

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Ecole Nationale Polytechnique  
Ecole Doctorale « Ingénierie et Environnement »

Option :

Gestion et Protection de l'Environnement

En vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

*Thème*

*Extraction et caractérisation de quelques plantes locales  
à pouvoir coagulant le lait*

Présenté par M<sup>me</sup> DOUAG-TIRICHINE Nassima

**Jury:**

|               |                                |                              |
|---------------|--------------------------------|------------------------------|
| Président     | : M <sup>r</sup> MAMMERY N.    | Professeur (ENP)             |
| Rapporteur    | : M <sup>r</sup> BELLAL M.M.   | Professeur (ENSA)            |
| Examinatrices | : M <sup>me</sup> ABDI N.      | Maître de Conférences (ENP)  |
|               | : M <sup>me</sup> MOUHOUCHE F. | Maître de Conférences (ENSA) |

*Année Universitaire : 2009 - 2010*

# Dédicaces

*Je voudrais dédier ce travail en signe de gratitude et de reconnaissance à mon père et ma mère, à qui je dois toute une grande partie de mon éducation et ma formation, et pour leurs encouragements afin de construire mon avenir.*

*À mon cher époux Salim, qui a été d'une grande aide et d'une grande patience.*

*À mon adorable fille « Amira ».*

*À mes chers frères Lyes et Nounou.*

*À mes beaux parents, et mes belles sœurs: Nacera, Assma, Soumia et Salima ainsi que Aziza.*

*À mes grands parents Baba Ibrahim et Mama Chacha, pour leurs encouragements et leur estime.*

*À ma grand-mère Mama Taazizt, et à la mémoire de mon grand père, « Allah yarahmou ».*

*À tous mes oncles, et mes tantes.*

*À tous mes cousins et cousines.*

*À tous mes amies surtout Samia.*

*Nassima*

# Remerciements

*Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.*

*Il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements à mon enseignant, mon promoteur Mr BELLAÏ M.M., Professeur au Département de Technologie Alimentaire à l'École Supérieure Nationale Agronomique d'Alger, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour ses précieux conseils et encouragements. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a témoigné.*

*Je tiens à remercier Mr NOUANI, Maître de Conférences à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, pour son aide précieuse et pour l'accueil qu'il m'a toujours réservé dans son laboratoire.*

*Mon profond respect et mes sincères remerciements vont à Mr MAMMERI N., Professeur à l'École Nationale Polytechnique d'Alger, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce jury et d'apprécier la qualité de ce travail.*

*Je tiens à remercier Mme Abdi N., Maître de Conférences à l'École Nationale Polytechnique d'Alger, pour avoir accepté de porter un jugement éclairé sur ce mémoire.*

*Mes remerciements vont également à Mme MOUHOUCHE F., Maître de Conférences à l'École Nationale Supérieure Agronomique d'Alger, qui a bien voulu examiner ce travail.*

# SOMMAIRE

|   |           |
|---|-----------|
| INTRODUCTION .....  | 8         |
| <b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>   |           |
| <b>I. Plantes à pouvoir coagulant le lait .....</b>                     | <b>10</b> |
| 1. Inventaire des plantes à pouvoir coagulant le lait en Algérie .....  | 10        |
| 2. Importance des plantes à pouvoir coagulant le lait .....             | 11        |
| 3. Aspects botaniques et agronomiques de quelques plantes locales ..... | 13        |
| 3.1. Artichaut .....  | 13        |
| 3.2. Chardon Marie .....  | 14        |
| 3.3. Figuiers de Barbarie .....   | 15        |
| <b>II. Les succédanés de présure .....</b>                              | <b>17</b> |
| 1. Les succédanés de présure d'origine végétale .....                   | 18        |
| 2. Les succédanés de présure d'origine animale .....                    | 19        |
| 3. Les succédanés de présure d'origine microbienne .....                | 20        |
| <b>III. Lait et coagulation .....</b>                                   | <b>21</b> |
| 1. Lait, substrat des protéases .....                                   | 21        |
| 2. Les constituants du lait .....                                       | 21        |
| 3. Les caséines .....   | 22        |
| 4. Phénomène de coagulation .....                                       | 23        |
| 4.1. Coagulation acide .....  | 23        |
| 4.2. Coagulation par la présure .....                                   | 24        |
| 4.3. Coagulation mixte .....  | 25        |
| 5. Facteurs de la coagulation enzymatique .....                         | 25        |
| 5.1. Nature et concentration en enzyme .....                            | 25        |
| 5.2. Température du lait .....  | 26        |
| 5.3. pH du lait .....   | 26        |
| 5.4. Composition du lait .....  | 27        |
| <b>MATERIEL ET METHODES</b>   |           |
| <b>I. Matières végétales employées .....</b>                            | <b>28</b> |
| 1. L'artichaut : <i>Cynara scolymus</i> L. ....                         | 28        |
| 2. Le chardon Marie : <i>Silybum marianum</i> .....                     | 29        |
| 3. Le figuier de Barbarie : <i>Opuntia ficus indica</i> .....           | 29        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| II.   | Extraction des enzymes de <i>Cynara scolymus</i> , <i>Silybum marianum</i><br>et <i>Opuntia ficus indica</i> ..... | 30 |
| III.  | Méthodes d'analyse physicochimique .....   | 33 |
| 1.    | Détermination du taux d'humidité (%).....  | 33 |
| 2.    | Détermination de la matière sèche (%).....   | 33 |
| 3.    | Dosage de la matière azotée totale (M.A.T.).....   | 33 |
| IV.   | Méthodes analytiques.....  | 34 |
| 1.    | Détermination de l'activité coagulante .....   | 34 |
| 2.    | Détermination de l'activité spécifique.....  | 35 |
| 3.    | Détermination de l'activité protéolytique.....   | 36 |
| 4.    | Dosage des protéines totales.....  | 36 |
| V.    | Purification partielle de l'extrait enzymatique d'artichaut .....  | 36 |
| 1.    | Concentration de l'extrait enzymatique brut par dialyse.....   | 37 |
| 2.    | Chromatographie d'exclusion moléculaire (Gel filtration) .....   | 37 |
| VI.   | Estimation du poids moléculaire de la Cynarase .....   | 40 |
| VII.  | Rendement d'extraction et de purification des extraits d'artichaut.....  | 41 |
| 1.    | Rendement d'extraction.....  | 41 |
| 2.    | Rendement de purification.....   | 41 |
| VIII. | Caractérisation de l'extrait enzymatique purifié d'artichaut<br>et de la présure.....                              | 43 |
| 1.    | pH optimal.....  | 43 |
| 2.    | Température optimale .....   | 43 |
| 3.    | Concentration en CaCl <sub>2</sub> optimale.....   | 43 |
| 4.    | Concentration en enzyme optimale .....   | 44 |
| IX.   | Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS) .....  | 44 |
| 1.    | Principe .....   | 44 |
| 2.    | Méthode .....  | 45 |
| 3.    | Réactifs .....   | 45 |

## RESULTATS ET DISCUSSION

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | Recherche de l'activité coagulante dans les trois végétaux utilisés .....   | 50 |
| II.  | Résultats de l'analyse physico-chimique des fleurs d'artichaut.....   | 51 |
| III. | Résultats de l'extraction enzymatique de l'extrait coagulant d'artichaut....                                      | 51 |
| 1.   | Choix du procédé d'extraction .....   | 51 |
| 2.   | Résultats de la caractérisation apparente et analytique de l'extrait coagulant de<br><i>Cynara scolymus</i> ..... | 53 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| IV.  | Purification de l'extrait coagulant de <i>Cynara scolymus</i> .....                               | 54 |
| V.   | Rendement d'extraction et de purification des extraits enzymatiques .....                         | 59 |
| 1.   | Rendement d'extraction.....   | 59 |
| 2.   | Rendement de purification.....  | 60 |
| VI.  | Caractérisation de l'extrait coagulant purifié de <i>Cynara scolymus</i><br>et de la présure..... | 61 |
| 1.   | Influence du pH du lait .....   | 61 |
| 2.   | Influence de la température du lait.....  | 62 |
| 3.   | Influence de la concentration en CaCl <sub>2</sub> .....  | 64 |
| 4.   | Influence de la concentration en extrait enzymatique .....  | 65 |
| 5.   | Activité protéolytique .....  | 66 |
| VII. | Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS) .....   | 68 |
|      | <b>CONCLUSION</b> .....   | 70 |

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1:</b> Inventaire des plantes locales à pouvoir coagulant le lait en Algérie .....                                      | 10 |
| <b>Tableau 2 :</b> Quelques sources de coagulants végétaux .....   | 12 |
| <b>Tableau 3 :</b> Classification botanique de quelques plantes locales.....   | 16 |
| <b>Tableau 4 :</b> Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.....   | 18 |
| <b>Tableau 5 :</b> La composition moyenne du lait de vache .....   | 21 |
| <b>Tableau 6 :</b> La composition moyenne des différents types de lait en leurs principaux constituants (pour 100 g du lait) ..... | 22 |
| <b>Tableau 7 :</b> Caractéristiques du gel Séphadex G-75.....  | 38 |
| <b>Tableau 8 :</b> Gamme de séparation des protéines en fonction du pourcentage d'acrylamide.....                                  | 46 |
| <b>Tableau 9 :</b> Mesure du temps de coagulation dans les trois végétaux utilisés .   | 50 |
| <b>Tableau 10 :</b> Résultats de l'analyse physico-chimique des fleurs séchées d'artichaut.....                                    | 51 |
| <b>Tableau 11 :</b> Comparaison des deux méthodes d'extraction enzymatique.....  | 52 |
| <b>Tableau 12:</b> Caractérisation apparente de l'extrait enzymatique brut de <i>Cynara scolymus</i> .....                         | 53 |
| <b>Tableau 13 :</b> Caractérisation analytique de l'extrait coagulant de <i>Cynara scolymus</i> et rendement d'extraction .....    | 54 |
| <b>Tableau 14 :</b> Bilan de purification de l'extrait coagulant de <i>Cynara scolymus</i> . ..                                    | 60 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1 :</b> Représentation du système végétatif et des organes de reproduction de la fleur de l'Artichaut « <i>Cynara scolymus</i> ».....        | 13 |
| <b>Figure 2 :</b> Représentation du système végétatif et des organes de reproduction de la fleur du chardon Marie « <i>Silybum marianum</i> ».....     | 14 |
| <b>Figure 3 :</b> Les jeunes cladodes d'« <i>Opuntia ficus indica</i> ».....   | 15 |
| <b>Figure 4 :</b> Modèle de formation des micelles selon Schmidt.....  | 23 |
| <b>Figure 5 :</b> Coupe longitudinale d'un artichaut ( <i>Cynara scolymus</i> ).....   | 28 |
| <b>Figure 6 :</b> Fleurs séchées de <i>Cynara scolymus</i> .....   | 29 |
| <b>Figure 7 :</b> Chardon Marie ( <i>Silybum marianum</i> ).....   | 29 |
| <b>Figure 8 :</b> Figuier de Barbarie ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) .....  | 30 |
| <b>Figure 9 :</b> Méthode d'extraction alcoolique .....  | 31 |
| <b>Figure 10 :</b> Méthode d'extraction au tampon acétate de sodium 0,1M pH 5.....   | 32 |
| <b>Figure 11 :</b> Mesure du temps de coagulation par la méthode de Berridje .....   | 35 |
| <b>Figure 12 :</b> Concentration dans les boudins de dialyse .....   | 37 |
| <b>Figure 13 :</b> Dispositif la chromatographie d'exclusion moléculaire .....   | 39 |
| <b>Figure 14 :</b> Dispositif de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-75 utilisé pour la détermination du poids moléculaire ..... | 40 |
| <b>Figure 15 :</b> Protocole d'obtention des extraits enzymatiques purifiés à partir de l'artichaut.....   | 42 |
| <b>Figure 16 :</b> Configuration du Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS) .....  | 45 |



|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 17</b> : Gel d'acrylamide- bis-acrylamide .....  | 46 |
| <b>Figure 18</b> : Cuve pour électrophorèse .....  | 47 |
| <b>Figure 19</b> : Profil électrophorétique .....  | 48 |
| <b>Figure 20</b> : Relation : masse molaire d'une protéine et sa mobilité relative .....   | 49 |
| <b>Figure 21</b> : Profil chromatographique sur Séphadex G-75 de l'extrait enzymatique de <i>Cynara scolymus</i> .....   | 55 |
| <b>Figure 22</b> : Extrait coagulant brut et purifié de <i>Cynara scolymus</i> .....   | 56 |
| <b>Figure 23</b> : Profil d'élution sur Séphadex G-75 de la fraction active (1 <sup>er</sup> pic actif) issue de la gel filtration de l'extrait enzymatique brut de <i>Cynara scolymus</i> . 58          |    |
| <b>Figure 24</b> : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié et de la présure .....   | 62 |
| <b>Figure 25</b> : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié et de la présure.....  | 63 |
| <b>Figure 26</b> : Influence de la concentration en CaCl <sub>2</sub> du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié et de la présure.....   | 64 |
| <b>Figure 27</b> : Variation de l'activité coagulante en fonction de la concentration en extrait purifié et de la présure.....   | 65 |
| <b>Figure 28</b> : Activité protéolytique de l'extrait enzymatique purifié d'artichaut et de la présure .....  | 67 |
| <b>Figure 29</b> : Profil électrophorétique de la fraction active issue de la gel filtration sur G-75 de l'extrait coagulant de <i>Cynara scolymus</i> sur gel de polyacrylamide en présence de SDS..... | 68 |

## INTRODUCTION

La présure animale constitue l'agent coagulant le plus utilisé dans la coagulation enzymatique du lait. Toutefois, son extraction demanderait des sacrifices trop onéreux qui nécessitent l'abattage de veaux non sevrés ; ceci affecte lourdement le niveau de production de la viande.

L'augmentation de la production fromagère impose l'utilisation croissante de la présure animale, ce qui a provoqué une situation de pénurie de cette dernière. De ce fait, les succédanés de présure constituent aujourd'hui d'excellents substrats de substitution dans l'industrie fromagère.

Cependant, l'exclusivité de remplacement est détenue par les enzymes d'origine microbienne (*Mucor* et *Aspergillus*), et les enzymes d'origine animale (la pepsine bovine et la pepsine porcine). Néanmoins, l'utilisation des succédanés de présure d'origine animale est limitée pour différentes raisons :

- L'incidence de l'encéphalopathie spongiforme bovine appelée « maladie de la vache folle »
- La maladie de la grippe aviaire, ou encore plus récemment la maladie de la grippe porcine ont réduit l'offre et la demande pour la présure de bovin et la pepsine avicole et porcine.
- De plus, les enzymes d'origine animale existent dans la plupart des sous produits d'abattage et restent donc tributaires des fluctuations du marché de la viande **(Roseiro et al., 2003)**.

Bien que la recherche d'enzymes coagulantes d'origine végétale reste encore au stade expérimental et n'a pu déboucher sur une application industrielle, des études très récentes ont montré un regain d'intérêt pour ces enzymes sur le plan de la stabilité et des propriétés physicochimiques. De plus, les protéases extraites des végétaux se montrent plus stables à la chaleur par rapport aux protéases d'origine microbienne **(Poznanski & coll., 1975)** et animales étudiées **(Morsli & coll., 1985)**.

Le succès de *Cynara sp.* est dû probablement aux caractéristiques uniques et spécifiques de ses enzymes ressemblant à la chymosine par plusieurs aspects **(Macedo et al., 1993)** et dont l'exclusivité est détenue par l'espèce de *Cynara cardunculus*, contrairement à la ficine dont l'emploi à l'état brut en fromagerie traditionnelle demeure toujours limité.

Il faut noter que le pouvoir coagulant des extraits végétaux très variable, ainsi que leur activité protéolytique très élevée confèrent un goût d'amertume pour les fromages selon Green (1977) et Lopez et *al.* (1996). Ainsi, une utilisation efficace de ces coagulants végétaux oblige à les purifier au préalable.

Plusieurs travaux de recherche récents utilisant des substrats de plantes ont fait l'objet de publications mettant en évidence l'intérêt que suscite les protéases d'origines végétales notamment ceux menés par (Kasunari et *al.*, 2000; Uchikoba et *al.*, 2000; Pardo et *al.*, 2001; Lo Piero et *al.*, 2002; Sousa et Malcata, 2002; Low et *al.*, 2006; Egito et *al.*, 2007; Chazarra et *al.*, 2007; Tejada et *al.*, 2008; Fernandez-Garcia et *al.*, 2008). De plus, des essais de purification plus poussés et une connaissance plus approfondie des mécanismes biochimiques de ces enzymes sont devenus le centre d'intérêt des chercheurs.

L'objectif de notre présent travail est de valoriser quelques plantes locales à pouvoir coagulant le lait. Des tests d'activité coagulante sur le lait ont été réalisés à partir d'extraits de fleurs de *Silybum marianum*, de fleurs de *Cynara scolymus* et des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica*, et seule *Cynara scolymus* a révélé une activité coagulante.

Ces essais sélectifs nous ont mené à retenir pour la suite de notre étude les extraits coagulants de *Cynara scolymus* sur lesquels ont été développées les étapes suivantes :

- L'obtention de l'extrait enzymatique coagulant des fleurs de *Cynara scolymus* ;
- L'essai de purification partielle de l'extrait enzymatique coagulant par gel filtration ;
- La caractérisation de l'extrait enzymatique purifié par la recherche des conditions optimales de son activité coagulante ;
- La caractérisation électrophorétique de l'extrait enzymatique purifié.

## I. Plantes à pouvoir coagulant le lait

### 1. Inventaire des plantes à pouvoir coagulant le lait en Algérie

En Algérie, la fromagerie traditionnelle a toujours utilisé des extraits coagulants végétaux à l'état brut obtenus à partir de la sève de figuier, des fleurs de cardon, d'artichaut ou de graines de citrouille pour la préparation des fromages frais tel que le Djeben dans le nord algérien ou la Kemaria dans le sud algérien.

Morsli et *al.* (1985) ont établi quant à eux la liste de la flore à pouvoir coagulant des régions nordiques et désertiques de l'Algérie (**Tableau 1**), et les produits sont destinés aux marchés locaux. Cependant, les produits sont caractérisés par une qualité microbiologique et sensorielle médiocre qui demeure tributaire d'une meilleure connaissance des caractéristiques de la protéase car plusieurs facteurs comme la température, le pH, la concentration en enzyme et en ions Ca<sup>++</sup> contrôlent le mécanisme de la coagulation du lait selon Payne et *al.* (1993) ; Picon et *al.* (1995) ; Gunasekaran et *al.* (1996) ; Daviau et *al.* (2000).

**Tableau 1:** Inventaire des plantes locales à pouvoir coagulant le lait en Algérie (Morsli et *al.*, 1985).

| Nom scientifique                           | Nom vulgaire |                    |                                    |
|--|--------------|--------------------|------------------------------------|
|  | Français     | Anglais            | Algérien                           |
| <i>Bryonia doïca Jacq.</i>                 | Bryone       | White bryony       | Tailoula /<br>Kerma beida          |
| <i>Chrysanthemum parthenium (L.) Pers.</i> | Matricaire   | Fever few          | Mouniat                            |
| <i>Conium maculatum L.</i>                 | Ciguë        | Hemlock            | Sik'rane/guebaba                   |
| <i>Cucurbita pepo L.</i>                   | Citrouille   | Pumpkin            | Takhsat/kabouia/<br>Karâa          |
| <i>Cucumis melon L.</i>                    | Melon        |                    | Afqous/Bettikha                    |
| <i>Cucumis sativus L.</i>                  | Concombre    | Cucumber           | Takhiart/Lekhiar                   |
| <i>Cynara cardunculus L.</i>               | Cardon       | Cardoon            | Thaga/Khorchef                     |
| <i>Cynara humilis</i>                      |              |                    | Tharédouit/Guernina<br>/Fegaa      |
| <i>Cynara scolymus L.</i>                  | Artichaut    | Artichocke         | Karnoune                           |
| <i>Dipsacus sylvestris Mill.</i>           | Cardère      | Teasel             | Tadjahnit-guizem/<br>Denb-es-sebaa |
| <i>Ficus carica L.</i>                     | Figuier      | Fig tree           | Taguérourt/Kerma                   |
| <i>Galium verum L.</i>                     | Gaillet      | Lady's<br>bedstraw | Fouaoua                            |

|                                      |               |                  |                                   |
|--------------------------------------|---------------|------------------|-----------------------------------|
| <i>Heracleum sphondylium L.</i>      | Berce         | Hogweed          | Aréoul                            |
| <i>Malva sylvestris L.</i>           | Mauve         | Common mallow    | Amedjir/Khobbeizza                |
| <i>Ricinus cummunis L.</i>           | Ricin         | Caster oil seeds | Akhilouane/Kharouaa               |
| <i>Silybum marianum (L.) Gaerth.</i> | Chardon Marie |                  | Douj-n-ilour'man/Chouket-el-beida |
| <i>Senecio jacobaea L.</i>           | Seneçon       | Ragwort          | Debouz-el-arab                    |
| <i>Solanum ddulcamaara L.</i>        | Douce amère   |                  | Aouzizi /H'loua morra             |
| <i>Urtica dioica L.</i>              | Ortie         | Stinging nettle  | Azegdouf/Bouzegdouf               |

## 2. Importance des plantes à pouvoir coagulant le lait

Plusieurs travaux de recherche menés sur des substrats de plantes (*Cynara cardunculus*, *Cynara scolymus*, *Cynara humilis*, *Albizia lebec*, *Ficus carica*, *Lactuca sativa*, *Silybum marianum*.....etc) ont été publiés montrant le nouvel intérêt que suscitent les protéases d'origine végétale ( **Kasunari et al., 2000 ; Uchikoba et al., 2000 ; Pardo et al., 2001 ; Lo Piero et al., 2002 ; Sousa et Malcata, 2002 ; Low et al., 2006 ; Egito et al., 2007 ; Chazarra et al., 2007 ; Tejada et al., 2008 ; Fernandez-Garcia et al., 2008**). Des essais de purification plus poussée et une connaissance plus approfondie des mécanismes biochimiques de ces protéases sont devenus le centre d'intérêt des chercheurs.

