes de la coagulation	26
6/ Coagulation mixte	29
7/ Facteurs de la coagulation	29
8/ L'évaluation de la coagulation	30
Partie Expérimentale	31
Chapitre III :	32

III. Problématique et l'objective.....	33
2/ Matériels et méthodes	34
2-1/Matériels	34
2-2/ Les matériels consommables au laboratoire	34
3/Echantillonnage « collecte du lait »	34
4/ Matériel végétal :.....	35
5/ Méthode de préparation du lait	35
6/ Préparation de l'extrait de la plante (la camomille).....	35
7/ Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976).....	36
8/ Etude de l'effet de variation de la température sur l'activité coagulase de l'extrait de camomille ..	36
9/ La détermination de l'activité coagulante	37
10/ Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium	38
11/ Méthodes	38
12/ La dialyse	40
Chapitre IV :.....	42
IV. Résultats et discussion	43
1/ Etude de l'effet de variation de la température sur l'activité coagulase de l'extrait de camomille ..	43
2/Effet de la trypsine sur l'activité coagulase de l'extrait étudié	46
3/Extraction de la coagulase par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et dialyse	47
4/Effet des cofacteurs métalliques.....	51
5/Le dosage des protéines	53
Conclusion.....	54
Références Bibliographique	57
Annexes	67
Résumé	84

 **Liste des abréviations**

BBC G-250 :Bleu de Coomassie brillant.

BSA : Bovine Sérum Albumine

CMP: casino-macro peptide

C. nobile :*Chamaemelum nobile*

COX-1 : L'enzyme cyclooxygénase-1

COX-2 : L'enzyme cyclooxygénase-2

FAO : Organisme des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FDA : Food and Drug Administration .Administration des aliments et des médicaments

GRAS : généralement reconnue comme sûre

LPS : Lipopolysaccharides

PC-3 : cellulaire de cancer de la prostate humaine.

UAC : d'unité d'activité coagulante

SPF30 : Sune Protection Factor 30. Facteur de Protection Solaire 30

 Liste des figures

Figure01 : <i>Chamaemelum nobile</i>	14
Figure02 : Anatomie de la glande mammaire de vache.....	22
Figure 03 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités.....	25
Figure 04 : Préparation de lait écrémé.....	34
Figure 05 : Macération de camomille (<i>Chamaemelum nobile</i>).....	35
Figure06 : Précipitation sulfate d’ammonium.....	38
Figure07 :Résultat de précipitation sulfate d’ammonium.....	38
Figure 08 : La dialyse.....	40
Figure 09 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait de vache par l’extrait aqueux de camomille en fonction de la variation de la température.....	42
Figure 10 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait pasteurisé par l’extrait de camomille on fonction de la variation de température.....	43
Figure 11 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait de vache enrichi par la poudre de lait, par l’effet de l’extrait de la camomille en fonction de la variation de la température.....	43
Figure 12 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait de vache par le mélange (extrait de camomille et trypsine) en fonction de la variation de la température.....	44
Figure 13 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l’activité coagulase de la fraction précipitée à 20% de sulfate d’ammonium, en fonction de la température	46
Figure 14 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l’activité coagulase de la fraction précipitée à 40% de sulfate d’ammonium, en fonction de la température	47
Figure 15 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l’activité coagulase de la fraction précipitée à 60% de sulfate d’ammonium, en fonction de la température	47
Figure 16 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l’activité coagulase de la fraction précipitée à 80% de sulfate d’ammonium, en fonction de la température.....	48
Figure 17 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l’activité coagulase de la fraction précipitée à 100% de sulfate d’ammonium, en fonction de la température.....	48

Figure 18 : Variation de l'activité coagulase du lait par l'extrait précipité à 80% en sel + MgSO₄.
.....50

Figure19 : Variation de l'activité coagulase du lait par l'extrait précipité à 80% en sel + FeSO₄.
.....50

Figure 20 : Variation de l'activité coagulase du lait par l'extrait précipité à 80% en sel +NaNO₃.
.....51

 **Liste des tableaux :**

Tableau I : Les caractéristiques physiques du lait.....23
Tableau II: Les caractéristiques chimiques du lait.....23
Tableau III: Les différents appareils utilisés et leurs marques.....33

Introduction générale

Introduction

L'extrait de camomille *Chamaemelum nobile* est un produit naturel dérivé de la plante de camomille. La camomille est une plante dont les propriétés médicinales sont reconnues depuis longtemps et elle est fréquemment incorporée dans de nombreux produits de santé et de beauté. L'une des activités biochimiques importantes de la camomille (*Chamaemelum nobile*) est sa capacité à agir comme une coagulase et une protéase (**Ckay et al.,2006**).

La coagulase est une enzyme qui joue un rôle clé dans le processus de coagulation sanguine. Elle convertit le fibrinogène en fibrine, formant ainsi un caillot qui aide à arrêter le saignement. La protéase, quant à elle, est une enzyme qui catalyse la dégradation des protéines en peptides plus petits. Il est important de comprendre les effets de l'extrait de camomille *Chamaemelum nobile* sur le système de coagulation et ses interactions avec les protéines en tenant compte de ces deux activités biochimiques.

La biochimie de l'activité coagulase/protéase de l'extrait de camomille *Chamaemelum nobile* a été caractérisée, impliquerait des études approfondies pour déterminer les paramètres enzymatiques tels que la cinétique, la spécificité du substrat, le pH et la température optimaux, ainsi que les facteurs qui peuvent influencer leur activité.

Diverses techniques de laboratoire sont fréquemment employées afin de caractériser ces activités biochimiques. Parmi celles-ci, on retrouve l'utilisation de méthodes de dosage spécifiques pour évaluer l'activité de la coagulase et de la protéase. Des analyses de substrat peuvent également être effectuées pour déterminer la spécificité des substrats préférentiels des enzymes. De plus, des études cinétiques sont menées afin d'évaluer la vitesse et l'efficacité des réactions enzymatiques (**Brown et al., 2018**).

Chapitre I

La camomille

I. Généralités sur camomille

La Camomille est une espèce de plante médicinale (Figure01), bien connue de la famille des astéracées, souvent qualifiée de « la plus ancienne parmi les espèces médicinales ». De nos jours, cette plante est hautement estimée et abondamment employée dans la médecine populaire et traditionnelle en tant que plante médicinale. Ses propriétés polyvalentes sur le plan thérapeutique, cosmétique et nutritionnel ont été prouvées grâce à des décennies d'usage et d'études tant traditionnelles que scientifiques (Sharif et al., 2018).

La camomille a un marché national (indien) et international établi, qui augmente de jour en jour grâce à sa popularité croissante en tant que plante médicinale efficace et sûre, soutenue par des études scientifiques et une demande croissante pour des produits naturels et écologiques (Amsterdam, 2009). La plante disponible sur le marché est souvent frelatée et remplacée par des plantes proches de la camomille, c'est-à-dire que les produits de camomille sur le marché peuvent être contrefaits ou remplacés par des plantes similaires qui ne sont pas de la camomille véritable. Cela peut être un problème pour les clients de Camomille, car ils pourraient ne pas obtenir les avantages souhaités des produits de camomille, ou même subir des effets indésirables si les produits sont mal étiquetés ou contaminés (Liu et Yang, 2013).



Figure01 : *Chamaemelum nobile* (Sharif et al, 2018).

1/ Description

La plante mesure entre 10 et 80 cm et présente une croissance dense et rampante. Elle dégage une odeur forte et agréable. Les racines sont étalées, fibreuses et couvertes de poils. La tige est couchée, simple et ramifiée, de forme cylindrique, légèrement tirée, couverte de poils, d'un vert légèrement blanchâtre. Elle porte de nombreuses racines adventives le long de sa partie rampante et se redresse à l'extrémité des rameaux. Les feuilles sont petites, disposées de manière alternée, irrégulièrement divisées en plusieurs segments très petits, linéaires ou légèrement pointus, avec une couverture de

poils .Les fleurs jaunes et blanches se trouvent en capitules solitaires à l'extrémité des rameaux (Heraud, 1895).

La plante fleurit de mars à mai et peut être récoltée de juin à août. Les parties utilisées de la plante sont les capitules floraux, qu'ils soient frais ou séchés. Ces capitules renferment divers principes actifs tels que des coumarines, des acides phénoliques, des huiles essentielles, des tanins, des flavonoïdes, et bien d'autres encore (Bernared et Laffitte, 1999).

Cette plante, couramment trouvée dans les prairies naturelles, pousse naturellement le long des bordures des terrains et dans les zones sableuses. Elle possède de nombreuses propriétés médicinales, notamment des effets antispasmodiques, antinévralgiques, anti-inflammatoires, antiallergiques, relaxants, légèrement apéritifs, sédatifs, adoucissants, analgésiques et cholagogues (Florence, 2007).

2/les constitutions chimiques de la camomille

La composition de la camomille comprend divers éléments. Elle est principalement composée d'eau (environ 80%), de matières minérales (environ 6-7%), d'huile volatile, de sesquiterpènes, d'hydro peroxydes, de flavonoïdes, de catéchines, de coumarines, de polyacétylènes, d'acides phénoliques, de triterpènes, de stéroïdes et de polysaccharides (Srivastava et al., 2010 ; Guimarães et al., 2001). Selon différents auteurs (Agrawal et Shishodia, 2006), les différentes parties de la plante contiennent :

Huiles volatiles (0,4-1,75%) : esters d'acide angélique et tiglique (environ 85%), 1,8 cinéole, 1-trans-pinocarvéol, 1-trans-pinocarvone, chamazulène, farnésol et néroli-diol.

Flavonoïdes : apigénine, lutéoline, quercétine et leurs glycosides (apiine, lutéoline-7-glucoside et rutine).

Coumarines : scopolétine-7-glucoside.

Lactones sesquiterpéniques de type germacranolide (environ 0,6%) : nobiline, 3-épinobiline, 1,10-époxy-nobiline et 3-déhydronobiline.

Alcools divers : alcools d'amyle et d'isobutyle.

Elle contient également des esters angéliques et tigliques, de l'acide anthémique, de la choline, des composés phénoliques, des phytostérols, de l'inositol et des acides gras. L'huile essentielle de camomille a une couleur bleu clair due au chamazulène, un terpénoïde. La quantité de ces composants isolés varie en fonction de l'origine et de l'âge des fleurs. Les parties aériennes de la plante, notamment l'huile essentielle, contiennent des composés tels que l'isobutanoate d'isobutyle (environ 4,4%), l'isobutanoate de 2-méthylbutyle (environ 4,3%), l'angélate d'isobutyle (environ 24,5%), l'angélate de 2-butényl (environ 7,3%), l'angélate de 2-méthylbutyle (environ 17,4%),

le trans-pinocarvéol (environ 4,5%), l'angélate d'isoamyle (environ 7,6%) et l'estragol (environ 5,0%) (**Radulović, 2006**).

C. nobile s'est révélée être une herbe précieuse et équilibrée, riche en glucides et en protéines, et faible en matières grasses. Elle offre également des tocophérols, des caroténoïdes et des acides gras essentiels. De plus, cette plante et son infusion sont une source d'acides phénoliques et organiques tels que les acides oxalique, quinique, malique, citrique et fumarique (**Guimarães et al., 2013**). Les capitules de la camomille romaine (*Chamaemelum nobile*) ont permis d'isoler six dérivés de l'acide octulosonique (**Zhao et al., 2014**). Par ailleurs, l'extrait éthanolique des fleurs de camomille a révélé la présence de six nouveaux hydroperoxydes en plus du 1bêta-hydroperoxyi déjà connu (**Rücker et al., 1986**).

3/Préparation médicale de la camomille

La camomille est largement utilisée sous différentes formes dans la préparation de remèdes traditionnels. La poudre de fleur de camomille séchée est recommandée et utilisée par de nombreuses personnes pour traiter divers problèmes de santé. Les principes actifs sont généralement extraits des fleurs séchées de camomille en utilisant de l'eau, de l'éthanol ou du méthanol comme solvants, ce qui donne des extraits aqueux, éthanoliques (alcooliques) et/ou méthanoliques. Les extraits de camomille optimaux ont une teneur en alcool d'environ 50%. Les extraits standardisés contiennent généralement 1,2% d'apigénine, qui est l'un des agents bioactifs les plus efficaces. Les extraits aqueux, tels que les infusions de thé, contiennent des concentrations relativement faibles d'apigénine libre, mais des niveaux élevés d'apigénine-7-O-glucoside. L'infusion de camomille par voie orale est recommandée par la Commission allemande E (**Carnat et al., 2004; Hamon, 1989**). Le thé à la camomille est l'une des tisanes les plus populaires dans le monde, avec environ un million de tasses consommées chaque jour. Des sachets de thé à la camomille sont également disponibles sur le marché, contenant de la poudre de fleur de camomille pure ou mélangée à d'autres herbes médicinales populaires.

La préparation de la teinture de camomille peut également consister à mélanger une partie de fleur de camomille avec quatre parties d'eau contenant 12% d'alcool de grain. Cette teinture est utilisée pour traiter la diarrhée estivale chez les enfants et est souvent associée à des purgatifs pour prévenir les crampes. Les fleurs de camomille, seules ou combinées avec des têtes de pavot broyées, sont couramment utilisées sous forme de cataplasme ou de fomentation chaude pour soulager les douleurs inflammatoires ou la névralgie congestive. Elles sont également utilisées pour réduire les gonflements externes tels que le gonflement du visage causé par une infection sous-jacente ou un abcès. Toute la plante de camomille est utilisée pour fabriquer des bières aux herbes et des lotions qui sont appliquées localement pour soulager les maux de dents, les douleurs aux oreilles, les névralgies et les gonflements externes (**Hamon, 1989**).

Il est également connu pour être utilisé comme additif de bain, recommandé pour apaiser l'inflammation ano-génitale (**Kyokong et al., 2002**).

L'infusion de thé est utilisée comme solution de rinçage ou de gargarisme pour apaiser l'inflammation des muqueuses de la bouche et de la gorge (**Fidler et al., 1996 ; Fidler et al., 2005**). De plus, l'inhalation des huiles essentielles vaporisées provenant des fleurs de camomille est recommandée pour soulager l'anxiété et la dépression générale. L'huile de camomille est un ingrédient couramment utilisé en aromathérapie et dans les soins capillaires (**Anderson et al., 2000 ; Wilkinson et al., 1999**).

La camomille romaine est largement utilisée dans les préparations cosmétiques et dans l'effet apaisant et adoucissant sur la peau (**Scala, 2005 ; Scala, 2006**).

4/ l'utilisation traditionnelle de la camomille

Depuis le Moyen Âge, la Camomille romaine est reconnue comme une plante médicinale. Le Conseil de l'Europe la classe comme une source naturelle d'aliments aromatiques, ce qui signifie qu'elle peut être ajoutée en petites quantités aux denrées alimentaires (**Dezso, 2011**). Elle est utilisée comme tonique de l'appétit avant les repas pour faciliter la digestion après le repas. De plus, elle est bénéfique pour apaiser les maux de tête, les douleurs diverses, les maux de dents et elle a un effet apaisant sur les yeux et les paupières (**Pierre et Lys, 2007**). La camomille romaine possède des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiseptiques et antispasmodiques. Elle est particulièrement utile pour les personnes hypersensibles qui ont du mal à s'adapter aux réalités de la vie et qui expriment leurs difficultés émotionnelles par des problèmes de peau (**Mourice, 2013**).

5/ l'utilisation cosmétique de la camomille

La camomille est largement reconnue du grand public pour ses utilisations cosmétiques, offrant deux propriétés principales : apaiser les peaux fragiles et irritées, et donner de la brillance aux cheveux blonds.

La camomille est l'infusion de douceur par excellence des peaux délicates. On la retrouve ainsi dans une multitude de produits de soin pour les peaux sensibles, avec des revendications d'apaisement et d'adoucissement soutenues par sa concentration en apigénine anti-inflammatoire (**Srivastava et al., 2010**).

Applications

Crème douceur universelle visage et corps, crème de jour apaisante et hydratante, crème réparatrice pour peaux sensibles, crème riche cocooning peaux sèches à très sèches, crème mains protectrice, crème solaire SPF30 enfants et bébés, crème de douche anti-dessèchement, crème dépilatoire peaux sensibles... (**Herbarom, 2019**).

C'est l'*Anthemis tinctoria*, ou « camomille des teinturiers », qui était traditionnellement utilisée pour les propriétés tinctoriales de ses fleurs jaunes. La camomille, si elle ne colore pas les cheveux, apporte toutefois de la brillance, et reste inscrite dans l'imaginaire collectif comme la plante de beauté des cheveux blonds. On la retrouve au fading de toutes les gammes capillaires destinées aux cheveux blonds et clairs (**Gupta et Malhotra, 2014**).

Applications

Shampooing brillance pour cheveux blonds, shampooing douceur et souplesse, shampooing reflets blonds dès 3 ans, après-shampooing crème illuminateur et démêlant, masque cheveux blonds et cuir chevelu irrité... (**Koulivand et al., 2013**).

6/Autres usages

La camomille est une plante médicinale remarquable et l'une des plus populaires dans le monde, souvent consommée sous forme de tisanes aux fines herbes (**Srivastava et Gupta, 2010**). Les produits commerciaux de camomille incluent les boissons, produits de beauté, colorants de cheveux, parfums, huiles de massage, savons et shampooings (**Bharati et al., 2014**).

7/Effet thérapeutique

7-1/Anti-inflammatoire et antiphlogistique

Les fleurs de camomille contiennent entre 1 et 2% d'huiles volatiles, telles que l'alpha-bisabolol, les oxydes d'alpha-bisabolol A et B, ainsi que l'azulène généralement dérivé de la chamazulène, et d'autres flavonoïdes qui présentent des propriétés anti-inflammatoires et antiphlogistiques. Une étude menée sur des volontaires humains a démontré que les flavonoïdes de la camomille et les huiles essentielles pénètrent en profondeur sous la surface de la peau. Cela est important pour leur utilisation en tant qu'agents topiques antiphlogistiques (anti-inflammatoires). L'une des activités anti-inflammatoires de la camomille consiste à inhiber la libération et l'atténuation de la prostaglandine E(2) induite par l'activité enzymatique de la cyclooxygénase (COX-2) sans affecter la forme constitutive COX-1 (**Srivastava et al., 2010**).

7-2/ Activité anticancéreuse

La plupart des études évaluant l'effet inhibiteur de la croissance tumorale de la camomille se sont concentrées sur l'apigénine, un composé bioactif présent dans la camomille. Des recherches portant sur des modèles précliniques de cancers de la peau, de la prostate, du sein et de l'ovaire ont démontré des résultats prometteurs en termes d'inhibition de la croissance tumorale (**Way et al., 2004 ; Shukla et al., 2005**).

