

REPUBLIQUE ALGERIENNE DE²MOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département des Sciences Alimentaires

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BENABDERRAHMENE Abid

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Spécialité : PRODUCTION ET TRANSFORMATION LAITIERE

THÈME

**APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE
D'UNE ENZYME COAGULANTE EXTRAITE DES FLEURS DE CHARDON**

Soutenu publiquement le : 29 juin 2025

DEVANT LE JURY:

Présidente	Dr TAHLAITI Hafida	MCA	UMAB Mostaganem
Examineur	Dr DAHOU Abdelkader El Amine	MCA	UMAB Mostaganem
Encadrante	Dr MENAD Najett	MCA	UMAB Mostaganem
Co-encadrant	Dr MOGHTET Snoussi	MCA	CU d'El Bayadh

Travail réalisé au du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale

Année universitaire : 2024-2025

REMERCIEMENTS

Au nom du Grand Dieu; le clément; le miséricordieux

Louanges au prophète Mohamed

Mes premiers remerciements vont à mon enseignante Madame MENAD Najett, au département des Sciences Alimentaires, de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem ; d'avoir accepté de diriger et d'orienter ce travail de master

Je tiens à remercier aussi, Dr DAHOU Abdelkader El Amine, pour ses orientations, son accompagnement tout au long de ma formation, son accueil à la réalisation de ce projet de fin d'études, son aide et ses conseils très précieux dans l'exploitation des résultats.

Il est agréable d'exprimer ma pleine gratitude pour votre simplicité et votre générosité preuve de votre qualité humaine et scientifique.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Dr TAHLAITI Hafida de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem, qui a accepté d'évaluer ce travail et de présider ce jury, qu'elle soit ici remercier de l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.

Je tiens aussi à remercier Dr DAHOU Abdelkader El Amine d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner mon travail.

Mes remerciements s'adressent à la cheffe du département des Sciences Alimentaires, à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation, à mon épanouissement dans ce parcours et pour leurs aides et encouragements au cours de mes études.

Mes remerciements vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACE

Tout d'abord, je tiens à remercier mon Dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

□ À mes très chers parents, en reconnaissance de leurs innombrables sacrifices et de leur soutien indéfectible tout au long de ma formation.

À mes sœurs et frères □

À mes ami(e)s les plus proches

À toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, dans la réalisation de ce travail

Résumé :

La préparation d'un caillé fromager par coagulation du lait à l'aide d'extraits des fleurs de chardon constitue une technologie originale spécifique de certaines régions Algériennes. Notre étude s'inscrit dans le cadre de la préservation du patrimoine culinaire du pays en caractérisant le pouvoir coagulant de l'extrait enzymatique de cette plante afin de combler le manque de données scientifiques sur ce coagulant.

Cette caractérisation permettra de proposer des solutions technologiques à la substitution de l'enzyme coagulante commerciale utilisée par les fromageries. En effet, les tests préliminaires effectués sur la fleur de la plante, indiquent une activité coagulante intéressante pour une utilisation dans la fabrication des coagulums fromagers mixtes.

L'extrait enzymatique obtenu à partir des fleurs de chardon a révélé une bonne coagulation d'un lait fromager, obtenue à partir d'une poudre de lait fromagère « low heat ». Les temps technologiques (temps de prise) obtenus, de 1820 secondes pour l'enzyme de fleur de chardon et de 1500 secondes pour l'enzyme commerciale, respectent la norme FIL fixée entre 960 secondes à 1920 secondes pour obtenir un caillé fromager enzymatique conforme.

Cet extrait enzymatique des fleurs de chardon a donné les résultats escomptés pour la fabrication d'un fromage à caillé mixte.

Ces résultats obtenus permettent d'envisager l'approche scientifique à l'application industrielle des coagulants naturels pour la substitution des coagulants commerciaux dans la fabrication des fromages locaux et la préservation de leur typicité.

Mots clefs: Extrait enzymatique, fleurs de chardon, temps technologiques, caillés fromagers mixtes.

Abstract :

The preparation of cheese curds by milk coagulation using thistle flower extracts is an original technology specific to certain Algerian regions. The aim of our study is to characterize the coagulating power of the enzymatic extract of this plant, in order to make up for the lack of scientific data on this coagulant.

This characterization will make it possible to propose technological solutions to replace the commercial coagulating enzyme used by cheese dairies. In fact, preliminary tests carried out on the plant's flower indicate an interesting coagulant activity for use in the manufacture of mixed cheese curds.

The enzymatic extract obtained from thistle flowers showed good coagulation of a cheese milk obtained from a “low heat” cheese milk powder. The technological times (setting times) obtained, 1820 seconds for the thistle flower enzyme and 1500 seconds for the commercial enzyme, are in line with the IDF standard set between 960 seconds and 1920 seconds to obtain a compliant enzymatic cheese curd.

This enzymatic extract from thistle flowers gave the expected results for the manufacture of a mixed curd cheese.

These results enable us to envisage a scientific approach to the industrial application of natural coagulants for the substitution of commercial coagulants in the manufacture of local cheeses and the preservation of their typicality.

Key words: Enzyme extract, thistle flowers, technological times, mixed cheese curds.

ملخص

يعد تحضير خثارة الجبن عن طريق تخثر الحليب باستخدام مستخلصات زهرة الشوك تقنية أصلية خاصة ببعض المناطق الجزائرية. تندرج دراستنا هذه في إطار الحفاظ على تراث تحضير مشتقات الحليب في البلاد من خلال توصيف قوة تخثر المستخلص الأنزيمي لهذا النبات من أجل سد الفجوة في البيانات العلمية حول هذا المخثر.

هذا التوصيف سيجعل من الممكن اقتراح حلول تكنولوجية لاستبدال إنزيم التخثر التجاري المستخدم في مصانع الأجبان. تشير الاختبارات الأولية التي أجريت على زهرة النبات إلى وجود نشاط تخثر مثير للاهتمام لاستخدامه في تصنيع خثارة الجبن المخلوط.

أظهر المستخلص الأنزيمي الذي تم الحصول عليه من أزهار الشوك تخثرًا جيدًا لحليب الجبن الذي تم الحصول عليه من مسحوق حليب الجبن "منخفض الحرارة". تتوافق الأزمنة التكنولوجية (أوقات التخمر) التي تم الحصول عليها، 1820 ثانية لإنزيم زهرة الشوك و1500 ثانية للإنزيم التجاري، مع معيار IDF المحدد بين 960 ثانية و1920 ثانية للحصول على خثارة جبن إنزيمية متوافقة.

وقد أعطى مستخلص إنزيم زهرة الشوك النتائج المرجوة لتصنيع جبن الخثرة المختلطة.

هذه النتائج تجعل من الممكن تصور نهج علمي للتطبيق الصناعي للمخثرات الطبيعية للاستعاضة عن المخثرات التجارية في تصنيع الأجبان المحلية والحفاظ على نموذجيتها.

الكلمات المفتاحية: المستخلص الأنزيمي، زهور الشوك، الأزمنة التكنولوجية، خثارة الجبن المختلطة

Liste des abréviations

CMP : Caséine-Macro-Peptide

CNIEL : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière

FAO : Food and Agriculture Organisation

FIL : Fédération Internationale du Lait

IDF : International Dairy Federation

LSTPA : Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale

Met : Méthionine

NPN : Azote non Protéique

NT : Azote total

PCK : Para- Caséine- Kappa

Phe : Phénylalanine

UAC : Unité d'Activité Coagulante

Liste des figures et des tableaux

Figures

01	Représentation schématique du processus de formation d'une micelle hétérogène de caséine..	4
02	La coagulation acide.....	6
03	Processus de la coagulation enzymatique du lait.....	10
04	Processus des 03 voies de coagulation des laits.....	14
05	Fleur de chardon.....	26
06	Extrait enzymatique clarifié obtenu de la fleur de chardon.....	28
07	Comparaison de l'aspect du coagulum formé après le temps de prise et l'activité enzymatique des 02 enzymes.....	37
08	Aspect du coagulum avec l'enzyme commerciale.....	37
09	Aspect du coagulum avec l'enzyme extraite de la fleur de chardon.....	37
10	Aspect du caillé fromager mixte après coagulation totale et tranchage.....	38
11	Aspect du caillé fromager mixte après moulage et égouttage.....	38
12	Cinétique de la libération du NPN pour la coagulation avec l'enzyme de fleur de chardon.....	40
13	Cinétique de la libération du NPN pour une coagulation à base d'enzyme commerciale.....	40

Tableaux

01	Caractéristiques de coagulation des différentes catégories de fromages.....	8
02	Origine des différentes enzymes coagulantes.....	16
03	Qualité physico-chimique du lait expérimental utilisé.....	35
04	Qualité de l'extrait enzymatique « Fleurs de chardon ».....	36
05	Teneur en azote non protéique libéré.....	39

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures et des tableaux

Introduction1

Partie synthèse bibliographique

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

1-Coagulation des laits.....	3
2-Coagulation des laits par voie acide.....	5
2.1- Modalités de la coagulation par voie acide.....	7
2.2- Propriétés des bactéries lactiques.....	8
2.3- Choix des levains.....	9
3- Coagulation des laits par voie enzymatique.....	10
4- Coagulation des laits par voie mixte.....	13

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

1. Enzymes coagulantes dans la transformation laitière.....	15
2. Enzymes coagulantes d'origine animale.....	16
3. Enzymes coagulantes d'origine microbienne.....	17
4. Enzymes coagulantes d'origine végétale.....	19
5. Propriétés protéolytiques des extraits végétaux.....	20
6. Aspects techno- fonctionnels des extraits végétaux.....	24

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

1- Cadre et objectifs de l'étude.....	26
2-Provenance des échantillons expérimentaux.....	26
2.1- Coagulant végétal.....	26
2.2- Le lait.....	27
2.3- Enzyme commerciale.....	27
3-Préparation du coagulant végétal.....	28
3.1- Séchage.....	28
3.2- Préparation de l'extrait de fleurs de chardon.....	28
4-Techniques d'analyse.....	29
4.1-Caractérisation physico-chimique du lait reconstitué.....	29
4.2- Caractérisation de l'extrait enzymatique.....	32
4.2.1- Détermination des temps de coagulation.....	32
4.2.2- Détermination de l'unité de l'activité coagulant.....	33
4.2.3- Cinétique de la protéolyse.....	33
5- Analyse statistique.....	35

Chapitre III : Résultats et Discussion

1- Qualité physico-chimique du lait expérimental utilisé.....	35
2- Qualité de l'extrait enzymatique en comparaison avec l'enzyme commerciale.....	35
3- Cinétique de la protéolyse coagulante.....	38
Conclusion.....	42
Références bibliographiques.....	44
Annexes.....	50

Introduction

Introduction

La vente mondiale des coagulants laitiers représente plus de 60% de la vente des enzymes (CNIEL, 2024). Ces enzymes jouent un rôle incontestable dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire, et dans la biotechnologie industrielle. De fait, l'industrie laitière est la plus grande utilisatrice de protéases, qui servent dans les applications les plus importantes soit plus précisément dans la coagulation laitière et la fabrication de fromages.