En effet de nombreuses préparations coagulantes sont issues des végétaux et sont obtenues par simple macération de différents organes supérieurs de la plante à savoir, les graines, les feuilles, les fleurs et les fruits (**Ramet, 1997**). L'une des préparations coagulantes les plus utilisées avec succès dans la fabrication de certains fromages traditionnels au Portugal et en Espagne est obtenue à partir de fleurs de Cardon (*Cynara cardunculus*) (**Cordeiro et al., 1992**). Et parmi les espèces du climat tempéré, on retrouve les feuilles du gaillet, les fleurs du chardon, et les fleurs d'artichaut (**Ramet, 1997**).

La liste des plantes étudiées est très grande (**Tableau 2**). Cependant, plusieurs travaux de recherche n'ont pas abouti à des préparations enzymatiques d'un intérêt certain pour la fromagerie.

**Tableau 2:** Quelques sources de coagulants végétaux (Roseiro et al., 2003).

| Nom scientifique            | Nom commun       |                          |
|-----------------------------|------------------|--------------------------|
|                             | Anglais          | Français                 |
| <i>Albizia julibrissin</i>  | Silk tree        | Acacia de Constantinople |
| <i>Ananas comosus</i>       | Pineapple        | Ananas                   |
| <i>Calotropis procera</i>   | Sodom apple      | Pomme de Sodomme         |
| <i>Carica papaya</i>        | Papaya           | Papaye                   |
| <i>Centaurea calcitrapa</i> | Red star thistle | Chardon étoilé           |
| <i>Cirsium</i>              | Thistle          | Chardon                  |
| <i>Cucurbita pepo</i>       | Pumpkin          | Citrouille               |
| <i>Cynara cardunculus</i> , |                  |                          |
| <i>C. humilis</i> ,         | Cardoon          | Cardon                   |
| <i>C. scolymus</i>          | ---              | ---                      |
| <i>Ficus carica</i> ,       | Artichoke        | Artichaut                |
| <i>F. glomerata</i> ,       | Fig tree         | Figuier                  |
| <i>F. religiosa</i>         | ---              | ---                      |
| <i>Lactuca sativa</i>       | Lettuce          | Laitue                   |
| <i>Silybum marianum</i>     | Holy thistle     | Chardon Marie            |
| <i>Streblus asper</i>       | Siora or Rusa    | ---                      |
| <i>Taraxacum officinale</i> | Dandelion        | Pissenlit                |
| <i>Withania coagulans</i>   | Withania berry   | ---                      |

### 3. Aspects botaniques et agronomiques de quelques plantes locales

#### 3.1 Artichaut « *Cynara scolymus* »

L'artichaut est une plante herbacée vivace. Inconnu à l'état spontané, c'est une forme culturale de *Cynara cardunculus* originaire du bassin méditerranéen. La partie souterraine est un gros rhizome pourvu d'un puissant système racinaire. La tige est dressée, cannelée, ramifiée, et mesure de 1 m à 1,50 m. La première année apparaît une rosette de grandes feuilles, larges, vert grisâtre, profondément découpées, à nervures très saillantes, non épineuses, blanchâtres et tomenteuses sur la face inférieure. La tige qui apparaît généralement la deuxième année, porte dans sa partie supérieure des feuilles presque entières, plus petites et sessiles. Les feuilles peuvent atteindre près de 1 m. Les fleurs bleues violacées, tubulées, sont disposées en gros capitules solitaires verts ou violacés (**Fig.1**). Elles sont hermaphrodites et apparaissent généralement la deuxième année. Ces capitules terminaux, très gros, dont la taille peut dépasser 10 cm de diamètre, sont constitués d'un réceptacle charnu, hérissé de soies, entouré par un involucre de bractées ovales, charnues à la base et pointues au sommet (**Goetz et Le Jeune, 2007**).

Classification botanique (**Tableau 3**).

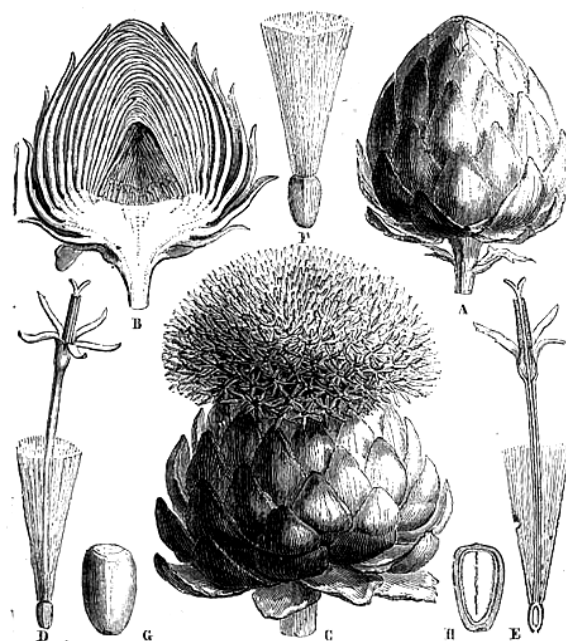


Fig. 49. — Artichaut (*Cynara Scolymus*). — A Tête d'artichaut alors que les fleurs ne sont pas épanouies — B coupe verticale taissant voir la disposition des bractées qui forment l'involucre; le réceptacle charnu sur lequel elles s'insèrent ainsi que les fleurs encore en bouton — C le même fleuri — D l'un des fleurons — E sa coupe verticale — F fruit — G le même ayant perdu son aigrette — H coupe de ce fruit.

**Figure 1** : Représentation du système végétatif et des organes de reproduction de la fleur de l'Artichaut « *Cynara scolymus* ».

### 3.2 Chardon Marie « *Silybum marianum* »

La plante de *Silybum marianum* est annuelle ou bisannuelle, dressée, robuste et épineuse pouvant atteindre 1,20 à 1,50 m de hauteur (Grisvard et Chaudun, 1964) ; ses racines sont pivotantes, fortes, longues, épaisses et fibreuses. La tige est cylindrique plus ou moins sillonnée, cannelée, à peu près glabre, rameuse à tous les niveaux (Neigre, 1962). Elle porte des feuilles alternes, très grandes, sans stipules, tachées de blanc le long des nervures, bordées d'épines dures et pointues. Ces dernières se terminent par une pointe jaune très acérée (Bezanger et Pinkas, 1980).

La fleur de *Silybum marianum* est hermaphrodite, et le semis naturel se fait en plein printemps. Ainsi, la floraison a lieu généralement de mai à octobre. Le chardon Marie est cultivé dans les sols sains, frais, profonds et ensoleillés (Grisvard et Chaudun, 1964).

Classification botanique (Tableau 3).



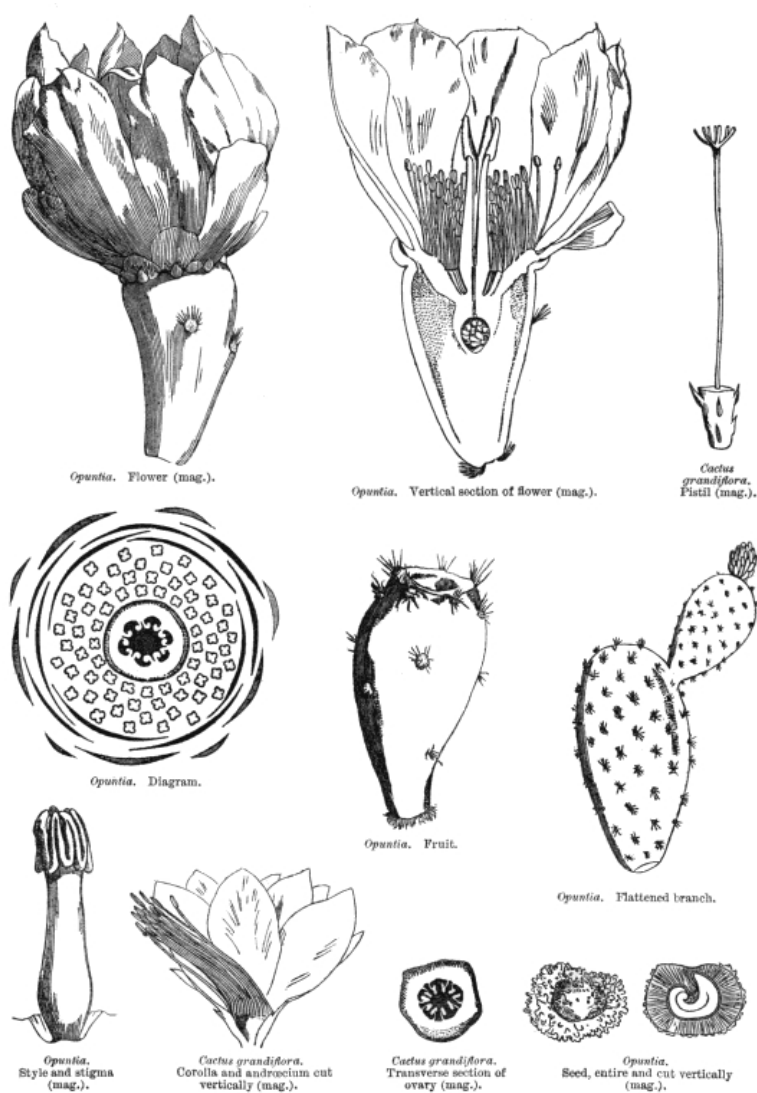
**Figure 2 :** Représentation du système végétatif et des organes de reproduction de la fleur du chardon Marie « *Silybum marianum* ».



### 3.3 Figuier de Barbarie « *Opuntia ficus indica* »

C'est une plante xérophyte, succulente caractérisée par un épiderme épais, un revêtement cireux, absence de feuilles et une tige riche en tissus aquifère permettant d'emmagasiner l'eau de pluie absorbée et de la préserver pendant les périodes de déficit hydrique ou de chaleur. La plante est un arbuste formé de cladodes ou raquettes qui sont des tiges aplaties et ovales. Les fruits présents à la périphérie des cladodes terminales sont pulpeux et de couleur orange jaune. Les cladodes sont ponctués d'aréoles qui peuvent être considérés comme des rameaux latéraux atrophiés où s'insèrent des bouquets de longues aiguilles (**Evêque, 1995**).

Classification botanique (**Tableau 3**).



**Figure 3 :** Représentation du système végétatif et des organes de reproduction du figuier de Barbarie « *Opuntia ficus indica* ».

**Tableau 3 :** Classification botanique de quelques plantes locales.

| <b>Classification</b>          | <b>Artichaut</b>               | <b>Chardon Marie</b>                     | <b>Figuier de Barbarie</b>  |
|--------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------|
| <b>Règne</b>                   | Végétal                        | Végétal                                  | Végétal                     |
| <b>Embranchement</b>           | Phanérogames<br>(Spermaphytes) | Phanérogames<br>(Spermaphytes)           | Magnoliophytes              |
| <b>Sous-<br/>embranchement</b> | Angiospermes                   | Angiospermes                             | ---                         |
| <b>Classe</b>                  | Dicotélydones                  | Dicotélydones                            | Magnoliopsidés              |
| <b>Sous-classe</b>             | Métachlamydées                 | Métachlamydées                           | Caryophylladés              |
| <b>Ordre</b>                   | Campanales                     | Campanales                               | Caryophyllales              |
| <b>Famille</b>                 | Composées<br>(Astéracées)      | Composées (Astéracées)<br><i>Silybum</i> | Cactacées                   |
| <b>Genre</b>                   | <i>Cynara</i>                  |  | <i>Opuntia</i>              |
| <b>Espèce</b>                  | <i>Cynara scolymus</i>         | <i>Silybum marianum</i> Gaertn (L).      | <i>Opuntia ficus indica</i> |

## II. Les succédanés de présure

Un succédané de présure est toute enzyme capable de remplacer la présure. Cependant, il doit présenter un certain nombre de propriétés physicochimiques et technologiques comparables à la présure, et une qualité alimentaire du produit fini (Dehove, 1990). Parmi ces propriétés physico-chimiques, on peut citer :

- Le substitut doit être exempté d'enzymes contaminantes telles que les lipases qui peuvent être à l'origine de mauvais goûts. Il doit présenter,
- Une bonne activité coagulante,
- Un degré de pureté élevé,
- Une absence d'activité antibiotique,
- Une bonne solubilité dans l'eau pour le conditionnement du produit, et
- Il doit permettre l'obtention d'un coagulum homogène.

Pour ce qui est des aptitudes technologiques des succédanés de présure, un certain nombre de caractéristiques doivent être prises en considération dont les suivantes :

- La force de l'activité coagulante doit être idéale dans les conditions physico-chimiques (pH, température, et équilibre salin) qui caractérisent les laits habituellement utilisés en fromagerie.
- Les propriétés rhéologiques du coagulum doivent évoluer après floculation.
- La synérèse du coagulum et les modalités d'affinage doivent permettre d'obtenir les caractéristiques du fromage (humidité et matière grasse), et enfin
- Le rendement fromager doit être identique à celui obtenu avec la présure. (Boudier, 1974 ; Smeets, 1995 ; In Fernani, 2002).

Le tableau 4 résume un grand nombre d'enzymes protéolytiques coagulant le lait. Les plus employées sont de loin les protéases d'origine animale (mélange de chymosine et de pepsine), et les protéases d'origine microbienne. Les préparations d'origine végétale sont rarement utilisées, en raison de leur pouvoir coagulant très variable et de leur activité protéolytique excessive.

**Tableau 4 :** Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.  
(De Roissart et al., 1994).

| Origines           |  | Enzymes   |
|--------------------|--|---|
| <b>Animaux</b>     | Veau<br>Agneau<br>Bovins adultes<br>Porcs<br>poulets                     | Chymosine + pepsine<br>Chymosine + pepsine<br>Pepsine + chymosine<br>Pepsine porcine<br>Pepsine avicole |
| <b>Végétaux</b>    | Figuier<br>Ananas<br>Chardon<br>Artichaut                                | Ficine<br>Broméline<br>Cyprosine<br>Cynarase  |
| <b>Moisissures</b> | <i>Mucor pusillus</i><br><i>Mucor miehei</i><br><i>Aspergillus niger</i> | Protéase<br>Protéase<br>Chymosine « génétique »   |
| <b>Levures</b>     | <i>Kluveromyces lactis</i>   | Chymosine « génétique »   |
| <b>Bactéries</b>   | <i>Bacillus subtilis</i>   | Subtilysine « génétique »   |

### 1. Les succédanés de présure d'origine végétale

C'est dans un contexte lié aux modifications des habitudes alimentaires que les chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'étude des enzymes coagulantes d'origine végétale dont les principaux avantages sont :

- La disponibilité du matériel végétal,
- Le potentiel d'utilisation technologique relativement simple, et
- La forte stabilité de ces coagulases à la chaleur (Verissimo et al., 1998).

Différentes préparations obtenues à partir de certains organes de végétaux sont capables de cailler le lait ; les plus connues sont : la ficine, la papine et la broméline.

De nombreuses préparations coagulantes sont issues des végétaux et sont obtenues par simple macération de différents organes supérieurs de la plante à savoir, les graines, les feuilles, les fleurs et les fruits (Ramet, 1997). L'une des préparations coagulantes les plus utilisées avec succès dans la fabrication de certains fromages traditionnels au Portugal et en Espagne est obtenue à partir de fleurs de Cardon (*Cynara cardunculus*) (Cordeiro et al., 1992).

Le succès de *Cynara sp.* est dû probablement aux caractéristiques uniques et spécifiques de ses enzymes ressemblant à la chymosine par plusieurs aspects (Macedo et al., 1993) et dont l'exclusivité est détenue par l'espèce de *Cynara cardunculus*, contrairement à la ficine dont l'emploi à l'état brut en fromagerie traditionnelle demeure toujours limité.

L'extrait coagulant de *Cynara cardunculus* (Cardon) a également fait l'objet de l'étude menée par Mouzali (2001), il a été conclu que malgré que les caractères physico-chimiques de cette enzyme soient proches de ceux de la présure, cet agent coagulant se caractérise par une activité protéolytique excessive. Selon certains auteurs (Silva et Malcata, 1998 ; Vioque et al., 2000), l'extrait coagulant de *Cynara cardunculus* présente deux protéases à acides aspartiques : la cardosine A, tout comme la chymosine, est responsable de l'activité coagulante et la cardosine B, similaire à la pepsine, est la responsable de l'activité protéolytique. Cependant, la fleur de cardon n'est pas utilisée, selon Macedo et al. (1996), dans la fabrication des fromages au lait de vache vu le goût amer qu'elle lui confère.

L'utilisation de la cynarase de l'espèce *Cynara scolymus* (Artichaut) quand à elle, est actuellement recommandée en raison du caractère thermophile de sa protéase végétale qui présente un optimum d'activité à 70°C (Chazarra et al., 2007 ; Sidrach et al., 2005 ; Silva et Malcata, 2000 ; Verissimo et al., 1998).

Notre équipe de recherche s'est intéressée à l'étude d'enzymes coagulants le lait d'origine végétale, en l'occurrence, la ficine (Morsli, 1996; Ball Ibrahim, 2000). Par ailleurs, Fernani (2002) a pu étudier un succédané local issu des graines de melon, fruit très répandu en Algérie et dont l'exploitation n'engagerait pas de dépenses considérables.

## 2. Les succédanés de présure d'origine animale

Les enzymes d'origine animale sont pour la plupart issues de sous produits d'abattage, disponibles et peu coûteuses. Différentes protéases digestives autres que celles contenues dans la présure ont fait l'objet de travaux de recherche, notamment ceux menés par Morsli (1996) ; Gildberg et al. (1990) ; Gordin et Rosenthal (1978) ; Green (1972)...etc

La pepsine bovine peut substituer avec succès la présure dans la fabrication du fromage Feta selon Anifantakis et Kandarakis (1983). En effet, d'après l'étude de Bengana (2001), la substitution de la présure par la pepsine bovine a permis son utilisation pour la fabrication de fromage à pâte molle (Camembert).

La pepsine porcine quant à elle en mélange avec de la présure permet d'obtenir de meilleurs résultats dans la fabrication de fromages acides (**Ramet, 1990**).

Par ailleurs, la pepsine issue du pro ventricule de poulet a été étudiée par notre équipe de recherche Hamrani (2007) ; Ait Amer Meziane (2008) ; Nouani (2009) et constitue une source potentielle de coagulases. Selon Morsli (1996), l'extrait du pro ventricule de poulet a permis la fabrication d'un fromage à pâte molle (Camembert). Cette pepsine a été utilisée également avec succès dans la fabrication de fromages locaux en Israël selon Cuvellier (1999).

D'autres travaux réalisés sur les coagulases animales, ont porté sur la pepsine issue de l'estomac de divers poissons à savoir ; le limon, le merlan et le mérrou.

Cependant, bien que les enzymes d'origine animale sont capables de coaguler le lait, les travaux réalisés dans ce domaine sont restés au stade expérimental.

### **3. Les succédanés de présure d'origine microbienne**

La recherche sur les enzymes de remplacement de la présure a porté également sur la production d'enzymes coagulants le lait d'origine microbienne de deux types : fongique et bactérien.

- Les enzymes d'origine fongique sont largement exploitées en industrie fromagère. Les travaux menés par de nombreux chercheurs Belhamiche (2005) ; Nouani (2009) ont donné des résultats comparables à la présure. Les principales moisissures connues depuis longtemps et très exploitées à l'échelle industrielle sont le *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* et *Endothia parasitica*. Les coagulases du genre *Mucor* ont été largement utilisées dans la fabrication de plusieurs fromages.
- Les enzymes d'origine bactérienne ont été étudiées par certains auteurs Chelal (1998) ; Matoub (2000), les extraits obtenus présentent des caractéristiques cinétiques relativement analogues à celles de la présure traditionnelle. Le genre *Bacillus* est le plus utilisé en particulier *Bacillus cereus* et *Bacillus polymexa*.

Cependant, les enzymes d'origine microbienne présentent quelques inconvénients, qui résident dans leur éventuelle toxicité, leur prix de revient, ainsi que le problème des OGM qui se pose dans certains pays (Allemagne et Hollande).

### III. Lait et coagulation

#### 1. Lait, substrat des protéases

Le lait de consommation humaine a été défini en 1909 par le Congrès International de la répression des fraudes, comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueillie proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Luquet, 1985 In Fernani, 2002**). Il est sécrété par les glandes mammaires des femelles des mammifères, et c'est la principale matière première dans la production fromagère.

#### 2. Les constituants du lait

Le lait est riche en protéines, matière grasse, lactose, vitamines et sels minéraux. Les teneurs moyennes du lait de vache en ses principaux groupes de constituants sont illustrées dans le tableau 4. Outre sa complexité et son hétérogénéité, le lait présente une grande variabilité, selon :

- La race
- L'espèce
- L'individu
- La saison et
- L'alimentation de l'animal (**Martin et Coulon, 1995**).

La composition moyenne des principaux constituants des divers types de lait, est indiquée dans le tableau 5 (**Alais, 1984**). La composition de ces laits est assez voisine en ce qui concerne la proportion en lactose et en minéraux, mais elle est variable en matière grasse et en protéine. Le lait de brebis et de bufflesse est très riche en matière grasse, par rapport au lait de vache et de chèvre.

**Tableau 5** : La composition moyenne du lait de vache (**Mathieu, 1998**).

|   | Les teneurs du lait en ses différents constituants (g/l) |
|---|--|
| <b>Constituants minéraux</b>                |  |
| Eau   | 902  |
| Constituants en sels minéraux               | 6,2  |
| Gaz dissous                                 | 0,1  |
| <b>Constituants organiques</b>              |  |
| Constituants salins organiques              | 1,7  |
| Lactose                                     | 49   |
| Matière grasse                              | 38   |
| Protéines ou constituants azotés protéiques | 32   |
| - Caséine                                   | 26   |
| - Protéines solubles                        | 6  |
| Constituants azotés non protéiques          | 1,5  |

**Tableau 6** : La composition moyenne des différents types de lait en leurs principaux constituants (pour 100 g du lait) (Alais, 1984).

|                  | Eau   | Extrait sec total | Matières azotées |         |          | Matière grasse | Lactose | Sels minéraux |
|------------------|-------|-------------------|------------------|---------|----------|----------------|---------|---------------|
|                  |       |                   | Total            | Caséine | NPN (%)* |                |         |               |
| <b>Vache</b>     | 87,30 | 12,50             | 3,50             | 78      | 5        | 3,50           | 4,70    | 0,80          |
| <b>Chèvre</b>    | 87,10 | 13,60             | 4,00             | 75      | 7        | 4,30           | 4,70    | 0,80          |
| <b>Brebis</b>    | 81,00 | 19,10             | 6,00             | 77      | 5        | 7,50           | 4,70    | 1,10          |
| <b>Bufflesse</b> | 87,50 | 17,80             | 3,60             | 80      | ---      | 7,50           | 4,70    | 0,80          |

\*matière azotée non protéique

### 3. Les caséines

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre de 30 à 300 nm, formée par l'association des différentes caséines ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) et de fragments peptidiques (caséine  $\gamma$ ) issus de la protéolyse de la caséine  $\beta$  et de composants salins dont les principaux sont le calcium et le phosphate (Mahaut *et al.*, 2000).