Une étude récente a examiné les extraits de camomille et a révélé qu'ils provoquent une inhibition de la croissance des cellules normales, mais entraînent une réduction significative de la viabilité des différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines. Cette exposition à la camomille a induit

l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans les cellules cancéreuses, mais n'a pas eu le même effet sur les cellules normales, même à des doses similaires (**Srivastava JK, Gupta S., 2007**).

Récemment, l'efficacité d'un nouveau composé appelé TBS-101, qui est un mélange de sept extraits botaniques standardisés incluant la camomille, a été testée. Les résultats ont confirmé que ce composé présente un bon profil de sécurité et possède une activité anticancéreuse significative contre les cellules PC-3 du cancer de la prostate humaine résistant aux androgènes, à la fois en laboratoire et chez l'animal (**Evans et al., 2009**).

Une étude réalisée en 2019 par une source fiable a examiné l'impact de l'extrait de camomille allemande sur des cellules cancéreuses cultivées en laboratoire. Les résultats de cette étude ont révélé que les cellules cancéreuses traitées avec cet extrait présentaient une probabilité plus élevée de mourir. De manière significative, l'extrait a également réduit la capacité des cellules cancéreuses à former des vaisseaux sanguins, ce qui est essentiel pour la survie des tumeurs (**Debra, 2019**).

7-3/Effet antibactérien, effet antimicrobien et antioxydant (Miraj et Alesaeidi, 2016).

7-4/Activité antidépressive et syndrome prémenstruel

La camomille présente des propriétés antidépressives et peut offrir des bienfaits aux personnes souffrant du syndrome prémenstruel. Des recherches ont démontré que la camomille peut contribuer à atténuer les symptômes de la dépression et de l'anxiété chez les individus présentant des troubles de l'humeur, tout en soulageant les symptômes physiques et émotionnels associés au syndrome prémenstruel (**Miraj et Alesaeidi, 2016**).

7-5/Autres effets thérapeutiques

La camomille est largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses affections. Elle est connue pour ses propriétés bénéfiques dans le traitement de conditions telles que l'anxiété, les convulsions, les rhumes, les problèmes cardiovasculaires, les coliques, la diarrhée, les hémorroïdes, la promotion de la santé générale, la réduction de la mucosité, l'ostéoporose, la cicatrisation des plaies, la vaginite, les maux de gorge et l'enrouement, ainsi que pour son potentiel dans le contrôle du diabète (**Srivastava et al., 2010**).

8/Toxicité et contres indications

Un pourcentage relativement faible de personnes sont sensibles à la camomille et développent des réactions allergiques (**Evans et al, 2000**). Les individus qui sont sensibles à l'herbe à poux, aux chrysanthèmes ou à d'autres plantes de la famille des Composées sont plus susceptibles de développer des allergies de contact à la camomille, en particulier s'ils prennent d'autres médicaments qui peuvent favoriser la sensibilisation. Un essai clinique à grande échelle a été mené à Hambourg, en Allemagne, entre 1985 et 1991 pour étudier le développement de la dermatite de contact secondaire à l'exposition

à un mélange de composants dérivés de la famille des Compositae. Douze espèces de la famille des Compositae, y compris la camomille allemande, ont été sélectionnées et testées individuellement lorsque le mélange a provoqué des réactions allergiques. Au cours de l'étude, 3 851 personnes ont été testées à l'aide d'un patch contenant l'extrait de plante (**Evans., 1996**). Parmi ces patients, 118 (3,1%) ont présenté une réaction allergique. D'autres tests ont révélé que la grande camomille provoquait le plus de réactions allergiques (70,1% des patients), suivie des chrysanthèmes (63,6%) et de la tanaïsie (60,8%). La camomille se situait dans la fourchette moyenne (56,5 %). D'après les conclusions de l'étude citée, il a été constaté que diverses espèces appartenant à la famille des Compositae, telles que la grande camomille, peuvent déclencher des réactions allergiques chez les individus sensibles lorsqu'ils sont exposés à un mélange de leurs composants. Bien que la camomille allemande ne soit pas la principale cause de réactions allergiques, elle est classée parmi les espèces susceptibles de provoquer des réactions allergiques chez les personnes sensibles. Une étude portant sur 686 sujets exposés à un mélange de lactone sésquiterpénique ou à un mélange d'extraits de Compositae a entraîné des réactions allergiques chez 4,5% des sujets (**Paulsen et al.,1993**). Dans une autre étude, il a été démontré que le lavage des yeux avec du thé à la camomille chez les patients atteints de rhume des foins atteints de conjonctivite exacerbe l'inflammation oculaire, alors qu'aucune aggravation de l'inflammation oculaire n'a été notée lorsque du thé à la camomille a été ingéré par voie orale (**Subiza et al.,1990**). La camomille est répertoriée comme étant sûre sur la liste GRAS de la FDA. Les réactions allergiques à la camomille pourraient être causées par la contamination de celle-ci par une plante hautement allergène appelée "camomille de chien" qui a une apparence similaire, mais un mauvais goût. Les preuves de réactions croisées entre la camomille et d'autres médicaments ne sont pas bien documentées, et des études supplémentaires sont nécessaires avant de tirer des conclusions. L'innocuité de la camomille n'a pas été établie chez les jeunes enfants, les femmes enceintes ou allaitantes, ou les personnes atteintes de maladies du foie ou des reins. Cependant, aucun rapport crédible de toxicité causée par cette boisson courante n'a été signalé.

Chapitre II

Généralité sur le lait

II. Généralités sur le lait

1/ Définition du lait

Le lait est une sécrétion mammaire produite par les animaux de traites, est utilisé comme aliment par les humains. Selon la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), il est obtenu par une ou plusieurs traites, sans modification de sa composition, et peut être consommé sous forme de liquide ou utilisé dans divers processus. Il s'agit d'un liquide aqueux opaque, de couleur blanche légèrement bleutée, avec une saveur douce et un pH légèrement acide, proche de la neutralité. (Mekhaneg, 2020). Il présente une apparence opacifiée et blanche, pouvant varier en couleur selon sa teneur en matières grasses. Son odeur est légère mais distinctive, tandis que son goût est agréable, légèrement sucré et varie selon l'espèce animale d'origine.

En 1909, le Congrès International de la Répression des Fraudes a défini le lait destiné à l'alimentation humaine comme étant le produit obtenu à partir d'une femelle laitière en bonne santé, bien nourrie et non surmenée, par une traite complète et continue. Il doit être collecté de manière hygiénique et ne pas contenir de colostrum, qui est le premier lait produit après la naissance. (Goursaud, 1985).

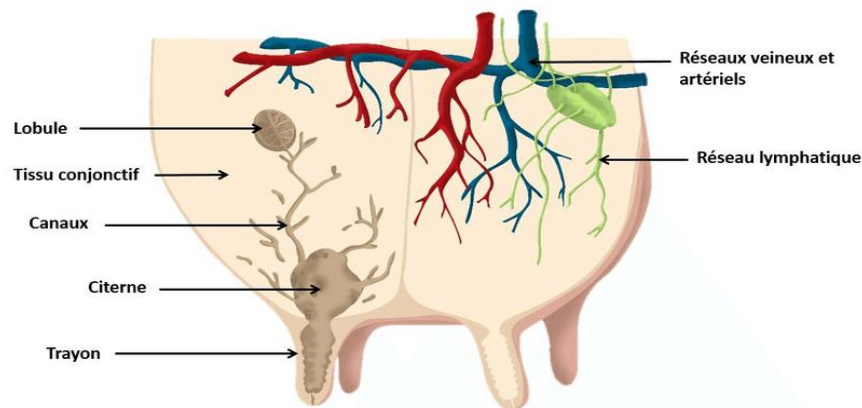


Figure02 : Anatomie de la glande mammaire de vache (Mekhaneg, 2020).

2/ Composition et caractéristiques du lait

Le lait est un produit d'origine biologique qui est sujet à une dégradation significative à la fois par des microorganismes et des enzymes. Il présente une structure complexe avec plusieurs phases distinctes : une phase aqueuse contenant principalement du lactose et des minéraux, une phase lipidique dispersée sous forme de globules gras, et une phase protéique constituée de micelles de caséines. La composition de ce produit varie en fonction de différents facteurs liés aux animaux, tels que la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge (Vignola, 2002).

2-1/ Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques sensorielles (couleur, odeur et texture) d'un produit se détériorent progressivement avec le temps. La durée de stockage, la température et leur interaction ont un impact significatif sur les attributs sensoriels globaux (**Raynaud, 2006**). Un lait de haute qualité sur le plan organoleptique présente des caractéristiques spécifiques liées à sa couleur, son odeur, son goût, sa viscosité, etc (**Luquet, 1990**).

2-2/ Caractéristiques physiques et chimiques

Tableau I : Les caractéristiques physiques du lait (**Bourgeois et al ., 1990**).

Caractéristiques physiques	pH	Densité	Température de coagulations (°C)
Valeurs	6.6-6.8	1,030 – 1,033	0,53

Tableau II: Les caractéristiques chimiques du lait (**Bourgeois et al., 1990**).

Caractéristiques chimiques (g/100g)	Valeurs
Extrait sec total	12,7
Taux de matière grasse	3 ,9
Teneur en matière azotée totale	3,4
Teneur en caséines	2,8
Teneur en albumines et globulines	0,5
Teneur en lactose	4,9
Teneur en cendres	0,9
Vitamines, enzymes et gaz dissous	Traces

2-3/ Caractéristiques microbiologiques du lait

Lorsqu'il est obtenu dans des conditions optimales à partir d'un animal en bonne santé, le lait renferme un faible nombre de microorganismes. Principalement composés de microcoques et de streptocoques lactiques (*Lactococcus* et *Lactobacillus*), (**Marthe al., 2017**) ces microorganismes sont des germes saprophytes présents dans les canaux galactophores et les mamelles. Le lait cru dispose d'une protection contre les bactéries grâce à des substances inhibitrices appelées "Lacténines", mais leur effet est de courte durée, d'environ une heure (**Guiraud, 1998**). Toutefois, en cas de provenance d'un animal malade, d'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, présentant alors des risques sanitaires considérables (**Hui et al., 2018**).

2-3-1/ Principales activités des microorganismes du lait

Les microorganismes présents dans le lait peuvent influencer de manière favorable ou défavorable les caractéristiques visuelles, olfactives, texturales et gustatives des produits laitiers en raison de leurs processus métaboliques. Certaines de ces activités sont :

- **L'acidification** : L'acidification désigne la production d'acide lactique par les bactéries lactiques pendant leur phase de croissance à partir du lactose.
- **La protéolyse** : La protéolyse est un processus de dégradation des protéines présentes dans le lait qui entraîne la formation de peptides. Certains de ces peptides sont responsables de l'apparition de goûts désagréables dans les produits laitiers.
- **La lipolyse** : La lipolyse est le processus de libération d'acides gras à partir des triglycérides présents dans le lait, ce qui entraîne un goût rance.
- **La production de gaz** : La production de gaz est observée lors de la croissance de certaines bactéries, telles que les bactéries hétéro fermentaires et telluriques. Dans le cas de certains fromages, cela peut entraîner l'apparition d'un défaut d'aspect, associé ou non à un défaut de goût. Cependant, il existe également des microorganismes qui ne semblent pas causer ces problèmes. Leur présence en grande quantité dans le lait indique cependant un manque d'hygiène générale lors de la production. Ces microorganismes peuvent donc être considérés comme des "indicateurs" d'une hygiène défectueuse (**Vignola, 2002**).

2-4/ Protéines du lait

Les protéines présentes dans le lait, qui constituent 95% de la matière azotée, se divisent en deux catégories principales : les caséines, représentant 80% du total, et les protéines du sérum, représentant 20%. En plus de ces protéines, le lait contient également d'autres composés azotés non protéiques tels que des protéases, des peptones et de l'urée (**Dussault-Chouinard, 2019**).

3/ Généralités sur les caséines

3-1/ Composition et structure chimique

Les caséines constituent 80 % des protéines totales présentes dans le lait. Elles se composent de quatre protéines principales : les caséines α_1 , α_2 , β et κ . Leurs proportions respectives sont les suivantes : 33 %, 11 %, 33 % et 11 % (**Dalgleish et Corredig, 2012**). Ces protéines partagent plusieurs caractéristiques communes, telles que la présence de groupements phosphorylés contenant du phosphore, leur teneur élevée en certains acides aminés (Glu, Leu, Pro) et une forte proportion de résidus apolaires (**Mahaut et al., 2000**). Leur point isoélectrique est de 4,65. L'étude de leur structure tridimensionnelle a révélé que les caséines s'assemblent en micelles sphériques (**Vignola, 2002**).

3-2/ Micelles de caséine

La micelle de caséine est une structure uniforme composée de caséines qui contient des nanoparticules de phosphate de calcium dispersées à l'intérieur. Les protéines se lient entre elles par des interactions faibles, telles que des interactions hydrophobes, des ponts hydrogène et de faibles forces de Van der Waals (**De Kruif et al., 2012**). Cependant, les micelles de caséine précipitent lorsqu'elles sont exposées à la présure ou à une acidité de pH 4,6. Le gel formé par la coagulation des caséines retient différentes substances, telles que les matières grasses, les minéraux, l'eau et les éléments solubles, et sert de base à des produits tels que le fromage et le yogourt (**Dussault-Chouinard, 2019**).

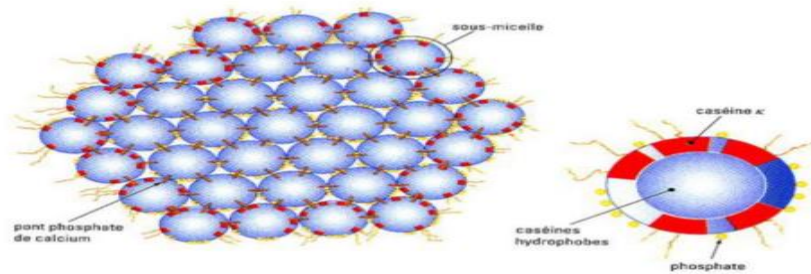


Figure 03 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (**Amiot et al., 2002**).

4/ La poudre de lait

4-1/ Définition

Les laits en poudre sont des produits obtenus en éliminant partiellement l'eau du lait par évaporation, de manière à ce que l'eau soit perdue et que le lait se transforme en poudre (**Arie et al., 2011**).

Conformément à la norme n° A5 (1971), il existe trois catégories de lait en poudre : entier, partiellement écrémé et totalement écrémé. Selon les réglementations en vigueur, ils peuvent contenir certains additifs alimentaires tels que des stabilisants, des émulsifiants et des antiagglomérants, sous certaines conditions (**Fao, 2008**).

4-2/ La fabrication de poudre du lait

La fabrication de la poudre de lait peut se faire de deux manières différentes. La première méthode est appelée atomisation ou pulvérisation :

- Elle consiste à pulvériser finement le lait concentré à l'aide d'une turbine à l'intérieur d'une tour de séchage par entraînement. Dans ce processus, un courant d'air chaud (à environ 150°C) est utilisé comme vecteur de chaleur et d'humidité. L'évaporation de l'eau se produit instantanément par

diffusion, ce qui entraîne le refroidissement de la poudre et de l'air (à environ 90 °C) (**Soustre et al., 2017**).

- Une méthode courante pour le séchage du lait est le procédé Hatmaker, qui implique l'utilisation de deux cylindres chauffés à l'intérieur à environ 140 °C. Le lait est versé sur la surface des cylindres qui tournent en sens inverse, et grâce à l'application de vapeur, il se forme rapidement un film de lait. Ce film est ensuite séché rapidement, formant une croûte qui est ensuite détachée par un racleur selon **Veisseyre (1979)**.

4-3/ La technologie de la poudre de lait

Après avoir été soumis à des étapes de purification, de standardisation et de pasteurisation, le lait subit deux étapes principales : la concentration et le séchage. La concentration s'effectue par évaporation, où le lait est chauffé sur une surface chaude. Afin de préserver la qualité, il est essentiel de limiter la température et de réduire le temps de traitement. C'est pourquoi on opte pour le traitement sous vide. Par souci d'efficacité énergétique, on utilise également des techniques telles que l'effet multiple, la compression mécanique des vapeurs et le préchauffage du liquide (**Fao, 2008**).

5/ Mécanismes de la coagulation

La coagulation du lait entraîne une transformation irréversible de l'état liquide vers un état semi-solide connu sous le nom de gel ou coagulum (**Cecchinato et al., 2012**). Cette étape revêt une importance primordiale dans la production du fromage, car les caractéristiques physico-chimiques du gel influencent son aptitude au drainage et les propriétés finales du fromage (**Hsieh et Pan, 2012**). Les mécanismes de formation du coagulum diffèrent considérablement selon que ces modifications sont provoquées par une acidification ou par l'action d'enzymes coagulantes (**Lefebvre Cases et al., 1998**).

5-1/ Coagulation du lait

La coagulation du lait est une pratique ancestrale visant à conserver les protéines, la matière grasse, ainsi qu'une partie du calcium et du phosphore. Ces qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées dans de nombreuses régions du monde (**Abiazar, 2007**). Dans l'industrie fromagère, le choix du procédé de coagulation a un impact considérable sur la texture du produit final (**Herbert et al., 1999**).

La coagulation du lait est une étape cruciale dans le processus de fabrication du fromage (**Talantikite, 2015**). Elle implique une modification physique irréversible des micelles de caséines, conduisant à une transition du lait de l'état liquide à l'état semi-solide, formant ainsi un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel (**Amimour, 2019**). Cette coagulation peut être obtenue par acidification du lait, par l'action d'enzymes coagulantes ou par une combinaison de ces mécanismes.

5-1-1/ Coagulation acide

La coagulation acide est provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne, qui convertit le lactose en acide lactique, entraînant une diminution du pH du lait de fromagerie. Cette diminution de pH solubilise le phosphate et le calcium colloïdal, des éléments importants pour la stabilité des micelles de caséine. Les micelles de caséine se lient alors entre elles pour former un gel cassant, friable et peu élastique (**Hickey et al., 2018**). Lorsque l'acidification est rapide grâce à l'ajout d'un acide minéral ou organique, les caséines se flocculent à un pH de 4,6, formant un précipité granulé dispersé dans le lactosérum. En revanche, une acidification progressive obtenue par fermentation lactique ou hydrolyse de la gluconolactone conduit à la formation d'un gel lisse et homogène qui occupe tout le volume initial du lait (**Fox et al., 2017**).

La teneur en protéines influence la coagulation acide, un lait riche en protéines produira un caillé lactique plus ferme (**Carole et Vignola, 2002**). La coagulation acide peut être réalisée en précipitant les caséines à leur point isoélectrique (pH 4,6) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique en injectant du CO₂, en ajoutant de la glucono-delta-lactone ou des protéines sériques à pH acide.