La transformation fromagère comporte plusieurs étapes dont l'une des plus fondamentales est la coagulation du lait. Cette coagulation est traditionnellement obtenue par action sur le lait, de la présure, qui est une enzyme extraite industriellement des caillettes de veaux non sevrés (Dagleish *et al.*, 2012). Depuis l'industrialisation de la transformation fromagère et jusqu'aux années 1950, la présure était l'enzyme dont l'utilisation était dominante dans la fabrication fromagère. Des pénuries mondiales ont suivi en raison du fait que sa production soit tributaire du marché de la viande (CNIEL, 2024). Actuellement, la production de présure traditionnelle (ou animale) ne couvre que 25% de la demande mondiale en coagulants (CNIEL, 2024). Cette carence mondiale en présure a conduit à une augmentation de son prix. Cette situation a conduit à la recherche d'autres préparations enzymatiques alternatives d'origines diverses, pouvant coaguler le lait de façon analogue à la présure.

Dans ce cadre plusieurs recherches menées par des firmes internationales (DSM Food, DANISCO et CHR HANSEN) pour trouver des substituts à la présure. Dans ce contexte, des protéases microbiennes mais surtout des protéases produites par des microorganismes génétiquement modifiés ont donné des résultats satisfaisants (Benani, 2017 ; Ramet, 2021 ; Talantikite-Kellil, 2015).

Ces dernières années, une attention croissante a été dirigée vers des extraits enzymatiques naturels d'origine végétal comme alternative (Getachew *et al.*, 2024 ; Mir Khan

et al., 2020). Ces protéases retiennent l'attention, non seulement en raison de leur activité protéolytique, mais également parce qu'elles sont généralement actives dans une large gamme de températures et de pH (**Kaur et al.**, 2024) et peuvent être optimisées dans les différentes familles de fromages fabriqués.

Un grand nombre de travaux ont été réalisés autour de l'effet des coagulants végétaux sur la coagulation des laits issus de diverses espèces animales (bovin, ovin et caprin) et sur la protéolyse du caillé fromager en affinage. Ainsi, ce présent travail se propose d'étudier l'effet de la substitution d'une enzyme animale commerciale par une enzyme d'origine végétale extraite de la fleur de chardon « *Cynara cardunculus* » sur la coagulation laitière et sur certaines activités protéolytiques du caillé fromager obtenu, dans le but de permettre une appréciation de l'intérêt des coagulants naturels comme succédanés aux enzymes commerciales.

Ce mémoire a été établi comme suit :

- Une synthèse bibliographique abordant les mécanismes de coagulation et les enzymes coagulantes utilisés en transformation laitière.
- Une partie expérimentale avec une présentation sur la méthodologie du cadre et des objectifs de l'étude, la préparation du coagulant végétal, son évaluation sur du lait fromager, son activité coagulante et sa cinétique protéolytique. Une discussion des résultats avec une approche ciblée des aptitudes coagulantes de l'extrait enzymatique végétal en comparaison à une enzyme commerciale et son orientation vers des applications fromagères.
- Enfin une conclusion sur l'étude établie et les perspectives envisagées.

PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

Mécanismes de coagulation des laits

1- Coagulation des laits

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait (**Alais et al., 2008**). Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

- Par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure,
- Par voie fermentaire à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains).

Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents. Bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un coagulum (gel ou caillé), les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation (**Attia et al., 2000**). L'aptitude à l'égouttage, dont dépendent les caractéristiques physico-chimiques du fromage non affiné, est déterminée également de façon spécifique.

Dans les techniques fromagères classiques, les deux modes de coagulation ne sont jamais utilisés séparément, seule varie l'importance relative de leur action coagulante respective (**Ouanezar et al., 2012**). Cette distinction permet de classer les fromages en trois grandes catégories :

- Les pâtes fraîches qui résultent d'une coagulation à caractère lactique prédominant ;
- Les pâtes pressées qui résultent d'une coagulation à caractère présure prédominant ;
- Les pâtes molles qui résultent d'une coagulation à caractère mixte.

Le substrat spécifique intéressé par le phénomène de coagulation dans le lait est constitué par les protéines, essentiellement représentées par les caséines (**Thapon, 2005**).

Ces protéines constituent la phase colloïdale ; elles se trouvent pour leur plus grande part à l'état originel dans le lait sous forme de micelles (**Xiuju et Zhengtao, 2022**). Les micelles sont des agrégats hétérogènes formés des polymères des différentes fractions

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

caséiniques et associés, sous forme de complexes, à plusieurs sels minéraux dont le plus représentatif est le phosphate de calcium (figure 01).

La forme des micelles est subsphérique : leur diamètre moyen varie entre 30 et 300 μm , celui-ci varie avec l'espèce, la race et le stade de lactation et se situe pour le lait de vache entre 80 et 100 μm . La composition des micelles provenant d'une même femelle laitière n'est pas constante ; les petites micelles sont deux fois plus riches en caséine K que les grosses, leur degré d'hydratation est plus élevé (**De Kruif *et al.*, 2012**).

La structure des micelles est mal connue. De nombreux modèles ont été proposés ces dernières années ; le plus récent place la caséine K aux points d'articulations d'un réseau formé de polymères de caséine A et B. Entre les mailles du réseau protéique se trouve fixé le phosphate colloïdal. Cette micelle renfermerait 97% de la caséine totale, 3 % se trouvant à l'état très dispersé dans la phase aqueuse (**Mc-Sweeney, 2004**).

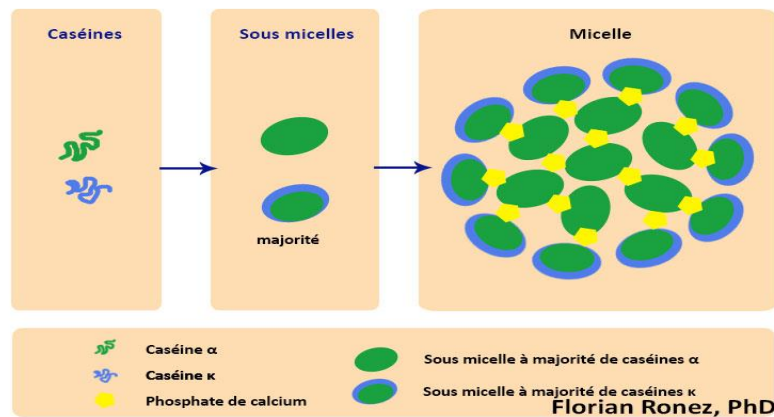


Figure 01 : Représentation schématique du processus de formation d'une micelle hétérogène de caséine (**Ronez, 2012**)

Plusieurs facteurs contribuent à conférer aux micelles leur stabilité : les principaux sont leur charge électrique, leur degré d'hydratation et leur charge minérale (Ronez, 2012).

- La charge électrique des micelles du lait frais est fortement négative ; ce caractère résulte de la présence de nombreux groupements COO, correspondant aux amino-acides

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

dicarboxyliques constituant en particulier la caséine K. Les micelles peuvent être assimilées à de gros ions chargés négativement, leur dispersion dans le lactosérum résulte de la forte répulsion électrostatique qui s'exerce entre particules voisines.

- Le degré d'hydratation des micelles est élevé : 1 g de protéines fixe environ 2,5 g d'eau. Ce caractère très hydrophile de la micelle correspond à la présence à sa périphérie d'une couche d'eau liée, étroitement fixée aux protéines, et d'une couche d'eau d'hydratation à structure moléculaire plus lâche, et moins orientée. Ces enveloppes d'eau contribuent à stabiliser fortement la micelle.
- Les sels minéraux, notamment Ca et P, se trouvent dans le lait sous des formes variées que l'on a coutume de classer en formes solubles et insolubles ou colloïdales

2. Coagulation des laits par voie acide

Le mécanisme de la coagulation acide est de nature électrochimique. Quel que soit le processus envisagé, l'acidification entraîne une chute du degré de dissociation des groupements acides (COO, PO₃H) du phosphocaséinate de calcium. Les ions H⁺ libérés par l'acidification neutralisent progressivement les charges électronégatives : la répulsion électrostatique diminue au fur et à mesure de l'enrichissement du milieu en ions H⁺, puis disparaît (**Attia et al., 2000**).

A la température ambiante, les micelles commencent à s'agréger à pH 5,2. Lorsque le pH isoélectrique de la caséine est atteint (pH 4,6), il y a floculation totale (figure 02). Si l'acidification intervient sur un lait au repos, il y a formation d'une structure continue occupant tout le volume initial du lait : le gel ou coagulum ; si le lait est en mouvement, il y a apparition d'un précipité baignant dans la phase dispersante (**Marchin et al., 2007**).

La coagulation acide est fortement dépendante de la température : pour des températures croissantes du lait supérieures à + 5°C, la floculation apparaît à des valeurs d'acidité de plus

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

en plus basses. Un lait acide peut aussi coaguler de manière imprévue lors du chauffage : il y a donc lieu de contrôler l'acidité avant tout traitement thermique, lorsqu'on redoute cette floculation.

Au contraire, une acidification sera souhaitable lorsqu'on réalise la précipitation thermique des protéines comme cela est pratiqué dans plusieurs procédés artisanaux de fabrication de fromages.