La caséine entière représente 80 % des protéines du lait de vache. Ces protéines se distinguent les unes des autres par le nombre de résidus phosphoséryls, la présence ou non de cystéine et de dérivés glucidiques, et la teneur en certains acides aminés tels que la proline et la tyrosine (Croguennec *et al.*, 2008).

Les caséines du lait ont la caractéristique principale de précipiter à pH 4,65 à température ambiante et de ne pas s'insolubiliser par chauffage à 100°C. Deux facteurs sont responsables de la stabilité des micelles :

- A pH 6,7 dans un lait frais, elles portent une charge négative et se repoussent ;
- Grâce leurs parties hydrophiles, elles fixent une grande quantité d'eau et sont donc caractérisées par un degré d'hydratation élevé.

Il existe de nombreux modèles représentant les micelles de caséines, qui reposent sur des méthodologies différentes. Le plus récent selon Linden et Lorient (1994), est celui développé par D.G. Schmidt, où la micelle est composée d'un noyau hydrophobe, entouré d'une couche polaire rassemblant les parties riches en groupements phosphoriques et groupements hydrophiles. Lorsque la surface externe est occupée par ces groupements hydrophiles, la croissance des micelles s'arrête.



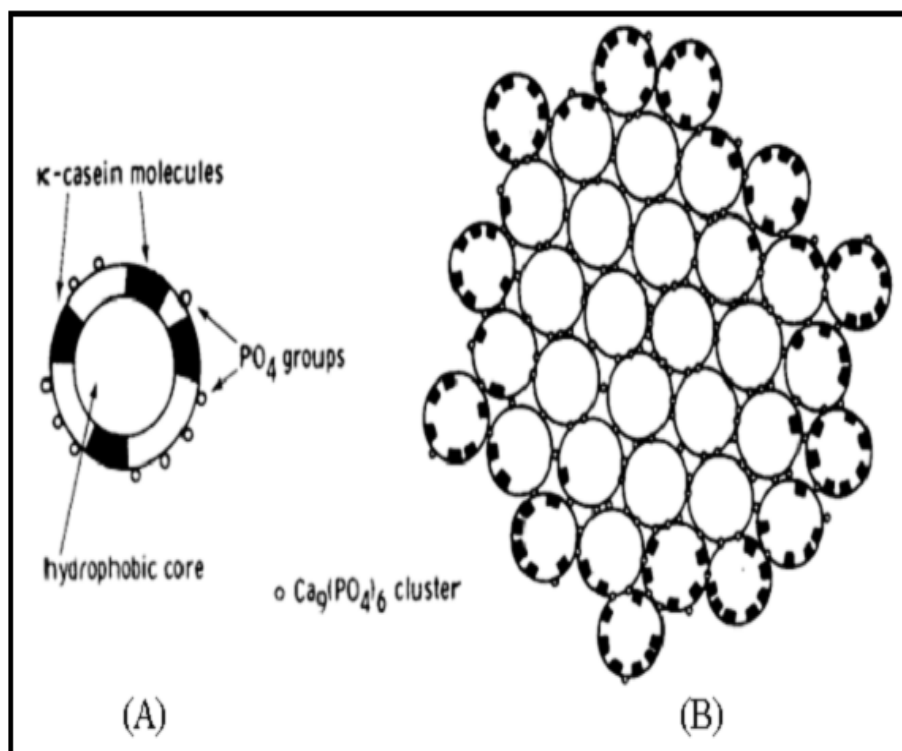


Figure 4 : Modèle de formation des micelles selon Schmidt (Phadungath, 2005).

(A) : Submicelles et (B) : micelle.

#### 4. Phénomène de coagulation du lait

La coagulation du lait selon Brule et Lenoir (1984) est un ensemble de modifications physico-chimiques des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique ; elles entraînent la formation d'un réseau protéique spécifique appelé coagulum ou gel. En industrie fromagère, la coagulation peut être obtenue soit par abaissement du pH et/ou par addition de la présure.

##### 4.1 Coagulation par acidification

Elle consiste à transformer le lactose en acide lactique sous l'action des bactéries lactiques. Cette acidification du lait entraîne une neutralisation des charges et une réduction importante de l'hydratation des protéines, ce qui entraîne leur insolubilisation (Brule et Lenoir, 1984). Il y a une profonde désorganisation de la micelle accompagnée d'une modification de la structure quaternaire des caséines.

L'apport de protons  $H^+$  par fermentation lactique, entraîne une diminution du nombre des charges négatives des micelles et donc une diminution de la couche d'hydratation. Simultanément, on a une solubilisation progressive du calcium et du phosphate inorganique de la micelle vers la phase aqueuse avec désintégration en sous-unités micellaires (**Mahaut et al., 2000**).

Le gel lactique englobe dans ses mailles la totalité de la matière grasse et la phase aqueuse du lait. C'est un gel fragile, friable, très perméable, et l'exsudation spontanée du lactosérum se fait facilement (**Vierling, 1999**). Ce mode de coagulation est peu utilisé par la fromagerie française, car il donne un caillé friable (**Alais, 2003**).

### 4.2 Coagulation par la présure

La coagulation du lait par la présure se déroule en trois étapes :

- Hydrolyse enzymatique de la caséine  $\kappa$  ;
- Agrégation des micelles de caséines déstabilisées ;
- Développement d'un réseau par réticulation et formation de gel.

(**Eck et Gillis, 1997**).

- La phase primaire, enzymatique, au cours de laquelle la présure ou autre protéase coagulante attaque le composant stabilisant de la micelle, la caséine  $\kappa$  avec libération d'un peptide, la caséinomacropeptide (Brule et Lenoir in Eck, 1984). La caséinomacropeptide (CMP), très hydrophile et acide, passe dans le lactosérum. Ainsi, la libération du CMP entraîne une diminution de l'électronégativité de la micelle ainsi que du degré d'hydratation qui sont responsables de la stabilité des micelles (**Mahaut et al., 2000**).
- La phase secondaire ou phase de coagulation correspond à la formation du gel par association des micelles modifiées sous l'action de l'enzyme. Selon Brule et Lenoir (1984), l'agrégation ne démarre que lorsque 85% à 90% de la caséine  $\kappa$  sont hydrolysés, et cette agrégation se poursuit après la formation du coagulum, mais avec une constante de vitesse plus faible. Au cours de cette phase, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. Les ions de calcium s'uniraient à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les répulsions électrostatiques auxquelles elles sont soumises et favorisant ainsi leur agrégation (**Vignola, 2002**).
- La réaction tertiaire selon Alais (1984) correspond à une protéolyse générale et proportionnelle à la concentration en enzyme. C'est une réaction lente et non spécifique, car elle concerne toutes les caséines. Celle-ci débute très lentement,

en même temps que la réaction primaire et se poursuit durant l'affinage. Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalciques et des ponts disulfures entre les para-caséines. Le gel présure est très minéralisé, il s'ensuit une augmentation de sa cohésion et de sa fermeté (**Mahaut et al., 2000**).

### 4.3 Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de l'acidification du lait et de la présure. C'est une méthode utilisant les deux principes ci-dessus, l'acidité du lait et l'addition de l'enzyme coagulant le lait. C'est la voie la plus pratiquée dans l'industrie fromagère pour la production des fromages frais (petits suisses, demi-sels,.....) et les fromages à pâte molle (Camembert, Brie,.....) (**Cheftel, 1980**).

Le coagulum obtenu, présente des caractères intermédiaires entre ceux des gels lactiques et de la présure. Il est caractérisé par une souplesse et une contractibilité moins grande, de fermeté et friabilité plus accentuées que celles des gels de présure (**Veisseyre, 1975**).

## 5. Facteurs de la coagulation enzymatique

La coagulation du lait par la présure se caractérise par :

- Le temps de prise qui sépare l'emprésurage de l'apparition des premiers flocons de caséine,
- La vitesse à laquelle le gel s'organise, et
- La fermeté maximale obtenue.

La caractérisation et la quantification des paramètres rhéologiques du gel, ont permis de mettre en évidence les principaux facteurs de coagulation, qui sont très complexes.

### 5.1. Nature et concentration en enzyme

Selon la règle de Stock et Segelke, le temps de prise est inversement proportionnel à la dose d'enzyme utilisée. La nature des préparations enzymatiques, et le rapport chymosine / pepsine (dans le cas de la présure), ont aussi une incidence sur la vitesse de coagulation et sur les caractéristiques rhéologiques du gel (**De Roissart et al., 1994. In Mouzali, 2001**).

## 5.2. Température du lait

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température. Cette influence de la température résulte de la conjugaison de deux effets :

- L'un agissant sur la réaction enzymatique par inhibition de l'enzyme, et
- L'autre sur la phase de coagulation par réduction de la forme ionisée du calcium et de la forme soluble des phosphates.

On notera, aussi que la température influe sur la vitesse de raffermissement du gel **(Eck, 1990 ; In Mouzali, 2001)**.

Comme pour toutes les protéases, l'activité protéolytique de la présure varie en fonction de la température, atteignant une activité maximale à 41°C.

Lorsqu'elle est inférieure à 10°C, la coagulation ne se produit pas, et entre 10 et 20°C, le temps de coagulation est assez long.

Aux températures supérieures, le temps de coagulation augmente, et à 55°C, la coagulation n'a plus lieu.

La présure est inactivée irréversiblement avec la perte de ces propriétés coagulantes **(Christien et Virasoro, 1935 ; Ramet et Weber, 1980, In Mouzali, 2001)**.

## 5.3. pH du lait

L'incidence du pH du lait est considérable. D'une manière générale, l'abaissement du pH du lait, réduit le temps de coagulation, augmente la vitesse de raffermissement du gel et influe sur la fermeté maximale **(Ramet et Weber, 1980)**.

En revanche, à pH élevé (pH  $\geq$  7), il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée **(Eck, 1990, In Mouzali, 2001)**.

Cette influence résulte soit d'un effet sur l'activité de l'enzyme coagulante (augmentation de la vitesse d'hydrolyse de la caséine  $\kappa$ ) qui est maximale pour le cas de la présure à pH compris entre 5,4 et 5,7, soit de la diminution de la stabilité des micelles liée à la neutralisation des charges et de la libération d'ions calcium à partir de complexes dissous et colloïdaux. Il a d'ailleurs été observé que la phase de coagulation est beaucoup plus sensible à l'abaissement du pH que ne l'est la phase enzymatique **(De Roissart et al., 1994, In Mouzali, 2001)**.

L'accroissement de la vitesse de coagulation par abaissement du pH s'accompagne d'une augmentation sensible de la vitesse de raffermissement du gel et de la fermeté maximale, sauf si l'on se situe à un pH inférieur à 6,0 à partir du quel se font sentir

les effets de la déminéralisation et de la désagrégation des micelles, entraînant une chute brutale de la fermeté du gel (**Eck, 1990, In Mouzali, 2001**).

#### 5.4. Composition du lait

La composition du lait influe considérablement sur le temps de coagulation et les caractères rhéologiques du coagulum. Ainsi, il a été montré que :

- La concentration en protéines a peu d'influence sur le temps de coagulation, mais elle constitue l'un des facteurs majeurs de la fermeté du gel (**Eck, 1990, In Mouzali, 2001**).
- Les caractéristiques des micelles et en particulier leur dimension liée aux proportions relatives des caséines ( $\alpha_s$ ,  $\beta$ , et  $\kappa$ ) influent sur la coagulation (**Alais, 1984, In Mouzali, 2001**).
- Le temps de coagulation est plus long quand le diamètre moyen des micelles est faible. Cet effet est probablement lié aux différences de composition des micelles en fonction de leur dimension, notamment les teneurs en phosphate de calcium colloïdal et en caséine  $\kappa$  qui sont plus élevées dans les petites micelles que dans les grandes, ainsi que le degré d'hydratation également plus fort dans les petites particules (**Lenoir et al., 1985 ; In Mouzali, 2001**).
- L'addition au lait d'un sel de calcium soluble ( $\text{CaCl}_2$ ), à pour effet de réduire le temps de coagulation et d'accroître la fermeté du coagulum (**Kowalchuk et Olson, 1979**). Cette influence résulte d'une part de l'abaissement du pH réduisant ainsi la stabilité des micelles avec accélération de la phase enzymatique (**Jen et Ashworth, 1970 ; Ramet et al., 1981**), et d'autre part de l'augmentation de la teneur du calcium ionique valable dans certaines limites de concentration en  $\text{Ca}^{++}$  ne dépassant pas une mole (**Mc Mahon et al., 1984 ; In Mouzali, 2001**).
- Le chauffage préalable du lait à une température supérieure à  $65^\circ\text{C}$ , insolubilise le phosphate de calcium avec pour conséquence un allongement du temps de coagulation et une fragilisation du gel (**Alais, 1984 ; In Mouzali, 2001**).



*Matériel et méthodes*

## I. Matières végétales employées

Dans notre étude, nous avons utilisé trois sources de végétaux dont l'avantage est la disponibilité, une grande répartition à l'échelle nationale et la non valorisation.

Les matières végétales utilisées sont :

- Les fleurs de *Cynara scolymus* (Artichaut)
- Les fleurs de *Silybum marianum* (Artichaut sauvage ou Chardon Marie)
- Les jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Figuier de Barbarie ou Cactus)

### 1. L'artichaut : *Cynara scolymus* L.

La variété employée dans notre étude est dénommée « violet », c'est une variété très exploitée en Algérie et génère beaucoup de déchets (bractées et fleurs). Les fleurs sont récupérées pour servir à l'obtention de l'extrait coagulant. Ces fleurs sont issues de la saison printanière (mars-avril).

Obtention et prétraitement des fleurs d'artichaut :

Pour obtenir un extrait enzymatique à forte activité coagulante, il faut utiliser des capitules frais et bien développés.

Après épluchage de l'artichaut, en le débarrassant de toutes les bractées, les fleurs sont découpées à ras de leur base et sont mises à sécher durant trois semaines à température ambiante et à l'abri de la lumière et l'humidité selon Morsli (1997) ; Mouzali (2001). Ce prétraitement empêche le développement des microorganismes qui risque d'inactiver les enzymes coagulantes.



Bractée

Fleurs

**Figure 5** : Coupe longitudinale d'un artichaut (*Cynara scolymus*).



**Figure 6 :** Fleurs séchées de *Cynara scolymus*.

## **2. Le chardon Marie : *Silybum marianum***

Les fleurs violettes sont récupérées directement au sommet de la plante et sont mises à sécher selon le même procédé utilisé en haut. Les fleurs fraîches du chardon marie ont été récoltées au stade mature de floraison (avril-mai) dans les jardins de l'INA.



Fleurs

**Figure 7 :** Chardon Marie (*Silybum marianum*).

## **3. Le figuier de Barbarie : *Opuntia ficus indica***

Les jeunes cladodes du figuier de Barbarie sont récupérées, découpées et mises à sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Elles subissent ensuite un broyage fin.



Cladodes



Fleur

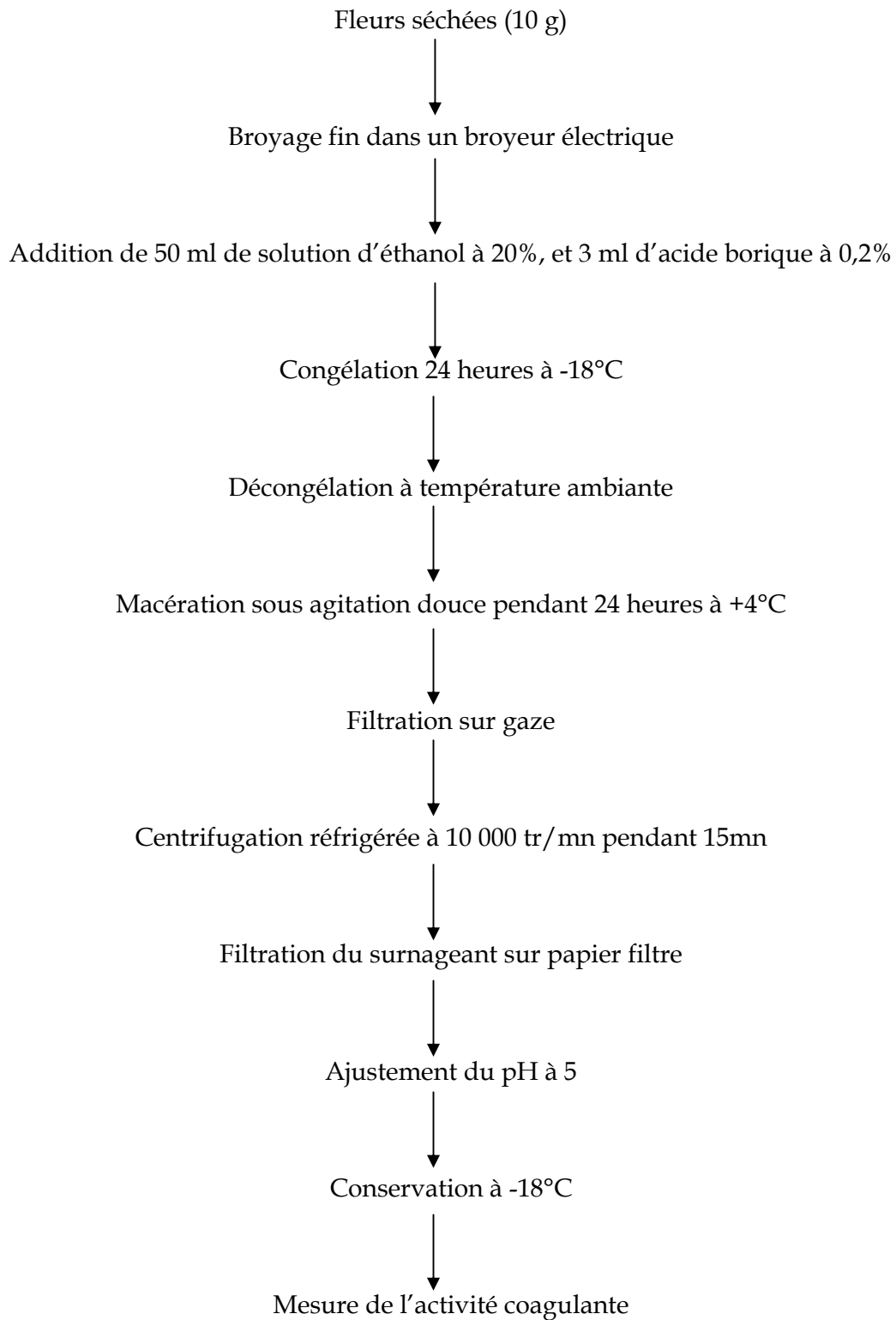
Fruit

**Figure 8 :** Figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*).

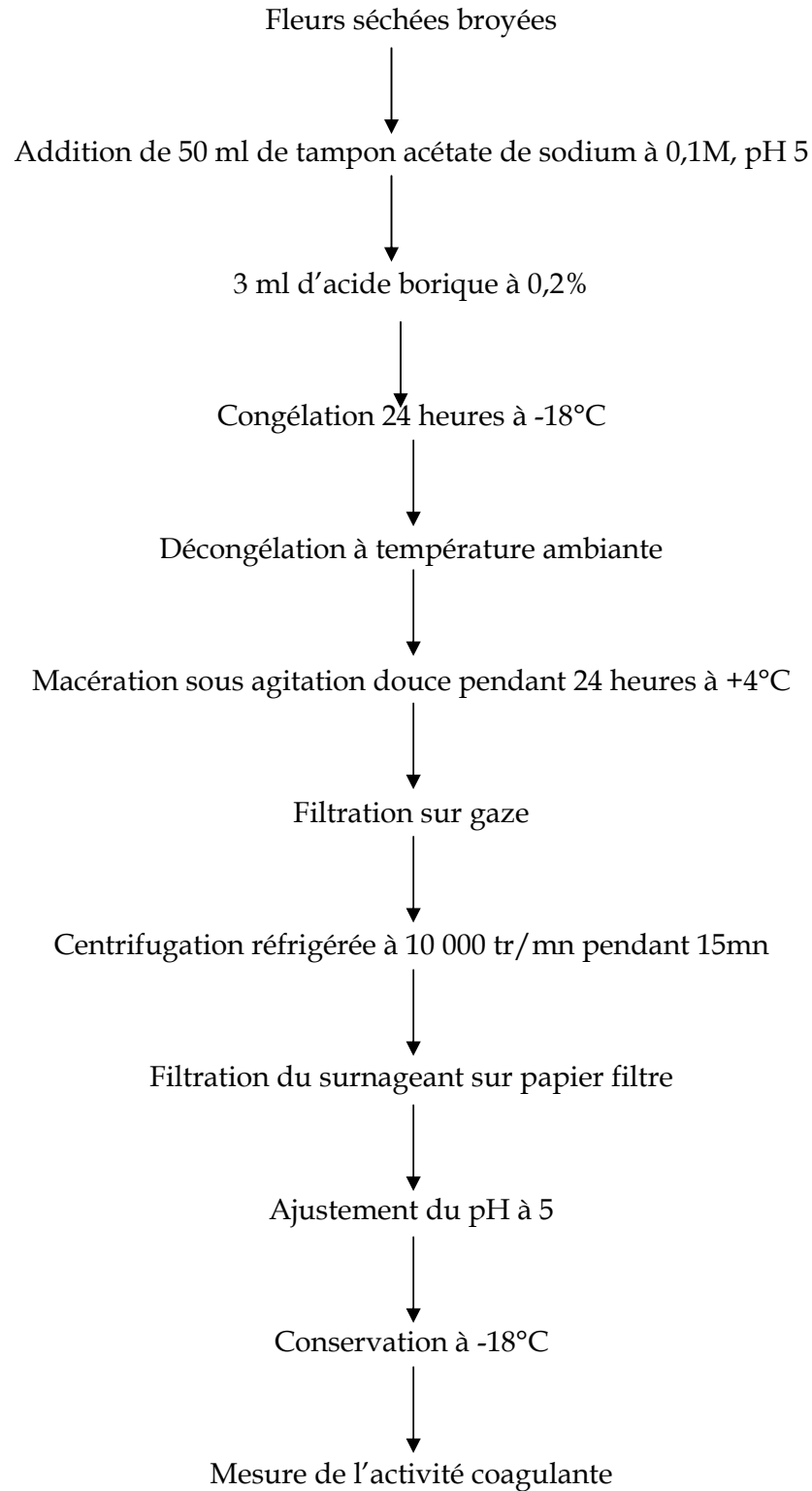
## II. Extraction des enzymes de *Cynara scolymus* L., *Silybum marianum* et *Opuntia ficus indica*

Nous avons réalisé deux types d'extraction :

- L'extraction alcoolique en utilisant de l'éthanol à 20% (**Annexe 1**) selon le procédé employé par Tsouli, 1979, cité par Mouzali, 2001 (**Figure 9**).
- L'extraction au tampon acétate de sodium à 0,1M et à pH 5 (**Annexe 1**) selon le procédé employé par Morsli, 1997 (**Figure 10**).