En France, la méthode chimique (acide organique) est uniquement utilisée pour standardiser le pH du lait avant le processus de coagulation. L'ajout d'acide minéral n'est pas autorisé (**Talantikite, 2015**).

5-1-2/ Coagulation par l'extrait de la plante

La coagulation du lait peut être réalisée de manière différente à travers le monde, en utilisant des extraits végétaux plutôt que de l'acide lactique ou des enzymes animales (**Froc, 2001**). Dans plusieurs pays, certaines plantes possèdent des enzymes capables de coaguler le lait. Cependant, ces préparations végétales ont généralement donné des résultats décevants en fromagerie, car elles ont souvent une activité protéolytique élevée, ce qui conduit à la production de fromages amers (**Lo Piero et al., 2002**).

5-1-3/ Coagulation enzymatique du lait

La coagulation enzymatique du lait est réalisée par de nombreuses enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne. Ces enzymes ont la capacité de coaguler le lait, mais elles possèdent également une forte activité protéolytique non spécifique qui leur permet d'hydrolyser les caséines α et β , libérant ainsi des peptides (**Fox, 2017**). Cependant, une hydrolyse excessive peut entraîner une diminution du rendement fromager, une texture molle et l'apparition de goûts anormaux (**Geurts, 2006**).

La présure est une enzyme protéolytique extraite de la caillette du veau non sevré. Elle se compose de deux fractions actives : une fraction mineure (20 %) constituée de pepsine et une fraction majeure (80 %) représentée par la chymosine, qui est le coagulant le plus couramment utilisé (**Bansal,**

2017). Dans la pratique, la coagulation du lait peut être caractérisée par trois paramètres : le temps de floculation, la vitesse de raffermissement et la fermeté maximale du gel (Guinee, 2017).

5-1-3-1/ Principaux enzymes coagulants du lait

❖ Protéases d'origine animale (Présure)

La présure est un ingrédient utilisé dans la fabrication du fromage pour provoquer la coagulation du lait. Elle est composée d'un mélange d'enzymes, principalement la chymosine et la pepsine. La présure est obtenue en macérant les caillettes des jeunes ruminants dans une saumure à 10% de NaCl, ce qui permet d'extraire les enzymes présentes dans ces organes.

La chymosine est l'enzyme principale de coagulation du lait présente dans la présure. Elle est initialement sécrétée sous forme de pro enzyme inactive appelée prochymosine. L'activation de la prochymosine en chymosine se produit naturellement dans la caquette lorsque le pH est inférieur à 5,0. Cela se fait par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule. (Mahaut et al., 2000).

Le processus de coagulation du lait provoqué par l'enzyme de la présure se déroule en trois phases distinctes :

- Phase primaire ou enzymatique : Pendant cette phase, la caséine κ , une des protéines du lait, est spécifiquement hydrolysée par l'enzyme. Cette hydrolyse se produit au niveau de la liaison entre l'acide aminé phénylalanine et méthionine (PHE105-MET106), ce qui conduit à la formation du para caséine κ et d'un peptide plus court appelé casino-macro peptide (CMP) composé de 65 acides aminés.
- Phase secondaire : Après l'hydrolyse de la caséine κ , les micelles de caséine, qui sont de petites agrégations de protéines, subissent des modifications de charge électrique. Ces micelles modifiées s'agrègent alors pour former un gel dense appelé caillé.
- Phase tertiaire : Cette phase de coagulation se poursuit avec l'organisation et la réticulation du gel formé. Elle implique la formation de liaisons intermoléculaires, ce qui donne au caillé sa structure solide. Cette phase est également connue sous le nom de phase de durcissement en fromagerie.

Ces différentes phases de coagulation sont essentielles dans le processus de fabrication du fromage, car elles permettent de transformer le lait liquide en une structure solide et cohérente (Ikonen, 2000).

❖ Protéases d'origine végétale

Il existe un large éventail de protéases d'origine végétale utilisées comme agents coagulants. Ces protéases sont extraites à partir de différentes parties des plantes supérieures en utilisant la méthode de macération (Veisseyre, 1979).

5-1-4/ Caractéristiques des différents gels obtenus

- Propriétés du coagulum obtenu par voie enzymatique : Le gel présure se distingue par sa rigidité, sa grande cohésion, sa contraction et son imperméabilité (**Le renard et al., 2015**).
- Propriétés du coagulum obtenu par voie acide : Le coagulum formé par voie acide présente des caractéristiques rhéologiques spécifiques : il est friable, peu élastique, son raffermissement est très limité et prend beaucoup de temps, sa porosité est élevée, sa perméabilité est élevée, mais il présente une capacité d'égouttage limitée (**Ramet, 1997**).

6/ Coagulation mixte

Le résultat de l'action combinée de la présure et de l'acidification lactique peut être obtenu selon deux techniques dans le contexte industriel (**Mahaut et al., 2000**). D'une part, en ajoutant de la présure au lait pendant l'acidification, la coagulation se produit généralement plus rapidement et le gel ainsi formé présente des caractéristiques intermédiaires entre un gel présure et un gel lactique (**Amimour, 2019**). D'autre part, en laissant naturellement le caillé emprésuré s'acidifier, celui-ci acquiert progressivement les propriétés lactiques (**Amimour, 2019**).

7/ Facteurs de la coagulation

Plusieurs éléments peuvent influencer la coagulation du lait et les propriétés physiques des caillés. Ces éléments sont principalement liés à la concentration d'enzymes, à la température, au pH, à la teneur en calcium, à la teneur en caséines et à la taille des micelles (**Mahaut et al., 2000 ; Li et Dalgleish, 2006**).

- **Concentration en enzyme** : La concentration en enzyme présente une relation inversement proportionnelle avec le temps de coagulation. Toutefois, elle est directement proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse de la caséine κ lors de la phase enzymatique, ainsi qu'à la vitesse d'agrégation des micelles lors de la phase physique.
- **Température** : La température idéale d'activité pour la chymosine et la pepsine se situe entre 40 et 42°C. Pendant cette plage de température, le temps nécessaire pour la coagulation est minimal, mais il augmente à des températures plus élevées. À 65°C, la présure devient inactive et la coagulation cesse complètement. De plus, il est important de noter que le temps nécessaire pour que le gel se raffermisse diminue à mesure que la température augmente.
- **pH** : Le passage du pH 6,7 au pH 5,6 entraîne une augmentation de la vitesse de coagulation.
- **Teneur en calcium** : Lors de la coagulation du lait par la présure, la formation de liaisons phosphocalciques est essentielle pour la réticulation du gel. La quantité et la nature du calcium présent ont un impact significatif sur ce processus. L'ajout de CaCl_2 augmente la concentration de calcium ionisé et de calcium colloïdal, ce qui se traduit par un temps de coagulation réduit et une consistance de gel plus ferme.

- **La teneur en caséines :** La vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent en fonction de la concentration de caséines, ce qui indique que la vitesse d'hydrolyse enzymatique est proportionnelle au contenu protéique (**Mahaut et al., 2000**).
- **La dimension des micelles**
La taille des micelles est également directement liée au temps de coagulation. Les micelles de plus petit diamètre, qui contiennent une quantité élevée de caséine ont tendance à subir une hydrolyse plus rapide (**Mahaut et al., 2000**).

8/ L'évaluation de la coagulation

Le temps de coagulation

Le temps de coagulation est défini comme la période qui s'écoule entre l'ajout de l'enzyme coagulante et le commencement de la formation du gel (**Ramet, 1997**). Le temps de prise quant à lui est le laps de temps entre l'ajout du présure et le début de la floculation, c'est-à-dire la solidification apparente du lait (**Luquet et Boudier, 1981 ; Mahaut et al., 2000**).

Partie Expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

III . Problématique et l'objective

- L'objectif principal de cette étude vise à évaluer le potentiel coagulant de l'extrait de camomille (*Chamaemelum nobile*) sur le lait, dans le but d'améliorer son utilisation industrielle. Plus précisément, notre intérêt se porte sur l'évaluation de la capacité de l'extrait à provoquer la coagulation ainsi que sur la mesure de sa teneur en protéines.
- L'amélioration de l'activité coagulante de la camomille présente un intérêt industriel significatif. Les agents coagulants jouent un rôle essentiel dans l'industrie laitière, notamment dans la production de fromage, en favorisant la coagulation du lait et la formation du caillé. Par conséquent, l'amélioration de cette propriété de la camomille offre des avantages potentiels pour les fabricants de produits laitiers.
- Afin d'étudier l'activité coagulante de l'extrait de camomille, nous avons entrepris diverses expériences. En premier lieu, nous avons examiné l'influence du temps sur la coagulation du lait en présence de cet extrait. Pour ce faire, nous avons soumis des échantillons de lait à des traitements avec l'extrait de camomille pendant des durées variables, puis nous avons observé et évalué la coagulation en fonction du temps nécessaire pour obtenir une coagulation complète.
- Ensuite, nous avons étudié l'impact de la trypsine sur l'activité coagulante de la camomille. La trypsine, une enzyme digestive, est responsable de la dégradation des protéines. En ajoutant de la trypsine à l'extrait de camomille, nous avons pu évaluer comment la dégradation des protéines affectait l'activité coagulante de l'extrait de camomille.
- De plus, nous avons également examiné l'impact des sels métalliques sur l'activité coagulante de la camomille. Certains sels métalliques peuvent agir en tant qu'activateurs ou inhibiteurs d'activités enzymatiques. En ajoutant divers sels métalliques à l'extrait de camomille, nous avons pu déterminer si ces composés altéraient l'activité coagulante de la camomille.

Pour finir, nous avons employé la précipitation au sulfate d'ammonium afin d'identifier la fraction protéique responsable de l'effet coagulant de la camomille. Cette méthode de précipitation nous a permis de séparer les protéines des autres composés présents dans l'extrait. En isolant cette fraction protéique et en évaluant son activité coagulante, nous avons pu établir une corrélation entre la présence de protéines dans l'extrait de camomille et son effet coagulant.

2/ Matériels et méthodes

2-1/ Matériels

Les différents appareils utilisés et leurs marques sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau III : Les différents appareils utilisés et leurs marques

Les appareils (Matériels)	Marques
Centrifugeuse	Sigma Aldrich
Spectroscopie	OPTIMA SP-3000nano
Mixeur	KitchenWare
Bain-marie	Nuve bath
pH mètre	STARTER3100
Balance de précision	OHAUS P max 50g
Agitateur magnétique	JlabTEch
Autoclave	VENTICELL
Distillateur	GFL
Réfrigérateur/Congélateur	IRIS
Conductimètre	METTLER TOLEDO
plaque chauffante	JlabTEch

2-2/ Les matériels consommables au laboratoire

- ✓ Micropipette de 100µl à 1000 µl, papier wattman, flacons stériles 250ml, étiquettes, spatule, Eppendorf, cuillères stériles, ciseaux, pissettes, portoirs, papier Josef, papier aluminium, papier film, scotch, barreau magnétique, Portoirs, Poudre de sulfate d'ammonium, Des tubes de dialyse, un récipient contenant une solution tampon Tris_HCl (appropriée pour la dialyse).

2-3/ Verreries

- Mortier, Bêchers (25ml, 50ml, 250ml, 500ml, 10ml) Tube à essais, Tube à visse, entonnoir, Erlenmeyer (de 250 mL, 500 mL et 1000 mL), éprouvettes graduée (250 mL et 500 mL), flacons stériles, burettes. Les tubes coniques (10ml) Pipette à volume (5ml)

3/ Echantillonnage « collecte du lait »

La collecte d'échantillons de lait pour cette étude a été réalisée en utilisant divers types de lait. Le premier type de lait utilisé était la poudre de lait écrémé de la marque Loya. Les échantillons de cette poudre de lait ont été prélevés dans des sachets stériles, contenant environ 500 g de poudre par sachet. Le deuxième type de lait utilisé était du lait pasteurisé provenant de la laiterie de la région de

Boudwaw. Enfin, le troisième type de lait utilisé était du lait de vache provenant de la laiterie "La Ferme" située dans la région d'Ain Bessame, wilaya de Bouira. Tous les échantillons ont été transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire de biochimie 02, situé à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV/STU) de l'Université de Bouira.

4/ Matériel végétal

Un type de plante a été utilisé dans cette étude pour la recherche de l'activité coagulase sur le lait : les fleurs de camomille (*Chamaemelum nobile*).

5/ Méthode de préparation du lait

12 g du lait en poudre (écrémé) ont été mis dans 100 mL d'une solution CaCl_2 (0,02M), le mélange a été agité pendant 15 min à la température ambiante.

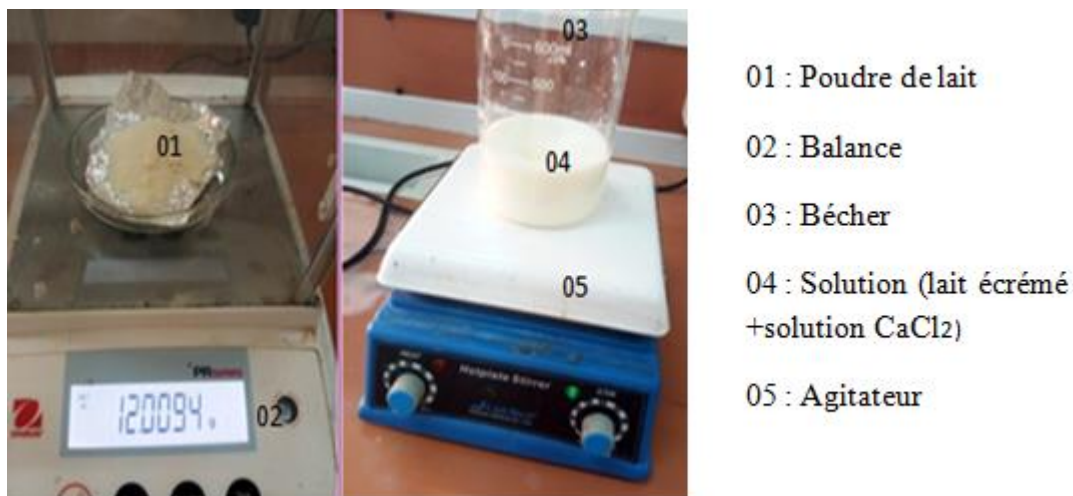


Figure 04 : Image montrant la préparation de lait écrémé (photo originale, 2023).

6/ Préparation de l'extrait de la plante (la camomille)

a) La camomille

Une quantité de 40 g de fleurs a été lavée, broyée puis tamisée dans le but d'éliminer les impuretés. Ces fleurs avaient subi une macération dans 1000mL d'eau distillée froide avec agitation périodique pendant 2 h. Une étape de filtration a été utilisée par du papier filtre, l'extrait récupéré par la filtration a été neutralisé en ajustant le pH à 6,4 pour éliminer l'effet de coagulation acide (Srivastava et al., 2010).

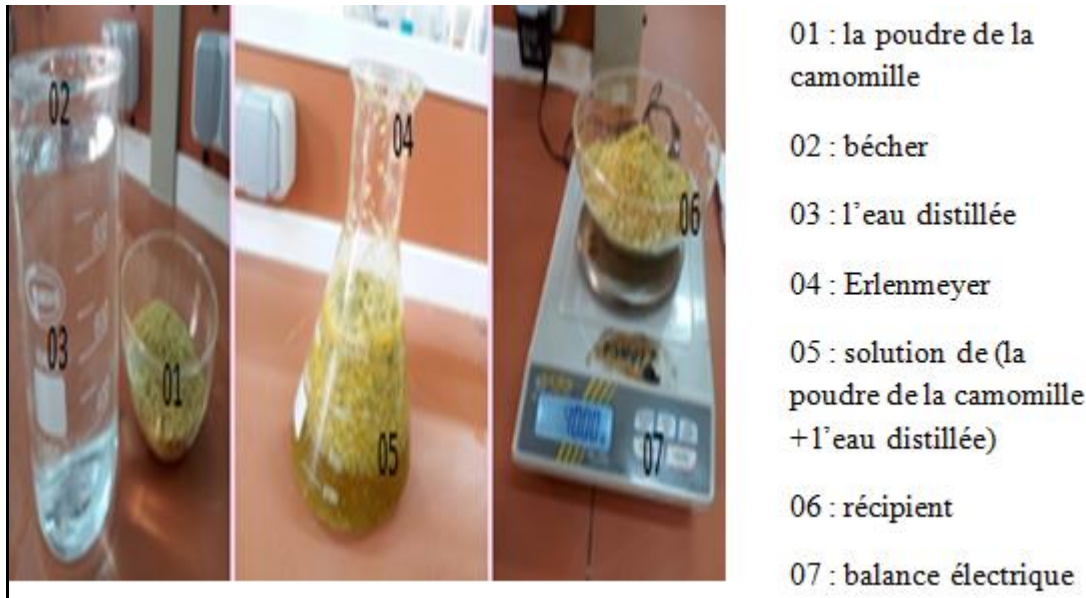


Figure 05 : Macération de camomille (*Chamaemelum nobile*) (photos originales, 2023).

7/ Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

La méthode de dosage des protéines développée par Bradford en 1976 repose sur une réaction entre les protéines et le BBC G-250, également connu sous le nom de Bleu de Coomassie brillant, dans un milieu acido-alcoolique. Initialement de couleur rouge/brun, ce colorant change de teinte pour devenir bleu lorsqu'il se lie aux protéines, ce qui entraîne un déplacement de son pic d'absorption maximale de 464 nm (forme cationique) à 595 nm (forme anionique). Cette liaison se produit principalement avec les acides aminés basiques (Arg, Lys, His) et aromatiques présents dans la molécule protéique, grâce à des interactions ioniques spécifiques. Cette méthode a été largement utilisée par de nombreux chercheurs en raison de sa simplicité, de sa rapidité, de sa grande sensibilité et de la stabilité de la coloration obtenue. Des détails sur la préparation du réactif de Bradford et le mode opératoire de la méthode peuvent être consultés dans (l'annexe III)

8/ Etude de l'effet de variation de la température sur l'activité coagulase de l'extrait de camomille

8-1/ Protocole 01 avec lait de vache comme substrat

Nous avons mis 0,55 g de CaCl_2 dans 250 ml de lait de vache que nous avons par la suite agité pendant 15 minutes après quoi nous avons pris 1 ml de cette solution avec 1 ml d'extrait de camomille et nous avons testé avec différentes températures 48°C, 50°C, 55°C, 60°C et 65°C.

8-2/ Protocole 02 avec lait pasteurisé comme substrat

Nous avons mis 0,55 g de CaCl₂ dans 250 ml de lait pasteurisé et que nous avons par la suite agité pendant 15 minutes après quoi nous avons pris 1 ml de cette solution avec 1 ml d'extrait de camomille et nous avons testé avec différentes températures 48°C, 50°C, 55°C, 60°C et 65 Degrés Celsius.