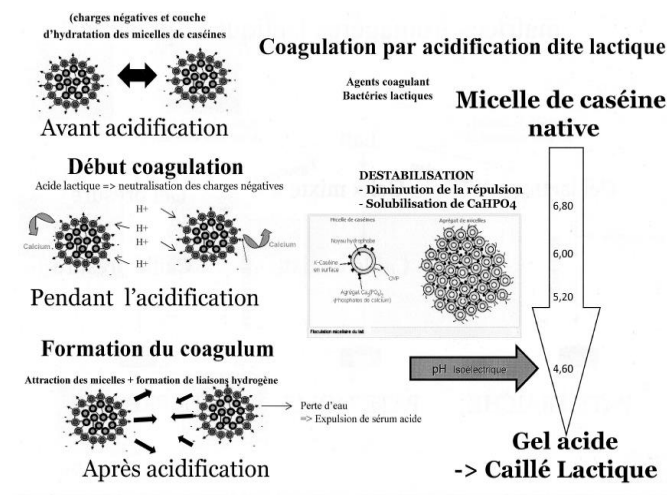


Figure 02 : La coagulation acide (Ronez, 2012)

A l'opposé, pour les températures inférieures à 5°C, la floculation par voie acide ne se fait plus, seule la viscosité du lait s'accroît et il n'est pas possible d'obtenir un gel véritable. En pratique fromagère la température choisie pour la coagulation est généralement comprise entre 20 et 35°C, elle contribue à une déstabilisation dans des délais raisonnables (Ronez, 2012).

La neutralisation des charges micellaires, consécutive à l'acidification, s'accompagne d'une déminéralisation corrélative de la micelle, la solubilisation du phosphate de Ca et du Ca liés à la caséine croît avec l'acidification (figure 02). Au pH isoélectrique, la charge minérale de la caséine devient nulle ; on obtient ainsi une caséine dite "Isoélectrique" entièrement désalifiée (Dalglish, 2007). Au cours des fabrications fromagères,

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

l'acidification développée en cours de coagulation et d'égouttage conduit toujours à une déminéralisation plus ou moins poussée du coagulum. Le contrôle constant de cette évolution permet de suivre et de régler la charge minérale du caillé ; cette dernière conditionne directement l'aptitude à l'égouttage et détermine, en grande partie, la composition et l'extrait sec finals du fromage. Pour un fromage donné, toute dérive de l'acidification au dehors de l'évolution standard se traduira par un accident (**Pradal, 2012**).

L'acidité développée n'est pas la même pour tous les types de fromages, mais possède pour chacun d'eux une valeur caractéristique qui est déterminée principalement par l'importance de la quantité de lactose transformée et par l'humidité finale du produit, les fromages humides étant généralement plus acides que les fromages secs (**Ramet, 2021**).

Au plan de la conservation, l'acidification intervient en ralentissant la croissance des micro-organismes intervenant dans l'altération du substrat ; mais cet effet est sélectif. Dans les limites d'acidification observées au cours de la fabrication des fromages, le développement des bactéries est ralenti d'une manière importante, celui des levures et des moisissures n'est que légèrement atténué (**Dahou et al., 2021**).

2.1- Modalités de la coagulation par voie acide

En fromagerie classique, l'acidification du lait est réalisée par voie biologique par l'intermédiaire de bactéries lactiques dont la caractéristique métabolique dominante permet la transformation du lactose en acide lactique (**Vignola, 2002**). Exceptionnellement, un apport limité d'acide organique peut contribuer à la déstabilisation des micelles; il s'agit d'une pratique utilisée surtout au plan industriel pour régler l'acidité initiale du lait et obtenir ainsi des temps de coagulation normalisés, nécessaires aux opérations de traitements ultérieurs mécanisés ou automatisés du coagulum (**Smit, 2003**).

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

En pratique fromagère (**Tirard-Coller *et al.*, 2002**), la fermentation lactique peut être conduite en faisant appel :

- aux bactéries lactiques présentes à l'état naturel dans le lait cru;
- aux bactéries lactiques apportées sous forme de levains.

Dans les deux cas, l'acidification est directement liée aux propriétés des bactéries lactiques présentes avec un ensemencement bactérien (bact/ml lait) lié à la catégorie de fromages sollicitée (tableau 01) et aux facteurs de milieu qui conditionnent leur développement (**Bennett et Johnston, 2004**).

Tableau 01: Caractéristiques de coagulation des différentes catégories de fromages
(**Bennett et Johnston, 2004**)

Catégories de fromages	Concentration de l'inoculum	
	Enzyme coagulante force : 1/10 000 (ml/100 kg lait)	Bactéries lactiques (bact/ml lait)
Pâtes fraîches	1–5 ml	2–5 10 ⁵
Pâtes molles	18–22 ml	1–2 10 ⁵
Pâtes pressées:		
• non cuites	20–25 ml	1–2 10 ⁵
• cuites	22–40 ml	0,5 10 ⁴

2.2- Propriétés des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques font partie de la famille des *Lactobacteriaceae* et se classent en deux tribus (**Vioque *et al.*, 2000**) :

- Les *Streptococaceae*, bactéries sphériques se présentant à l'examen microscopique sous forme de chaînes plus ou moins longues;
- Les *Lactobacilleae*, bactéries allongées en forme de bâtonnet;

Ces bactéries sont très exigeantes en ce qui concerne leurs besoins azotés et vitaminiques. La présence dans le milieu de culture de facteurs de croissance et d'oligo-

éléments est indispensable pour leur développement.

Elles utilisent le lactose dans leur métabolisme en le transformant en acide lactique, et en produits secondaires intervenant notamment dans le goût et l'arôme des produits laitiers. Elles possèdent une activité protéolytique faible, mais en raison de leur grand nombre dans le fromage (1 milliard/g), elles contribuent efficacement à la transformation de substrat lors de l'affinage où l'action de leurs protéases s'ajoute à celle de la présure pour dégrader la caséine (Lo Piero *et al.*, 2002).

2.3- Choix des levains

Sélection des souches en fonction de leurs pouvoirs acidifiant (quantité d'acide lactique produite par unité de temps) et aromatisant ainsi que de leur résistance aux bactériophages (Mahaut *et al.*, 2000).

Sélection de levains d'après l'adéquation entre leur composition et le type de fromages fabriqués. Généralement l'équilibre suivant est recherché pour les produits ci-après :

- Beurre, pâtes fraîches, pâtes molles, pâtes persillées et pâtes pressées non cuites :

- *Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* : ce sont des germes acidifiants ; leur température d'incubation varie entre 20 et 30°C ;
- *Lactococcus diacétylactis* et *Leuconostoc citrovorum* : ce sont des germes producteurs de diacétyle; leur température d'incubation varie entre 20 et 30°C. Leur activité acidifiante n'est pas négligeable; elle varie selon les souches.
- *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*: leur température optimum de développement se situe vers 40–45°C. Ces bactéries sont utilisées facultativement et en très petites quantités en raison de leur pouvoir acidifiant très élevé.

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

- Fromages à pâtes pressées cuites :

- *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*: leur température d'incubation se situe vers 38–40°C ; il existe entre ces deux bactéries un phénomène particulier de symbiose : *Streptococcus thermophilus* ne se développe bien qu'en présence de produits d'hydrolyse de la caséine résultant de l'action du *Lactobacillus*.

Ferments propioniques du genre *Propionibacterium* responsables de l'ouverture des fromages. Ces ferments n'appartiennent pas au groupe des bactéries lactiques. Le coagulum formé par voie acide possède des propriétés rhéologiques caractéristiques : il est friable, peu élastique, son raffermissement est très limité et très lent. Sa porosité est bonne, sa perméabilité élevée, mais son aptitude à l'égouttage est limitée (Mc-Sweeney, 2004).

3. Coagulation des laits par voie enzymatique

Le mécanisme d'action des enzymes coagulantes lors de la coagulation du lait est bien connu (Harboe *et al.*, 2010). Schématiquement, lors de la réaction d'hydrolyse, un fragment de la caséine, le caséinopeptide est dissocié de la micelle et éliminé dans le lactosérum ; le phénomène peut être résumé comme suit :

Phosphocaséinate de Ca → Phosphoparacaséinate de Ca + caséinopeptide soluble

A la suite de l'hydrolyse, la caséine Kappa, qui à l'état originel protégeait la micelle de l'insolubilisation, perd ce pouvoir protecteur et provoque une modification de structure et de composition de la micelle qui conduit à la gélification (figure 03).

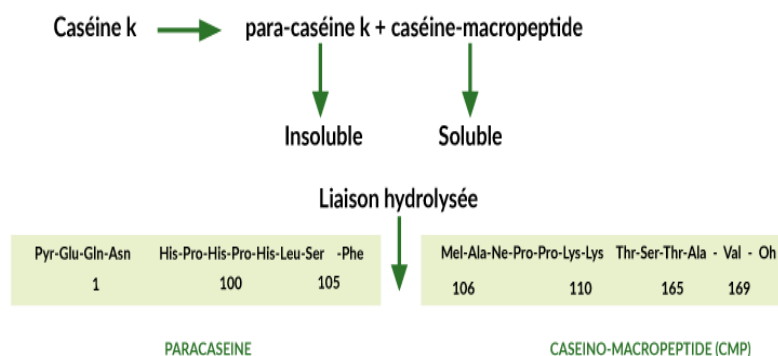


Figure 03 : Processus de la coagulation enzymatique du lait (Ronez, 2012)

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

La perte du pouvoir protecteur est liée au fait que l'hydrolyse prive la micelle des groupements chimiques stabilisateurs présents sur la caséine Kappa ; il s'agit de fonctions hydrophiles conférant l'hydratation et de fonctions acides apportant la charge électro négative à la micelle et responsables de sa stabilité native (**Ronez, 2012**).

Le phénomène de coagulation a été largement étudié, il se dissocie en deux phases successives :

- Une phase dite primaire qui correspond à la réaction d'hydrolyse proprement dite de la fraction Kappa ; elle se traduit par une augmentation progressive de l'azote solubilisé dès l'apport de l'enzyme coagulante au lait.

En fin de réaction, lorsque toute la caséine Kappa a été hydrolysée, la teneur en azote soluble se stabilise à 1,6 % de la teneur en azote total.