**Figure 9 :** Méthode d'extraction alcoolique (Tsouli, 1979 cité par Mouzali, 2001).



**Figure 10 :** Méthode d'extraction au tampon acétate de sodium 0,1M pH 5 (Tsouli, 1979 cité par Mouzali, 2001).

### III. Méthodes d'analyse physicochimique

#### 1. Détermination du taux d'humidité (%)

Le taux d'humidité de l'échantillon est déterminé par la lecture directe sur un humidimètre de type SARTORIUS.

#### 2. Détermination de la matière sèche (%)

Après détermination du taux d'humidité, la teneur en matière sèche est déduite en appliquant la formule suivante :

$$MS (\%) = 100 - H (\%)$$

#### 3. Dosage de la matière azotée totale (M.A.T.)

La matière azotée totale est déterminée suivant la méthode de Kjeldhal (AFNOR, 1982) (Annexe 2). Cette méthode consiste à transformer l'azote organique en azote minéral (sulfate d'ammonium) sous l'action de l'acide sulfurique concentré à chaud en présence d'un catalyseur approprié, et de doser après alcalinisation et distillation, l'ammoniac formé recueilli dans de l'acide borique, avec l'acide sulfurique (N/50).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche suivant la formule :

$$N (g) = X . 280 . \gamma . 100 / Y . 100 / A$$

**N** : Teneur en azote minéral (g)

**X** : Descente de la burette (ml)

**Y** : Prise d'essai (g)

**A** : Volume du minéralisat dilué (ml)

$\gamma$  :  $10^{-6}$  (constante)

$$Teneur \text{ en } M.A.T. (\% MS) = N (g) . 6,25 / M.S. 100$$

## IV. Méthodes analytiques

### 1. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique, est calculée en terme de force coagulante, selon la méthode SOXHLET ou d'unité de présure. La mesure de l'activité coagulante est déterminée dans les conditions standards suivantes :

- Volume de la solution enzymatique 1 ml
- Volume de lait à coaguler 10 ml
- Température du lait 35 °C
- pH du lait 6,4
- Durée du test 40 mn (2400 secondes)

La force coagulante « F » représente le volume de lait coagulable par unité de volume de l'extrait enzymatique ou de l'enzyme en 40 mn, à 35°C et à pH 6,4. Elle est exprimée selon la relation suivante :

$$F = \frac{2400 \cdot V}{v \cdot T}, \text{ où}$$

F : force de l'enzyme

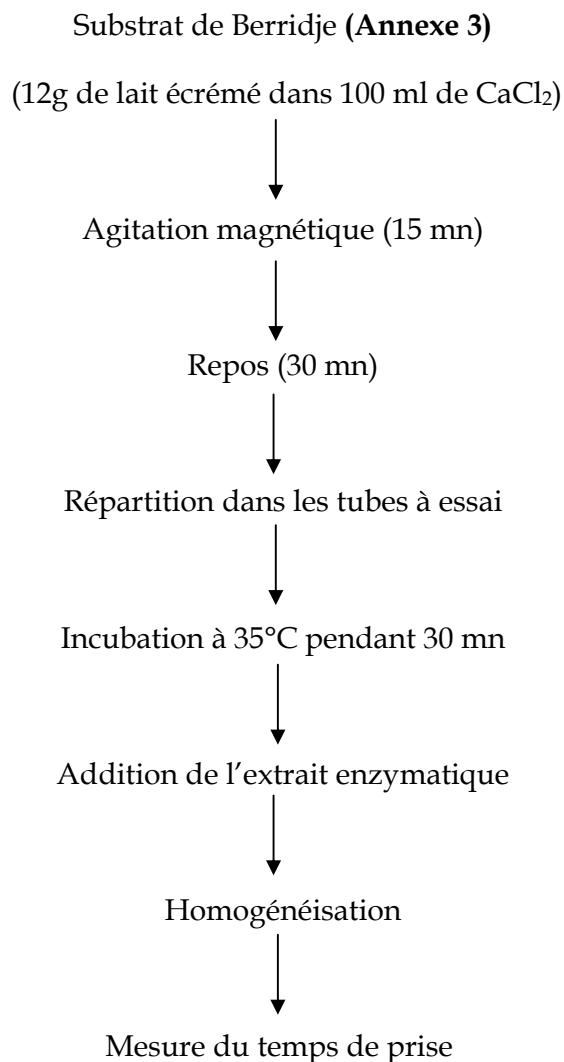
V : volume du lait de pH 6,4

v : volume de l'extrait enzymatique

T : temps de coagulation du lait (secondes), obtenu selon la méthode de Berridje (1945) décrite par Collin et *al.* (1977) (**Figure 11**).

L'unité de présure « UP » correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 35°C. Elle est calculée selon l'expression suivante :

$$UP = \frac{10 \cdot V}{T \cdot v}$$



**Figure 11** : Mesure du temps de coagulation par la méthode de Berridge (1945) décrite par Collin et *al.* (1977).

## 2. Détermination de l'activité spécifique

Nous avons mesuré l'activité spécifique de l'extrait enzymatique brut et purifié, selon la méthode décrite par Adrian et *Coll.* (1981).

L'activité spécifique est un rapport entre l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le taux de protéines de cet extrait. Ce rapport nous renseigne sur le niveau de pureté de la solution où se trouve la coagulase recherchée.

### 3. Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée par la méthode de Green et Stackpoole (1975) (**Annexe 4**).

La mesure de l'activité protéolytique de l'extrait coagulant purifié permet d'évaluer le taux de dégradation de la caséine pendant la réaction primaire. Elle consiste à mesurer l'augmentation des produits d'hydrolyse de la caséine dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12% (**Houins et al., 1973**).

L'addition du TCA dans le milieu réactionnel arrête la réaction et la centrifugation permet de séparer le précipité de caséine et les produits d'hydrolyse solubles. Ensuite le dosage de l'hydrolysate se fait selon la méthode de Lowry (1951) (**Annexe 5**).

Les résultats s'expriment en termes de concentration de la tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ ) d'extrait enzymatique par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir de concentrations croissantes en tyrosine.

### 4. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de Lowry (1951) (**Annexe 5**). Le principe de cette méthode est basé sur la coloration bleue développée par les protéines suite à une réaction entre le réactif de Folin et les acides aminés.

L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant le sérum d'albumine bovin (B.S.A à  $200 \mu\text{g/ml}$ ) (**Annexe 5, figure 2**).

## V. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut

Le but de la purification est d'éliminer sélectivement les autres composants d'un mélange afin que seule la molécule intéressante subsiste (**Gaudemer, 1998**). Les techniques que nous avons utilisées sont les suivantes :

## 1. Concentration par dialyse

Elle permet de réduire une quantité considérable d'eau présente dans l'échantillon en utilisant le principe d'osmose où l'eau migre à travers la membrane semi-perméable du milieu le moins concentré vers le plus concentré (**Annexe 6**). Elle consiste à remplir les membranes avec l'extrait enzymatique et bien fermer les deux extrémités, ensuite les immerger dans une solution concentrée de saccharose sous agitation à +4°C (**Figure 12**).



**Figure 12** : Concentration dans les boudins de dialyse.

## 2. Chromatographie d'exclusion moléculaire (Gel filtration)

C'est une chromatographie de type liquide-liquide dont le principe est de séparer un mélange de molécules de poids moléculaires différents. Ce mélange traverse une épaisseur donnée de gel où les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et sont éluées les premières, les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses, leur migration est freinée en diffusant dans le gel. La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires (**Annexe 7**).

La suspension enzymatique est purifiée par filtration sur gel Séphadex le G-75, dont le domaine de fractionnement se situe entre 3.000 et 70.000 Daltons. Les caractéristiques du Séphadex G-75 sont rapportées dans le tableau suivant :



**Tableau 7** : Caractéristiques du gel Séphadex G75.

| Type du Séphadex          | Diamètre des grains secs ( $\mu\text{m}$ ) | Domaine de fractionnement(PM) | Volume du lit approximatif (ml/g) |
|---------------------------|--|-------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Séphadex G75 moyen</b> | 10 - 40                                    | 3.000 - 70.000                | 12 -15                            |

La préparation du gel est une opération capitale. Le gonflement est effectué dans un solvant pendant 24 heures à la température du laboratoire puis dégazer pour éviter la formation de bulles d'air dans le gel, ce qui pourrait modifier la régularité des débits sur colonne.

Le gonflement du gel est obtenu comme suit : 14 g de G75 sont mis à gonfler dans 200 ml de tampon acétate de sodium 0.1 M pH 5 pendant 24 heures, puis dégazés pendant 30 min.

L'appareillage utilisé est le suivant : **(Figure 13)**

- Réservoir pour la solution tampon,
- Colonne de type Pharmacia (1,5 X 80 cm),
- Pompe péristaltique,
- Collecteur de fractions type LKB, BROMA,
- Spectrophotomètre UV/VIS type UNICAM.

La colonne est calibrée avec un mélange de protéines de poids moléculaire connus **(VI)**. Un ml d'extrait protéique est appliqué au sommet de la colonne, équilibré avec du tampon acétate de Na, ajusté à pH 5.

Le volume de la colonne est calculé selon la formule suivante :

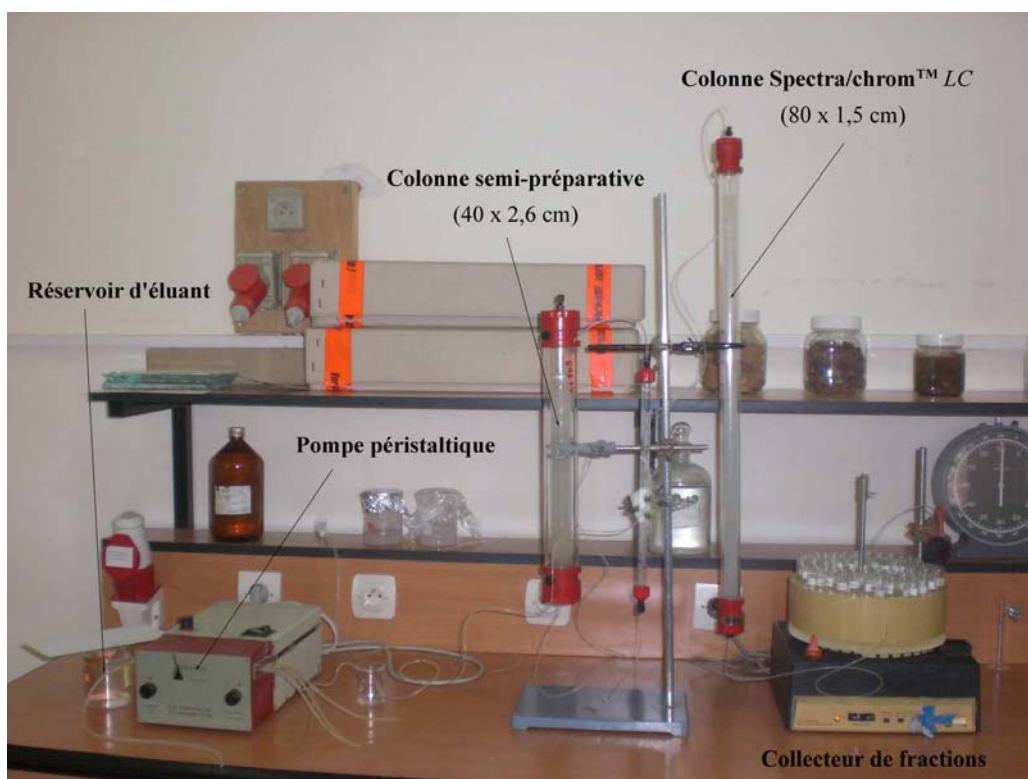
$$V = \pi \cdot R^2 \cdot H \quad \text{où,}$$

V : volume de la colonne.

R : rayon intérieur.

H : hauteur de la colonne.

$\pi$ : 3,14



**Figure 13** : Dispositif la chromatographie d'exclusion moléculaire.

Le remplissage de la colonne se fait sur les parois avec un entonnoir pour éviter la formation des bulles d'air. Au fur et à mesure que le tassement se fait, on enlève le tampon en haut tout en laissant une fine couche à la surface.

L'extrait enzymatique brut a subi une première filtration sur gel de haute résolution Séphadex G-75 dans une colonne de type *Pharmacia* (30 x 1,5 cm), préalablement équilibrée à l'aide d'une solution tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5 avec un débit d'élution de 1,15 ml/mn.

Les fractions actives récupérées et concentrées, subissent une deuxième filtration sur le même gel. Cependant, pour une meilleure élution, nous avons utilisée une colonne de type *Spectra/chrom™ LC* (80 x 1,5), avec un débit d'élution de 13 ml/heure. La lecture de l'absorbance se fait à 280 nm dans le spectrophotomètre.

## VI. Estimation du poids moléculaire de la Cynarase

La détermination du poids moléculaire de la Cynarase a été réalisée par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-75 sur une colonne analytique de dimension (30 × 1,5 cm). L'évaluation approximative de la masse moléculaire d'un extrait partiellement purifié sur Séphadex G-75 a été déterminée par l'élution des protéines de poids moléculaires connus (B.S.A. : 67 000 Da, et Cytochrome C : 13000 Da).

Le profil chromatographique est obtenu par détection des pics à l'aide d'un intégrateur *Jasco 807 IT* par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant un détecteur UV de type *Jasco UV 2075* (**Figure 14**).



**Figure 14** : Dispositif de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-75 utilisé pour la détermination du poids moléculaire.

Grâce à une courbe étalon logarithmique du poids moléculaire des protéines marqueuses en fonction du temps de rétention exprimé en minutes, nous avons pu estimer le poids moléculaire de la protéase étudiée (**Annexe 8**).

## VII. Rendement d'extraction et de purification des extraits enzymatiques

### 1. Rendement d'extraction

Le rendement en protéines totales des extraits bruts est calculé en pourcentage à partir du taux de protéines totales de l'extrait brut par rapport à la masse nette de la matière première employée.

$$\text{Rendement d'extraction} = \frac{Mp (EEB)}{M (MP)} \cdot 100$$

(Edward, 1986).

**Mp (EEB)** : masse en protéines totales de l'extrait enzymatique brut.

**M (MP)** : masse de la matière première utile employée.

### 2. Rendement de purification

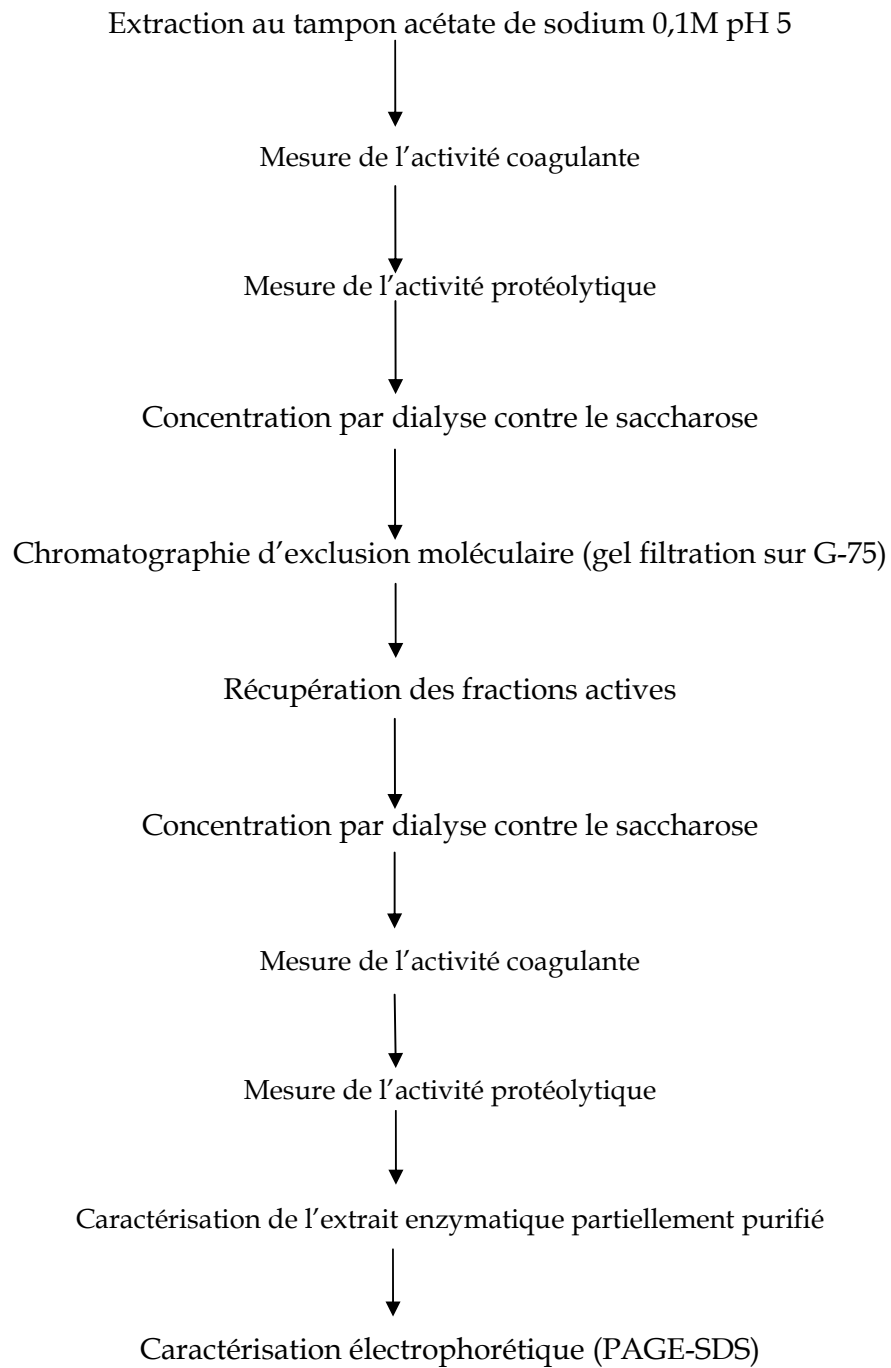
Le rendement de purification est le rapport de l'activité enzymatique des extraits enzymatiques purifiés par rapport à l'activité des extraits enzymatiques bruts, exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Rendement de purification} = \frac{Fp}{Fb} \cdot 100$$

(Edward, 1986).

**Fp** : force coagulante de l'extrait enzymatique purifié.

**Fb** : force coagulante de l'extrait enzymatique brut.



**Figure 15 :** Protocole d'obtention des extraits enzymatiques purifiés à partir de l'artichaut.

## **VIII. Caractérisation des extraits coagulants purifiés des fleurs d'artichaut et de la présure**

L'activité coagulante optimale des extraits enzymatiques et de la présure est déterminée en faisant varier les valeurs des paramètres suivants : température, pH, concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait et la concentration en enzyme, et en observant le temps de coagulation du lait.

L'activité coagulante optimale est exprimée en activité relative (%) par rapport à la plus forte activité coagulante.

### **1. pH optimal**

Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé en observant le temps de coagulation le plus court dans un intervalle de pH compris entre 5,2 et 7 avec un intervalle de 0,2. Les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

### **2. Température optimale**

La température optimale de coagulation est évaluée en mesurant le temps de coagulation du lait le plus court de 30°C à 90°C avec un intervalle de 10°C. Les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

### **3. Concentration en $\text{CaCl}_2$ optimale**

La concentration en  $\text{CaCl}_2$  optimale favorisant l'activité coagulante est déterminée en observant le temps le plus court de coagulation sur différentes concentrations du  $\text{CaCl}_2$  variant de 0,01 M à 0,08 M avec un intervalle de 0,01. Les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

#### 4. Concentration en enzyme optimale

La concentration optimale en enzyme des extraits coagulants est déterminée en observant le temps de coagulation du lait le plus court à différents volumes : 0,5 ml à 5 ml avec un intervalle de 0,5 ml. Les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

### IX. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS -PAGE)

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE) a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970. C'est l'une des techniques les plus citées dans la littérature scientifique. Elle est constituée d'un gel dans lequel sont déposés les échantillons, et dont les deux extrémités opposées sont en contact avec une solution tampon où baignent les électrodes.

#### 1. Principe

Le principe de cette méthode consiste à utiliser le « dodecyl sulfate de sodium (SDS) » qui est un puissant agent dénaturant associé à un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, le «  $\beta$ -mercaptoéthanol ». Ce dernier permet la dissociation de la plupart des polypeptides et confère aux protéines une forte charge négative. Les protéines seront séparées dans le gel de polyacrylamide sous l'effet de leur poids moléculaire.

Cette méthode utilise deux types de gel : un gel de concentration et un gel de séparation, qui permet la migration des protéines selon leur poids moléculaire. La révélation des protéines se fait par coloration au bleu de Coomassie, après dénaturation à l'aide d'une solution acide (**Pasteur et al., 1987**).