8-3/ Protocole 03 avec Lait de vache enrichi par la poudre de lait comme substrat

Nous avons mis 0,55 g de CaCl₂ dans 250 ml de lait de vache avec 12g de poudre de lait et que nous avons par la suite agité pendant 15 minutes après quoi nous avons pris 1 ml de cette solution avec 1 ml d'extrait de camomille et nous avons testé avec différentes températures 48°C, 50°C, 55°C, 60°C et 65 Degrés Celsius.

8-4/ Protocole 04 avec Lait de vache comme substrat et l'ajout de trypsine à l'extrait de plante

Nous avons ajouté 0,55 g de CaCl₂ à 250 ml de lait de vache, puis nous avons agité le mélange pendant 15 minutes. Ensuite, nous avons prélevé 1 ml de lait de vache et nous l'avons mélangé avec 1 ml d'extrait de camomille et 1 ml de trypsine (avec l'addition de trypsine à l'extrait de la plante). Ensuite, nous avons effectué des tests à différentes températures 48 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C et 65 °C.

9 /La détermination de l'activité coagulante

La méthode utilisée pour déterminer l'activité coagulante (AC) de l'extrait enzymatique est basée sur la méthode **d'Arima et al. (1970)**. Cette méthode repose sur l'évaluation visuelle de la coagulation du lait écrémé, en observant l'apparition des premiers flocons, et est exprimée en unités d'activité coagulante (UAC). Le temps de coagulation est mesuré en chronométrant le laps de temps entre l'ajout de l'enzyme coagulante et l'apparition des premières particules de caillé sur la paroi interne d'un tube incliné soumis à un mouvement de rotation lent (**Moschopoulou, 2011**).

L'activité coagulante peut également être exprimée en force de coagulation (F), qui est calculée en utilisant la formule suivante :

$$F (US) = 2400 \times V1 / T \times V2$$

Dans cette formule, 2400 représente le facteur de conversion pour convertir le temps en unités spécifiques (40 minutes x 60 secondes). F (US) représente le temps moyen de coagulation mesuré en unités de temps spécifiques (dans ce cas, 2400). V1 correspond au volume de lait écrémé à coaguler, V2 est le volume de l'extrait coagulant utilisé, et T représente le temps de coagulation en secondes.

En utilisant cette formule, les chercheurs peuvent évaluer le temps moyen de coagulation du lait en fonction de la quantité de présure utilisée et du volume de lait traité. Cette mesure permet de comparer différents échantillons de lait ou de détecter des variations dans la coagulation en fonction de différents facteurs expérimentaux.

10/ Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium est une méthode largement adoptée pour la purification et le fractionnement des protéines à grande échelle, tant dans les laboratoires que dans les environnements industriels. Elle offre une séparation efficace des protéines en modifiant leur solubilité grâce à l'ajout de concentrations élevées de sels. Cette approche est hautement fiable et couramment employée dans le domaine de la biotechnologie pour obtenir des échantillons protéiques de haute qualité

11/ Méthodes

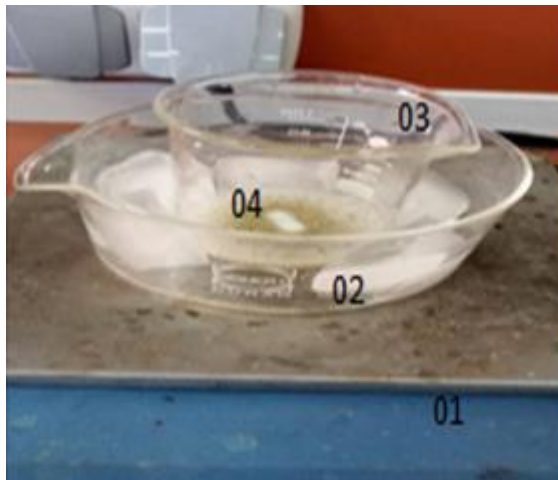
On préparera 5 béchers propres de 25 ml, en mettant dans chaque bécher 5 ml de l'extrait brut après placer chaque bécher dans un récipient à glace.

Pour calculer les masses de sulfate d'ammonium à ajouter pour atteindre chaque palier de saturation, il est recommandé d'utiliser le tableau de saturation en sel plutôt que l'équation. Le tableau de saturation en sel fournit les masses de sel (sulfate d'ammonium dans ce cas) nécessaires pour atteindre différents pourcentages de saturation dans une solution.

Les paliers ou pourcentages de saturation choisis sont 20%, 40%, 60%, 80% et 100%. Pour chaque palier, vous pouvez utiliser le tableau de saturation en sel pour déterminer la masse de sulfate d'ammonium à ajouter à chaque bécher.

Pour atteindre un taux de saturation de 20%, trouver la masse de sulfate d'ammonium correspondante dans le tableau de saturation en sel. Supposons que la masse nécessaire soit de 0,544g grammes. Alors ajouter 0,544g grammes de sulfate d'ammonium à le bécher pour atteindre un taux de saturation de 20%. Et faire même chose pour 40% ,60%,80% et 100

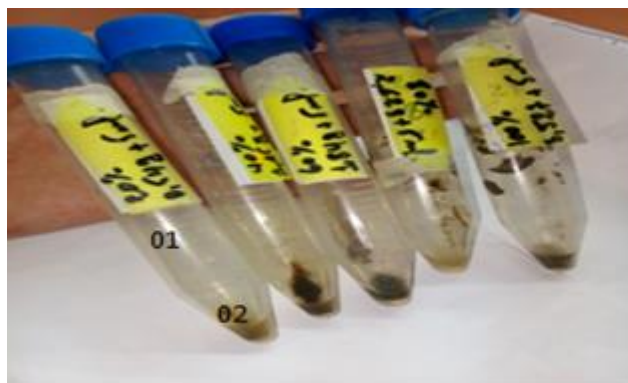
Dans cette expérience, nous utilisons une balance pour mesurer cinq quantités distinctes, auxquelles nous ajoutons ensuite les quantités appropriées dans chaque bécher afin d'atteindre des taux de saturation de 20%, 40%, 60%, 80% et 100% respectivement. Ce processus est réalisé sous une agitation lente et constante pendant une durée de 15 minutes. L'utilisation d'une balance permet de garantir des mesures précises et cohérentes des quantités utilisées, tandis que l'agitation lente assure une distribution uniforme des substances dans chaque mélange. Ces conditions expérimentales nous permettent d'observer les effets de la saturation à différents niveaux (**Smith et al., 2019**).



- 01 : Agitateur magnétique
- 02 : récipient à glace
- 03 : bécher contient (extrait +sulfate d'ammonium)
- 04 : barreau magnétique

Figure06 : Précipitation sulfate d'ammonium (photo originale,2023).

Après avoir ajouté la quantité totale de sulfate d'ammonium, les extraits sont laissés sous une légère agitation pendant 20 à 30 minutes. Ensuite, le pH est neutralisé jusqu'à atteindre 7. Les extraits précipités sont introduits dans des tubes coniques propres. Ces tubes sont ensuite placés sur un portoir dans un réfrigérateur réglé à une température de 4 °C, permettant une décantation pendant une durée de 16 à 18 heures. Après la décantation, le culot formé est séparé du surnageant par centrifugation à 3000 tours par minute, pendant 15 à 20 minutes, à une température de 4 °C. Enfin, le culot de chaque tube est récupéré en ajoutant 5 mL de tampon Tris/HCl 50 mM. Ainsi, ce protocole permet d'obtenir les échantillons désirés dans les conditions spécifiées.



- 01 : tube conique
- 02 : le culot

Figure07 : Photo montrant le résultat de la Précipitation sulfate d'ammonium (Photo originale ,2023).

12/ La dialyse

La dialyse après la précipitation au sulfate d'ammonium, communément appelée dialyse d'exclusion de sel, est un processus utilisé pour purifier et concentrer des protéines ou d'autres molécules biologiques en éliminant principalement l'excès de sel. Dans cette méthode, un protocole général est suivi pour réaliser cette dialyse (Smith et al.,2022).

12-1/ Protocole

➤ Préparation des tubes de dialyse :

La préparation des tubes de dialyse est une étape cruciale dans le processus de dialyse pour éliminer les sels et autres petites molécules d'un échantillon. Pour commencer, les tubes de dialyse doivent être rincés soigneusement avec une solution tampon de dialyse afin de les pré-hydrater. Cela permet de s'assurer que les tubes sont propres et prêts à être utilisés.

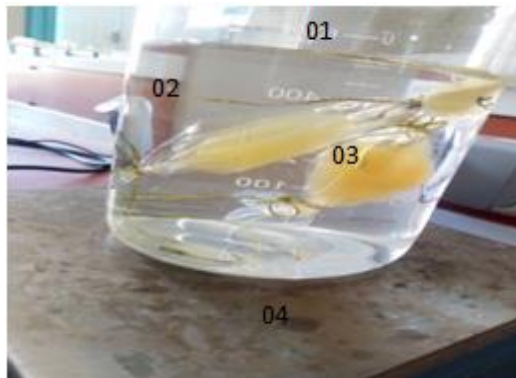
Une fois les tubes de dialyse préparés, le précipité obtenu après la centrifugation est transféré dans ces tubes. Il est important de veiller à ce que les tubes soient correctement fermés pour éviter toute fuite. Cela peut être réalisé en nouant les tubes avec une ficelle ou en utilisant des clips fournis avec les tubes.

La dialyse proprement dite commence en plaçant les tubes de dialyse contenant les échantillons dans une grande quantité de solution tampon de dialyse, généralement une solution Tris HCl. Pendant la dialyse, il est recommandé d'agiter doucement la solution tampon de dialyse pour favoriser l'échange des sels et autres petites molécules à travers la membrane des tubes de dialyse. Cette agitation favorise le processus de diffusion et aide à éliminer les substances indésirables de l'échantillon.

Pour maintenir l'efficacité de la dialyse, il est essentiel de changer régulièrement la solution tampon de dialyse. Les sels et autres petites molécules s'accumulent progressivement dans la solution tampon pendant la dialyse, il est donc nécessaire de la remplacer toutes les 4 à 6 heures pour garantir l'élimination continue de ces substances indésirables.

Une fois la période de dialyse appropriée écoulée, qui peut varier en fonction de la taille et des caractéristiques des molécules à récupérer, les échantillons dialysés peuvent être récoltés. Chaque solution dialysée est placée dans un tube approprié pour une analyse ultérieure.

Pour évaluer les effets de différentes températures, chaque tube peut être testé à des températures différentes, telles que 48 °C, 55 °C, 60 °C et 65 °C. Cela permet d'étudier l'influence de la température sur les propriétés et les caractéristiques des échantillons dialysés.



- 01 : bécher
- 02 : tampon tris -HCl
- 03 : tube de dialyse
- 04 : agitateur magnétique

Figure 08 : La dialyse (photo originale ,2023).

12-2/ Le protocole de l'addition des solutions préparées des cofacteur $MgSO_4$, le $FeSO_4$ et le $NaNO_3$

L'efficacité de saturation a été testée à différentes températures (48 °C, 55 °C, 60 °C et 65 °C) en utilisant des cofacteurs tels que le $MgSO_4$, le $FeSO_4$ et le $NaNO_3$. Les échantillons comprenaient 200 μ l d'extrait de taux de saturation (80%), 200 μ l de trypsine, 200 μ l de lait de vache et 100 μ l de $MgSO_4$, $FeSO_4$ et $NaNO_3$ mélangés.

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons testé l'activité coagulante du lait par l'action de l'effet de l'extrait de camomille (4 mélanges différents de lait sont utilisés : lait de vache, lait pasteurisé, lait de vache avec l'ajoute de trypsine à l'extrait de plante et lait de vache enrichi en poudre de lait) à différentes températures (48°C, 50°C, 55°C, 60°C et 65°C), pH=6,5 et un rapport volumique de (1mL/1mL: extrait/lait)(Annexe 03).

Nous avons choisi les températures et le rapport volumique à partir des résultats de l'étude de nos anciens camarades (Fodil et Alouache, 2021) qui ont initié ce travail dans leur mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master en Sciences Biologiques, Spécialité Biochimie Appliquée, sous le titre "Étude sur l'activité de quelques extraits naturels dans la coagulation du lait pour la fabrication du fromage" au laboratoire du département de Biologie de l'Université AKLI MOHAND OULHADJ à Bouira en 2021 . Les résultats montrent que la meilleure force coagulante a été observée par l'extrait de la camomille lyophilisé ($F= 30,96\pm 4,44$) sous les conditions de (pH=6,4), température (40 °C) et un rapport volumique (1mL/1mL: extrait/lait).

Les résultats que nous avons obtenus sont représentés dans les graphes suivants :

1/ Etude de l'effet de variation de la température sur l'activité coagulase de l'extrait de camomille

1-1/ Protocole 01 avec lait de vache comme substrat

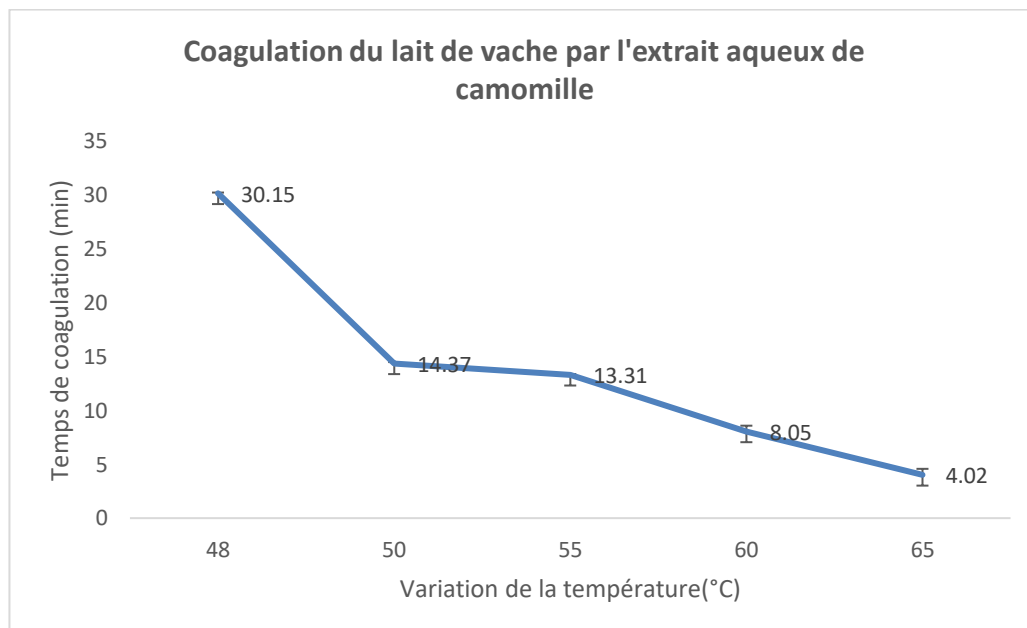


Figure 09 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait de vache par l'extrait aqueux de camomille en fonction de la variation de la température.

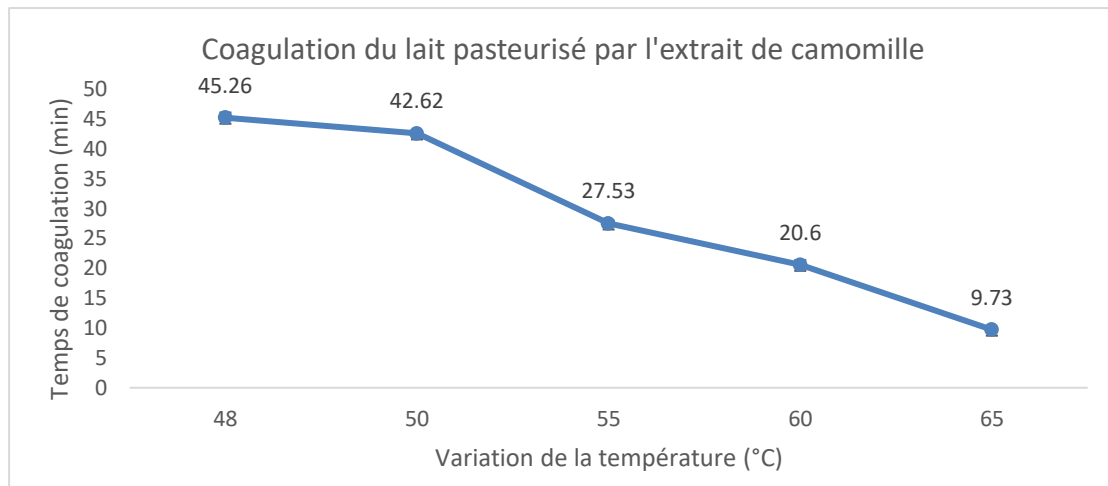
1-2/ Protocole 02 avec lait pasteurisé comme substrat

Figure 10 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait pasteurisé par l'extrait de camomille en fonction de la variation de température.

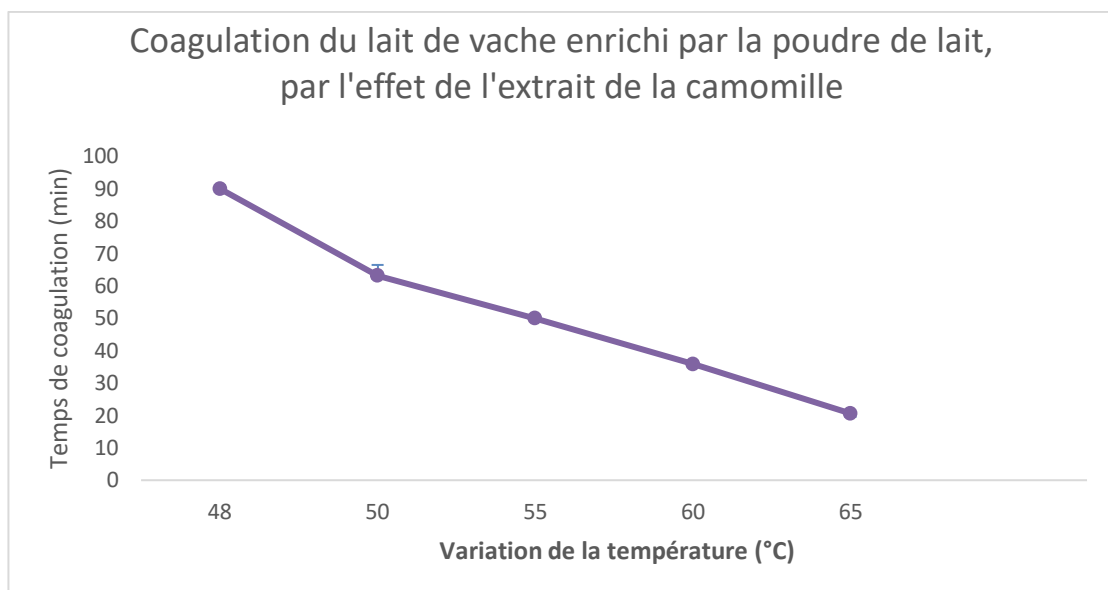
1-3/ Protocole 03 avec Lait de vache enrichi par la poudre de lait comme substrat

Figure 11 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait de vache enrichi par la poudre de lait, par l'effet de l'extrait de la camomille en fonction de la variation de la température.