La réaction primaire est très sensible à la température, elle est très lente entre 0 et 10°C, sa vitesse augmente rapidement aux températures supérieures, elle triple lorsque l'élévation de température est de 10°C (**Hsieh et Pan, 2012**).

Une phase secondaire correspondant à la floculation proprement dite. Cette réaction ne peut se faire que si elle a été précédée par la phase primaire (**Hsieh et Pan, 2012**).

Le processus de la floculation est mal connu, il résulte vraisemblablement dans une première étape de l'agrégation des micelles en filaments, puis dans une seconde étape, de l'entrelacement de ces filaments en un réseau tridimensionnel. Cette phase est très sensible aux variations de température. Elle ne se produit pas à des températures inférieures à + 15°C. Au-delà, sa vitesse croît très rapidement, elle est multipliée par 15 par élévation de température de 10°C (**Amiot et al., 2002**).

Par ailleurs, la présence du calcium soluble à l'état ionisé est indispensable à l'accomplissement de la phase secondaire. Dans le lait cru, la présence de calcium est suffisante pour permettre une bonne coagulation (**Cecchinato et al., 2012**).

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

Au contraire, dans les laits pasteurisés où le chauffage a insolubilisé le calcium, il est nécessaire de restaurer la charge initiale en ions par apport de chlorure de calcium. Cet apport est réalisé le plus souvent à raison de 5 à 30 g/100 kg de lait. Il y a lieu de ne pas dépasser ces concentrations, un excès de calcium augmente en effet le risque d'apparition de goût amer dans le fromage en particulier si ce sel n'est pas purifié et renferme notamment du magnésium (**Cecchinato *et al.*, 2012**).

La phase secondaire est un phénomène dynamique qui se traduit par une modification importante des propriétés physiques du lait (**Ronez, 2012**). Dans les premières minutes suivant l'apport de l'enzyme coagulante dans le lait préconisée suivant la catégorie fromagère (tableau 01), une diminution de la viscosité du lait apparaît ; elle s'explique par la diminution de la dimension moyenne des micelles consécutive à leur hydrolyse spécifique.

Lorsque l'agrégation des micelles devient prépondérante sur la réaction d'hydrolyse, la viscosité s'accroît progressivement avec l'augmentation de la taille des agrégats formés et conduit à la formation d'une structure continue : le gel. Un point privilégié de cette évolution est la floculation qui correspond au moment où les agrégats deviennent visibles par l'oeil humain, mais cette étape n'a pas d'autre signification particulière en soi.

Ce point particulier est défini par le temps de floculation qui sépare le moment de l'addition de l'enzyme coagulante, et celui où le début de gélification est visible (**Croguennec *et al.*, 2008**).

La phase primaire et la phase secondaire diffèrent donc principalement par leur sensibilité aux variations de température ; en pratique il y a donc lieu d'ajuster très précisément au degré près ce paramètre de manière à bien maîtriser la phase de coagulation.

Par ailleurs, cette sensibilité différentielle à la température a été exploitée dans certains procédés modernes de coagulation en continu : le lait le plus souvent concentré est mûré et emprésuré à basse température (5–10°C), la phase primaire a lieu pendant ce stockage ;

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

pour provoquer la floculation, il suffit de réchauffer le lait à une température supérieure à 15°C, la coagulation est alors instantanée (Dalglish, 2007).

4. Coagulation des laits par voie mixte

Dans le lait, les micelles de caséines et les globules gras sont chargés négativement. Ceci entraîne une répulsion électrostatique qui assure la stabilité du lait (Dahou *et al.*, 2021). Les fragments de caséine sont hydrophiles et se trouvent en périphérie des micelles, où ils créent une couche d'hydratation (eau retenue empêchant le rapprochement des colloïdes entre eux).

Dans la coagulation des laits par voie mixte, l'artisan fromager doit d'une part maîtriser la production d'acide lactique, issu de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques (d'une fermentation lactique), par l'utilisation d'une flore lactique à pouvoir acidifiant rapide pour atteindre rapidement le pH 4,6 (appelé point isoélectrique de la caséine) et obtenir la neutralité des charges négatives portées par la caséine kappa. L'acide déshydrate ainsi les micelles, ce qui leur permet de se rapprocher.

D'autre part, l'enzyme coagulante utilisé à faible force ou activité coagulante capable d'hydrolyser la liaison Phe(105)-Met(106) de la k-caséine (figure 03). Cette hydrolyse coupe la molécule en deux. On obtient d'une part le CMP (Caseino-Macro-Peptide) hydrophile et soluble, diffusé à l'extérieur de la micelle de caséines ; d'autre part le PCK (Para-Caséine-Kappa) hydrophobe, qui lui reste à l'intérieur. La rapidité du déroulement dépend du pH et de la température (Ronez, 2012).

L'action optimale de l'enzyme qui est à 40°C et à pH 4,6 pour les fromages à pâte dure et à dominance enzymatique. A 35-37°C et à pH 5,8-6,3 pour les fromages à pâte molle et à dominance lactique.

Chapitre I : Mécanismes de coagulation des laits

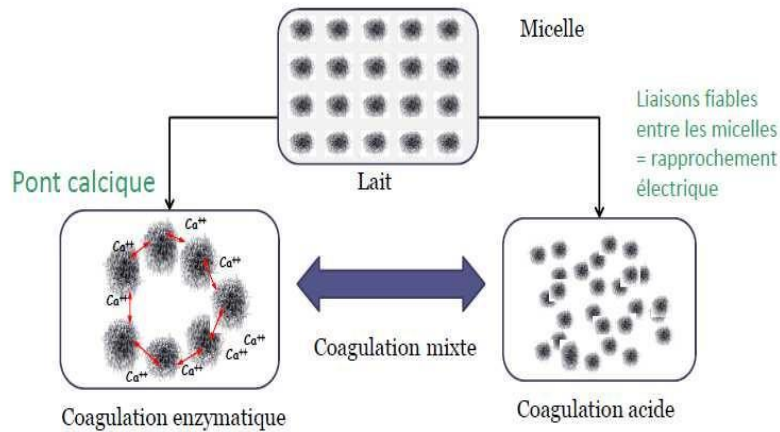


Figure 04 : Processus des 03 voies de coagulation des laits (**Ronez, 2012**)

La figure 04 montre que la coagulation des laits est une réaction irréversible (**Ronez, 2012**).

On obtient de cette réaction soit un:

- caillé avec un gel souple non friable pour une coagulation 100% enzymatique;
- caillé avec un gel ferme pour une coagulation mixte à dominance lactique;
- caillé avec gel compact pour une coagulation mixte à dominance enzymatique;
- caillé friable pour une coagulation lactique.

La vitesse de formation du coagulum ainsi que de son durcissement augmente avec la température. Elle est très faible à 15°C et très forte à 55°C (**Pougheon, 2001**).

La partie liquide restante est principalement constituée du lactosérum qui est lui-même composé de lactose, de 20% des protéines du lait, ainsi que de divers molécules et vitamines.

Chapitre II :

Enzymes coagulantes des laits

1. Enzymes coagulantes dans la transformation laitière

Les enzymes coagulantes sont une nécessité absolue pour la transformation laitière. Ces coagulants sont des préparations d'enzymes protéolytiques (**Lovisi et al., 2003; Roseiro et al., 2003**) et sont de différentes sources : animale, microbienne et végétale.

Un coagulant est une préparation enzymatique dont la principale fonction est de faire coaguler le lait. Il est constitué d'enzymes protéolytiques (concentration inférieure à 0,1% pour les coagulants liquides) qui reposent sur un support. La composition de ce support est très variable selon qu'il s'agit d'une macération de caillette traditionnelle, d'une présure, d'un coagulant d'origine fongique ou d'une chymosine fermentaire (**Pradal, 2012**).

La majorité des coagulants sont commercialisés sous forme liquide mais il est possible de s'en procurer sous forme de pâte ou de poudre, la composition spécifique des supports de ces préparations peut avoir un intérêt technologique.

Le tableau 02 (**IDF, 2018**) montre l'origine et la codification des principales enzymes coagulantes, elles peuvent être d'origine animale, microbienne (protéases fongiques et chymosine fermentaire), végétale.

La majorité des enzymes coagulantes sont des endopeptidases aspartiques (EC.3.4.23.-) et des endopeptidases à cystéine (EC.3.4.22.-).

Les coagulants sont des extraits enzymatiques dont la composition varie selon les méthodes d'extraction et de préparation utilisées. Ils se caractérisent par une fraction active qui englobe les enzymes coagulantes et éventuellement d'autres enzymes, telles que des enzymes lipolytiques et lysozyme, voire des micro-organismes, et par une fraction inactive qui contient plus ou moins de minéraux et matières azotées et éventuellement des conservateurs (**IDF, 2018**).

Tableau 02 : Origine des différentes enzymes coagulantes (IDF, 2018)

Protéase	Codification internationale
	Origine animale
Pepsine	EC 3.4.23.1 EC 3.4.23.2
Chymosine	EC 3.4.23.4
	Origine microbienne
Protéases de <i>Cryphonectria parasitica</i>	EC 3.4.23.22
Protéases de <i>Rhizomucor miehei</i> et <i>Rhizomucor pusillus</i>	EC 3.4.23.23
	Origine végétale
Extrait d'artichaut – Extrait de chardon	
Papaïne (feuilles de papaye)	EC 3.4.22.2
Ficine (latex de figuier)	EC 3.4.22.3
Bromélaïne (tige de l'ananas)	EC 3.4.22.32

2. Enzymes coagulantes d'origine animale

Plusieurs protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère (Vignola, 2002).

La trypsine et la chymotrypsine entraînent des modifications profondes des modalités de fabrication et de la qualité des produits finis consécutives à la forte activité protéolytique. Ces enzymes ne sont pas utilisées au plan industriel (IDF, 2018).

Seules les pepsines bovines présentent un intérêt industriel. L'utilisation de pepsine bovine a débuté pendant la seconde guerre mondiale, mais ne s'est développée réellement que depuis 1960. C'est une protéase à caractère plus acide que la chymosine, son activité est bonne en milieu acide, mais décroît fortement au-dessus du pH 6,3 ; au pH du lait frais, la coagulation n'apparaît pas (IDF, 2018).