## 2. Réactifs

Les solutions utilisées dans cette méthode sont :

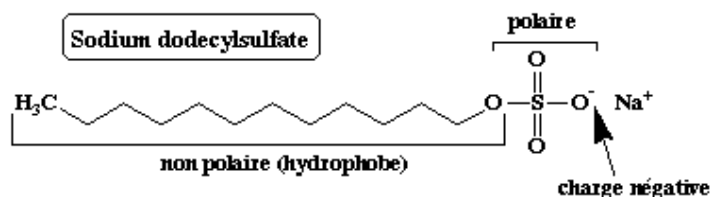
- La solution d'acrylamide
- Le tampon Tris-Hcl 1,5M ; pH 8,8
- Le tampon Tris-Hcl 0,5M ; pH 6,8
- Le tampon Tris-Hcl 0,5M ; pH 6,8\*\*
- Le tampon de migration ; pH 8,3
- Le tampon de gel de séparation 12%
- Le tampon de gel de concentration 5%
- Solution SDS (10%)
- Solution PSA (10%)
- Le gel de fixation : TCA (12%)

La préparation des ces solutions est indiquée dans les annexes (**Annexe 9**).

## 3. Méthode

Les différentes étapes de cette méthode sont les suivantes :

1. On fait bouillir un mélange de protéines en présence :  
D'un agent réducteur : le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.  
D'un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques.



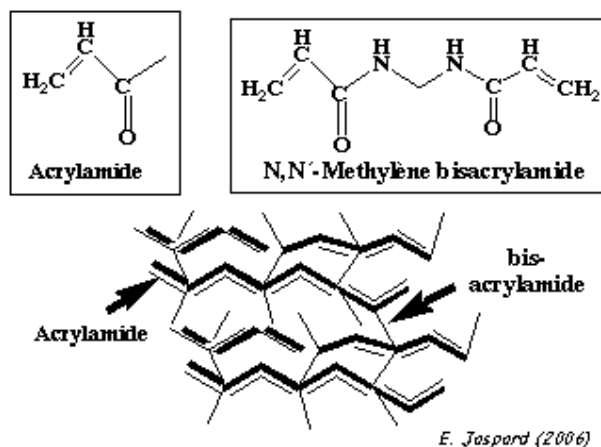
*E. Jaspard (2006)*

**Figure 16 :** Configuration du Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS).

En conséquence :

- Les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native.
- Les protéines n'ont plus de pont disulfure : elles sont sous une forme monomérique.





**Figure 17 :** Gel d'acrylamide- bis-acrylamide.

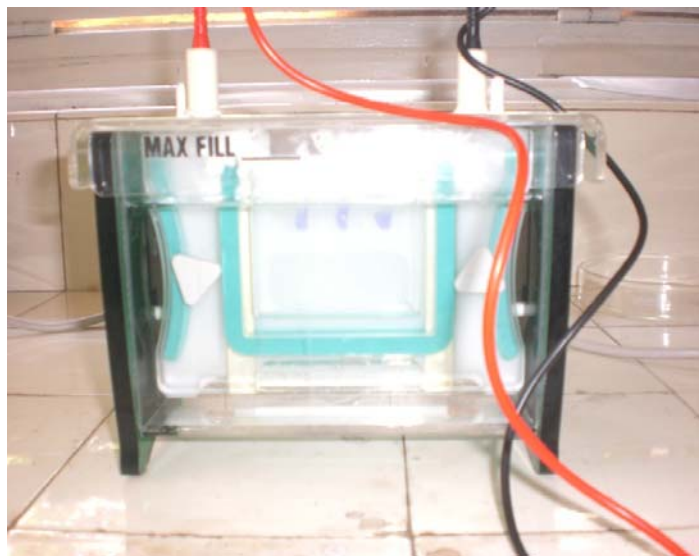
2. Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. C'est un gel réticulé, obtenu par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide.
3. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (PSA) catalysée par le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-1-,2-diaminométhane) qui est toxique.

Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. En conséquence, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Une protéine globulaire (assimilable à une sphère) migre d'autant moins que sa masse molaire est élevée.

**Tableau 8 :** Gamme de séparation des protéines en fonction du pourcentage d'acrylamide.

| Pourcentage d'acrylamide | Gamme de séparation en kDa |
|--------------------------|----------------------------|
| 7,5                      | 45 - 400                   |
| 10                       | 22 - 300                   |
| 12                       | 13 - 200                   |
| 15                       | 2,5 - 100                  |

4. Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques. Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits. La taille et le nombre des dents des peignes sont variables ce qui permet de déposer des volumes allant de 20  $\mu\text{L}$  à 200 $\mu\text{L}$  d'échantillon de protéines à séparer.
5. Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique.
6. Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits. Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel. Et les protéines sont révélées par une coloration avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (plus sensible).



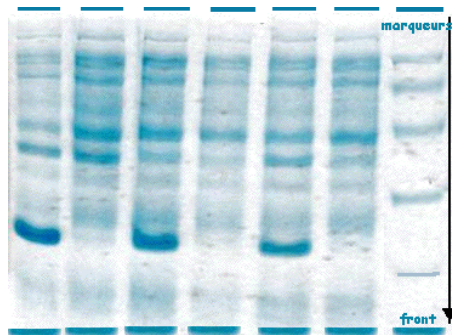
**Figure 18 :** Cuve pour électrophorèse.

On obtient différentes bandes pour chaque piste de la figure ci-contre (la flèche indique le sens de migration).

La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).

Exemple de marqueurs :

- myosine (205 kDa)
- $\beta$ -galactosidase (116 kDa)
- phosphorylase b (97,4 kDa)
- albumine (66 kDa)
- ovalbumine (45 kDa)
- anhydrase carbonic (29 kDa)



**Figure 19** : Profil électrophorétique (Source : Jaspard E., 2004).

La détermination de la masse molaire d'une protéine se fait comme suit :

$$\text{La mobilité relative} = \frac{\text{distance de migration d'une bande}}{\text{distance de migration du front de migration}}$$

La droite :

**$\text{Log (masse molaire)} = f (\text{mobilité relative})$**  permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.

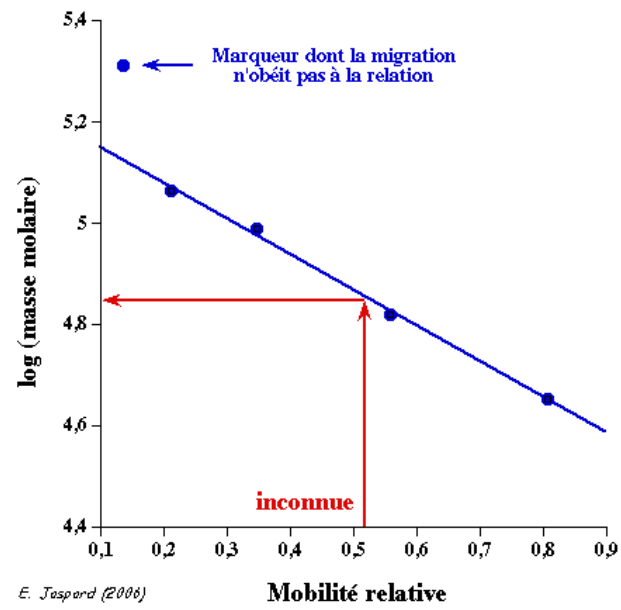


Figure 20 : Relation entre la masse molaire d'une protéine et sa mobilité relative.



*Résultats et Discussion*

## I. Recherche de l'activité coagulante dans les trois végétaux utilisés

- L'extrait brut obtenu des fleurs d'artichaut séchées a donné une coagulation en 1 minute 20 secondes. Ce temps a été réduit à 1 minute après concentration par dialyse contre le saccharose.
- L'extrait brut obtenu des fleurs de chardon Marie séchées n'a pas donné de coagulation même après 40 minutes (limite des conditions standards).
- Et quant à l'extrait brut obtenu à partir des cladodes du figuier de Barbarie, il n'a pas donné non plus de coagulation après 40 minutes (**Tableau 9**).

Les extraits des fleurs séchées du chardon Marie et des cladodes du figuier de Barbarie n'ont montré aucune activité coagulante, par contre une forte activité coagulante a été observée pour les fleurs séchées d'artichaut. Ces essais sélectifs nous ont mené à retenir pour la suite de cette étude les extraits coagulants d'artichaut.

**Tableau 9** : Mesure du temps de coagulation dans les trois végétaux utilisés.

| Partie du végétal               | Temps de coagulation (secondes) | Force | Bibliographie                     |
|---------------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------------------|
| Fleurs d'artichaut              | 80                              | 300   | 400 (Morsli, 1997 ; Nouani, 2009) |
| Fleurs de chardon Marie         | Pas de coagulation              | -     | -                                 |
| Cladodes du figuier de barbarie | Pas de coagulation              | -     | -                                 |

## II. Résultats de l'analyse physico-chimique des fleurs d'artichaut

L'analyse physico-chimique des fleurs séchées d'artichaut est basée essentiellement sur la détermination de la matière sèche, du taux d'humidité et de la matière azotée totale (ou taux de protéines).

**Tableau 10 :** Résultats de l'analyse physico-chimique des fleurs séchées d'artichaut.

| Paramètres physico-chimiques | Teneurs moyennes |
|------------------------------|------------------|
| M.S. (%)                     | 80,7             |
| Humidité (%)                 | 19,3             |
| Protéines (%)                | 3,2              |

La teneur en protéines totales dans les fleurs d'artichaut utilisées pour l'obtention de notre extrait coagulant est de 3,2% (**Tableau 10**), alors que les travaux menés par **Sidrach et al. (2005)** ont révélé une teneur de 2,7%. Cette différence est liée à certains facteurs qui peuvent influencer sur la composition physico-chimique de la matière première, à savoir : le stade de développement du végétal, la variété, la saison de cueillette, la nature du sol...etc.

## III. Résultats de l'extraction enzymatique de l'extrait coagulant d'artichaut

### 1. Choix du procédé d'extraction

Pour l'extraction industrielle de la présure, on utilise généralement un milieu salé (le sel de sodium). Alors qu'au laboratoire, on a recours souvent à des milieux tampons pour mieux caractériser l'enzyme en question.

Afin de permettre un meilleur emploi de l'extrait coagulant pour la coagulation fromagère, nous avons effectué un essai comparatif entre deux procédés d'extraction.

Le choix du procédé d'extraction est basé sur la mesure de l'activité coagulante exprimée en force coagulante selon les conditions standards d'évaluation de l'activité coagulante (T 35°C ; pH 6,4 ; CaCl<sub>2</sub> 0,01M ; Concentration en enzymes 1 ml). Les méthodes d'extraction utilisées sont :

- Méthode d'extraction alcoolique en utilisant de l'éthanol à 20% (Tsouli, 1979, cité par Mouzali, 2001).
- Méthode d'extraction au tampon acétate de sodium à 0,1M et à pH 5 (Morsli, 1997).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11. Afin de pouvoir comparer les deux extraits enzymatiques de *Cynara scolymus*, nous avons rapporté nos résultats à la même prise d'essai (10 g).

La force coagulante obtenue avec le tampon acétate de sodium est plus élevée, soit 300 par rapport à l'éthanol 20% qui est de 200. La force coagulante obtenue par Morsli (1997), et Nouani (2009) pour l'artichaut est supérieure à celle que nous avons obtenu, soit 400.

A ce stade d'expérimentation, l'activité coagulante des extraits bruts est relative, car elle dépend de plusieurs facteurs lié à leur composition, leur concentration en protéases et au procédé de leur extraction. Ainsi, cette différence d'activité est liée à la concentration en enzymes coagulantes.

Néanmoins, l'extraction d'une protéase végétale à partir de la graine de melon selon Fernani (2002) a donné une force coagulante inférieure, soit 133. Cette valeur est largement inférieure à celle que nous avons obtenu pour l'artichaut.

**Tableau 11** : Comparaison des deux méthodes d'extraction enzymatique.

| Méthode d'extraction                   | Temps de coagulation (secondes) | Force coagulante | Bibliographie                     |
|--|---------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| Extraction à l'éthanol 20%             | 120                             | 200              | ---                               |
| Extraction au tampon acétate 0,1M pH 5 | 80                              | 300              | 400 (Morsli, 1997 ; Nouani, 2009) |



L'extrait coagulant de *Cynara scolymus* obtenu avec le tampon d'acétate de sodium a été retenu pour la suite de l'étude, et sur lequel a été effectuée une caractérisation analytique.

## 2. Résultats de la caractérisation apparente et analytique de l'extrait coagulant de *Cynara scolymus*

L'extrait coagulant brut d'artichaut est non visqueux, d'une odeur très forte du végétal et présente une couleur brun foncée (**Tableau 12**). Cette coloration est due à la présence de composés phénoliques dans les fleurs d'artichaut.

Nous avons décoloré cet extrait par filtration à travers une couche de charbon actif en utilisant le verre fritté. L'extrait obtenu est totalement décoloré, mais nous avons remarqué une absence d'activité coagulante. Ceci est dû au fait que la protéase responsable de la coagulation du lait a été retenue par le charbon actif.

Des essais de purification ultérieure ont donné de meilleurs résultats tout en préservant le pouvoir coagulant de l'extrait obtenu (**IV**).

**Tableau 12 :** Caractérisation apparente de l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus*.

| Caractères apparents | Viscosité    | Odeur              | Couleur    |
|----------------------|--------------|--------------------|------------|
| EEB d'artichaut      | Non visqueux | Végétale prononcée | Brun foncé |

L'activité coagulante de l'extrait coagulant brut de *Cynara scolymus* est de 1/300 (**Tableau 13**). Cette valeur est plus faible par rapport à la présure commerciale (1/10000). Cependant, cette comparaison n'est pas significative, car la présure commerciale est à l'état pur.

La concentration en protéines totales de l'extrait enzymatique brut est de 4,5 mg/ml (**Tableau 13**). Ce taux est proche de celui obtenu par **Morsli (1997)**, pour le même végétal, soit 4,8 mg/ml.

Ce taux de protéines est relatif. Il ne reflète pas la concentration de la protéine (protéase) coagulante, mais c'est l'ensemble des protéines contenues dans le végétal (coagulantes et non coagulantes). C'est l'activité spécifique qui nous renseigne mieux sur la protéine responsable de la coagulation (**Tableau 14**).

**Tableau 13** : Caractérisation analytique de l'extrait coagulant de *Cynara scolymus* et rendement d'extraction.

| Extrait coagulant | Quantité employée (g) | Volume EEB obtenu (ml) | Activité coagulante | Concentration Protéines totales (mg/ml) | Rendement d'extraction (%) |
|-------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|---|----------------------------|
| Artichaut         | 10                    | 37                     | 1/300               | 4,5                                     | 1,66                       |

#### IV. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus*

La technique de chromatographie d'exclusion moléculaire (Filtration sur gel) a été utilisée pour la séparation et l'estimation du poids moléculaire de la Cynarase.

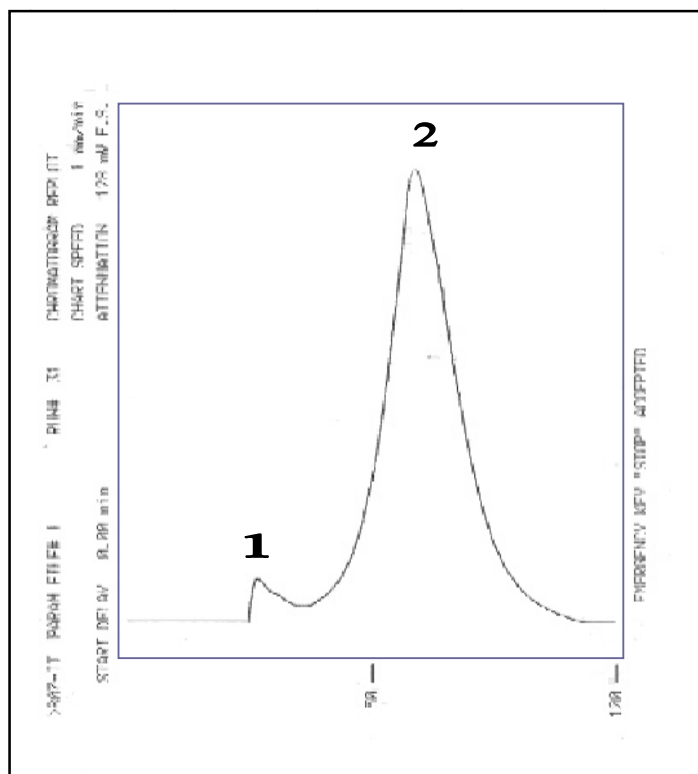
Les protéines enzymatiques sont séparées selon leur poids moléculaire par le gel Séphadex G-75 dont la zone de fractionnement est comprise entre 3 000 et 70 000 Daltons. La colonne utilisée est calibrée dans un premier temps avec des protéines étalons de poids moléculaire connus. Ce sont la B.S.A. (Sérum albumine bovine) 67 000 Daltons, et le Cytochrome C : 13000 Daltons.

L'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus* concentré par dialyse contre du saccharose a subi une première filtration à travers le Séphadex G-75.

L'élution a été réalisée avec le tampon acétate de sodium 0.1 M pH 5 dans une colonne de type Pharmacia (30 x 1,5 cm).

La figure 21 illustre le profil d'élution, en faisant apparaître 2 pics sur lesquels des mesures de l'activité coagulante ont été effectués.

Les résultats acquis montrent que seul le premier pic est actif. Le 2<sup>ème</sup> pic ne présente pas d'activité coagulante sur le lait, se qui représente les protéines non coagulantes. Le 1<sup>er</sup> pic est caractérisé par un volume de 18 ml.



- le pic (1) représente le pic actif : Log PM= 4.78
- le pic (2) représente les autres protéines présentes dans notre extrait : Log PM= 3.98

**Figure 21** : Profil chromatographique sur Séphadex G-75 de l'extrait enzymatique de *Cynara scolymus*.

Colonne (30 x 1,5 cm) ; Tampon d'acétate de sodium 0,1 M ; Fractions intégrées avec temps de rétention.

Cette filtration sur Séphadex G-75 nous a permis d'éliminer les pigments responsables de la coloration de l'extrait enzymatique d'artichaut (2<sup>ème</sup> pic non actif), et d'obtenir ainsi une décoloration très nette de notre extrait enzymatique, qui présentait une couleur brun très foncée initialement (**Figure 22**).

Cette couleur pouvait modifier les caractéristiques organoleptiques des produits finaux. Ce qui constitue un inconvénient technologique majeur en fromagerie.



**Figure 22 :** Extrait coagulant brut et purifié de *Cynara scolymus*.

L'évaluation approximative du poids moléculaire de la Cynarase est possible et parallèlement après le passage de marqueurs de poids moléculaire connus et variables dans les mêmes conditions que ceux de notre enzyme (volume de la colonne, débit d'élution, longueur de la colonne).

D'après la courbe étalonnage obtenue avec les marqueurs à poids moléculaires connus et séparés dans les mêmes conditions (**Annexe 8**), la masse moléculaire de la fraction coagulante de l'extrait enzymatique d'artichaut sur lequel nous avons travaillé est de l'ordre de 60 000 Da, qui est présentée par le pic 1 (**Figure 21**). Ce qui se rapproche de la protéine sérum albumine bovine.

Mais ce niveau de purification n'est que partiel, car il n'est pas exclu que d'autres protéines de masses moléculaires très rapprochées peuvent être incluses dans cette même fraction (1<sup>er</sup> pic actif) sachant qu'il est peut être possible que de faibles activités non détectées, soient incluses dans le second pic d'élution.

Ces résultats obtenus concordent avec ceux rapportés par **Liorente et al., (2004)** qui a travaillé sur des extraits d'artichaut, et qui a retrouvé un poids moléculaire de l'ordre de 62 000 Daltons. De même **Fernani, (2002)**, a obtenu un poids moléculaire de l'ordre de 67 000 Daltons pour la coagulase des graines de melon.

Cependant des différences de PM peuvent être observées et cette caractéristique dépend de l'origine de la coagulase. En effet, **Sidrach et al. (2005)** rapportent des PM de l'ordre de : 42,9 kDa ; 46 kDa ; et 45,5 kDa pour les 3 Cynarases (A, B et C) respectivement, identifiées chez *Cynara scolymus*.

Dans notre cas, ayant employé la chromatographie d'exclusion moléculaire, on peut admettre que ce résultat n'est pas confirmé (nous avons obtenu un seul pic à PM

correspondant à 60 kDa), mais par contre une purification plus sélective par électrophorèse qui sera réalisé dans la suite de notre étude pourrait éventuellement nous rapporter ou nous vérifier la composition protéique de notre extrait.

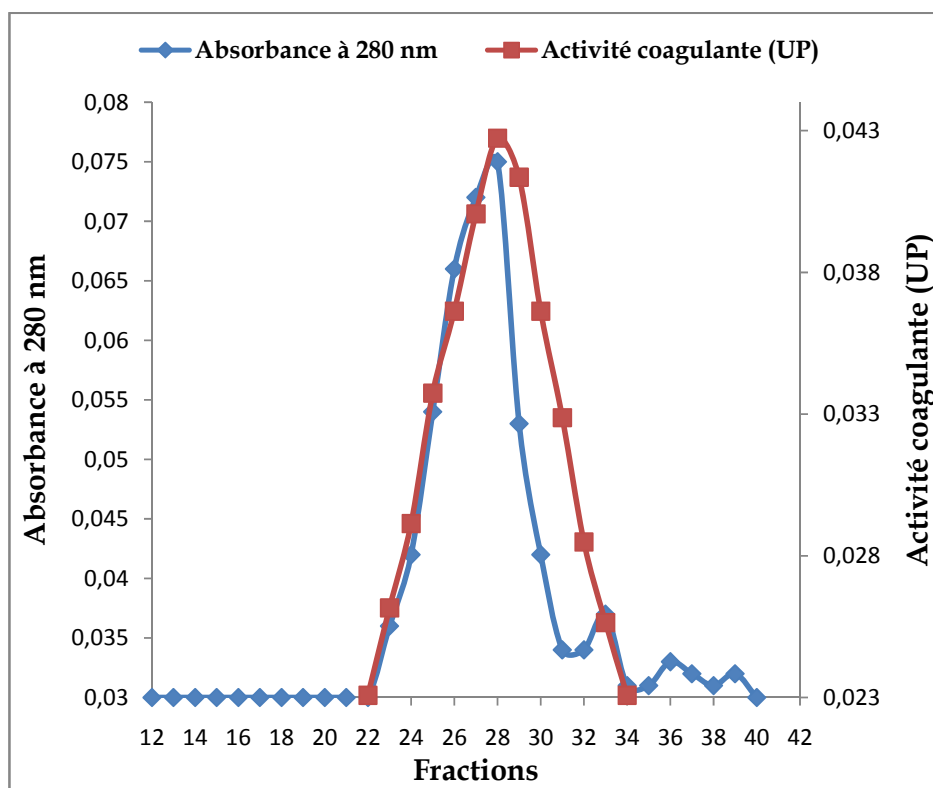
Par ailleurs, le pic 2 apparaissant dans l'extrait partiellement purifié à forte concentration correspond à un peptide caractérisé par un PM de l'ordre de 9 500 Daltons. Ce peptide ne peut pas être assimilé à une forme secondaire de Cynarase, compte tenu de son faible PM.