1-4/ Protocole 04 avec Lait de vache comme substrat et l'ajout de trypsine à l'extrait de plante

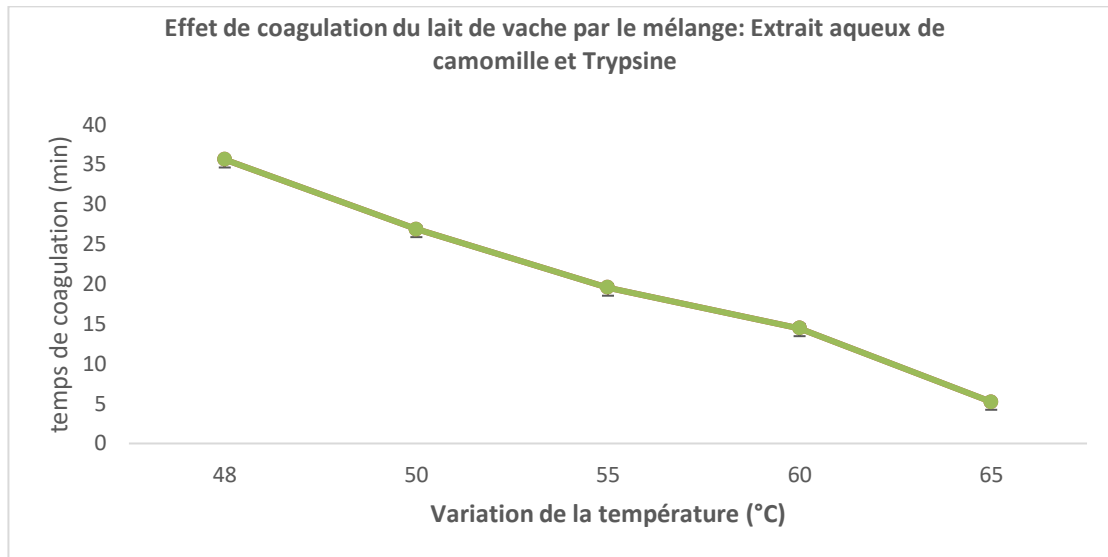


Figure 12 : Graphique montre la variation du temps de coagulation du lait de vache par le mélange (extrait de camomille et trypsine) en fonction de la variation de la température.

D'après les résultats illustrés sur les figures 09,10,11et12, nous remarquons que l'activité coagulante s'est exprimée à hautes températures, notamment à partir de 55°C dans tous les graphes où le temps de coagulation est bas ($4,01 \pm 0,55$ min (Figure 09), $9,73 \pm 0,25$ min (Figure 10) et $20,61 \pm 0,36$ min (Figure11), $5,23 \pm 0,29$ min (Figure12) à 65°C et pH=6,5). Par contre, à basse température (entre 50°C et 48 °C), le temps de coagulation est élevé ($90 \pm 0,97$ min (Figure 11), $35,64 \pm 0,35$ min (Figure12), $45,26 \pm 0,87$ min (Figure10), $30,15 \pm 0,07$ min (figure09) à 48°C et pH=6,5).

Le fait que l'activité coagulase soit exprimée à des températures élevées, en particulier à partir de 55°C, suggère que la coagulase contenue dans l'extrait testé est thermostable. Cela signifie qu'elle pourrait être utilisée dans des applications industrielles nécessitant des températures élevées, ce qui est encourageant du point de vue de l'industrie. Selon (Sudhakar et al.,2016) il est souvent préférable dans l'industrie d'utiliser des enzymes thermostables, c'est-à-dire capables de maintenir leur activité même à des températures élevées. Cette caractéristique permet d'optimiser les processus industriels en évitant la dégradation ou la perte d'activité de l'enzyme due à la chaleur. Ainsi, il est possible de substituer la présure par l'extrait enzymatique de camomille dans la coagulation du lait.

Cependant, l'activité enzymatique dépend de la température optimale propre à chaque enzyme. Lorsque la température baisse, le mouvement moléculaire diminue, entraînant un ralentissement de la cinétique enzymatique et finalement l'inactivation de l'enzyme (Robitaille et al., 2012).

En effet, lorsque la température du milieu augmente, les particules telles que les molécules ou les ions deviennent plus agitées. Cette agitation accrue favorise les rencontres entre les différents réactifs.

Les molécules se heurtent les unes aux autres et libèrent de l'énergie, ce qui permet d'atteindre plus rapidement l'énergie d'activation nécessaire pour déclencher la réaction. Ainsi, l'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction. Cependant, au-delà d'un certain niveau d'activité thermique, l'effet positif diminue en raison de la dénaturation (**Özer et al., 2010; Kumar et al., 2012; Bayraktar et Önal, 2013**).

Selon **Raposo et Domingos (2008)**, il a été observé que les protéases végétales présentent une stabilité thermique supérieure à celle de la chymosine à des températures élevées, ce phénomène ayant déjà été constaté dans des extraits de plantes telles que l'extrait de *C. calcitrapa*. Cette constatation est confirmée par plusieurs auteurs, qui soulignent que les protéases végétales sont généralement très résistantes à la chaleur et ont une température optimale d'activité coagulante bien plus élevée que les protéases d'origine animale (**Roseiro et al., 2003 ; Sidrache et al., 2005 ; Chazzarra et al., 2007**). Par conséquent, cela justifie l'augmentation de l'activité coagulante en augmentant la température de 55°C à 65°C.

2/Effet de la trypsine sur l'activité coagulase de l'extrait étudié

Il ressort à travers l'observation des temps de coagulation illustrées dans les figures 09,10,11 et 12 que la meilleure activité coagulante a été observée pour le mélange qui contient le lait de vache avec l'ajout de trypsine à l'extrait de plante (Figure 12), où nous avons un temps de coagulation réduit par rapport aux autres mélanges.

La trypsine, une enzyme protéolytique, est capable de dégrader les protéines présentes dans le lait, notamment les caséines. La coagulation du lait est un processus naturel au cours duquel les protéines du lait, principalement les caséines, se réorganisent en une structure tridimensionnelle formant des agrégats solides appelés caillé (**Cao et al., 2014**).

Cependant, lorsqu'on ajoute de la trypsine au lait, celle-ci hydrolyse les liaisons peptidiques des caséines, entraînant leur dégradation en peptides plus petits. Cette dégradation enzymatique des protéines modifie leur structure et leur capacité à former un réseau de coagulation stable (**Eissa et al., 2017**). En conséquence, l'ajout de trypsine au lait conduit généralement à une diminution du temps de coagulation. Les liaisons peptidiques essentielles à la formation d'une structure solide de caillé sont rompues, ce qui réduit la capacité du lait à former un réseau cohésif (**Remeuf et al., 2004**).

Il est essentiel de prendre en compte plusieurs facteurs, tels que la concentration de trypsine, la température, le pH et la présence d'autres substances, car ils peuvent influencer l'effet de la trypsine sur la coagulation du lait. Les conditions spécifiques peuvent favoriser ou inhiber l'action de la trypsine, ce qui entraîne des effets variables sur la coagulation du lait (**Jeleník et al., 2011**).

De plus, il est important de noter que l'utilisation de la trypsine pour la coagulation du lait est principalement observée dans des contextes de recherche ou industriels. Cette méthode n'est pas couramment utilisée dans les procédés traditionnels de fabrication de produits laitiers tels que le fromage (**Corredig et al., 2005**).

La justification de l'ajout de trypsine à l'extrait de camomille est liée à l'utilisation de présure animale dans l'industrie fromagère. Traditionnellement, la présure animale utilisée dans la fabrication du fromage contient deux enzymes principales : la chymosine, une protéase spécifique, et la pepsine, une protéase non spécifique.

La chymosine joue un rôle crucial dans la coagulation du lait en clivant spécifiquement une liaison peptidique présente dans la caséine, la protéine principale du lait. Cela entraîne la formation d'un réseau de coagulation solide, permettant la séparation du caillé et du lactosérum (**Eissa et al., 2017**). En revanche, la pepsine est une enzyme plus aléatoire qui agit de manière non spécifique sur les liaisons peptidiques, provoquant une dégradation plus générale des protéines du lait (**Eissa et al., 2017**). L'addition de trypsine à l'extrait de camomille peut donc être justifiée en raison de son potentiel à imiter l'action de la chymosine dans la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage.

En ajoutant de la trypsine, qui est également une enzyme protéolytique, à l'extrait de camomille, on peut obtenir une action plus similaire à celle de la présure animale. La trypsine est une protéase spécifique qui clive préférentiellement les liaisons peptidiques contenant des résidus spécifiques d'acides aminés. Elle peut donc contribuer à la coagulation du lait en ciblant spécifiquement les caséines. Selon **Remeuf et al., (2004)**, le mélange d'extrait de camomille, de trypsine et de lait a le potentiel de reproduire certains aspects de la coagulation du lait observée lors de l'utilisation de présure animale dans l'industrie fromagère.

3/Extraction de la coagulase par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et dialyse

L'extrait que nous utilisons dans cette partie est celui qui a donné une bonne activité coagulase dans la première partie de l'étude (Figure 12) : 1 ml de l'extrait+1ml de trypsine (**Annexe IV et V**).

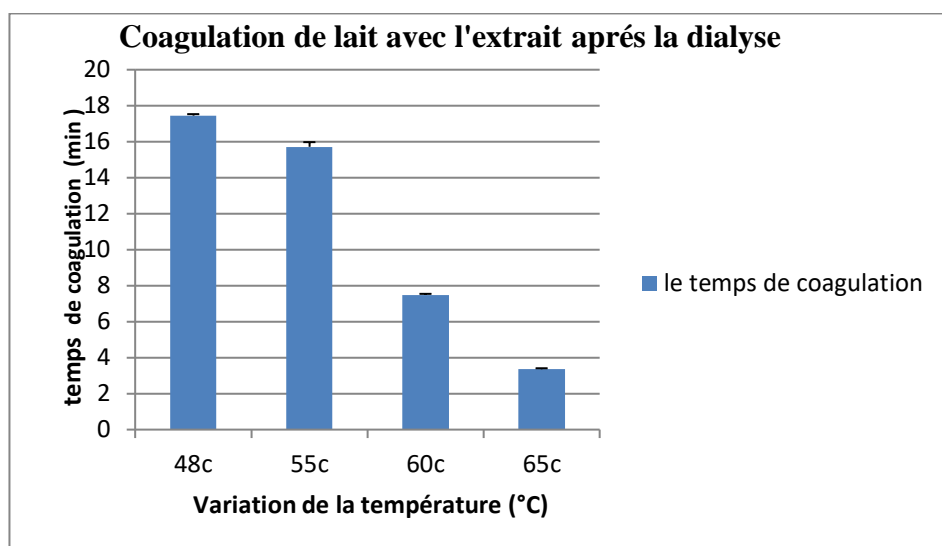


Figure 13 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l'activité coagulase de la fraction précipitée à 20% de sulfate d'ammonium, en fonction de la température.

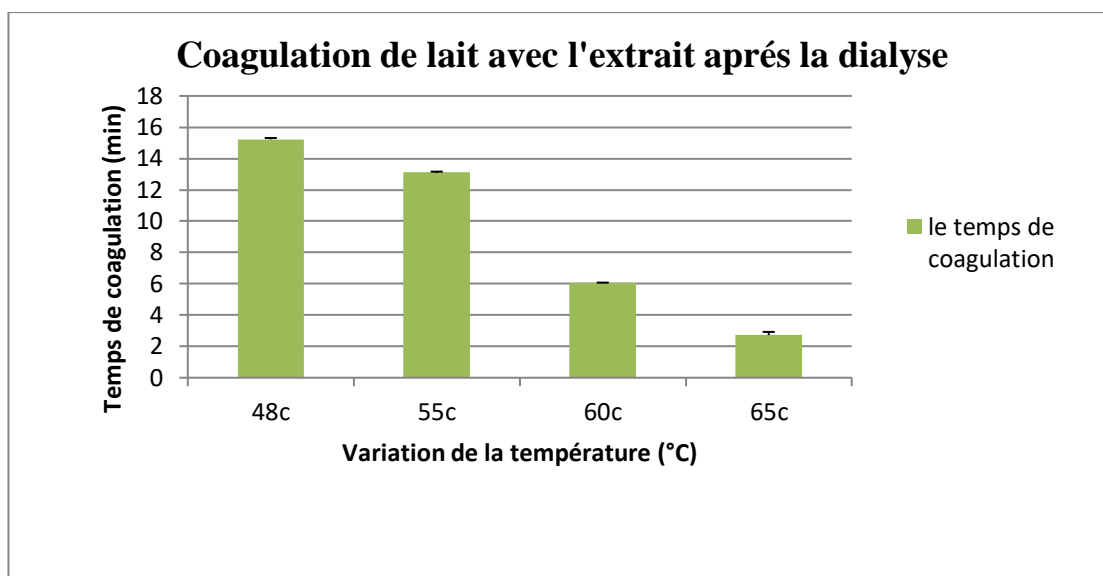


Figure 14 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l'activité coagulase de la fraction précipitée à 40% de sulfate d'ammonium, en fonction de la température.

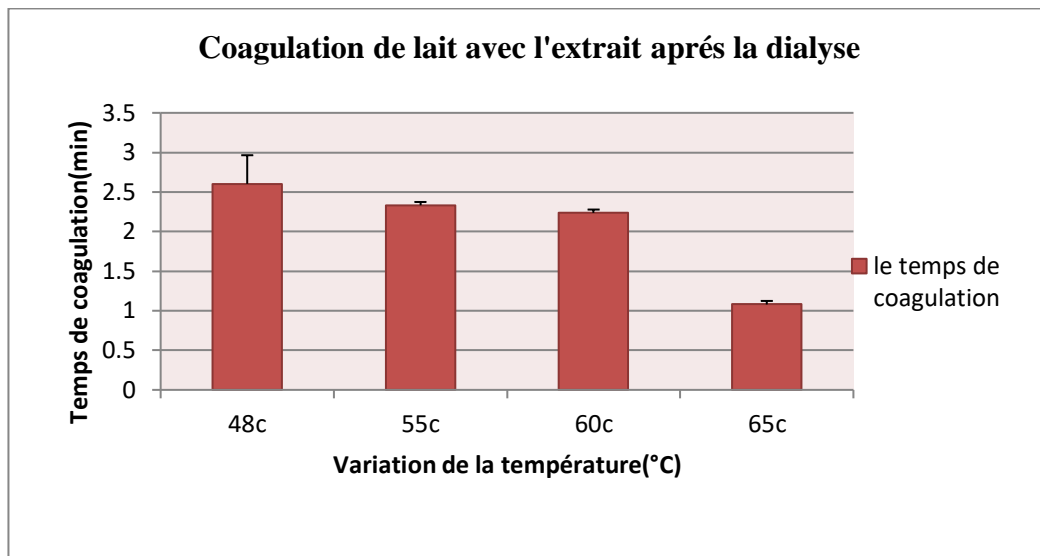


Figure 15 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l'activité coagulase de la fraction précipitée à 60% de sulfate d'ammonium, en fonction de la température.

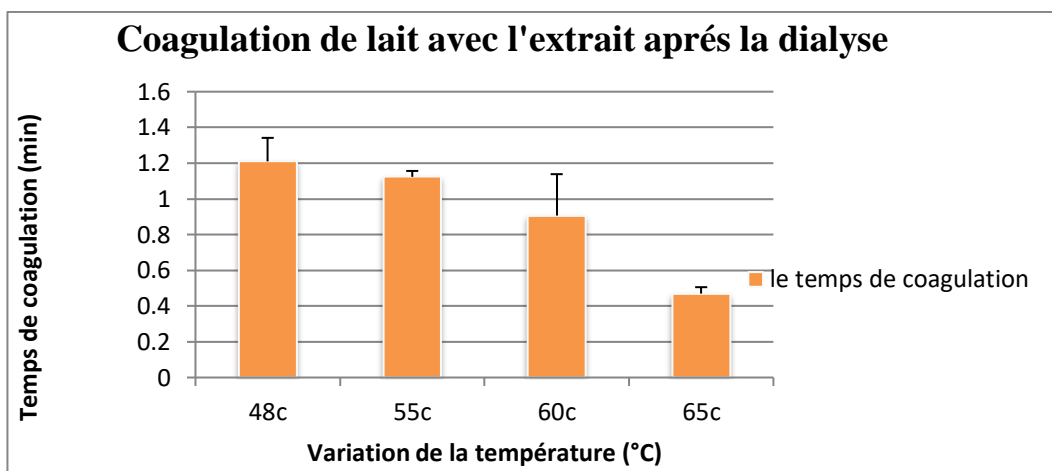


Figure16 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l'activité coagulase de la fraction précipitée à 80% de sulfate d'ammonium, en fonction de la température.

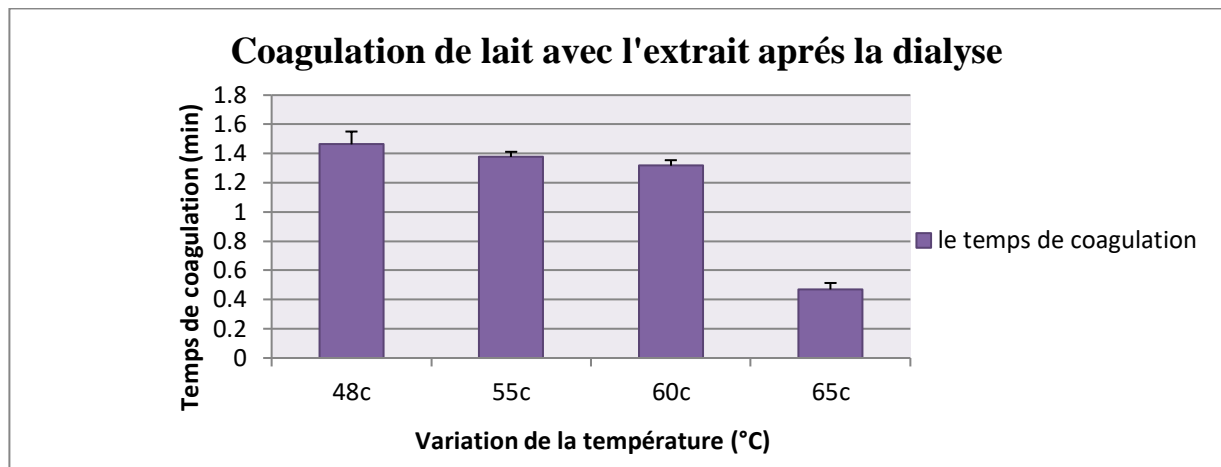


Figure 17 : Graphique représentant les valeurs en temps de coagulation, de l'activité coagulase de la fraction précipitée à 100% de sulfate d'ammonium, en fonction de la température.