Divers traitements de corrections (augmentation du temps de maturation, de la concentration en CaCl_2) permettent de compenser partiellement cette aptitude coagulante réduite pour la fabrication de fromages à pâtes molles et pâtes pressées non cuites. Ces méthodes ne sont pas applicables aux pâtes cuites (Gallacier *et al.*, 2018).

Certains succédanés d'origine animale peuvent donc être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau ; il convient toutefois de remarquer que,

comme pour l'élaboration de la présure, leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande (**Ramet, 2021**).

Plusieurs enzymes animales sont utilisées pour la fabrication de fromages. Toutefois, la présure (mélange de chymosine et de pepsine) est de très loin la plus employée et est considérée comme étant la meilleure enzyme de coagulation du lait (**Vignola, 2002**). Le principal coagulant de la présure est la chymosine qui représente 80 % de l'enzyme contre 20 % pour la pepsine (**Mandy et al., 2011**).

Dans le processus de la coagulation du lait, la chymosine a une double action. Une action coagulante par hydrolyse de la caséine κ et une protéolyse générale sur toutes les protéines au cours de l'affinage du fromage (**Mandy et al., 2011**).

L'enzyme hydrolyse la liaison Phe¹⁰⁵ et Met¹⁰⁶ de la κ -caséine, entraînant la déstabilisation des micelles de caséines et leur coagulation. L'hydrolyse des caséines par la présure fournit des substrats pour la formation de saveurs pendant la maturation du fromage. Bien que la protéolyse soit essentielle pour la fabrication de fromages affinés, un bon coagulant doit posséder un bon rapport d'activité de coagulation sur l'activité protéolytique générale (**Dalglish, 2007**).

Les présures provenant d'animaux comme le chameau, la chèvre, l'agneau, et le buffle ont été étudiées et caractérisées afin de remplacer la présure bovine. Toutefois, elles ne sont pratiquement pas utilisées au niveau industriel, car ces enzymes présentent des propriétés enzymatiques moins intéressantes en comparaison de celles de la présure bovine (**Mahaut et al., 2000**).

3. Enzymes coagulantes d'origine microbienne

Depuis une trentaine d'années, une puissante industrie de transformation s'est développée dans le monde ; elle produit des substances variées, dont une grande quantité

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

d'enzymes qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs industriels variés, et en particulier des protéases susceptibles de coaguler le lait (**Gallacier *et al.*, 2018**).

Des protéases d'origine bactérienne provenant de cultures en fermenteurs de Bacilles et de *Pseudomonas* ont donné en général des résultats décevants en raison de leur activité protéolytique généralement très élevée : aussi l'utilisation de ces enzymes bactériennes n'a pas dépassé le stade expérimental ; aucune préparation n'est commercialisée (**Gallacier *et al.*, 2018**).

Les enzymes d'origine fongique, au contraire, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (Pa) ; plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marché international et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays (**Getachew *et al.*, 2024**).

Ces préparations proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica* (E.p.), *Mucor pusillus* (M.p.), *Mucor miehei* (M.m.). Un travail important a été réalisé dans la sélection de microorganismes pouvant produire des enzymes coagulantes. De nombreuses protéases microbiennes agissent de la même manière que la chymosine. Toutefois, ces enzymes montrent une activité protéolytique plus élevée pendant la fabrication du fromage.

L'enzyme de *Rhizomucor miehei* est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production fromagère et est disponible à différents degrés de thermo-stabilité et de pureté (**Mir Khan et Selamoglu, 2020**).

Actuellement, la recherche sur les présures microbiennes est toujours dirigée vers la découverte d'enzymes qui sont plus thermolabiles et ayant un meilleur rapport de coagulation sur l'activité protéolytique générale. La thermolabilité est un critère important, en particulier pour les protéases ayant une activité protéolytique générale élevée (**Ramet, 2021**).

4. Enzymes coagulantes d'origine végétale

On connaît de très nombreuses préparations coagulantes provenant du règne végétal ; elles sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures (**Abiazar, 2007 ; Aworth et Nakai, 1986 ; Beghdad, 2010**). Parmi les espèces européennes, on peut citer le gaillet, l'artichaut, le chardon qui ont été et (ou) sont encore utilisés dans des fabrications de fromages fermiers, en particulier dans l'ouest du bassin Méditerranéen (Espagne).

D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales : les plus connus sont les ficines, extraites du latex du figuier, la papaine, extraite des feuilles du papayer, la bromélaïne, extraite de l'ananas (**Bellal, 2009 ; Brickeil, 2004 ; Djerromi, 2004**).

D'une façon générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée, qui se traduit par l'apparition des inconvénients technologiques majeurs précédemment signalés (**Mc-Sweeney, 2004**).

L'activité coagulante est d'autre part très variable car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et par les conditions de collecte et de stockage. De ce fait, l'emploi de ces protéases coagulantes est toujours resté limité aux aires locales de production (**Mc-Sweeney, 2004**).

De nombreuses préparations coagulantes végétales sont connues. Elles sont obtenues par macération de divers organes de plantes supérieures (**Sousa et Malcata, 2002**).

Malgré le nombre élevé de coagulants végétaux, leur application en industrie est très limitée. Toutefois, des études ont révélé que certaines enzymes végétales sont prometteuses (**Xiuju et Zhengtao, 2022**).

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

L'extrait de chardon est probablement la présure végétale ayant connu le plus de succès à ce jour. Il est employé depuis de nombreuses années dans la fabrication de fromages traditionnels (Aquilanti *et al.*, 2011).

Des études ont montré qu'il est possible d'extraire et de purifier deux protéases aspartiques, à savoir les cardosines A et B, à partir des fleurs de chardon. Ces protéases possèdent des spécificités similaires, respectivement, à celles de la chymosine et de la pepsine (Xiuju et Zhengtao, 2022).

Elles clivent la liaison peptide Phe¹⁰⁵- Met¹⁰⁶ de la κ -caséine bovine et ovine, tandis que la κ -caséine caprine est de préférence clivée au niveau de la liaison Lys¹¹⁶ - Thr¹¹⁷. Les deux enzymes peuvent également hydrolyser à la fois l' α et la β - caséine pour produire des fromages ayant un arôme typique, une texture de beurre doux, et une saveur légèrement piquante (Xiuju et Zhengtao, 2022).

5. Propriétés protéolytiques des extraits végétaux

Dans le but d'identifier des enzymes qui agissent de manière similaire à la présure, de nombreuses plantes ont fait l'objet d'études afin d'évaluer leurs propriétés protéolytiques et coagulantes. Les propriétés de plantes comme *Actinidia deliciosa* (Beghdad, 2010), *Ficus* spp, *Carica papaya*, *Calotropis procera* et *Cynara cardunculus* L. (Benani, 2017), *Onopordum acanthium* L. (Ramet, 2021), *Cynara cardunculus* L. et *Cynara scolymus* L. (Sousa et Malcata, 2002 ; Ramet, 2021) ont été étudiées.

Pour évaluer la valeur réelle des enzymes végétales étudiées, certains auteurs ont effectué des études pour comparer leur activité coagulante et protéolytique à la chymosine et à d'autres enzymes végétales qui ont déjà été étudiées. Getachew et al. (2024) ont montré que l'actinidine purifiée, extraite d'*Actinidia deliciosa* (kiwi), a une activité coagulante et que celle-ci est liée à la concentration de l'enzyme.

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

Ces auteurs affirment que leur procédure de purification a permis la production d'une préparation enzymatique ayant une activité spécifique élevée et un rapport d'activité coagulante sur la protéolyse générale similaire à celle rapportée pour la chymosine. Kaur et al. (2024), quant à eux, ont démontré que ce n'est pas l'extrait de kiwi qui contenait la plus forte concentration d'enzyme protéolytique active (pH 9,0) qui avait le plus haut niveau d'activité de coagulation.

Des essais sur du lait commercial contenant 0,5 % de matières grasses ont montré que l'extrait préparé à pH 5,0 a eu une activité coagulante 18% plus élevée que la même quantité d'actinidine purifiée. Leur étude a également montré que le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique de l'extrait préparé à pH 5,0 est inférieur à celui de la chymosine, cependant, le coagulum obtenu était comparable à celui obtenu avec la chymosine.

Mirkhan et Selamoglu et al. (2020) sont arrivés à la même conclusion dans leur étude sur l'activité protéolytique de trois extraits végétaux. Selon ces auteurs, il n'y a pas de différence significative en termes de rendement entre l'extrait d'*Actinidia deliciosa* et la chymosine (17,8 % et 20,2% ont respectivement été obtenus pour les deux enzymes).

Quant aux autres enzymes, les extraits de *Zingiber officinale* et de *Cucumis melo* ont donné des résultats nettement inférieurs. L'activité protéolytique des enzymes du chardon, du ficus (*Ficus* spp) et de la papaye (*Carica papaya*) a été comparée sur du lait écrémé régulier et du lait écrémé ultra filtré (Lo Piero et al., 2002).

Bien qu'il soit légèrement plus protéolytique que la présure, seul l'extrait de chardon a donné des résultats proches de cette dernière. Tandis que pour la ficine, c'est surtout avec du lait ayant une concentration en protéines d'au moins quatre fois celle du lait régulier qu'elle se révèle prometteuse. Quant à la papaine, elle a été jugée trop protéolytique dans les deux types de lait et donnait des rendements de coagulation variables.

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

Mandy et al. (2011) ont démontré que la papaïne hydrolyse moins bien la caséine que la broméline (extraite de *Ananas comosus*), qui, à son tour, donne des résultats nettement plus faibles que la chymosine.

Compte tenu du succès de certaines enzymes dans la fabrication de fromages traditionnels dans diverses régions du monde, des essais de fabrication d'autres fromages ont été réalisés ces dernières décennies. Ainsi, Tirard-Coller et al. (2002) ont comparé le profil protéolytique de la cacioricotta de type artisanal, un fromage fait de lait de chèvre coagulé par un extrait de *Ficus carica sylvestris*, à la cacioricotta industrielle coagulée par la présure. Même avec un chauffage intense du lait, la forte activité protéolytique de l'extrait de *Ficus carica sylvestris* a conduit à la formation de grande quantité de peptides, contrairement à la présure.