Néanmoins, pour mettre en évidence l'existence d'autres formes de Cynarase (système enzymatique complexe), nous allons effectué une deuxième filtration sur Séphadex G-75. L'élution est réalisée avec le même tampon, dans une colonne plus haute de type *Spectra/chrom<sup>TM</sup> LC* (80 x 1,5 cm).

Le profil chromatographique est illustré dans la figure 23. Les résultats obtenus indiquent deux pics mal séparés, qui apparaissent au bout d'un volume d'élution de 28 ml, qui peuvent être assimilés à deux formes de Cynarase.

Le volume total de la fraction active est de 9 ml. Des tests d'activité coagulante ont été effectués sur les 13 fractions actives. L'allure est illustrée dans le même chromatogramme en parallèle avec le profil d'élution, afin de mieux définir le pic actif et les fractions correspondantes. Ceci dans le but de récupérer directement les fractions actives qui vont servir à la caractérisation de la coagulase végétale de la colonne semi-préparative.

En conclusion à cette purification partielle par chromatographie d'exclusion moléculaire, nous pourrions dire qu'elle nous a permis d'éliminer une partie importante de protéines inactives et indésirables qui sont rencontrées dans les préparations coagulantes pour notre essai et de ce fait pouvoir purifier partiellement les enzymes en solution.



**Figure 23** : Profil d'élution sur Séphadex G-75 de la fraction active (1<sup>er</sup> pic actif) issue de la gel filtration de l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus*.

(Colonne *Spectra/chrom<sup>TM</sup> LC* (1,5 X 80 cm), tampon d'élution : acétate de sodium (0.1M ; pH 5), débit : 13 ml/h, fraction : 1,3 ml)

## V. Rendement d'extraction et de purification des préparations enzymatiques

### 1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction en protéines totales permet de définir le rapport entre la masse de protéines de l'extrait enzymatique brut et la masse de la matière première utile employée.

Le rendement obtenu lors des essais est de l'ordre de 1,6% (**Tableau 13**) ce qui représente un taux relativement faible qui peut être intimement lié à l'activité coagulante exprimée en force qui est de l'ordre de 300.

**Tableau 13** : Caractérisation analytique de l'extrait coagulant de *Cynara scolymus* et rendement d'extraction.

| Extrait coagulant | Quantité employée (g) | Volume EEB obtenu (ml) | Activité coagulante | Concentration Protéines totales (mg/ml) | Rendement d'extraction (%) |
|-------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|---|----------------------------|
| Artichaut         | 10                    | 37                     | 1/300               | 4,5                                     | 1,66                       |

Or **Morsli, (1996)** rapporte des rendements en protéines totales de 2,4% pour l'extrait d'artichaut ce qui se rapproche de notre résultat, de 8% pour l'extrait de poulet et enfin de 11% pour l'extrait de la sève de figuier.

Par ailleurs, la valeur trouvée n'est pas représentative vu que la concentration en protéines totales de l'extrait brut (4,5 mg/ml) ne reflète pas effectivement le taux de protéines enzymatiques ou protéases recherchées car les protéines rencontrées dans les extraits bruts font apparaître en plus des protéines enzymatiques, toutes les autres protéines naturelles qu'on peut retrouver dans ces extraits.

On peut faire une remarque sur la présure liquide commerciale (**Dehove, 1990 ; Fernani, 2002**) où l'activité est élevée (10 000) par contre sa concentration en protéines est plus faible.

On peut conclure qu'à ce stade des essais, la concentration des extraits en enzymes protéasiques n'est pas encore défini, effectivement ce paramètre ne sera établi qu'après l'étape de purification.

Ainsi, l'activité coagulante est fonction de la concentration globale en protéines totales, sauf dans le cas de la présure commerciale.

## 2. Rendement de purification

La détermination du rendement de purification est exprimée en pourcentage par rapport aux activités enzymatiques coagulantes (Edward, 1986).

C'est le rapport de l'activité coagulante de l'extrait purifié sur l'activité coagulante de l'extrait brut. On évalue ainsi l'activité spécifique qui représente l'activité coagulante de l'extrait purifié sur le taux de protéines.

Ces valeurs sont obtenues à partir de l'activité coagulante et de la teneur en protéines totales. Nous constatons que le rendement de purification est faible de l'ordre de 33% (Tableau 14).

On peut émettre plusieurs hypothèses à ce résultat, soit la très faible concentration en enzymes dans les extraits coagulants bruts, ou encore la perte d'enzymes au cours du processus de purification.

On peut remarquer ainsi que l'extrait enzymatique d'artichaut ne contient pas beaucoup de protéines totales (4,5 mg/ml). Cette remarque est également valable pour les extraits purifiés (0,1 mg/ml).

On considère ce rendement relativement faible, comparé aux travaux antérieurs de Morsli, (1996) entrepris sur différents extraits (artichaut, poulet et figuier).

En conclusion et afin de pouvoir quantifier l'étape de purification réalisée sur l'extrait enzymatique brut d'artichaut, les trois principaux paramètres ont été déterminés dont :

- L'activité spécifique qui représente le rapport de l'activité coagulante par la concentration en protéines (activité/ mg de protéine enzymatique).
- Le facteur de purification qui représente le rapport entre l'activité spécifique après purification de l'activité spécifique de l'extrait brut.
- Le rendement en activité

**Tableau 14 :** Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Cynara scolymus*.

|                       | Activité coagulante | Protéines (mg/ml) | Activité spécifique (%) | Rendement en activité (%) | Facteur de purification |
|-----------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>E.E.B.</b>         | 1/300               | 4,50              | 66,6                    | 100                       | 1                       |
| <b>Gel filtration</b> | 1/100               | 1,02              | 98,0                    | 33,3                      | 1,47                    |



## VI. Caractérisation de l'extrait enzymatique purifié et de la présure

Pour fixer les conditions optimales d'activité, il est intéressant de vérifier l'influence de certains paramètres physico-chimiques (concentration en extrait enzymatique, température, pH et concentration en  $\text{CaCl}_2$ ) afin de spécifier notre enzyme.

### 1. Influence du pH du lait

La recherche de la mesure favorable d'activité coagulante de l'enzyme en fonction du pH du lait a été calculée dans l'intervalle de pH de 5,2 à 7. La figure 24 illustre les résultats.

On constate que les deux préparations enzymatiques étudiées présentent un comportement analogue vis-à-vis du pH du lait. L'activité des deux coagulants augmente lorsque le pH baisse.

Une activité relativement importante est constatée à pH 5,4 pour la coagulase végétale de *Cynara scolymus*, et à pH 5,2 pour la présure. Au-delà de ces valeurs, l'activité coagulante diminue.

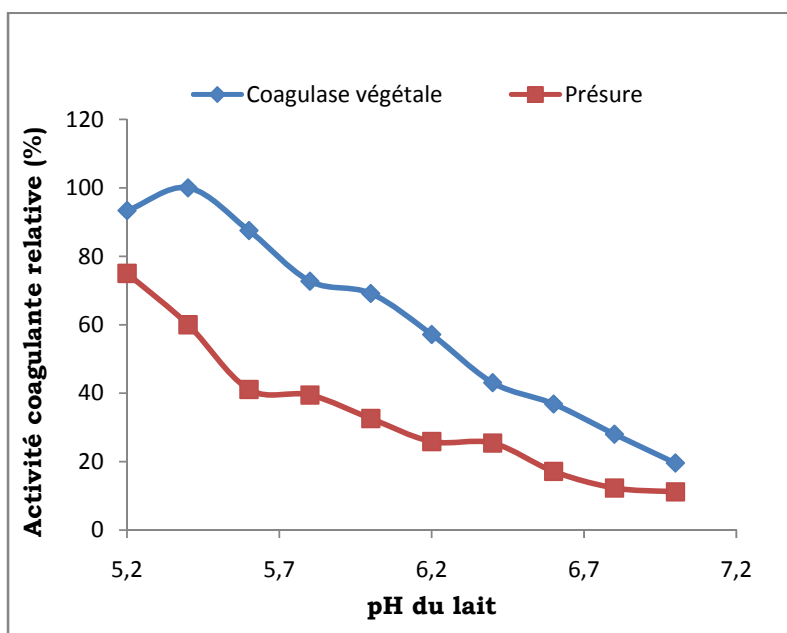
En général, les enzymes d'origine animale (présure et pepsine) ou d'origine végétale ont des pH d'activité de situant dans l'intervalle des pH acides (Morsli, 1996), où il a obtenu un pH optimal de 6,2 ; 6,3 et 6,5 pour des préparations enzymatiques purifiées de l'artichaut, du poulet, du figuier respectivement. On peut conclure que cette augmentation dépend de l'origine de la substance coagulante.

Selon Garnot et Martin, (1979), le pH optimum d'activité de la présure est de 5,8. De même Vieira et Barbosa, (1972) ; Barbosa, (1983) lors d'une étude menée sur la caractérisation de l'extrait coagulant de la fleur de cardon, indiquent une action active de l'extrait au pH bas du lait.

En revanche, les valeurs habituelles utilisées en technologie fromagère sont de pH 6,5 à 6,3.

A pH 7, l'activité de la coagulase végétale étudiée diminue jusqu'à 19,58 % pour la coagulase végétale et jusqu'à 11,2% pour la présure. Au-delà de pH 7, les deux préparations tendent à être inactivées.

On peut conclure que le pH optimum des coagulases varie dans l'intervalle de 5,2 à 6,5 selon leur origine.



**Figure 24 :** Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié et de la présure selon les conditions standards (T : 35°C, CaCl<sub>2</sub> : 0,01 M, [Enzyme] : 0,1 mg, volume du lait 10 ml).

## 2. Influence de la température du lait

La détermination de la température optimale d'activité des préparations coagulantes a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait allant de 30°C à 90°C.

La figure 25 montre une faible activité de l'enzyme végétale de *Cynara scolymus* entre les températures du lait de 30 à 40°C. Ce n'est qu'à 50°C que l'activité coagulante augmente pour atteindre son optimum à 70°C. Alors qu'elle est élevée pour la présure dès 30°C est atteint son optimum à 40°C.

La figure rapporte donc un comportement différent des enzymes étudiées. L'optimum d'action pour la coagulase purifiée de *Cynara scolymus* et de la présure animale est respectivement, obtenu aux températures du lait égales à 70 et 40°C. Au-delà de ces températures, on note une baisse d'activité pour les deux coagulases. Cette constatation confirme bien les résultats de travaux antérieurs réalisés sur des extraits végétaux (Morsli, 1996).

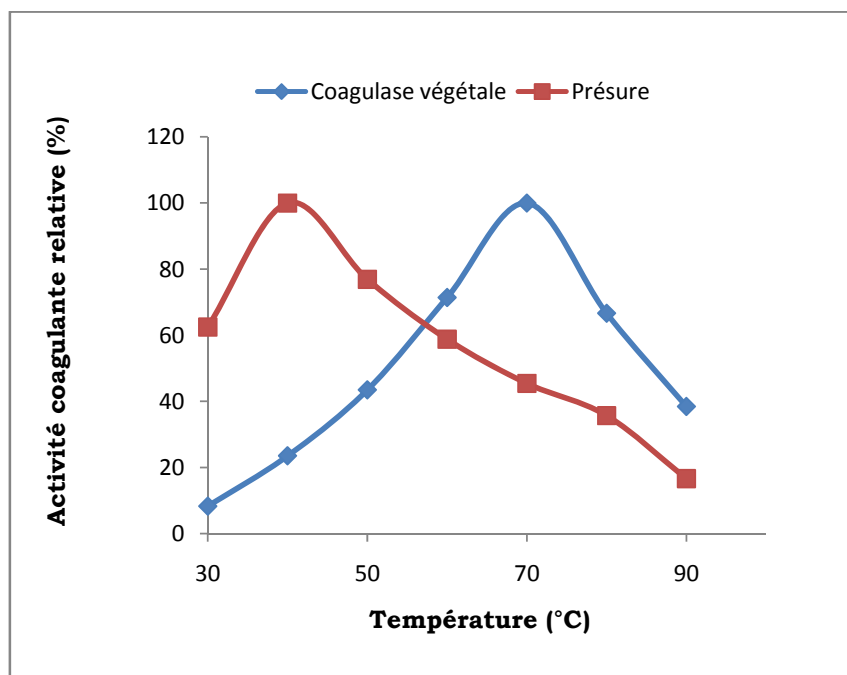
Les enzymes d'origine végétale se caractérisent donc par des températures optimums d'activité bien supérieures à celles observées dans le cas des enzymes animales.

En effet ces dernières perdent leur activité aux températures voisines de 42°C pour la présure (**Garnot et Martin, 1979**), et 58°C pour le poulet (**Morsli, 1996**).

Un avantage peut être pris en considération pour les enzymes d'origine végétale, c'est la capacité d'activer le processus technologique de fabrication des fromages, pour le cas où la coagulation nécessiterait des températures élevées, juste après la pasteurisation où l'on fixe des valeurs de températures supérieures à 50°C.

Or ce procédé ne peut être appliqué pour les enzymes d'origine animale car elles sont inactivées à la température de pasteurisation et nécessite donc un refroidissement du lait.

Dans le lait porté à différentes températures, l'extrait d'artichaut perd son activité à 78°C, alors que la présure à 65°C.



**Figure 25 :** Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié et de la présure selon les conditions standards (pH : 6,4, CaCl<sub>2</sub> : 0,01 M, [Enzyme] : 0,1 mg, volume du lait 10 ml).

### 3. Influence de la concentration en $\text{CaCl}_2$

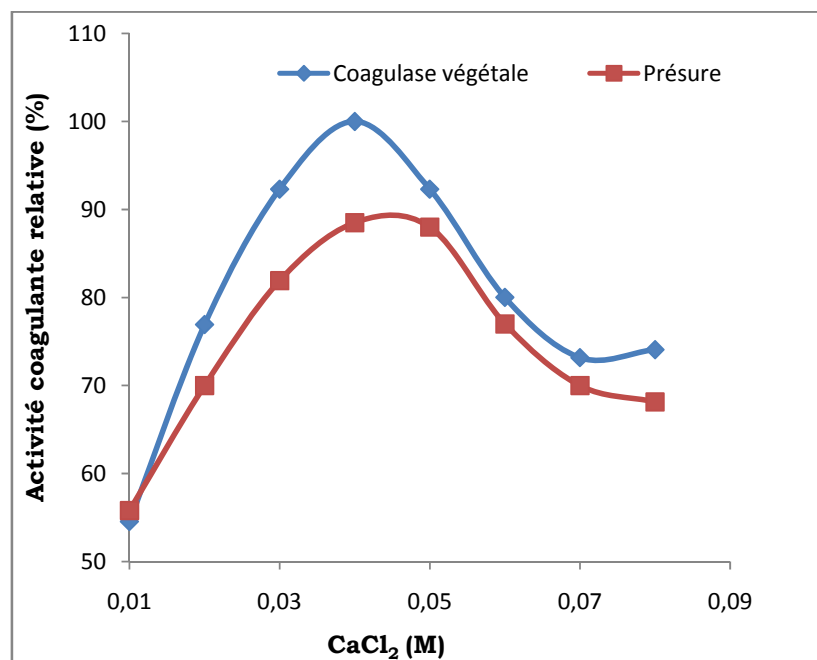
D'après **Lenoir, (1985)**, l'ion calcium est un activateur des protéases, de ce fait il est indispensable pour la coagulation du lait et joue le rôle de ciment dans la polymérisation des caséines par la formation de ponts calciques, après hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la protéase coagulante.

L'addition au lait de chlorure de calcium est une pratique courante en fromagerie. Elle a pour effet de réduire le temps de coagulation et d'accroître la fermeté du coagulum, cette influence n'est pas seulement liée à l'augmentation des teneurs en calcium ionique, mais intervient aussi sur l'abaissement du pH, réduisant ainsi la stabilité micellaire (**Eck, 1990**).

Ainsi une concentration optimale est indispensable pour favoriser l'action des protéases. Le calcium est généralement ajouté au lait sous forme de  $\text{CaCl}_2$ .

Un intervalle de concentration en  $\text{CaCl}_2$  compris entre 0,01 et 0,1 M est ajouté au lait pour évaluer l'influence sur l'activité coagulante.

La figure 26 exprime les résultats en montrant que l'activité coagulante relative pour les deux extraits croit lorsque la concentration en  $\text{CaCl}_2$  augmente jusqu'à une valeur optimale. C'est la concentration optimale pour éviter une précipitation de la caséine par le  $\text{CaCl}_2$  qui est de 0,04 M pour les deux coagulants (**Figure 26**).



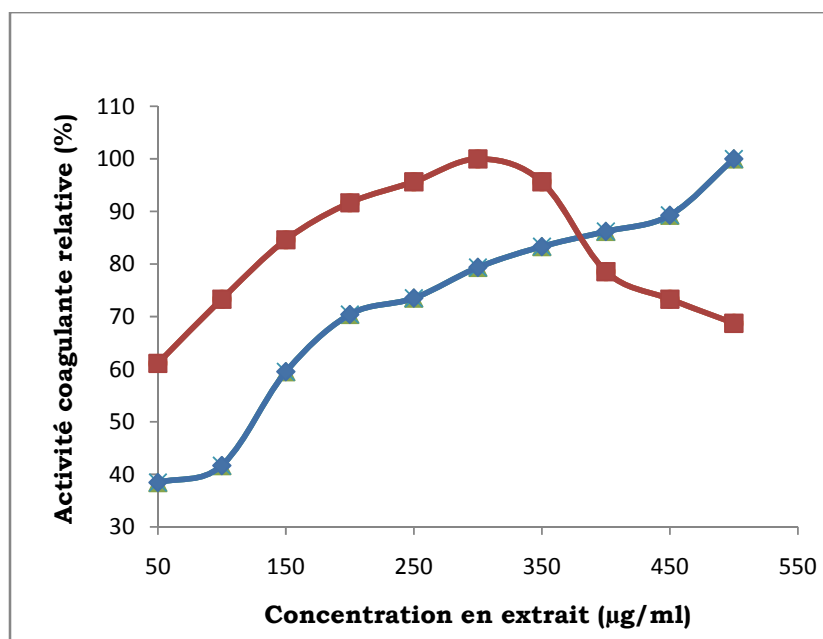
**Figure 26** : Influence de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié et de la présure selon les conditions standards (T : 35°C, pH : 6,4, [Enzyme] : 0,1 mg, volume du lait 10 ml).

#### 4. Influence de la concentration en extrait enzymatique

L'effet de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité coagulante est défini en faisant varier la quantité d'extrait de 50 à 500 µg. Les résultats rapportés par la figure 27 montrent que l'activité coagulante de l'extrait purifié de *Cynara scolymus* augmente avec l'accroissement des concentrations en enzyme. Alors que l'activité de la présure croît linéairement en fonction de sa concentration lorsque celle-ci est faible jusqu'à un seuil, ce qui correspondra aux doses utilisées en fromagerie. Contrairement à l'extrait d'artichaut qui nécessite des doses plus importantes pour un temps de coagulation plus court.

Il est clair que l'extrait de *Cynara scolymus* nécessite des doses importantes en fromagerie et à faibles doses, le temps de coagulation serait trop lent contrairement à la présure qui manifeste une forte activité aux faibles doses, ce qui correspond aux doses utilisées en industrie fromagère selon **Garnot et Martin (1979)**. Ces observations sont confirmées par **Bencini (2002)** ; **Sidrach et al. (2005)** ; **Chazarra et al. (2007)** ; et **Nouani (2009)**.

Ainsi, **Granday, (1978)** dans une étude de détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale a montré que la concentration en enzymes est inversement proportionnelle au temps de coagulation.



**Figure 27 :** Variation de l'activité coagulante en fonction de la concentration en extrait purifié et de la présure selon les conditions standards (T : 35°C, pH : 6,4, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, volume du lait 10 ml).

Tenant compte de toutes nos observations et dans nos conditions expérimentales, notre extrait issu des fleurs d'artichaut nécessite lors de son utilisation en fromagerie une dose importante comparée à la présure animale.

### 5. Activité protéolytique

Au cours de la coagulation du lait, il est impératif de connaître le degré de protéolyse engendré par les enzymes qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes. En effet, ce degré de protéolyse peut affecter le rendement fromager par une forte attaque des caséines avec libération de composés peptidiques solubles dans le lactosérum. On obtient, par conséquent :

- Une très faible tension du coagulum ;
- Un ralentissement de l'égouttage ;
- L'apparition de goût d'amertume ; et
- Une texture molle non consistante.

De plus, la protéolyse est l'un des phénomènes les plus importants de l'affinage, car non seulement elle intervient dans la saveur du fromage, mais en plus elle est susceptible de modifier son aspect et sa texture. Elle se traduit par la libération successive de peptides, puis d'acides aminés qui peuvent être dégradés en composés variés, contribuant ainsi à l'apparition de la flaveur.

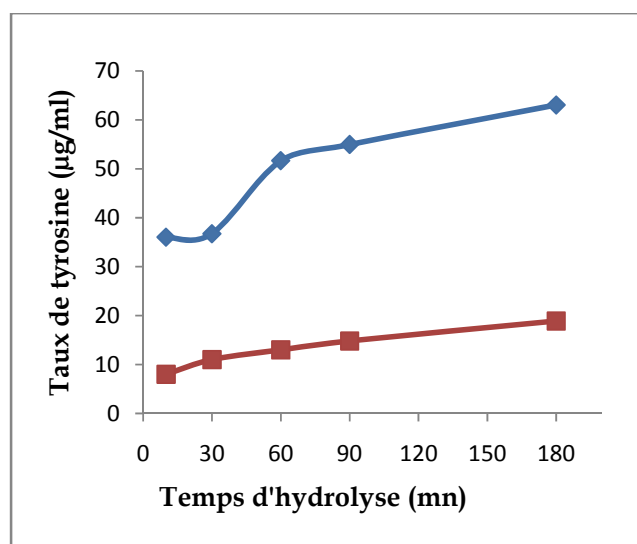
L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique partiellement purifié de l'artichaut a été rapportée par la figure 28. Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique partiellement purifié de *Cynara scolymus* évolue fortement avec la durée de contact enzyme-substrat.