D'après les résultats obtenus et montrés sur les figures 13, 14, 15, 16 et 17, la meilleure activité coagulante a été observée pour l'extrait ayant un taux de saturation en sel égal à 80% (Figure 16), où le temps de coagulation est très faible ($0,47 \pm 0,03$ min à 65°C). Lorsque nous comparons ces résultats avec ceux de la première partie (Figure 12), nous remarquons qu'il y a une diminution du temps de coagulation suite à une précipitation au sulfate d'ammonium et à une dialyse plus précise réalisées à un taux de saturation de 80%.

Une des étapes initiales des procédures de purification est souvent la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium (NH_4)₂SO₄, il va priver les protéines de leurs possibilités d'établir des liaisons hydrogènes avec l'eau du solvant. Pour la plupart des protéines on peut trouver une concentration précipitante de ce sel neutre, généralement situés entre 0,5 et 3 M. Il faut toutefois faire suivre cette étape d'une dialyse ou d'une ultrafiltration pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel. Là où les protéines précipitées se dissolvent et retrouvent leurs fonctions. Elle est utilisée comme première étape pour la purification des protéines (**Hainque et al., 2008**).

La dialyse est une étape suivante importante dans le processus de purification des protéines. Elle consiste à éliminer les sels et autres petits composés non désirés qui peuvent être présents après la précipitation au sulfate d'ammonium. La dialyse se fait en plaçant le précipité de protéines dans une membrane semi-perméable, qui permet le passage des petits composés indésirables tout en retenant les protéines (**Hainque et al., 2008**). Lorsque les sels et autres petits composés sont éliminés par la dialyse, il est possible que certains facteurs inhibiteurs de la coagulation du lait soient également éliminés. Ces facteurs peuvent inclure des ions ou des composés présents dans les sels, qui peuvent retarder la coagulation du lait. Par conséquent, une dialyse plus précise peut contribuer à éliminer ces

inhibiteurs, ce qui entraîne une diminution du temps de coagulation du lait (Park et al.,2009 ; Walstra et al., 2006).

Les protéines ont des solubilités différentes à différentes concentrations en sels. À une concentration de sulfate d'ammonium de 80%, les protéines de l'extrait de camomille peuvent devenir moins solubles, ce qui favorise leur précipitation. Il est possible que les protéines spécifiques de l'extrait de camomille présentes dans cet échantillon aient une solubilité optimale à cette concentration de sulfate d'ammonium. À 80% de saturation de sulfate d'ammonium, la plupart des protéines indésirables ou contaminants présents dans l'extrait de camomille peuvent rester en solution, tandis que les protéines d'intérêt ont une plus grande affinité pour précipiter. Cela permet une meilleure séparation entre les protéines ciblées et les autres composants indésirables de l'extrait (Park et al.,2009 ; Walstra et al.,2006).

4/Effet des cofacteurs métalliques

L'extrait que nous utilisons dans cette partie est celui qui a montré une bonne activité coagulase et qui a été extrait à 80% de saturation en sulfate d'ammonium (Figure 16), (Annexe 05).

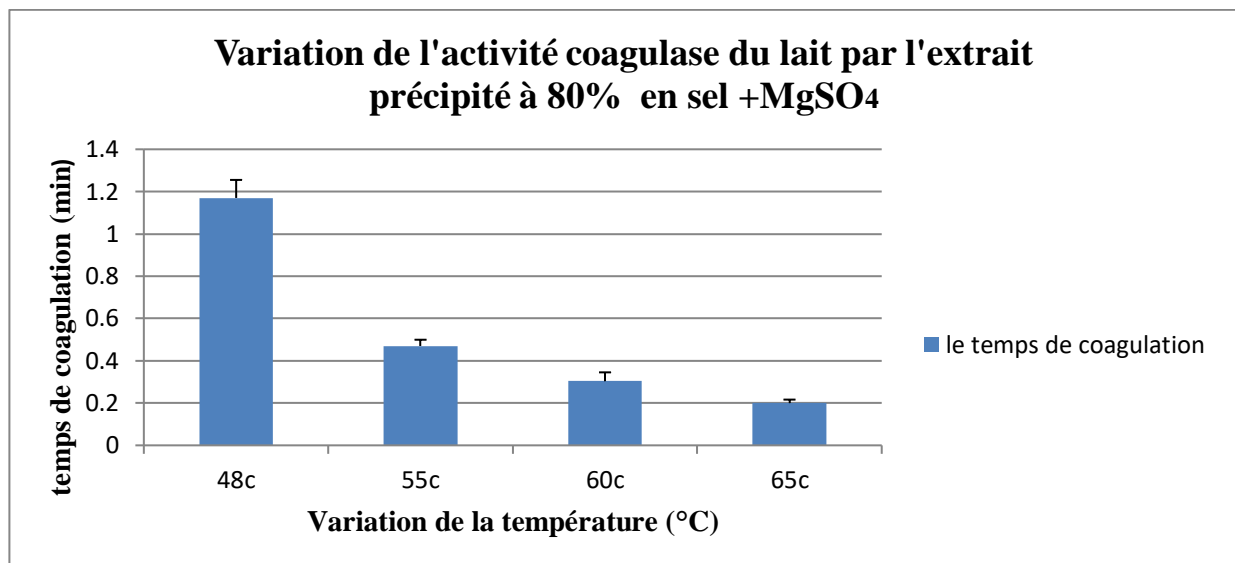


Figure 18 : Variation de l'activité coagulase du lait par l'extrait précipité à 80% en sel + MgSO4.

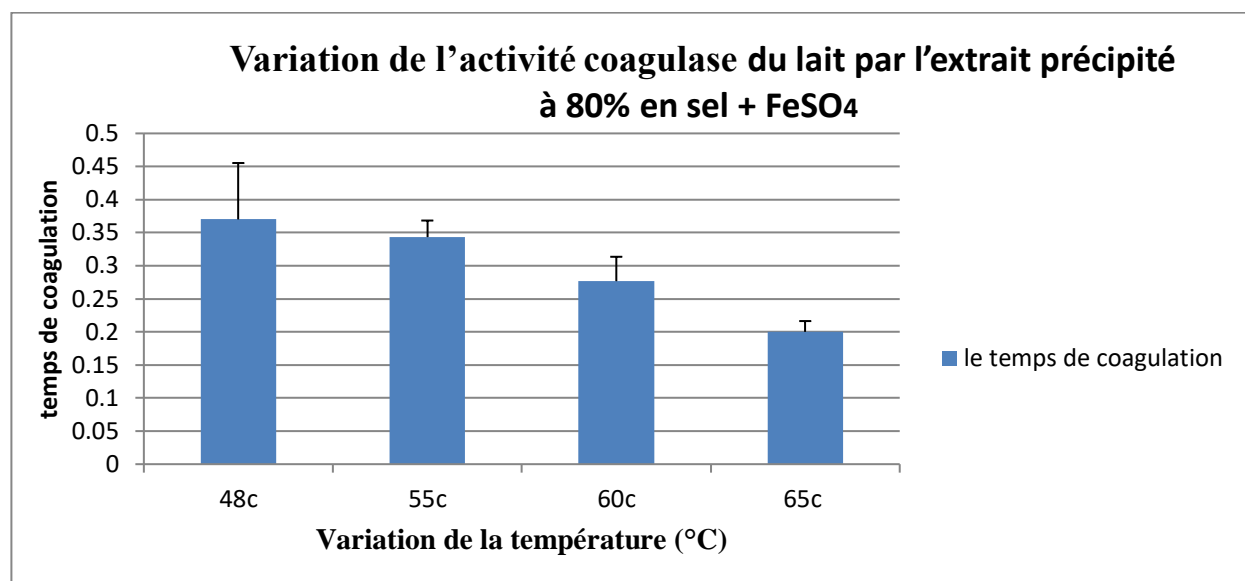


Figure19 : Variation de l'activité coagulase du lait par l'extrait précipité à 80% en sel + FeSO₄.

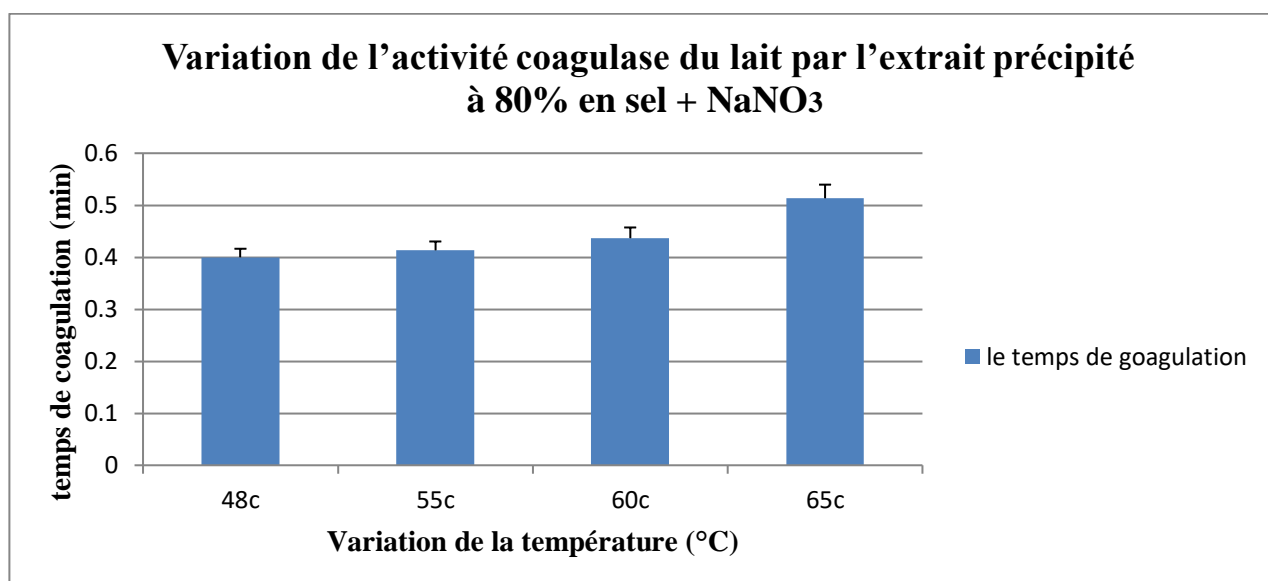


Figure20 : Variation de l'activité coagulase du lait par l'extrait précipité à 80% en sel + NaNO₃.

D'après les figures 18 et 19 on observe une diminution du temps de coagulation du lait ($0,2 \pm 0,1$ min à 65°C pour MgSO₄ et FeSO₄) suite à l'ajout de MgSO₄ et FeSO₄.

D'après la figure 20 on observe une augmentation du temps de coagulation du lait ($0,51 \pm 0,02$ min à 65°C) suite à l'ajout de NaNO₃.

Le sulfate de magnésium contient du magnésium, un cation vital pour diverses réactions enzymatiques dans les organismes vivants, notamment chez les plantes. Le magnésium joue un rôle crucial en activant certaines enzymes et en garantissant le bon fonctionnement de nombreuses voies métaboliques. En ce qui concerne l'extrait de camomille, il est envisageable que le sulfate de magnésium puisse influencer l'activité des enzymes présentes dans cet extrait (**Romani, 2013**).

Cependant, lorsque le sulfate de fer est ajouté à l'extrait de camomille, il peut interagir avec les composés présents et altérer leur activité enzymatique ou leur capacité à coaguler le lait. Cette interaction peut éventuellement entraîner une augmentation du taux de coagulation du lait. Le fer peut agir en tant que cofacteur ou activateur enzymatique (**Licheng et al., 2018**).

Le nitrate, quant à lui, peut agir en tant que régulateur de l'activité enzymatique. Par exemple, dans le cas de la nitrate réductase, son activité peut être régulée par des mécanismes d'activation ou d'inhibition dépendant du nitrate. Des concentrations élevées de nitrate peuvent stimuler l'activité de certaines enzymes, tandis que des concentrations basses peuvent l'inhiber (**Kocacinar et al., 2019**).

D'autre part, le sulfate de magnésium a la capacité de stabiliser les micelles de caséines, réduisant ainsi leur propension à se déstabiliser et à former un gel de coagulation. Cela peut entraîner une diminution du temps nécessaire à la coagulation du lait. De manière similaire, le sulfate de fer peut également influencer la coagulation du lait. Il peut agir comme un catalyseur, favorisant la formation de liaisons entre les protéines du lait et renforçant ainsi la structure du gel de coagulation (**Guinee et al., 2017**).

Des études ont révélé que des concentrations élevées de NaNO_3 peuvent inhiber la coagulation du lait en perturbant les interactions entre les protéines du lait. Cela peut entraîner une augmentation du temps de coagulation ou même une absence de coagulation (**AbdEl-Salam et al., 2013**).

Le NaNO_3 peut affecter les interactions entre les protéines du lait, en particulier les caséines. Il peut modifier la charge électrique des protéines et perturber les forces de liaison nécessaires à la coagulation. Cela peut entraîner une diminution de la capacité des protéines à former un gel de coagulation solide (**Balthazar et al., 2017**).

5/Le dosage des protéines

Selon la Courbe étalon du dosage des protéines de l'extrait de la camomille (*Chamaemelum nobile*)

$Y = 0,130x + 0,002$ donc :

$X = 0,76\text{mg/ml}$

Les résultats montrent que l'extrait de la camomille (*Chamaemelum nobile*)

contient un taux de protéines de $X = 0,76\text{mg/ml}$.

Conclusion

Conclusion

Plusieurs recherches et études ont été menées pour trouver des alternatives à la présure commerciale dans le processus de coagulation du lait. Dans ce contexte, notre travail vise à enrichir les connaissances sur les protéases coagulantes dérivées de la plante de camomille (*Chamaemelum nobile*).

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la coagulation du lait par l'extrait de camomille. Nous avons testé quatre types différents de lait (lait de vache, lait pasteurisé, lait de vache avec l'addition de trypsine à l'extrait de plante et lait de vache enrichi en poudre de lait) avec l'extrait de camomille à différentes températures : 48°C, 55°C, 60°C et 65°C. Nous avons extrait la coagulation par la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, en choisissant de taux de saturation allant de 20% à 100%, en suite après dialyse nous avons testé l'effet de certains cofacteurs MgSO₄, FeSO₄ et NaNO₃ sur la stabilité de l'activité coagulase.

Les résultats obtenus montrent que l'activité coagulante s'exprime davantage à des températures élevées, notamment à partir de 55°C, et pour le mélange contenant du lait de vache avec l'ajout de trypsine à l'extrait de plante pour un taux de saturation en sel de 80%. On observe une diminution du temps de coagulation du lait ($0,2 \pm 0,1$ min à 65°C pour le MgSO₄ et le FeSO₄) suite à l'ajout de MgSO₄ et FeSO₄, ainsi qu'une augmentation du temps de coagulation du lait ($0,51 \pm 0,02$ min à 65°C) suite à l'ajout de NaNO₃.

L'utilisation de la camomille pourrait potentiellement améliorer le processus de coagulation du lait et renforcer la qualité du caillé ou du fromage produit. Cela pourrait conduire à une amélioration des caractéristiques sensorielles et nutritionnelles du produit final. Les composants actifs de la camomille, tels que les enzymes, pourraient accélérer le processus de coagulation et favoriser la formation d'un caillé solide, ce qui augmenterait l'efficacité de la production laitière. En outre, la camomille pourrait offrir des alternatives naturelles et saines aux coagulants commerciaux traditionnellement utilisés dans l'industrie laitière. L'adoption de pratiques durables et naturelles impliquant l'utilisation de la camomille pourrait répondre à la demande croissante des consommateurs pour des produits laitiers naturels et sains, offrant ainsi des opportunités aux producteurs.

Références

Bibliographique

A

1. AbdEl-Salam, M.H., El-Baghdady, K.Z., & El-Geddawy, M.I. (2013). Effect of sodium nitrate on some properties of white cheese made from buffalo's milk. *World Applied Sciences Journal*, 21(2), 205-213
2. Abiazar r., 2007 : Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus, thèse AgroParisTech, 142p.
3. Amimour, M. : Essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (jben et klila) (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badais)2019
4. Aggarwal, B. B., & Shishodia , S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* 71(10), 1397-1421.
5. Anderson C, Lis-Balchin M, Kirk-Smith M. Evaluation of massage with essential oils on childhood atopic eczema. *Phytother Res* 2000; 14:452–456. [PubMed: 10960901].
6. Amsterdam, J.D., Li, Y., Soeller, I., Rockwell, K., & Mao, J.J. (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Matricaria recutita* (chamomile) extract therapy for generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 29(4), 378-382.
7. Arie. F, Srikumalaningsh et Ariesta.W (2012).Process engineering of drying milk powder with Foam mat drying method. *Journal of basic and Applied Scientific Research* 2(4):3588- 3592.

B

8. Bansal, N., & Fox, P. F. (2003). Enzymes Used in Cheese Manufacturing. En *Handbook of Food Enzymology* (pp. 663-680). CRC Press.Fox, P. F., &McSweeney, P. L. H. (2017). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer.
9. Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrão, L.L., Almada, C.N., Sant'Anna, C., &Esmerino, E.A. (2017). Sodium nitrate enhances proteolysis and lipolysis processes in Serrano cheese during ripening. *Food Chemistry*, 221, 1570-1578.
10. Bayraktar, H., &Önal, S. (2013). Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and purification technology*, 118, 835-841
11. Bernard et Laffitte, 1999. *Le messugué encyclopédie familiale des plantes médicinales*. France,33, 74, 109, 205p.
12. Berridge N. J., Davis J. G., Kon P. M., Kon S. K. et Spratling F. R. (1943). The production of rennet from living calves. *J. DairyRes.* 13, 145-161.

13. Bourgeois C, Mescle J F et Zucam ; 1990 : Microbiologie Alimentation ; Aspect microbiologique de la sécurité de la qualité alimentaire. Paris ; Lavoisier : Techniques et Documentation – 422p.
14. Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* 2000; 7:273–282. [PubMed: 10969720].
15. Brown, R. W., et al. (2018). Kinetic studies of enzymatic reactions: Methods and applications. *Methods in Molecular Biology*, 1456, 87-105.