L'extrait de *Withania coagulans* a été utilisé pour préparer le fromage Cottage au lait de buffle et comparé avec celui coagulé par la présure. Le type de coagulant n'a eu aucun effet significatif sur les propriétés organoleptiques, l'acidité, la quantité de protéines et de cendres des deux fromages.

Néanmoins, le fromage coagulé par l'extrait de *Withania coagulans* avait une teneur en humidité plus élevée qui traduit une plus grande activité protéolytique de cette enzyme (Mirkhan et Selamoglu, 2020). Ces résultats concordent parfaitement avec ceux de Getachew et al. (2024) avec le fromage de type Mozzarella.

L'influence de l'extrait de *Zingiber officinale* sur les propriétés physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du fromage Peshawari fabriqué à partir de lait de vache, a été évaluée et comparée à celle de la présure.

Seules les teneurs en azote soluble et en humidité ont présenté des différences significatives. Le fromage coagulé par l'enzyme du *Zingiber officinale* a présenté des niveaux d'humidité inférieurs et d'azote soluble plus élevés par rapport à celui coagulé par

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

la présure. Aucune amertume n'a été notée dans le fromage fait avec l'extrait du *Zingiber officinale* (Getachew *et al.*, 2024).

Des études réalisées sur les extraits de *Cynara cardunculus* L. et de *Cynara humilis* L. ont montré, en accord avec leur contenu enzymatique similaire, que presque toutes les propriétés rhéologiques étaient similaires pour les deux coagulants. Comparés à la chymosine, ces derniers se sont révélés légèrement plus protéolytiques, conduisant à la formation d'un gel moins ferme (Kaur *et al.*, 2024).

Utilisé pour la fabrication de fromages de type Gouda à partir de lait de vache, l'extrait de *Cynara scolymus* L. a affiché un rendement similaire à celui obtenu avec la présure. Toutefois, les fromages obtenus devaient être mis en saumure pendant une période plus longue pour empêcher une sur-protéolyse et éviter le développement d'amertume (Mirkhan et Selamoglu, 2020).

Différentes quantités d'extrait de *Cynara cardunculus* L. ont été comparées à la présure dans la fabrication de fromages de lait de brebis. Sur une période de six mois de maturation, aucune différence significative n'a été observée entre les coagulants pour la majorité des paramètres chimiques étudiés.

Cependant, l'azote soluble était significativement plus élevé dans les fromages fabriqués avec les coagulants végétaux (Mirkhan et Selamoglu, 2020). Des résultats similaires ont été obtenus pour la fabrication de fromages de lait de chèvre (Mandy *et al.*, 2011).

Plusieurs auteurs ont passé en revue les différentes recherches effectuées sur les coagulants extraits de plantes. Lo Piero *et al.* (2002) ont examiné le rôle de l'extrait de *Cynara cardunculus* in vitro et pendant la maturation de plusieurs types de fromages. Mirkhan et Selamoglu (2020) ont étudié l'utilisation d'extraits de plantes en particulier l'espèce *Cynara spp.* Les récentes avancées sur les différents types de coagulants (animaux, présures recombinantes, microbiens, végétaux) ont été examinées par Kaur *et al.* (2024).

Chapitre II : Enzymes coagulantes des laits

Dans ce travail, l'auteur fait ressortir l'impact des enzymes sur la protéolyse, le rendement fromager et la qualité du fromage. Mandy et al. (2011) ont passé en revue les progrès dans le domaine des protéases aspartiques d'origine diverses avec un accent particulier sur les structures, les fonctions et le mécanisme catalytique de ces protéases. Plus récemment, l'utilisation des protéases végétales comme coagulants a été étudiée (Mirkhan et Selamoglu, 2020).

Cette étude a mis l'accent sur les différents types de protéases végétales, leurs sources et leurs propriétés fonctionnelles. De façon générale, les résultats ont montré que les coagulants végétaux ont une activité protéolytique très élevée. Cette activité protéolytique se manifeste par une diminution du rendement fromager, des défauts de texture et de goût.

Toutefois, certaines enzymes végétales, comme celle du *Withania coagulans*, ont donné des résultats plutôt satisfaisants en fromagerie. Mais l'enzyme végétale ayant donné les meilleurs résultats est l'extrait de chardon qui est employé avec succès depuis de nombreuses années au Portugal et dans les régions limitrophes de l'Espagne pour la fabrication de fromages traditionnels (Mandy et al., 2011).

6. Aspects techno-fonctionnels des extraits végétaux

Les fromages préparés avec des coagulants végétaux ont une texture douce caractéristique et une saveur légèrement amère. L'utilisation d'enzymes végétales pour la production de fromage a parfois conduit à des produits de faible qualité, en particulier en termes de texture et de saveur (Kaur et al., 2024).

Toutefois, ces enzymes sont largement utilisées pour la production de fromages durs et mi-durs de lait de caprins ou d'ovins (Mandy et al., 2011). Ce succès des enzymes végétales dans la production de fromages au lait de brebis suggère que les caractéristiques différentes des caséines des laits ovins et caprins par rapport au lait bovin limitent la production de

peptides amers lors de la protéolyse (**Mirkhan et Selamoglu, 2020**).

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III :

Matériels et méthodes

1. Cadre et objectif de l'étude

L'objectif de l'étude est un essai de substitution de la présure animale par un coagulant végétal qui permettra de fabriquer un caillé fromager en respectant les normes technologiques d'activités coagulantes et de fabrication fromagère.

La présente étude consiste en la détermination du pouvoir coagulant d'un échantillon de fleurs de chardon sous forme de macéra, par la détermination du temps de floculation et de la force de coagulation, servant à la recherche de la dose d'extrait des fleurs de chardon nécessaire pour une coagulation optimale.

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animales "LSTPA" de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, à Hassi-Mamèche (Mostaganem).

2. Provenance des échantillons expérimentaux

2.1. Coagulant végétal

Le coagulant utilisé dans notre expérimentation est constitué de pétales de la fleur du *Cynara cardunculus* L. appelée communément fleurs de chardon (figure 05), séchés de façon naturelle sous soleil, récoltés dans la région de Sfisifa, wilaya de Naama.

Les pétales de cette fleur utilisée dans le sud Algérien, notamment dans la wilaya de Naama, connue pour son pouvoir coagulant du lait induit par une protéase spécifique. Cette enzyme « cynarase » est utilisée comme agent coagulant pour fabriquer un caillé fromager typique à la région et des laits fermentés.



Figure 05 : Fleur de chardon.

2.2. Le lait

Le lait expérimental a été reconstitué à raison de 12% (p/v) à partir d'une poudre de lait écrémé low heat enrichi en protéines récupérée de la filiale GIPLAIT « Laiterie le littoral Mostaganem » (voir en annexe 02).

Pour amender l'équilibre minéral, le lait a été enrichi avec du phosphate monocalcique (0,01M) et stabilisé avec de l'azide de sodium (0,025%) pour éviter tout développement microbien. Il est ensuite stocké au réfrigérateur pendant 10 à 15 heures pour une bonne réhydratation des protéines et permettre l'équilibre physico-chimique.

La poudre du lait utilisée a été récupérée de la filiale GIPLAIT, Laiterie le Littoral Mostaganem, du même lot, de marque AGROPUR Canada, conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2.3. Enzyme commerciale

L'enzyme commerciale utilisée est une présure animale en poudre commerciale de marque CHR HANSEN Danemark de force 1/125000 à 650 mg de chymosine /100 g achetée du groupe FLY CHEMICALS Oran (Voir en annexe 01). La poudre de l'enzyme utilisée est conservée hermétiquement à 4°C.

Nous avons préparé pour notre expérimentation, une solution mère par dissolution de 2 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée (se référant à la fiche technique du fournisseur). La solution est conservée dans un réfrigérateur à 4°C avant son utilisation.

Lors de chaque utilisation expérimentale, nous avons dilué la solution mère dans de l'eau distillée à raison de 2,5% (v/v) se référant au fournisseur correspond à un temps de floculation à 37°C compris entre 8 et 15 minutes.

3. Préparation du coagulant végétal « *Cynara cardunculus* L. »

3.1. Séchage

Afin de garantir la qualité et la sécurité du séchage, nous avons soumis 250 grammes de pétales de la fleur de chardon à un second séchage au laboratoire dans une étuve à 37°C pendant 24h, après quoi ils sont conservés dans un bocal étanche à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière.

3.2. Préparation de l'extrait de fleurs de chardon

Nous avons préparé 03 solutions d'enzyme coagulante par macération des fleurs de chardon à raison de 10g respectivement dans 500 ml d'eau distillée pendant une période de 02 jours (selon les recommandations du Dr DAHOU A., chef d'équipe du laboratoire LSTPA).

Après macération, le mélange est placé dans un agitateur électrique pendant 30 min, puis on procède à la filtration de la solution obtenue à travers un entonnoir de filtration Pyrex TM en verre Buchner de 40 mm de diamètre et à l'aide d'une pompe à vide.

On obtient ainsi un extrait coagulant dont son activité coagulante sera contrôlée dans l'étude (figure 06).



Figure 06 : Extrait enzymatique clarifié obtenu de la fleur de chardon.

4. Techniques d'analyse

4.1. Caractérisation du lait reconstitué

4.1.1. Détermination de l'acidité titrable

La mesure de l'acidité titrable est établie selon la norme F.I.L ISO 707 (2018).

L'acidité du lait est la somme de l'acidité des composants d'une matière organique (le lait) qui sont : la caséine, les substances minérales et les acides organiques, les réactions secondaires des phosphates, de l'acide lactique et des autres acides organiques résultants de l'activité microbienne. Elle est déterminée par titrage de l'acide lactique.

Un échantillon de 10 ml de lait reconstitué a été introduit dans un bécher de 100 ml puis un volume de 0,3 ml de l'indicateur a été ajouté (1 g pour 100 ml).

Le titrage se fait par la solution sodique jusqu'au virage au rose, faiblement perceptible par comparaison avec un témoin. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

Pour exprimer les résultats ; il faut considérer que 1ml de solution titrée correspond à 0,01 g d'acide lactique. L'acidité titrable, exprimée en grammes d'acide lactique pour 100 g d'échantillon, est donnée par la formule :

$$0,01 \text{ g} \times V \times 100/2 = V/2$$

Où **V**: le volume en millilitres de solution sodique à 0,111 ml/l utilisé pour le titrage.