L'activité excessive de cet extrait coagulant par comparaison à la présure, est probablement due à l'action non spécifique de la protéase végétale envers les autres caséines du lait ( $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  caséines) et cela en plus de son action spécifique d'hydrolyse envers la caséine  $\kappa$ .

Selon **Green (1977) et Lopez et al. (1996)**, l'activité protéolytique très élevée des extraits végétaux confèrent un goût d'amertume pour les fromages.

Certains chercheurs, **Heimgarrtner et al. (1990)** ; **Cordeiro et al. (1992)** ; **Morsli (1997)** ; **Nouani A. (2009)**, ont observé lors d'une étude comparative de l'activité coagulante et protéolytique que les extraits bruts et les formes 1 et 2 de la Cynarase manifestent une activité protéolytique excessive comparée à la Chymosine. Ceci est dû à l'action non spécifique des protéases envers les autres caséines du lait ( $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  caséines) car, il est certain que les protéases coagulantes du lait présentent une double activité : l'une très spécifique sur la caséine  $\kappa$ , l'autre de protéolyse générale susceptible de se manifester au cours de l'affinage.

L'effet protéolytique de la Cynarase de *Cynara scolymus* est identique à celle des extraits de *Cynara cardunculus* qui sont largement utilisés dans la fabrication des fromages, selon **Campos et al. (1990)** ; **Silva et Malcata (1999)** ; et **Silva et al. (2002)**. Cependant, l'extrait coagulant de *Cynara cardunculus* a fait l'objet de l'étude menée par **Mouzali (2001)**, et il a été conclu que cet extrait se caractérise par une activité protéolytique excessive malgré que les caractères physico-chimiques de cette enzyme sont proches de ceux de la présure.



**Figure 28** : Activité protéolytique de l'extrait enzymatique purifié d'artichaut et de la présure.

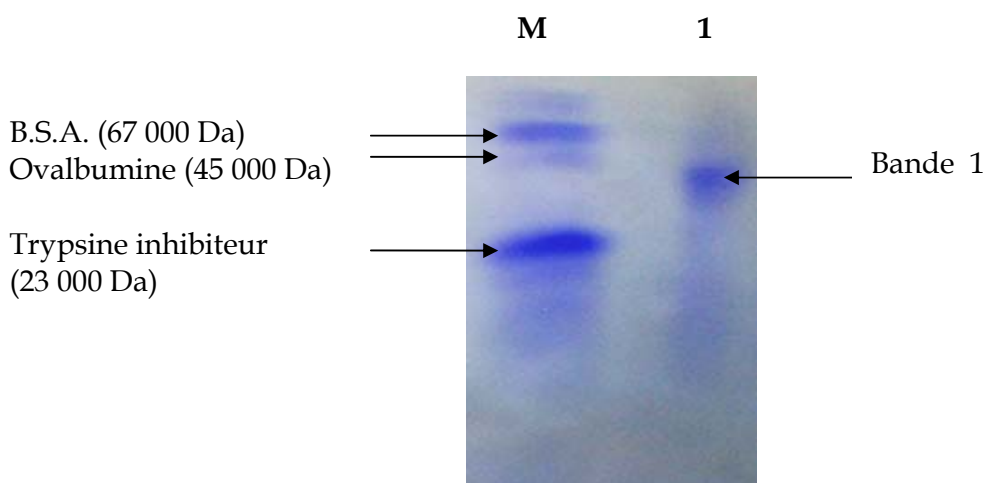
## VII. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS)

L'extrait purifié de *Cynara scolymus* obtenu suite à une purification par chromatographie d'exclusion moléculaire est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S.

Le profil électrophorétique de l'extrait purifié est représenté par la figure 29. L'électrogramme obtenu montre que l'extrait purifié de *Cynara scolymus* révèle une seule bande protéique qui représente la part de protéine la plus importante correspondant au pic actif d'éluion chromatographique sur G-75 de l'extrait brut. Ceci montre que la fraction active correspondrait à une seule protéine : l'enzyme coagulante.

Par ailleurs, la migration électrophorétique de l'enzyme purifiée étudiée est réalisée parallèlement à celle des marqueurs de poids moléculaire variables.

La courbe d'étalonnage obtenue avec les marqueurs de poids moléculaires connus et séparés dans les mêmes conditions est indiquée en **Annexe 10**. Suivant cette courbe d'étalonnage, le poids moléculaire de la fraction enzymatique coagulante est de l'ordre de 43 000 Daltons, qui est présentée par la bande 1 (**Figure 29**).



**Figure 29** : Profil électrophorétique de la fraction active issue de la gel filtration sur G-75 de l'extrait coagulant de *Cynara scolymus* sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

**Ligne M** : Marqueurs de poids moléculaire (B.S.A. 67 000 Da, Ovalbumine 45 000 Da, Trypsine inhibiteur 23 000 Da).

**Ligne 1** : Fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire de l'extrait brut de *Cynara scolymus* présentant une seule bande protéique.



Ce poids moléculaire semble être proche de la protéine « Ovalbumine », ce qui ne confirme pas les estimations obtenus plus haut avec la chromatographie d'exclusion moléculaire. En effet, **Sidrach et al. (2005)** ont rapporté des poids moléculaires de l'ordre de : 42,9 kDa ; 46 kDa ; et 45,5 kDa pour les 3 formes de Cynarase (A, B et C) respectivement, identifiées chez *Cynara scolymus*. Ces résultats concordent parfaitement avec le résultat que nous avons obtenu. Cependant, nous avons obtenus une seule forme de Cynarase qui est proche de la forme A, selon **Sidrach et al. (2005)**.

En effet, ces résultats concordent avec ceux rapportés par la littérature où les protéases d'origine végétale sont caractérisées par des poids moléculaire élevés, comparés aux protéases animales, où des travaux de recherche ont indiqué des poids moléculaires compris entre 31 000 et 37 000 Daltons (**Fox et Whitaker, 1977 ; Slamani, 2002 et Machou, 2004**).

Aussi certains chercheurs notamment **Chopra et Mathur, (1985)** ont estimé un poids moléculaire de 67000 Daltons pour la coagulase purifiée de *Bacillus stearothermophilus*, de même **Safarik, (1984) ; Yang et al., (1987)** en purifiant des coagulases de *Bacillus subtilis* ont obtenu des poids moléculaires de 42000 et 29000 Daltons.

Pour ce qui est de la présure dont les deux enzymes sont la chymosine et la pepsine, elles ont respectivement des poids moléculaires de 30000 et 35000 Daltons. Ainsi, il semble que cette différence des poids moléculaires des différentes coagulases est une caractéristique qui dépend de l'origine de l'enzyme (**Garnot et Martin, 1979**).

Enfin, on peut conclure qu'après avoir effectué ces deux techniques que la chromatographie d'exclusion moléculaire et l'électrophorèse sont les deux techniques qui nous ont permis de connaître la composition protéique globale de notre extrait coagulant. En effet, d'une part, la chromatographie d'exclusion moléculaire nous a permis de séparer et d'exclure toute protéine indésirable contenue dans l'extrait coagulant brut, et de récupérer la fraction chromatographique contenant la protéase coagulante à l'état purifié et d'autre part l'électrophorèse nous a permis de contrôler l'homogénéité protéique de la fraction active.

## CONCLUSION

L'étude entreprise sur les trois végétaux (Artichaut, Chardon Marie et Figuier de Barbarie) a révélé une activité coagulante pour l'extrait enzymatique d'artichaut et aucune activité pour les deux autres plantes. Ce qui nous a mené à retenir la plante d'artichaut (*Cynara scolymus*) pour la suite de notre travail.

L'ensemble des résultats a montré qu'une meilleure activité coagulante pour *Cynara scolymus* est obtenue par une extraction de l'enzyme au tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5, avec un temps de coagulation du lait de 80 secondes.

L'extrait enzymatique de *Cynara scolymus* a toujours été employé à l'état brut dans la fabrication des fromages traditionnels. Il est utilisé sous forme d'une macération de fleurs à maturité complète pour la coagulation des laits (de bovins, de chèvre et de brebis). Cependant, l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus* présente un inconvénient majeur qui réside dans sa pigmentation excessive, qui constitue un problème pour l'industrie fromagère.

Un essai de purification partielle a été effectué par chromatographie d'exclusion moléculaire (Gel filtration sur Séphadex G-75). Il a permis de séparer les molécules responsables de cette pigmentation ou coloration foncée de l'extrait enzymatique brut, et a permis d'obtenir une solution coagulante limpide.

Une deuxième chromatographie d'exclusion moléculaire (2<sup>e</sup> gel filtration) sur le même support G-75 de la fraction active issue de la 1<sup>ère</sup> gel filtration a montré que l'extrait coagulant présente 1 pic actif doué d'une activité coagulante.

En effet, l'ensemble des résultats obtenus nous ont permis d'avoir un aperçu sur :

- L'activité coagulante de l'extrait coagulant purifié,
- Sa composition protéique,
- Son degré de protéolyse,
- La caractérisation de son activité coagulante en fonction de divers paramètres, notamment : le pH, la température, la concentration en CaCl<sub>2</sub>, et la concentration en enzymes.
- Ainsi que la caractérisation électrophorétique de la fraction coagulante de *Cynara scolymus*.

L'évaluation des principales caractéristiques de l'enzyme purifiée de *Cynara scolymus* en comparaison avec la présure, par la détermination des conditions optimales d'activité de l'enzyme purifiée, a montré une activité coagulante maximale à :

- Un pH de 5,4 ;
- Une température du lait de 70°C ;
- Une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,04 M et ;
- Une concentration en extrait enzymatique maximale.

Quand à l'activité protéolytique, elle évolue fortement avec la durée de contact enzyme-substrat, pour atteindre 60 µg/ml après 3 heures d'incubation à 35°C. Cette activité protéolytique très élevée des extraits végétaux confèrent un goût d'amertume pour les fromages. Ce qui constitue un deuxième inconvénient pour l'industrie fromagère.

Pour remédier à ce défaut industriel, il faudra faire des tests d'activité protéolytique sur des laits à extrait sec total élevé ; par exemple : le lait de brebis, de chèvre ou de chamelle.

L'électrophorèse de la fraction coagulante a révélé une seule bande de poids moléculaire voisin de 43 000 Daltons. Cela laisse supposer que la protéase obtenue correspond à une protéase homogène.

Aujourd'hui, et pour des raisons religieuses et surtout pathologiques, les laitages portant le label « Bio » sont en pleine expansion, et la notion de biodiversité végétale est actuellement ancrée dans l'esprit du consommateur. Ce qui a poussé les chercheurs à approfondir leurs connaissances dans le domaine du végétal. A ce propos, des améliorations doivent être apportées par une recherche de nouvelles sources de coagulases végétales, afin d'atténuer la dépendance envers la présure industrielle.

# Références bibliographiques

- Alais C., 1984.** Science du lait : Principes des techniques laitières. 4 Ed. Sepaic. Paris. 814 p.
- Alais C., Linden G., Miclo L., 2003.** Biochimie alimentaire. 5 Ed. Paris, Dunod, 250 p.
- Barbosa M., 1983.** Cardo as a vegetable rennet. Report of the Departement of Technologie for the Food Industry, Lisbon, Portugal, 16 p.
- Belhamiche N., 2005.** Extraction, purification et caractérisation de la protéase de *Mucor pusillus*. Thèse de Magister, INA, Alger, 73 p.
- Brule et Lenoir in Eck, 1984.** Le fromage. 3 Ed. Paris, Technique & documentation (Lavoisier), p.p. 1-21.
- Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D., Rodriguez-Lopez J.N., 2007.** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus L.*) flowers. *International Dairy Journal*, vol. 17, p.p. 1393-1400.
- Cheftel J.C. et Cheftel H., 1980.** Introduction à la biologie des aliments. Tome 2. Ed. Techniques & Documentation. Lavoisier. p.p. 54-60.
- Chopra A.K., Mathur D.K., 1985.** Purification and characterisation of heat proteases from *Bacillus stearothermophilus*. *J. App. Bacteria*. p.p. 3202-3210.
- Collin J.C., Grappin R., Legraet Y., 1977.** Etude de la méthode de mesure, selon Berridje du temps de coagulation. *Revue laitière Française*, vol.355, p.p. 389-394.
- Cordeiro M., Jacob E., Puhan Z., Pais M.S., Brodelius P.E., 1992.** Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus* - a comparaison to chymosin, vol. 47, p.p. 683-687.
- Daviau C., Famelart M.H., Pierre A., Gouedranche H., Maubois J.L., 2000.** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le Lait*, vol. 80, p.p. 397-415.
- Dehove R.A., 1990.** La réglementation des produits, qualité et répression des fraudes. Ed. Lamy, France, vol. 13, p.p. 550-560.
- Eck A., Gillis J.C., 1997.** Le fromage : De la science à l'assurance-qualité. 3 Ed. Paris, Technique & documentation, 891p.
- Egito A.S., Girardet J.M., Laguna L.E., Poirson C., Molle D., Miclo L., Humbert G., Gaillard J.L., 2007.** Milk clotting activity of enzyme extracts from sunflower and alibizia seeds and specific hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein. *International Dairy Journal*, vol. 17, p.p. 816-825.

- Fernandez-Garcia E., Imhof M., Schlichtherle-Cerny H., Bosse J.O., Nuez M. 2008.** Terenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal*, vol. 18, p.p. 147-157.
- Fernani L., 2002.** Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de graines de melon (*Cucumis melo L.*), Thèse de Magister, UMBB, 71 p.
- Garnot P., Martin P., 1979.** La présure : Composition, détermination de l'activité. Son rôle en fromagerie. *Tech. Lait*. vol. 930, p.p. 27-30.
- Gildberg A., Olsen R.L., Bjarnason J.B., 1990.** Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, vol. 96, p.p. 323-330.
- Goetz P., Le Jeun R., 2007.** Artichaut (*Cynara scolymus*) : Monographie médicalisée. *Phytothérapie*, vol. 5, p.p. 219-222.
- Gordin S., Rosenthal I., 1978.** Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal Food Protection*, vol. 41, p.p. 684-689.
- Green M.L., 1972.** Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for Cheddar cheese making. *Journal of Dairy Research*, vol. 39, p.p. 261-266.
- Green M.L., Stackpoole A., 1975.** The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase-swine Pepsin mixture for cheddar cheese-making. *Journal of Dairy Research*, vol. 42, p.p. 297-312.
- Gunasekaran S., Ay C., 1996.** Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering*, vol. 19, p.p. 63-73.
- Houins G., Deroanne C., Coppin R., 1973.** Etude comparative de l'activité coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure et de trois de ses succédanés. *Le Lait*, vol. 53, p.p. 610-611.
- Kamoun P., 1977.** Appareil et méthode en biochimie. Paris, 2 Ed. Flammarion médecine sciences, 236 p.
- Laemmli U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, T4, *Nature*, vol. 227, p.p. 680-685.
- Lenoir J., Lamberret G., Schmidt J.L. et Tourneur C., 1985.** La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofuture*, Décembre, p.p. 23-50.
- Lo Piero A.R., Petrone G., Puglisi I., 2002.** Characterization of « lettuce », a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 50, p.p. 2439-2443.
- Lopes A., Teixeira G., Liberato M.C., Pais M.S., Clemente A., 1998.** New vegetal sources of milk clotting enzymes. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, vol. 83, p 181.

**Lorente B.E., Brutti C.B., Caffini N.O., 2004.** Purification and characterization of a milk clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 52, p.p. 8182-8189.

**Low Y.H., Agboola S., Zhao J., Lim M.Y., 2006.** Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*, vol. 16, p.p. 335-343.

**Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951.** Proteine measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, vol. 193, p.p. 265-275.

**Maatoub L., 2000.** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (LC33). Thèse de Magister, INA, Alger, 91p.

**Macedo A., Malcata F.X., Oliveira J.C., 1993.** The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, p.p. 1725-1739.

**Mahaut M., Jeant R., Brulé G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. Paris, Technique & documentation, 194 p.

**Mathieu Jacques, 1998.** Initiation à la physicochimie du lait. Paris, Technique & documentation, 220 p. (Guides technologiques des IAA).

**Morsli A., Bellal M.M., Hammouche A., 1985.** Etudes du pouvoir coagulant sur le lait de quelques plantes locales, Annales INA, Alger, vol. 9, p.p. 63-70.

**Morsli A., 1997.** Recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère, Thèse Magister, INA, Alger.

**Mouzali L., 2001.** La fleur de Cardon sauvage *Cynara cardunculus* utilisée comme agent coagulant du lait : Caractérisation et extraction enzymatique, Thèse de Magister, INA, 86 p.

**Nouani A., 2009.** Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Doctorat en sciences agronomiques, INA, Alger, 135 p.

**Payne F.A., Hicks C.L., Madangopal S., Shearer S.A., 1993.** Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Transactions of the ASAE*, vol. 36, p.p. 841-847.

**Phadungath C., 2005.** Casein micelle structure: A concise review. *Songklanakarin Journal of Sciences and Technology*, vol.27, p.p. 201-212.

**Picon A., Gaya P., Medina M., Nunez M., 1995.** Kinetics of milk coagulation by mixtures of cyprosin and chymosin. *Milchwissenschaft*, vol. 50, p.p. 393-395.

**Poznanski S., Reps A., Dowlaszewicz E., 1975.** Propriétés coagulantes et protéolytiques de la protéase extraite de *Cirsium arvense*. *Le Lait*, vol.11, p.p. 669-682.

**Quezel P., Santa S., 1962.** La flore Nouvelle de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris, Tome 1 et 2.

**Ramet J.P., 1997.** Les agents de transformations du lait. In « le fromage ». Paris, Ed. Techniques & Documentation. Lavoisier (3<sup>e</sup> Ed.), p.p. 165-172.

**Safarik I, 1984.** Rapid isolation of microbial protease. *Journal of chromatographie.* vol. 3, p.p. 531-533.

**Schmidt D.G., Payen T.A.J., 1980.** Micellar aspects of casein. In *Surface and colloid science.* Ed. E. Matijevic, 9. Wiley, New-York.

**Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J., Neptuno Rodriguez-Lopez J., 2005.** Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, vol. 66, p.p. 41-49.

**Silva S.V., Malcata F.X., 1999.** On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on avine caseins. *Food Chemistry*, vol. 67, p.p. 373-378.

**Silva S.V., Malcata F.X., 2000.** Action of cardosin A from *Cynara humilis* on avine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research*, vol. 67, p.p. 449-457.

**Sousa M.J., Malcata F.X., 2002.** Advances in the role of a plant coagulant *Cynara cardunculus* in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le lait*, vol. 82, p.p. 151-170.

**Tejada L., Abellan A., Cayuela J., Martínez-Cacha A., Fernandez-Salguero J., 2008.** Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, vol. 18, p.p. 139-146.

**Tsouli J., 1974.** Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara scolymus* sur la coagulation du lait. *Le Lait*, vol. 537, p.p. 415-421.

**Uchikoba T., Kaneda M., 1996.** Milk clotting activity of cucumin, a plant serine protease from Melon fruit. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 56, p.p. 325-330.

**Veisseyre R., 1975.** Technologie du lait : Récolte, traitement et transformation du lait, pays tempérés, pays chauds. La maison rustique, 3 Ed. Paris. 696 p.

**Vieira de SAF., Barbosa M., 1972.** Cheese making with a vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus*). *Journal of Dairy Research.*, vol. 39, p.p. 355-343.

**Vierling E., 1999.** Aliment et boissons : Filières et produits. Paris, Ed. Doin, 271 p. (Collection : Science des aliments).

**Vignola C.L., 2002.** Science et technologie du lait : Transformation du lait, Montréal, 576 p.

# Annexe 1

## Préparation des solutions tampons d'extraction (Kamoun, 1977)

### 1- Solution de tampon acétate de sodium 0,1M :

Solution A : acétate sodique 0,1 N : 8,204 g/l ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ).

Solution B : acide acétique 0,1 N : 6,005 g/l ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ).

Pour obtenir une solution tampon acétate de sodium à pH 5, mélanger

67,8 ml A + (100 - 67,8) ml de B

### 2- Solution d'éthanol 20 % :

20,8 ml d'éthanol à 96% dans 100 ml d'eau distillée.



## Annexe 2

### Dosage de la matière azotée totale selon la méthode de KJELDAHL

#### I. Mode opératoire

##### ✦ Minéralisation

Dans un matras Kjeldahl, introduire 1 à 2g d'échantillon. Ajouter 15 à 20 ml d'acide sulfurique concentré, environ 2 g de catalyseur composé de 100g de sulfate de potassium pur, 10g de sulfate de cuivre pur et 1g de sélénium en poudre pur, après homogénéisation laisser pendant 3 heures dans le minéralisateur jusqu'à obtention d'une solution limpide et ceux-ci par chauffage modéré, puis fort en évitant de surchauffer les parois du matras.

**But:** Azote organique +  $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

##### ✦ Distillation et dosage de l'ammoniac

Après refroidissement, le minéralisât est récupéré avec précaution dans une fiole de 100ml avec l'eau distillée. Transvaser 20ml du minéralisât dilué dans un ballon additionné de 20ml de lessive de soude à 33% ( $d = 1,33$ ), plus 80ml d'eau distillée.

**But:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2 \text{NaOH} \rightarrow 2 \text{NH}_3 + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2 \text{SO}_4$

Placer le ballon dans le dispositif de distillation.

Placer l'allonge qui termine le dispositif dans un bêcher de 200ml contenant 20ml d'acide borique à 4% et 2 gouttes d'indicateur (TASHIRO).

Après distillation : titrer le distillat avec l'acide sulfurique à N/50 ( $d = 1,83$ ).