C

16. Cao, J., et al. (2014). The effect of trypsin on the coagulation properties of yak milk. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3403-3413.
17. Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Ricoux L, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic
18. Cayot P, Lorient D., 1998 : Structure et techno fonction des protéines de lait. *Technique et documentation*. Lavoisier, Paris, 363p.
19. Cecchinato A, Penasa M, Cipolatgotet C, De Marchi M, Bittante G. (2012). Short communication: Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. *J. DairySci*, vol. 95,1709-1713
20. Chauhan, R., Singh, S., Kumar, V., Kumar, A., Kumari, A., Rathore, S., & Kumar, R. (2021). A Comprehensive Review on Biology, Genetic Improvement, Agro and Process Technology of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L).
21. Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D., et Rodriguez -Lopez, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393-1400.
22. Composition of Roman camomile tea. *Fitoterapia* 2004;75:32–38. [PubMed: 14693217].
23. Corredig, M., et al. (2005). Effects of trypsin on heat-induced gelation of milk. *International Dairy Journal*, 15(3), 217-224.

D

24. Dalgleish dig. et Corredig m., 2012: The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*; 3:449–467.
25. De Kruijff, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Avances in colloïd and interface science*, 171, 36-52. Delahaye, J. (2015). *Utilisations de l'ortie (Urtica dioïca L.)*.
26. Dezso C., 2011. Assessment report on *Chamaemelum Nobile* L. All., flos, Committee on Herbal Medicinal Products. 19p.

27. Dussault-Chouinard, I. (2019). Amélioration des performances fromagères des concentrés laitiers d'osmose inverse: phase de coagulation par la présure

E

28. Eissa, H. A., et al. (2017). Effect of trypsin and α -chymotrypsin on the coagulation properties of buffalo milk. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 278-286.
29. Evans S, Dizeyi N, Abrahamson PA, Person J. The effect of a novel botanical agent TBS-101 noninvasive prostrate cancer in animal models. *Anti Cancer Res* 2009 ; 10 :3917–3924

F

30. FAO. (2008). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Département de l'agriculture. <http://www.fao.org/3/t4280f/T4280F00.htm>. Consulté le (1/07/2021).
31. Fao/Oms., 2000 : Codex Alimentarius : Lait et produit laitiers, 2e édition- Rome : FAO ; OMS- 136p.
32. Fidler P, Loprinzi CL, O'Fallon JR, Leitch JM, Lee JK, Hayes DL, Novotny P, Clemens-SchutjerD, Bartel J, Michalak JC. Prospective evaluation of a chamomile mouthwash for prevention of 5-FU induced oral mucositis. *Cancer* 1996; 77:522–525. [PubMed : 8630960].
33. Florence Lecanu ,2007.lexie Guide des plantes médicinales, ED. Toulouse. Almand,85, 176, 217p.
34. Fodil O, Alouache L (2021).Étude sur l'activité de quelques extraits naturels dans la coagulation du lait pour la fabrication du fromage. Mémoire de master en Sciences Biologiques Spécialité Biochimie Appliquée , AKLI MOHAND OULHADJ , BOUIRA, 39p.
35. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. Springer.
36. Fox, P. F., Singh, T. K., &McSweeney, P. L. H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. *Special Publication-Royal Society of Chemmistry*, 150, 1-1.
37. Froc J., 2001 : Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. *INRA mensuel* n°110,41-42.

G

38. Goursaud J., 1985 : Composition et propriétés physico-chimiques. In : LUQUET F.M., *Laits et produits laitiers*. 1ère éd. Paris : Technique et documentation Lavoisier. Vol.1, 1-90.
39. Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Calhella RC, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Queiroz MG and Ferreira IC. Carvalho AM and Santos-Buelga C. Nutrients, photochemical and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*, 136(2), 2001, 718-725.

40. Guinee, T.P., Fox, P.F., & Cogan, T.M. (Eds.). (2017). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (4th Edition). Academic Press
41. Guiraud J.P., 1998 : *Microbiologie Alimentaire*. Ed Dunod, Paris, 652p.
42. Gupta, V. K., & Malhotra, S. (2014). Pharmacological attribute of chamomile (*Matricaria chamomilla*) - A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 1323-1330.

H

43. Hainque, B. (2008). *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. 2eme édition de Flammarion, p : 450.
44. Hamon N. Herbal medicine. The Chamomiles. *Can Pharm J* 1989; 612.
45. Hausen BM. A 6-year experience with *Compositae mix*. *Am J Contact Dermat* 1996; 7:94–99.[PubMed: 8796749].
46. HERAUD, 1895. *Dictionnaire des plantes médicinales*. France, 38, 65p.
47. Herbert S. A., Riaublanc B., Bouchet D., Gallant J., and Dufour E., 1999: Fluorescence spectroscopy investigation of acid or rennet-induced coagulation of milk. *J Dairy Sci* 82:2056 – 2062.
48. Hickey, M. W., & Kilcawley, K. N. (2018). Starter cultures: general aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 85-106). Academic Press.
49. HSIEH J.F. et PAN P.H. (2012). Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin ; *J. Agric. Food Chem.*; 60:2039-2045.
50. Hui, Y.H., et al. (Eds.) (2018). *Dairy Science and Technology Handbook* (2nd ed.). John Wiley & Sons.

J

51. Jeleník, E., et al. (2011). Effects of enzymatic hydrolysis of whey proteins by trypsin on the properties of reconstituted milk protein concentrate. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10), 2170-2176

K

52. D. M Kocacinar, M. Aydin, et al. (2019). Effects of NaNO₃ on the growth, yield, and antioxidant enzyme activities of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(7), 4862-4869.
53. Kyokong O, Charuluxananan S, Muangmingsuk V, Rodanant O, Subornsug K, Punyasang W. Efficacy of chamomile-extract spray for prevention of post-operative sore throat. *J Med Assoc Thai* 2002; 85:180–185.

54. Koulivand, P. H., Ghadiri, M. K., & Gorji, A. (2013). Lavender and the nervous system. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
55. Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar M, Vidyadevi T and Sivanesan S (2012) Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 74:63-72.

L

56. Licheng Yang, Jiwei Tian, Shumei Sun, et al. (2018). Iron ions inhibit the activity and antioxidant enzyme function of glutathione S-transferase from the Antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis*. Journal of Basic Microbiology, 58(2), 167-176.
57. Lefebvre-cases E., Gastaldi E., Vidal V., Marchesseau S., Lagaude A., Cuqj.L., Tarodo de la fuente B., 1998 : Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. J. DairySci., 81, 932-938.
58. Lenoir J., Remeuf F., Schneid N., 1997 : L'aptitude du lait a la coagulation par la présure. In: Le Fromage, 3ème édition, Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp: 229-256
59. Le renard, C. et al. (2015). From milk to cheese: Evolution of flavor fingerprints of Camembert-type cheeses during ripening. International Journal of Food Microbiology, 197, 14-22.
60. Liu, J., & Yang, Y. (2013). Counterfeit and substandard herbs: A major problem in today's society. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(4), 133-137.
61. Lo Piero A.R., Puglisi I. Et Petrone G., 2002: Characterization of lettuce, a serine like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. J. Agric. Food Chem. 50: 2439-2443.

M

62. Mahaut M., Jeantet R., Braule G. (2000). Initiation à la technologie fromagère. Editions Tec et Doc Lavoisier, 1-21.
63. Mahaut M., Jeantet R., Schuck P. Et Brule G., 2000 : Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. – Lavoisier : pp. 26-40.
64. Marth, E.H. and Steele, J.L. (2017). Applied Dairy Microbiology (3rd ed.). CRC Press. Ce livre couvre en détail les différentes caractéristiques microbiologiques du lait, y compris les micro-organismes spécifiques trouvés dans le lait cru et le lait pasteurisé, ainsi que leur impact sur la qualité du lait et les procédés de transformation.

65. Mazokopakis EE, Vrentzos GE, Papadakis JA, Babalis DE, Ganotakis ES. Wild chamomile (*Matricaria recuita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. *Phytomedicine* 2005; 12:25–27. [PubMed: 15693704].
66. Mekhaneg, B. (2020). Variation de la composition du lait en fonction de la race et de l'alimentation (Doctoral dissertation).
67. 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'agriculture et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.
68. Miraj, S., et Alesaeidi, S. (2016). Une étude de revue systématique des effets thérapeutiques de la camomille *Matricaria recuita* (camomille). *Médecin électronique*, 8 (9), 3024.
69. Mourice N., 2013. *Chamaemelum nobile* (camomille romain). Bulletin d'information, Hunzaroma Inc).

N

70. Newall CA, Anderson LA and Phillipson JD. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. London: Pharmaceutical Press, 1996, 72.

O

71. Özer, B., Akardere, E., Çelem, E. B., & Önal, S. (2010). Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal*, 50(3), 110-115

P

72. Park, Y. W. (2009). Bioactive components in milk and dairy products. Wiley-Blackwell.
73. Paulsen E, Andersen KE, Hausen BM. Compositae dermatitis in a Danish dermatology department in one year (I). Results of routine patch testing with the sesquiterpene lactone mix supplemented with aimed patch testing with extracts and sesquiterpene lactones of Compositae plants. *Contact Dermatitis* 1993;29:6–10. [PubMed: 8365167].
74. Pierre M. et Lys M., 2007. *Secrets des plantes pour se soigner naturellement*. Editions Artémis, Slovaquie. Pp:89-198.

R

75. Radulovi NS, Blagojevi PD, Zlatkovi BK and Pali RM. Chemotaxonomically important volatiles of the genus *Anthemis* L.- a detailed GC and GC/MS analyses of *Anthemis segetalis* Ten. From Montenegro. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56, 2006, 642-652.

76. Ramet, J. P., (1997). L'égouttage du coagulum. Le Fromage, Tec et Doc Lavoisier, Paris, 42-61.
77. Raynaud, S., 2006 : Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Doctorat spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Filière Microbiologie et Biocatalyse industrielle. Université Paul Sabatier. Toulouse, France.
78. Remeuf, F., et al. (2004). Hydrolysis of bovine caseins by trypsin: Effect on rennet coagulation properties of milk. *International Dairy Journal*, 14(8), 689-699.
79. Robitaille, G., Lapointe, C., Leclerc, D., & Britten, M. (2012). Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropéptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science*, 95(1), 1-8.
80. Romani, A. M. (2013). Magnesium in health and disease. *Metal ions in life sciences*, 13, 49-79.
81. Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., et Wilbey, A. (2003). Cheese making with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.
82. Rücker G, Mayer R and Lee KR. Peroxides as plant constituents. 6. Hydroperoxides from the blossoms of Roman chamomile, *Anthemis nobilis L.* *Arch Pharm*, 322(11), 1989, 821-826.

S

83. Srivastava, J. K., Shankar, E., & Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular medicine reports*, 3(6), 895-901.
84. Smith, J., Johnson, A., & Brown, K. "Fractionated Ammonium Sulfate Precipitation and Analysis of Protein Complexes" *Journal of Biochemical Techniques* 10.1007/s11262-018-1565-6, 2019
85. Sidrach, L., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., & Rodriguez-Lopez, J. N. (2005). Purification of cynarase from artichoke (*Cynarascolymus L.*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66, 41-49.
86. Sharifi-Rad, J., Mnyer, D., Morais-Braga, M. F. B., Salehi, B., Rodrigues, C. F., Sharopov, F., ... & Ayatollahi, S. A. (2018). Efficacy of chamomile (*Matricaria chamomilla L.*) as an anti-inflammatory agent: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 467-483.
87. CKay, D.L., & Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita L.*). *Phytotherapy Research*, 20(7), 519-530.
88. Scala C. Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol Surg* 2005;7:873–880. [PubMed: 16029681].
89. Scala G. Acute, short-lasting rhinitis due to chamomile-scented toilet paper in patients allergic to *compositae*. *IntArch . Allergy Immunol* 2006;139:330–333. [PubMed: 16508334].

90. Sharafzadeh S and Alizadeh O. German and Roman Chamomile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(10), 2001, 1- 5.
91. Shukla S, Mishra A, Fu P, MacLennan GT, Resnick MI, Gupta S. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J* 2005;19:2042–2044. [PubMed: 16230333].
92. Smith, J. et al. (2022). Dialysis after Salting Out: A General Protocol for Salt Removal in Protein Purification. *Journal of Biochemical Methods*, 45(3), 123-135.
93. Soustre Y., Farrokh C. et Jeantet R. (2017). Questions sur les produits laitiers et technologie laitière. Paris. France, 2.
94. Srivastava JK, Gupta S. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *J Agric Food Chem* 2007;55:9470–9478. [PubMed: 17939735].
95. Srivastava, JK, Shankar, E. et Gupta, S. (2010). Camomille: une phytothérapie du passé avec un avenir radieux. *Rapports de médecine moléculaire*, 3 (6), 895-901.
96. Subiza J, Subiza JL, Alonso M, Hinojosa M, Garcia R, Jerez M, Subiza E. Allergic conjunctivitis to chamomile tea. *Ann Allergy* 1990;65:127–132. [PubMed: 2382873].
97. Sudhakar, M. P., Yoo, M. J., & Cho, S. S. (2016). Thermostable microbial enzymes in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), 9821-9837.

T

98. Talantikite-Kellil, S. (2015). Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie (Doctoral dissertation, Université M'hamed Bougara de Boumerdès, Département de Tec).
99. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M and Impicciatore M. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci*, 78(13), 2006, 1419-1432.

V

100. Veisseyre R. (1979). *Technologie du lait : constitution, récolte, traitement et transformation du lait*. 3ème édition. Paris. La Maison Rustique, 714.
101. Vignola C.L., 2002 : *Science et technologie du lait : Transformation du lait – Montréal* : Presse internationale polytechnique 600p.

W

102. Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. CRC Press.
103. Way TD, Kao MC, Lin JK. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol-3'-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:4479–4489. [PubMed: 14602723].

104. Wilkinson S, Aldridge J, Salmon I, Cain E, Wilson B. An evaluation of aromatherapy massages in palliative care. *Palliat Med* 1999; 13:409–417. [PubMed: 10659113].

Z

105. Zhao J, Khan SI, Wang M, Vasquez Y, Yang MH, Avula B, Wang YH, Avonto C, Smillie TJ and Khan IA. Octulosonic acid derivatives from Roman chamomile (*Chamaemelum nobile*) with activities against inflammation and metabolic disorder. *J Nat Prod*, 77(3), 2014, 509-515.

Les sites web :

106. www.botanical.com/botanical/mgmh/c/chammo49.html
107. <https://herbarom-groupe.com>
108. <https://www.potomac.fr/en/herbarom>

Annexes

Annexe 01

Les réactifs

- Tris_HCl
- L'acide Chlorhydrique **HCL à 1 N.**
- Bleu de Coomassie-**250**
- Solution d'hydroxyde de sodium **NaOH à 1N.**
- Réactifs de Bradford.
- Chlorure de calcium **CaCl₂.**

Composition du réactif de Bradford

Voici la composition détaillée du réactif de Bradford

BBC G-250 : 100 mg

Ethanol absolu : 50 mL

Acide phosphorique à 85% : 100 mL

Eau distillée : compléter à 1000 mL

Il est recommandé de conserver ce réactif pendant 3-4 semaines à une température de 4 °C, à l'abri de la lumière.

Annexe02

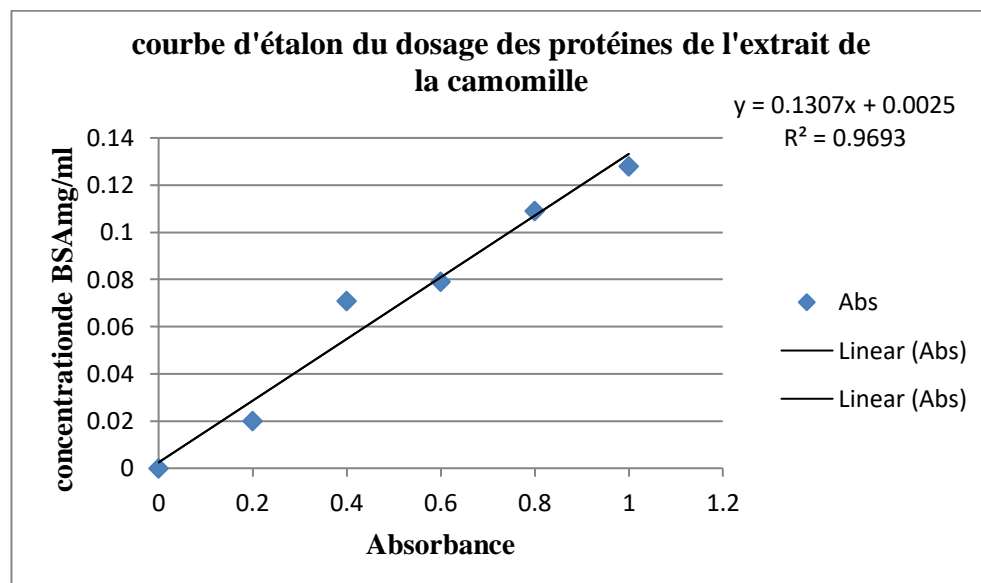


Figure : Courbe d'étalon du dosage des protéines de l'extrait de la camomille (*Chamaemelum nobile*).

Détermination de la concentration en protéines de l'extrait brut



Figure : Dosage des protéines de l'extrait brut selon la méthode de Bradford.