Pour une fiabilité de l'analyse on doit prendre le médiane de deux déterminations. Ce résultat est traduit en degré Dornic (°D) : 1°D = 0,1 grammes d'acide lactique dans 100g de poudre de lait.

4.1.2 Mesure du pH

La mesure du pH est établie selon la norme F.I.L ISO 707 (2018).

Le pH traduit la concentration en ions hydrogènes. Pour le lait normal, il est compris entre 6,6 et 6,8. La légère acidité ainsi observée est due à la présence des anions phosphoriques et citriques ainsi que de la caséine.

Une mesure directe du pH à l'aide d'un pH-mètre HANNA (HI-2210) de paillasse a été faite sur une prise d'échantillon de 10 ml du lait reconstitué, plonger l'électrode dans le liquide (le lait) et effectuer la mesure potentiométrique à 20°C +/- 2°C en agitant le contenu du bécher. Lire directement la valeur de pH avec deux décimales. Les résultats sont exprimés en unité du pH et à la température de 20°C.

Pour une fiabilité de l'analyse on doit prendre le médiane de deux déterminations.

4.1.3 Détermination de l'extrait sec total du lait

La détermination de l'extrait sec total du lait est établie selon la norme F.I.L ISO 707 (2018). L'extrait sec total correspond au poids du résidu restant après dessiccation de l'échantillon à 105°C dans dessiccateur infra-rouge (KERN MLS 50-3C). Le principe consiste à sécher 10 ml du lait par infrarouge et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance de précision intégrée jusqu'à poids constant.

Le pourcentage d'extrait sec total est calculé par la différence entre le poids initial et le poids final après évaporation complète de l'eau contenue dans l'échantillon analysé.

L'extrait sec total est donné en % par affichage sur l'écran du dessiccateur.

Trois déterminations de l'extrait sec total ont été effectuées sur le même échantillon pour essai.

4.1.4 Détermination de la teneur en azote total (protéines) et de l'azote non protéique NPN

La détermination de la teneur en azote totale est effectuée par la méthode de Kjeldahl

et selon la norme FIL ISO 707 (2018). Elle consiste en une minéralisation de l'échantillon du lait reconstitué par chauffage en présence d'un mélange d'acide sulfurique concentré, de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre, utilisés comme catalyseurs pour convertir l'azote organique de l'échantillon en sulfate d'ammonium.

Le produit de la réaction est additionné de la soude pour libérer de l'ammoniac qui sera titré par une solution d'acide chlorhydrique en présence d'acide borique.

4.1.4.1. Minéralisation

Une prise d'essai de 10 ml de lait expérimental est pesée dans un tube en verre appelé matras, ensuite, 5g de sulfate de potassium (K_2SO_4), 0,5 g de sulfate de cuivre ($CuSO_4$) et 15 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 0,2 N) ont ajoutés à l'échantillon, ensuite le matras est placé dans l'appareil de Kjeldahl à une température de 400°C pendant 1h30 min.

4.1.4.2. Distillation et dosage de l'azote total

L'échantillon minéralisé est refroidi à température ambiante, puis son contenu est dilué avec 75 ml d'eau distillée qui servent en même temps à rincer les parois du matras.

Ensuite, ce dernier est raccordé à l'appareil de distillation où 60 ml (3x20ml) de l'hydroxyde de sodium à 30% sont ajoutés à l'échantillon. L'ammoniac produit (suite à l'ajout de la solution de NaOH), est capté avec 25 ml d'acide borique (H_3BO_3) qui vire du rose au vert. L'ammoniaque contenu dans la solution d'acide borique est titré avec une solution d'acide sulfurique à 0,1N jusqu'à obtention de la couleur de départ de l'acide borique (rose).

l'azote total de l'échantillon est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Azote total en \%} = \frac{(\text{Cb} - 0,1) \times N \times 14}{\text{Pe}} \times \frac{100}{1000}$$

Cb : Chute de la burette (ml). **N** : Normalité de l'acide sulfurique (solution de titration). **14** : Masse équivalente de l'azote. **Pe** : Masse de la prise d'essai (g).

La quantité des protéines totales est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Azote totale en \%} \times F$$

F : facteur de conversion de l'azote en protéines = 6,38

Le taux d'azote non protéique (NPN) est déterminé après précipitation des protéines du lait avec une solution d'acide trichloroacétique (T.C.A) à une concentration finale de 12% suivi d'une filtration. Le taux d'azote total et d'azote non protéique ont été déterminés sur un échantillon de 5 ml de lait reconstitué servant à l'expérimentation.

4.2 Caractérisation de l'extrait enzymatique

L'activité coagulante est déterminée par la mesure du temps de floculation et du temps de prise selon la méthode établie par Xiuju et al. **2022**.

Le temps de floculation, établie par l'IDF (**2018**), est l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu.

4.2.1. Détermination de l'unité d'activité coagulante

L'unité d'activité coagulante U.A.C ou l'unité présure est défini par la quantité d'enzyme contenu dans 1 ml qui peut coaguler 10 ml de lait : 12% p/v de lait écrémé en poudre dissout dans une solution de CaCl₂ 0,01 M en 100 secondes à 37°C.

$$\text{U.A.C} = 10 \cdot V / T \cdot V'$$

Où : V : volume du lait. V' : Volume de l'extrait enzymatique. T : temps de floculation

Un volume de 10 ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 37°C dans un bain marie. Au temps zéro, 1 ml de la solution enzymatique est ajouté et le chronomètre déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait.

Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation des petits flocons apparaissent au sein même de ce film. Le chronomètre est arrêté à ce moment et le temps de floculation est ainsi noté.

4.2.2. Détermination du temps de prise

Le temps de prise est le moment où apparaissent les premières gouttelettes du lactosérum (début de l'exsudation du lactosérum) sur la surface du gel appelé aussi coagulum qui devient rigide et ne coule plus sur les parois du tube. Ce temps de prise en masse compacte est noté.

Pour toute coagulation, le temps de prise représente généralement environ le double du temps de floculation : ainsi pour un temps de floculation compris entre 8 et 15 minutes, le temps de prise se situe entre 16 et 30 minutes (FAO, 2000).

4.2.3. Cinétique de la protéolyse

L'activité protéolytique d'une enzyme coagulante se traduit par l'augmentation du taux d'azote non protéique (non protéique nitrogen: NPN) libéré dans la masse du coagulum.

La comparaison du rapport NPN/NT (où NT représente l'azote total) entre la coagulation de l'enzyme des fleurs de chardon et la coagulation de l'enzyme commerciale, permet d'évaluer la différence de la protéolyse entre les deux enzymes.

Chapitre III: Matériels et méthodes

Le dosage de l'azote non protéique, est estimé après précipitation, avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 12% de concentration finale des protéines du lait expérimental mis en contact avec l'enzyme coagulante. Après filtration, l'azote est dosé par la méthode Kjeldahl.

Une série de 10 tubes à essai contenant 10 ml de lait expérimental chacun est maintenue à 37°C pendant 1 heure dans un bain marie. Au temps 0, une dose de 1ml de l'enzyme est ajouté pour chaque tube, et le chronomètre est actionné. Pour chaque temps de la cinétique, 10 ml d'une solution TCA 12% sont ajoutés, et le tube est bien agité.

Il faut noter que nous avons utilisé des concentrations d'enzyme commerciale et d'enzyme extraite des fleurs de chardon assurant un temps de floculation compris entre 8 et 15 minutes pour toute l'expérimentation. Chaque tube est filtré, et le sérum est récupéré pour déterminer la teneur en azote NPN par la méthode Kjeldahl.

La cinétique de la protéolyse des deux enzymes est étudiée en dosant le NPN à temps de prise. L'expérience permettant l'obtention de cette cinétique est répétée cinq fois, et nos résultats exprimeront la courbe moyenne.

5. Analyse statistique

Les résultats sont la moyenne des cinq essais, et présentés sous forme de moyenne écart type. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée par le logiciel statistique MINITAB 19.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

1. Qualité physico-chimique du lait expérimental utilisé

Le lait expérimental utilisé préparé à raison de 12% (p/v) a présenté une humidité de 88,30%, un taux protéique de 3,48%, un taux de NPN de 0,175%, une acidité Dornic de 16,2°D et un pH de 6,68. Ces résultats sont conformes aux normes de la F.I.L et de la FAO (tableau 03).

La coagulation enzymatique d'un lait est la première étape de la fabrication d'un fromage qui peut être considérée comme le résultat d'un processus dans lequel la caséine est concentrée après élimination du lactosérum (**Dagleish et Corredig, 2012**).

Pour le fromager, un lait de qualité joue un rôle important pour une bonne aptitude coagulante, assurer une cinétique adéquate de la floculation à la prise du lait, éviter les déperditions des protéines solubles après exsudation du lactosérum et la formation d'un gel ferme (**Dahou et al., 2021**).

Tableau 03 : Qualité physico-chimique du lait expérimental utilisé

Analyse	Moyenne obtenue et écart type	Méthode utilisée
Humidité du lait reconstitué %	88,30 ± 0,2	Dessication à 105°C
Taux protéique %	3,48 ± 0,02	Kjeldahl
NPN %	0,175 ± 0,005	Kjeldahl
NPN/NT %	5,0	Kjeldahl
Acidité Dornic	16,2 ± 0,3	Dornic
pH	6,68 ± 0,02	pH-métrie

2. Qualité de l'extrait enzymatique en comparaison avec l'enzyme commerciale

Les résultats du contrôle de l'extrait enzymatique clarifié de fleurs de chardon et de la dilution retenue, ainsi que celles de la présure commerciale sont regroupés dans le tableau 04.

L'extraction de l'enzyme de fleurs de chardon à partir de 100 grammes de pétales de fleurs de chardon a donné un volume de 75 ml d'extrait enzymatique clarifié.