#### II. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche (M.S.) de la façon suivante :

$$N (g) = X \cdot 280 \cdot \gamma \cdot (100/Y) \cdot (100/A) \text{ Où :}$$

X : Descente de la burette (ml)

Y : prise d'essai (1g)

A : Volume du minéralisât (20ml)

$\gamma$  :  $10^{-6}$  (constante)

$$\text{Teneur en M.A.T. (\% M.S.)} = N (g) \cdot (6,25 / M.S.) \cdot 100$$

## Annexe 3

### Préparation du substrat de Berridje (Collin et *al.*, 1977)

Le substrat de Berridje est préparé par addition de 12 g de lait écrémé à 100 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,01 M. Après 30 minutes d'agitation magnétique douce en évitant la formation de mousse gênante ; le pH est ajusté à 6,4 avec une solution de Hcl ou NaOH 0,1 N. Le substrat est laissé au repos pendant 30 min à température de laboratoire.

# Annexe 4

## Mesure de l'activité protéolytique (Green et Stackpoole, 1975)

### ➤ Solutions

#### Solution alcaline (A)

- Soude caustique (NaOH) (2g / 500 ml) 500 ml
- Carbonate de sodium 10 g

#### Solution cuivrique (B)

- Sulfate de cuivre 5 H<sub>2</sub>O (0,32g / 100 ml) 2 ml
- Tartrate de sodium et de potassium (1g / 100 ml) 2 ml

#### Solution (C)

- Solution (A) 50 ml
- Solution (B) 1 ml

#### Solution (D)

- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au ½

### ➤ Méthodes de mesure

#### Courbe étalon de tyrosine

Préparer des solutions diluées de concentrations croissantes : 20, 40, 60, 80 et 100 µg / ml à partir d'une solution mère de tyrosine (100 µg/ml). Le tube témoin contient 1 ml d'eau distillée.

Ajouter dans chaque tube 5 ml de la solution (C).

Incuber pendant 10 mn à 35°C au bain-marie.

Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) et agiter fortement.

Laisser incuber 20 mn à 35°C.

#### Conditions d'hydrolyse

Ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 1 ml de la solution de caséine à 2% (P/V) dans le NaOH (0,02M).

Incuber pendant 10, 30, 60, 90 et 180 mn à 35°C.

Laisser reposer 15 mn.

Filtrer à travers du papier filtre.

### Préparation de l'échantillon

A 1 ml du filtrat, ajouter 5 ml de la solution (C) puis mélanger.

Incuber pendant 10 mn à 35°C.

Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) et agiter immédiatement.

Incuber à 35°C pendant 20 mn.

### Préparation du blanc

A 1 ml de la solution de caséine sont ajoutés 5 ml de TCA (12%).

Ajouter 1 ml de la solution enzymatique.

### Lecture de l'absorbance

La lecture de l'absorbance (densité optique) est effectuée à 660 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

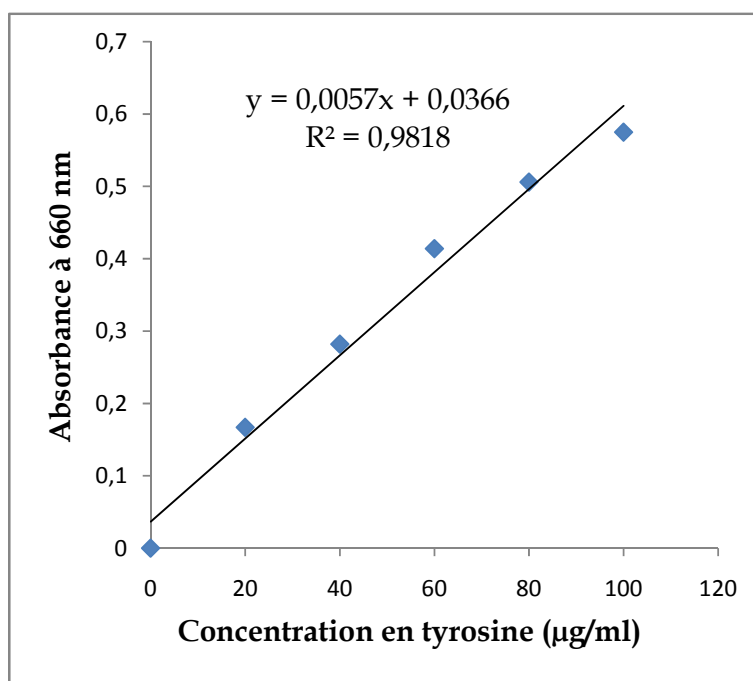


Figure 1 : Courbe étalon de la tyrosine.

# Annexe 5

## Dosage des protéines totales selon Lowry et *al.*(1951)

### ➤ Solutions

- (A) 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- (B) 0,5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  dans 1% de tartrate de sodium et de potassium
- (C) 50 ml (A) + 2 ml (B)
- (D) NaOH (1N)
- (E) Réactif de Folin-Cicalteau dilué  $\frac{1}{2}$ .

### ➤ Méthode de mesure

#### Courbe étalon de B.S.A.

Préparer des solutions diluées de concentrations croissantes : 10, 40, 80, 120, 160 et 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  à partir d'une solution mère de B.S.A. (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Le tube témoin contient 0,5 ml d'eau distillée.

Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D), puis 2,5 ml de la solution (C).

Laisser reposer 10 mn. Ajouter 0,5 ml de la solution (E). Incuber pendant 30 mn à l'obscurité.

La lecture de la densité optique est effectuée à 750 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

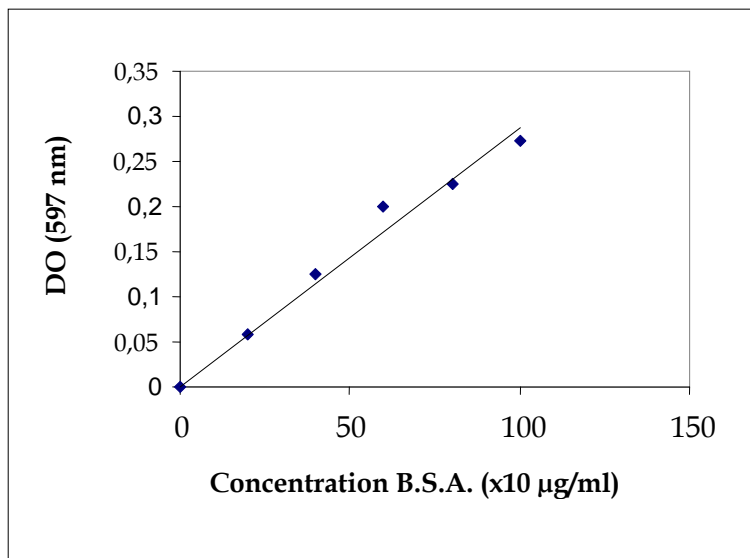


Figure 2 : Courbe étalon de la B.S.A.

## Annexe 6

### Préparation des membranes de dialyse (Kamoun, 1977).

Placer successivement les membranes :

- 1 heure dans un mélange à volume égal Ethanol/Eau, puis
- 1 heure dans une solution de bicarbonates de sodium 10 mM, puis
- 1 heure dans une solution diluée d'EDTA, ensuite 2 heures dans l'eau distillée.

Les membranes ainsi préparées peuvent être conservées à 4°C pendant 2 à 3 jours dans l'eau distillée.

### Séparation par dialyse

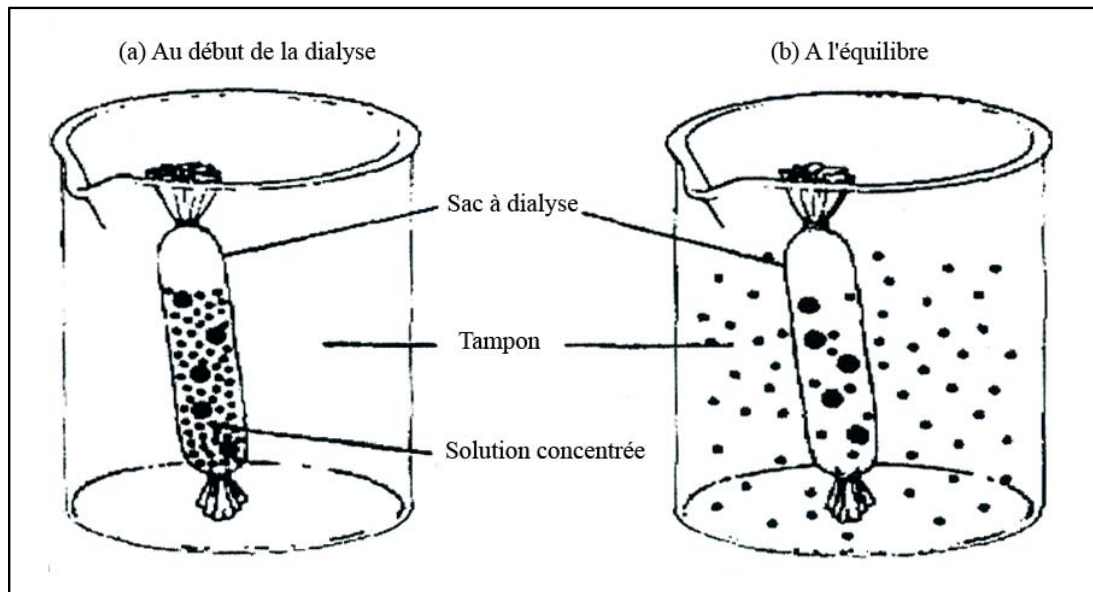
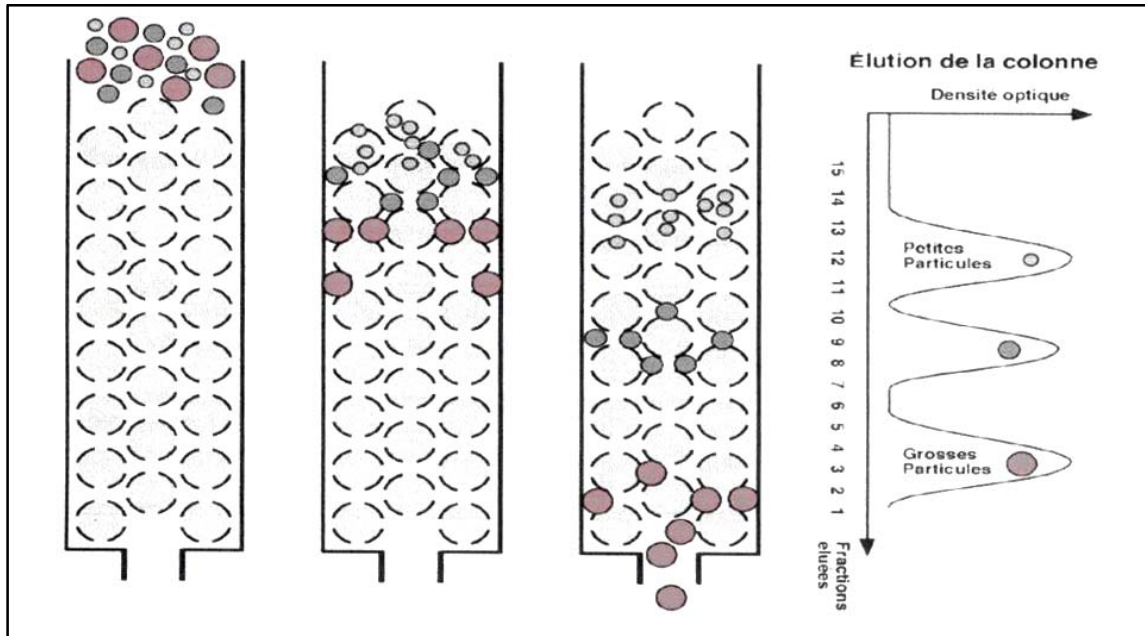


Figure 3 : Séparation de petites et grandes molécules par dialyse (Voet et Voet, 1998).

# Annexe 7

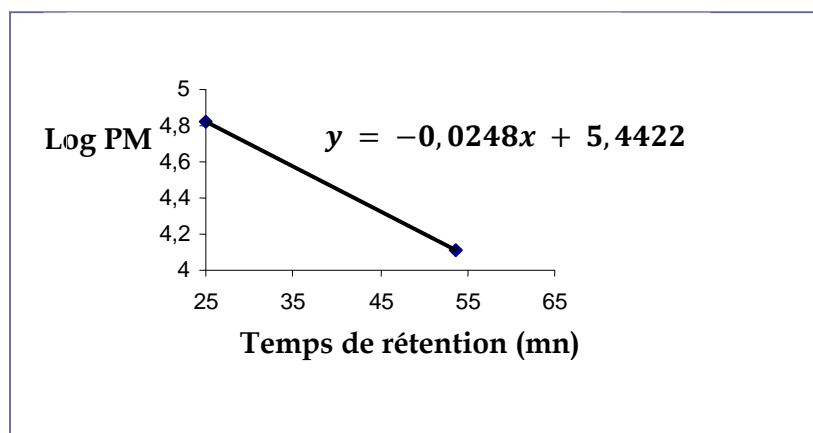
## Principe de la Gel filtration



**Figure 4 :** Principe de fonctionnement de la chromatographie d'exclusion moléculaire (ou Chromatographie par gel filtration) (Leblanc, 2006).

## Annexe 8

### Estimation du poids moléculaire de la Cynarase par une courbe étalon logarithmique



**Figure 5** : Droite d'étalonnage des protéines marqueurs ( $\text{Log PM} = f(\text{Tr})$ ) éluées sur Séphadex G-75.

B.S.A. : 67 kDa

Cytochrome C : 13 kDa

B.S.A: bovine sérum albumine.



## Annexe 9

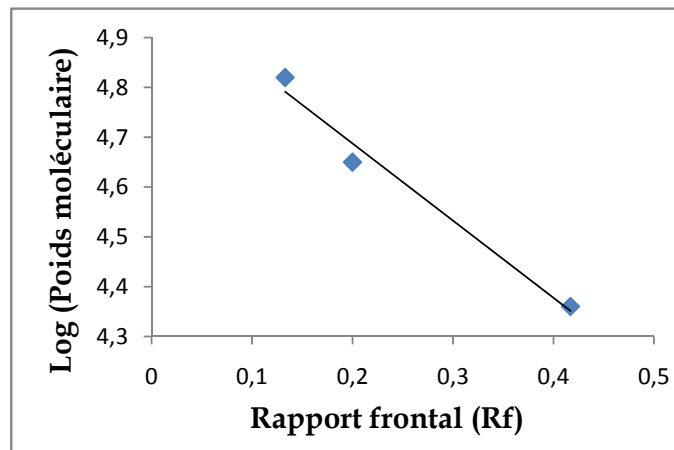
### Electrophorèse en conditions dénaturantes (P.A.G.E.-S.D.S.)

| Solutions   | Remarques   |
|---|---|
| <b>Solution acrylamide/bis-acrylamide</b>                             |   |
| Acrylamide  | 3 g   |
| Bis-acrylamide  | 0,08 g  |
| Eau distillée   | 10 ml   |
|   | La solution est dégazée puis filtrée. Elle se conserve à + 4°C.   |
| <b>Tampon Tris-HCl 1,5M pH 8,8</b>                                    |   |
| Tris base   | 18,224 g  |
| S.D.S.  | 0,2 g   |
| Eau distillée   | 80 ml   |
| Eau distillée Q.S.P.  | 100 ml  |
|   | Agiter quelques minutes puis filtrer. Garder à température ambiante dans un flacon foncé. Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl 4N. |
| <b>Tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8</b>                                    |   |
| Tris base   | 6,048 g   |
| S.D.S.  | 0,4 g   |
| Eau distillée   | 80 ml   |
| Eau distillée Q.S.P.  | 100 ml  |
|   | Agiter quelques minutes puis filtrer. Garder à température ambiante dans un flacon foncé. Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 4N. |
| <b>Tampon échantillon pH 6,8</b>                                      |   |
| <b>Solution (A) : stock</b>   |   |
| Tris-HCl 0,5 pH 6,8   | 1,65 ml   |
| E.D.T.A. pH 7,5   | 120 µl  |
| Saccharose  | 4,3 g   |
| Bleu de Bromophénol   | 120 µl  |
| Eau distillée Q.S.P.  | 20 ml   |
|   | Solution à stocker à +4°C.  |
| <b>Solution (B)</b>   |   |
| Solution (A)  | 800 µl  |
| S.D.S. (10%)  | 200 µl  |
| Bleu de Brophénol   | 80 µl   |
|   | Extemporaneément.   |
| <b>Tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8</b>                                    |   |
| Tris base   | 6,048 g   |
| Eau distillée   | 80 ml   |
| Eau distillée Q.S.P.  | 100 ml  |
|   | Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 4N.   |
| <b>Tampon de migration pH 8,3 (solution stock 10 fois concentrée)</b> |   |
| Tris base   | 3,03 g  |
| Glycine   | 14,42 g   |
| S.D.S.  | 1 g   |
| Eau distillée Q.S.P.  | 100 ml  |
|   | Ajuster le pH à 8,3 avec HCl 4N.  |

|  |          |  |
|--|----------|--|
| <b>Gel de séparation 12%</b>                       |          |  |
| Acrylamide/bis-acrylamide (30%)                    | 2,75 ml  | Le P.S.A. et le T.E.M.E.D. sont ajoutés en derniers. La polymérisation se fait à température ambiante. |
| Tris base 1,5M pH 8,8                              | 1,25 ml  |  |
| Eau distillée                                      | 1,3 ml   |  |
| P.S.A. (10%)                                       | 25 µl    |  |
| T.E.M.E.D.   | 10 µl    |  |
| <b>Gel de concentration 5%</b>                     |          |  |
| Acrylamide/bis-acrylamide (30%)                    | 0,375 ml | Le P.S.A. et le T.E.M.E.D. sont ajoutés en derniers. La polymérisation se fait à température ambiante. |
| Tris base 0,5M pH 6,8                              | 1 ml     |  |
| Eau distillée                                      | 2,25 ml  |  |
| P.S.A. (10%)                                       | 100 µl   |  |
| T.E.M.E.D.   | 20 µl    |  |
| <b>Solution de fixation</b>                        |          |  |
| T.C.A. à 12%                                       | 12 g     |  |
| Eau distillée                                      | 100 ml   |  |
| <b>Solution de coloration au bleu de Coomassie</b> |          |  |
| Bleu de Coomassie R-250                            | 0,415 g  | Agiter, filtrer et conserver à température ambiante.   |
| Méthanol   | 250 ml   |  |
| Acide acétique                                     | 50 ml    |  |
| Eau distillée                                      | 250 ml   |  |
| <b>Solution de décoloration</b>                    |          |  |
| Méthanol   | 250 ml   | Conserver dans un flacon brun à température ambiante.  |
| Acide acétique                                     | 50 ml    |  |
| Eau distillée                                      | 250 ml   |  |
| <b>Marqueurs</b>                                   |          |  |
| Bovin sérum albumin                                | 67 k Da  |  |
| Ovalbumine   | 43 k Da  |  |
| Trypsine inhibiteur                                | 23 k Da  |  |

# Annexe 10

## Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS)



**Figure 6 :** Droite d'étalonnage des protéines marqueurs (Log PM = f (Rf)).

## ملخص

منذ العشرية الأخيرة ، إنتقل الاهتمام بالأخص إلى الإنزيمات البديلة للروبة التجارية من أصل نباتي . هذه الدراسة تضمنت : إستخلاص، تنقية، وتبيان خصائص العامل التخثيري لأزهار الخرشوف المزروع الصنف البنفسجي والمتوفر محليا – الجزائر –

تبيان خصائص هذه الإنزيمية المتخثرة ( سينراز ، المنتقاة ) أفصحت عن نشاط تخثيري أقصى في درجة حرارة مقدرة ب 70 ° م ، 4pH ، تركيز  $CaCl_2$  في الحليب مقدر ب 0.04 مول ، كما أفصحت عن نشاط بروتوليتيكي عالي.

كل النتائج المحصل عليها والمتعلقة بالسينراز تؤكد إمكانية إستعمالها في التكنولوجيا الجبنية ، وعلى الصعيد الصناعي . دراسة معمقة مدعمة بالتماسا إقتصادية مرتاة مستقبليا، لتقييم إمكانية إستعمال محلي – الجزائر – .

كلمات مفتاحية : خرشوف، سينراز ، استخلاص ، تنقية ، تبيان الخصائص ، حليب ، التخثر ، كامومبير ، أنزيمية متخثرة.

## Résumé

Cette étude porte sur l'extraction, la purification partielle et la caractérisation de l'agent coagulant des fleurs d'artichaut cultivée (*Cynara scolymus*) variété « violet », disponible localement (Algérie).

L'obtention de la protéase a été réalisée par extraction au tampon acétate de sodium 0,1M, pH 5. L'extrait brut présente une force coagulante de l'ordre de 1/300.

Un essai de purification de l'extrait coagulant a été réalisé par une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-75.

Les conditions optimales d'activité coagulante de l'extrait purifié ont été déterminées. L'activité est maximale à pH 5,4 ; à une température de 70°C ; et pour une concentration en  $CaCl_2$  du lait de 0,04M. L'enzyme présente également une activité protéolytique élevée par rapport à la présure traditionnelle.

Les résultats obtenus concernant la Cynarase, confirment la possibilité de son usage en technologie fromagère et à l'échelle industrielle.

Une étude plus approfondie renforcée par une approche économique est envisagée pour évaluer la possibilité d'une utilisation locale (Algérie).

**Mots clés :** Artichaut, Cynarase, protéase de *Cynara scolymus*, extraction, purification, caractérisation, coagulant du lait, présure.

## Abstract

For these last decades and for corporate names, religious and pathologicals reasons, the interest has been related to substitute's rennet of vegetable origin.

In the same interest, this study relates to the extraction, the purification and the characterization compared with a rennet used on an industrial scale , of the agent coagulant of the artichoke flowers cultivated (*Cynara scolymus*) variety "purple", available locally (Algeria).

The characterization of this coagulase (Cynarase) purified revealed an optimum of activity coagulating at a temperature of 70°C, pH 5,4 and with a concentration of  $CaCl_2$  of the milk of 0,04M as well as a high proteolytic activity.

All the results obtained concerning Cynarase, confirm the possibility of its use in cheese-making technology and on an industrial scale.

A thorough study reinforced by an economic approach is planned to evaluate the possibility of a local use (Algeria).

**Key words:** Artichoke, Cynarase, proteases, extraction, purification, characterization, milk, coagulation.