Détermination de la concentration en protéines de l'extrait

Selon la Courbe d'étalon du dosage des protéines de l'extrait de la camomille (*Chamaemelum nobile*)

$Y = 0,130x + 0,002$ donc :

$X = 0,76 \text{ mg/ml}$

Annexe 03

Les résultats :

1. Lait de vache (1mL de lait et 1ml d'extrait)

➤ Pour une température d'A 48 C°

Tubes	Tube1	Tube2	Tube 3
Temps (min)	30,07 min (1804,2s)	30,18 min (1810,8s)	30,20 min(1812s)



Figure : (+) de coagulation

➤ Pour la température d'A 50 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	14,28 min (856,8s)	14,33 min (859,8s)	14,50 min (870s)



Figure : (+) de coagulation

➤ Pour la température d'A 55 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	13,24 min (794,4s)	13,33 min (799,8s)	13,37 min (802,2s)



Figure : (+) de coagulation

➤ Pour la température d'A 60 C°

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	7,47min (448,2s)	8,15 min (489)	8,52 min (511,2)

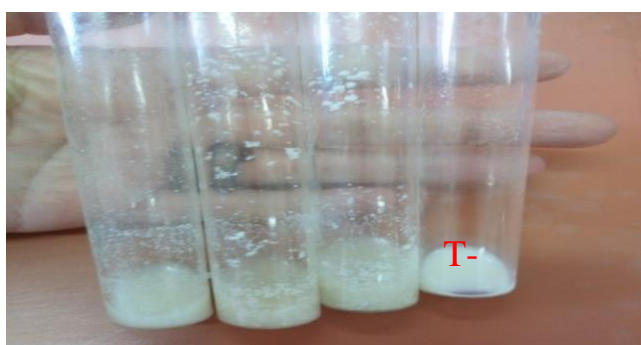


Figure : (+) de coagulation

➤ Pour la température d'A 65 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	3,41min (204,6s)	4,15 min (249s)	4,50 min (270s)



Figure : (+) de coagulation

2. Lait pasteurise (1mL de lait et 1ml d'extrait)

➤ Pour une température d'A 48 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	44,30 min(2658 s)	45,48 min(2728,8 s)	46,01 min(2760,6 s)



Figure : (+) de coagulation

➤ Pour une température d'A 50 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	42,37 min (2542,2)	42,45 min (2547 s)	43,03 min (2581,8s)



Figure : (+) de coagulation

➤ Pour une température d'A 55 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	27,15 min (1629 s)	27,35 min (1641s)	28,08 min (1684,8 s)

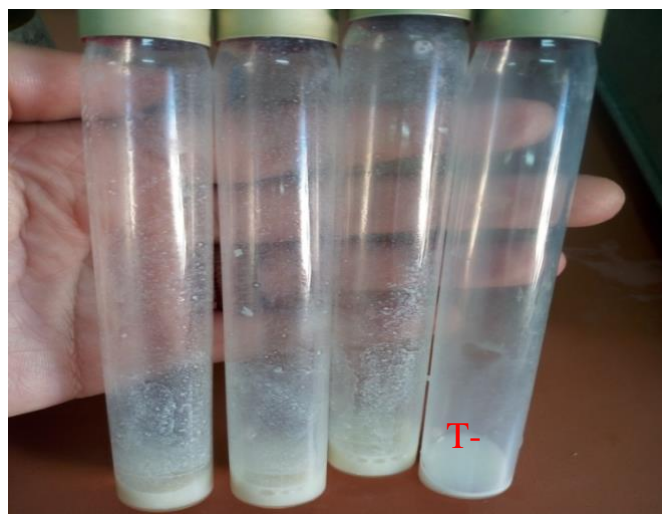


Figure : (+) de coagulation

➤ Pour une température d'A 60 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	20,28 min (1216,8 s)	20,03 min (1201,8 s)	21,50 min (1290 s)



Figure : (+) de coagulation

➤ Pour une température d'A 65 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	9,58 min (574,8 s)	9,59 min (574,4s)	10,03 min (601,8s)

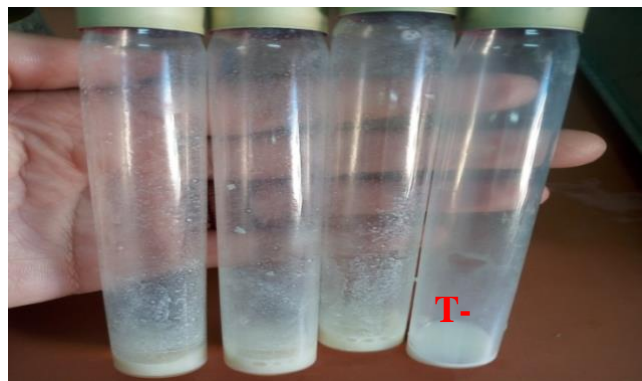


Figure : (+) de coagulation

3. Lait de vache enrichi par la poudre de lait (1 ml de lait + 1ml de l'extrait).

➤ Pour une température d'A 48 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	89min(5340s)	90min(5400s)	91min (5460 s)

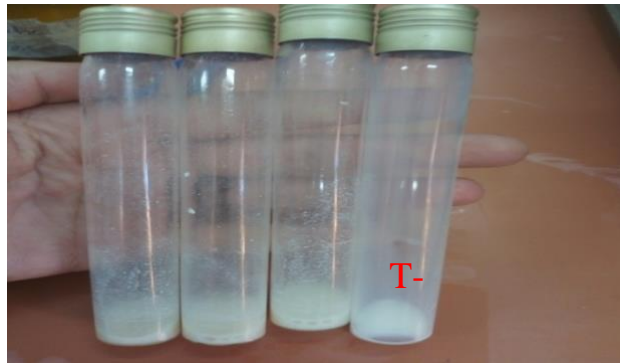


Figure : (+) de coagulation

➤ Pour une température d'A 50 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	64min (3840 s)	59,57min (3574,2 s)	66min(3960 s)

➤ Pour une température d'A 55 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	49,57min (2974,2s)	50,03min (3001,8s)	50,47min (3028,2s)

➤ Pour une température d'A 60 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	35,59 min (2135,4s)	36,05min (2163s)	36,12min (2167,2s)

➤ Pour une température d'A 65 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	20,35min (1221s)	20,47min (1228,2s)	21,03min (1261,8s)



Figure : (+) de coagulation

Annexe 04

Précipitation sulfate d'ammonium

Calculer la quantité de sulfate d'ammonium pour 20%,40 %,60% ,80% et 100%

Selon l'équation :

$$g = 515(X - X_0) / 100 - 27x \quad \longrightarrow \quad X_0 = 0$$

Le pourcentage (%)	La quantité de sulfate d'ammonium(g)
20%	0,544g
40%	1,15g
60%	1,84g
80%	2,62g
100%	3,527g

Annexes 05

Les résultats d'essai de l'activité coagulase que nous avons obtenus après la précipitation au sulfate d'ammonium et la dialyse

➤ Pour un taux de saturation de 20 % et 40% et 60% et 80% et 100%

200 ul de l'extrait après dialyse (4h) +200 ul de trypsine + 200ul de lait de vache (250 ml de lait + 0,55g CaCl₂)

➤ 20% (Pour une température d'A 48 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	17,45min (1047s)	17,37min (1042,2s)	17,55min (1053s)

➤ 20%(Pour une température d'A 55 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	15,58min (934,8s)	16,08min (964,8s)	15,49min (929,4s)

➤ **20%**(Pour une température d'A 60 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	7,41min (444,6s)	7,50min (450s)	7,55min (453s)

➤ **20%**(Pour une température d'A 65 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	3,30min (198s)	3,36 min (201,6s)	3,42 min (205,2s)

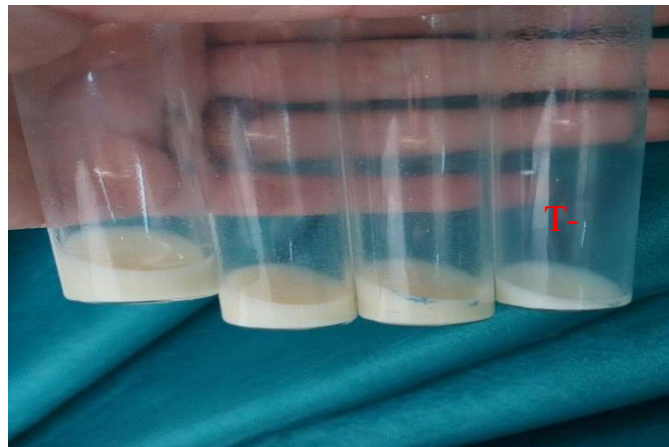


Figure : (+) de coagulation

➤ **40%**(Pour une température d'A 48 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	15,11min (906,6s)	15,23min (918,8s)	15,33min (919,8s)

➤ **40%**(Pour une température d'A 55 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	13,04min (782 ,4s)	13,12min (787,2s)	13,17min (790,2s)

➤ **40%(Pour une température d'A 60 °C)**

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	6,01min (360,6s)	6,05min (363s)	6,08min (364,8s)

➤ **40%(Pour une température d'A 65 °C)**

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	2,57min (154,2s)	2,59min (155,4s)	3,01min(180,6s)



Figure : (+) de coagulation

➤ **60%(Pour une température d'A 48 °C)**

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	2,48min (148,8s)	2,32min (139,2s)	3,01min (180,6s)

➤ **60%(Pour une température d'A 55 °C)**

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	2,37min (142,2s)	2,29min (137 ,4s)	2,34min (139,2s)

➤ **60%(Pour une température d'A 60 °C)**

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	2,27min (136,2s)	2,19min (131,4s)	2,25min (135s)

➤ **60%**(Pour une température d'A 65 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,05min (63s)	1,13min (67,8s)	1,06min (63,6s)



Figure : (+) de coagulation

➤ **80%**(Pour une température d'A 48 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,03min (61,8s)	1,34min (80,4s)	1,26min (75,6s)

➤ **80%**(Pour une température d'A 55 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,08min (64,8s)	1,16min (69,6s)	1,13min (67,8s)

➤ **80%**(Pour une température d'A 60 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,05min (63s)	1,09 min (65,4s)	0,58min (34,8s)

➤ **80%**(Pour une température d'A 65 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,42min (25,2s)	0,50min (30s)	0,49min (29,4s)

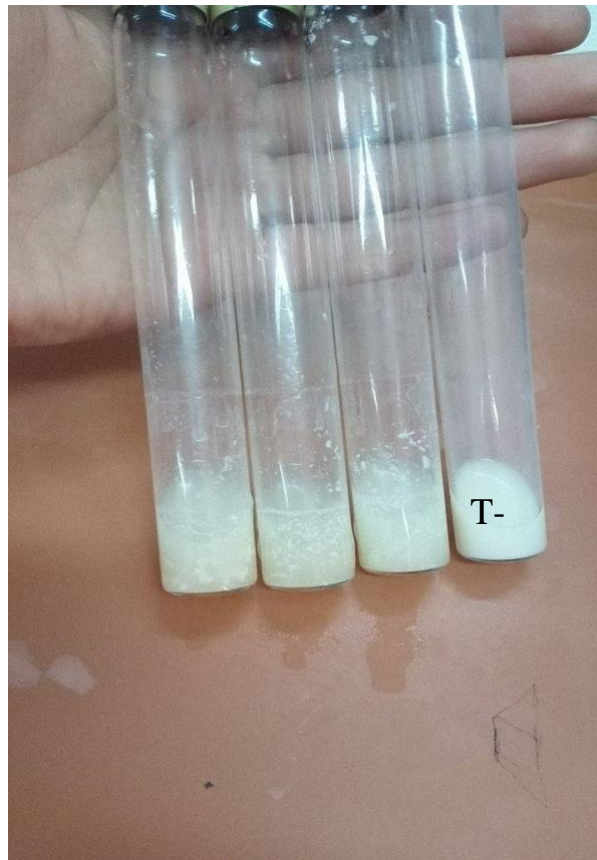


Figure : (+) de coagulation

➤ **100%**(Pour une température d'A 48 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,44min (86,4s)	1,56min (93,6s)	1,39min (83,4s)

➤ **100%**(Pour une température d'A 55 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,38min (82,8s)	1,34min (80,4s)	1,41min(84,6s)

➤ **100%**(Pour une température d'A 60 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,30min (78s)	1,36min (81,6s)	1,29min (77,4s)



Figure : (+) de coagulation

➤ **100%**(Pour une température d'A 65 °C)

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,20min (72s)	1,19min (71,4s)	0,59min (35,4s)



Figure : (+) de coagulation

Résultats de l'essai sur l'effet des cofacteurs métalliques :

200 ul (de l'extrait de taux de saturation **80%**) + 200ul de trypsine +200ul de lait de vache +100 ul de (MgSO₄) / (Fe SO₄) / (Na NO₃)

1) MgSO₄

➤ Pour une température d'A 48 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	1,05min (60s)	1,22min (73,1s)	1,24 min(74,4s)

➤ Pour une température d'A 55 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,48min (28,8s)	0,43min (25,8s)	0,50min (30s)

➤ Pour une température d'A 60 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,26min (15,6s)	0,36min (21,6s)	0,29min (17,4s)

➤ Pour une température d'A 65 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,18min (10,8s)	0,22min (13,2s)	0,20min (12s)

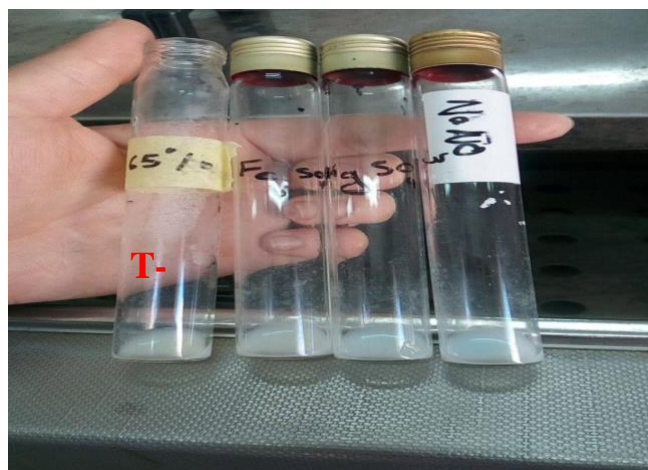


Figure : (+) de coagulation

2) Fe SO₄

➤ Pour une température d'A 48 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,32min (19,2s)	0,49min (29,4s)	0,30min (18s)

➤ Pour une température d'A 55 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,35min (21s)	0,37(22,2s)	0,31(18,6s)

➤ Pour une température d'A 60 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,23min (13,8s)	0,32min(19,2s)	0,28min (16,8s)

➤ Pour une température d'A 65 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,17min (10,2s)	0,25min (15s)	0,19min (11,4s)



Figure : (+) de coagulation

3) Na NO₃

➤ Pour une température d'A 48 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,38min (22,8s)	0,40min (24s)	0,42min (25,2s)

➤ Pour une température d'A 55 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,42min (25,2s)	0,43min (25,8s)	0,39min (23,4s)

➤ Pour une température d'A 60 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,44min (26,4s)	0,46min (27,6s)	0,41min (24,6s)

➤ Pour une température d'A 65 °C

Tubes	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Temps (min)	0,50min (30s)	0,55min (33s)	0,49min (29,4s)



Figure : (+) de coagulation

Résumé

La présure est un coagulant traditionnel utilisé dans la fabrication du fromage, Aujourd'hui la recherche cherche des alternatives économiques offrant les mêmes résultats, qui consiste à remplacer la présure par des protéases d'origine végétale. L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence et de caractériser l'activité coagulase sur le lait, de l'extrait aqueux de la camomille. Pour cela Nous avons testé 4 types différents de lait (lait de vache, lait pasteurisé, lait de vache avec l'addition de trypsine à l'extrait de plante et lait de vache enrichi en poudre de lait) avec l'extrait de camomille à différentes températures : 48°C, 55°C, 60°C et 65°C. Nous avons extrait la coagulation par la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, en choisissant de taux de saturation allant de 20% à 100%, en suite après dialyse nous avons testé l'effet de certains cofacteurs $MgSO_4$, $FeSO_4$ et $NaNO_3$ sur la stabilité de l'activité coagulase. Les résultats obtenus montrent que l'activité coagulante s'exprime davantage à des températures élevées, notamment à partir de 55°C, et pour le mélange contenant lait de vache avec l'addition de trypsine à l'extrait de plante avec un taux de saturation en sel égal 80%. On observe une diminution du temps de coagulation du lait ($0,2\pm 0,1$ min à 65°C pour le $MgSO_4$ et le $FeSO_4$) suite à l'ajout de $MgSO_4$ et $FeSO_4$, ainsi qu'une augmentation du temps de coagulation du lait ($0,51\pm 0,02$ min à 65°C) suite à l'ajout de $NaNO_3$. Enfin, les résultats obtenus convergent vers la possibilité de substitution de la présure par l'extrait de la camomille.

Mots-clés : sulfate d'ammonium ; dialyse ; Bradford ; coagulase ; lait ; camomille.

Abstract

Rennet is a traditional coagulant used in cheese making. Today, research is seeking economical alternatives that offer the same results, which involve replacing rennet with plant-based proteases. The main objective of this study was to highlight and characterize the coagulase activity on milk using aqueous chamomile extract. To achieve this, we tested four different types of milk (cow's milk, pasteurized milk, cow's milk with the addition of trypsin to the plant extract, and cow's milk enriched with milk powder) with chamomile extract at different temperatures: 48°C, 55°C, 60°C, and 65°C. We extracted coagulation through fractional precipitation with ammonium sulfate, using saturation levels ranging from 20% to 100%. Following dialysis, we tested the effect of certain cofactors ($MgSO_4$, $FeSO_4$, and $NaNO_3$) on the stability of coagulase activity. The results obtained show that coagulating activity is more pronounced at higher temperatures, especially from 55°C onwards, and for the mixture containing cow's milk with the addition of trypsin to the plant extract, with a salt saturation level of 80%. We observed a decrease in milk coagulation time (0.2 ± 0.1 min at 65°C for $MgSO_4$ and $FeSO_4$) following the addition of $MgSO_4$ and $FeSO_4$, as well as an increase in milk coagulation time (0.51 ± 0.02 min at 65°C) following the addition of $NaNO_3$. Finally, the results obtained suggest the possibility of substituting rennet with chamomile extract.

Keywords: ammonium sulfate; dialysis; Bradford; coagulase; milk; chamomile

ملخص

لكيماوية التقليدية تستخدم عادة كمتخثر في صناعة الجبن. ومع ذلك، تزايدت الأبحاث لإيجاد بدائل أقل تكلفة توفر نتائج مماثلة. تظهر اتجاهات جديدة تقوم بتعويض المتخثر بإنزيمات نباتية. كان الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو إيراز وتوصيف نشاط المتخثر على الحليب من خلال الشاي المستخلص من البابونج. لهذا الغرض، قمنا بتجربة أربعة أنواع مختلفة من الحليب (حليب البقر، حليب مبستر، حليب البقر مع إضافة الثريسين إلى المستخلص النباتي وحليب البقر المخصب بمسحوق الحليب) مع مستخلص البابونج في درجات حرارة مختلفة: 48 درجة مئوية، 55 درجة مئوية، 60 درجة مئوية و 65 درجة مئوية. قمنا بفصل التخثر بالترسيب الكسري باستخدام كبريتات الأمونيوم، واخترنا نسب تشبع تتراوح بين 20% إلى 100% بعد ذلك، قمنا باختبار تأثير بعض المساعدات العاملة المشتركة تظهر النتائج المتحصل مثل كبريتات المغنيسيوم وكبريتات الحديد و نترات الصوديوم على استق رار نشاط المتخثر من 55 درجة مئوية، وللمزيج الذي عليها أن نشاط التخثر يتجلى بشكل أكبر عند درجات حرارة مرتفعة، خاصة ابتداء يحتوي على حليب البقر مع إضافة الثريسين إلى المستخلص النباتي مع معدل تشبع للملح يساوي 80% نشهد تقلباً في وقت تخثر الحليب (0.2±0.1 دقيقة عند 65 درجة تشير النتائج المحصل عليها إلى إمكانية استبدال اللبنة بمستخلص البابونج كما يمكن استخدامه في مجالات أخرى أو لأغراض تكنولوجية وصناعية.

كلمات مفتاحية: كبريتات الأمونيوم؛ الغسيل الكلوي؛ برادفورد؛ كواغولاز؛ الحليب؛ البابونج