Tableau 04 : Qualité de l'extrait enzymatique « Fleurs de chardon »

Contrôle effectué	Enzyme extraite de la fleur de chardon		Enzyme commerciale	
	Extrait clarifié	Dilution 0,5%	Solution mère 1%	Dilution 2,5%
Temps de floculation (s)	125,25 ± 5,25	910 ± 2,10	35,25 ± 0,25	750 ± 10
Temps de prise (s)	250,50 ± 0,5	1820 ± 5,10	70,50 ± 1,5	1500 ± 10
Activité coagulante U.A.C/ml	0,8 ± 0,2	0,10 ± 0,01	2,84 ± 0,01	0,13 ± 0,02

Il est à noter que lors de notre expérimentation nous avons opté pour une dilution de 0,5% (v/v) suite aux essais préalables effectués pour obtenir un temps de floculation conforme à une bonne coagulation compris entre 8 et 15 minutes comme décrit par Kaur et al. 2024.

Dans ce sens, l'extrait clarifié de la fleur de chardon donne un temps moyen de floculation de 125 secondes à 37°C. La dilution à 0,5% (v/v) dans de l'eau distillée stérile a donné un temps moyen de floculation de 910 secondes (15 minutes) et un temps moyen de prise de 1820 secondes (30 minutes).

En comparaison, la solution d'enzyme commerciale à 1% a donné un temps de floculation moyen de 35,25 secondes. A une dilution calculée de 2,5%, on a obtenu un temps moyen de floculation contrôlé de 750 secondes (12,5 minutes) et un temps de prise moyen de 1500 secondes (25 minutes) (figure 7).



Figure 07 : Comparaison de l'aspect du coagulum formé après le temps de prise et l'activité enzymatique des 02 enzymes.

Les figures 08 et 09 montrent l'aspect des deux gels enzymatiques formés après activité enzymatique et atteinte du temps technologique « le temps de prise » à une température de 37°C. Il apparaît clairement que les deux gels montrent une bonne consistance et fermeté avec le peu de lactosérum soit une faible libération du NPN soluble (figure 10).

Cette qualité de gel est très demandée en industrie des fromages à pâte molle stabilisée (Dagleish et Corredig, 2012) pour laquelle le gel est à coagulation mixte mais à activité enzymatique dominante et ce gel doit être ferme et tenace (figure 11).



Figure 08 : Aspect du coagulum avec l'enzyme commerciale.



Figure 09 : Aspect du coagulum avec l'enzyme extraite de la fleur de chardon.



Figure 10 : Aspect du caillé fromager mixte après coagulation totale et tranchage.



Figure 11 : Aspect du caillé fromager mixte après moulage et égouttage.

L'unité de l'activité coagulante (U.A.C) qui représente la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de la solution enzymatique pour coaguler 10 ml du lait en 100 secondes à 37°C ; est de 0,8 unité /ml pour l'extrait enzymatique clarifié de fleur de chardon et de 2,84 unité /ml pour la solution mère d'enzyme commerciale (1%).

Le temps de floculation pour les 02 enzymes mises en dilution est entre 12,5 et 15 minutes avec une U.A.C moyenne comprise entre 0,10 et 0,13 unité/ml. Ces résultats obtenus sont conformes à une activité et à une cinétique coagulante réussie et adaptée à toute transformation fromagère spécialisée dans la fabrication des pâtes molles stabilisées.

3. Cinétique de la protéolyse coagulante

La cinétique de la protéolyse coagulante donne parallèlement une libération d'azote non protéique NPN, soluble dans une solution d'acide trichloracétique TCA à une concentration de 12%. Cette libération évolutive de la teneur en azote non protéique en fonction du temps est donnée dans le tableau 05.

Tableau 05 : Teneur en azote non protéique libéré.

Répétition	Enzyme de fleur de chardon		Enzyme commerciale	
	NPN (g/100ml) + Ecart type	% NPN / NT(*)	NPN (g/100ml) + Ecart type	% NPN / NT (*)
1	0,175 ± 0,005	5,03	0,198 ± 0,002	5,64
2	0,176 ± 0,004	5,06	0,203 ± 0,002	5,78
3	0,177 ± 0,003	5,08	0,208 ± 0,002	5,92
4	0,178 ± 0,002	5,11	0,208 ± 0,002	5,94
5	0,179 ± 0,001	5,14	0,209 ± 0,001	5,98
Moyenne obtenue	0,177 ± 0,003	5,08	0,205 ± 0,005	5,84
Azote total NT	3,48 ± 0,02	100,00	3,51 ± 0,05	100,00

* Pas de différence significative (P>0,05)

L'analyse de la variance a été faite pour pouvoir déterminer le temps à partir duquel la différence devient non significative entre le nombre de répétition réalisé (05 répétitions).

La teneur en azote non protéique pour les deux enzymes et se situe à une moyenne comprise entre 0,177 et 0,205. Après la floculation la teneur en azote non protéique libéré est la même (pour les répétitions faites) à un temps de prise moyen compris entre 25 et 30 minutes pour les 02 enzymes sur un lait expérimental contrôlé en teneur protéique.

Le taux de NPN / NT pour la coagulation faite avec l'extrait d'enzyme de fleur de chardon et la coagulation faite avec l'enzyme commerciale se stabilise à une moyenne respective contrôlée de 5,08 à 5,84 ce qui confirme la maîtrise des dilutions à l'obtention des temps technologiques conformes à une coagulation enzymatique maîtrisée et adaptée à une transformation fromagère de type pâte molle stabilisée.

La cinétique de la libération de l'azote non protéique NPN pour les 02 types de coagulation est représentée sur la figure qui suit :

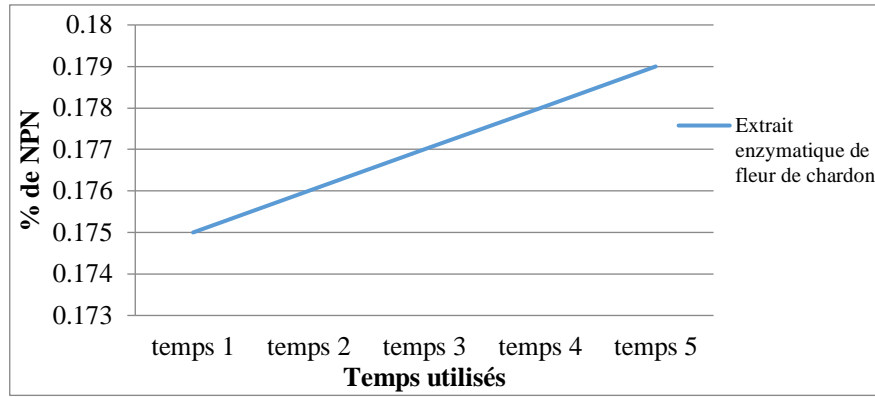


Figure 12 : Cinétique de la libération du NPN pour la coagulation avec l'enzyme de fleur de chardon

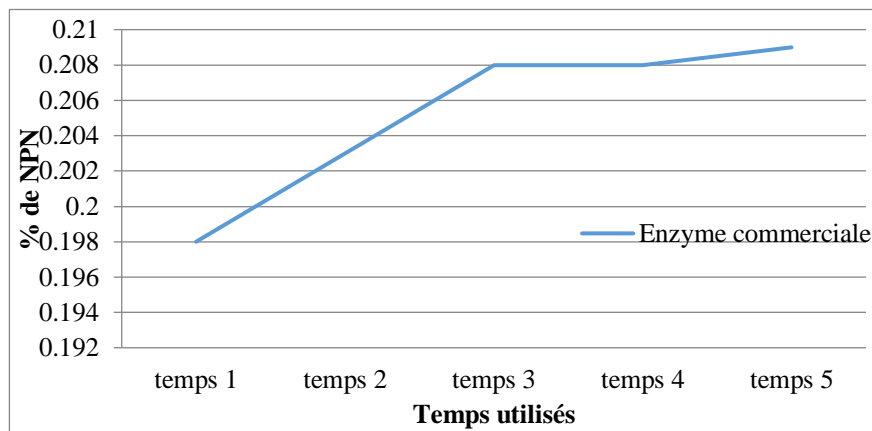


Figure 13 : Cinétique de la libération du NPN pour une coagulation à base d'enzyme commerciale

Les deux figures montrent deux cinétiques avec une allure identique. Les taux du NPN libérés sont presque identiques pour les deux enzymes. La moyenne obtenue pour l'enzyme de fleur de chardon est de 0,177 g / 100 ml contre 0,205 g/100 ml pour l'enzyme commerciale.

Les taux NPN obtenus sont conformes à la technologie fromagère de référence et significative à cause de la maîtrise des dilutions donnant les mêmes aptitudes de coagulation pour les 02 enzymes.

Dagleish et Corredig (2012), Kaur et al. (2024) et Xiuju et al. (2022) ont montré que la libération d'azote non protéique (soluble dans une solution de TCA 12%) par les enzymes

d'origine végétale d'une structure caséinique identique au lait maintenue à pH 6,3, était égale à celle de la chymosine (enzyme animale) lors des premières 25 minutes du temps de floculation. De plus, la libération de l'azote dans le lactosérum à fin du temps de prise (estimé à 2 fois le temps de floculation) était égale entre les deux types d'enzymes.

Notre étude a montré que la coagulation par l'enzyme de fleur de chardon présente les mêmes phases que la coagulation par l'enzyme commerciale. Même si la floculation ne donne pas le même aspect des flocons primaires de coagulation avec la même qualité du lait.

Les études de Gallacier et al. (2018) ont montré que les différences des aspects du lait à la floculation sont dues essentiellement aux activités protéolytiques des enzymes qui sont optimales à des pH qui se rapprochent de la neutralité (6,2 à 6,5) alors que les enzymes commerciales (à dominance chymosine) tolèrent des pH moyennement acide (5,2).

Cependant au temps de prise le gel obtenu est du même aspect avec un taux de libération d'azote non protéique presque identique à celui de la présure commerciale.

L'analyse statistique des résultats, réalisée par le logiciel statistique MINITAB 19, a donné des valeurs de signification supérieures à 5% avec une activité coagulante presque similaire pour les 02 extraits enzymatiques avec 0,10 UAC/ml pour l'extrait enzymatique des fleurs de chardon contre 0,13 UAC/ml pour l'enzyme commerciale. La cinétique de la coagulation représentée par le pourcentage NPN/NT est aussi presque identique pour les 02 enzymes 5,08 % pour l'enzyme des fleurs de chardon contre 5,84 % pour l'enzyme commerciale.

Les temps technologiques (temps de prise), de 1820 secondes pour l'enzyme de fleur de chardon et de 1500 secondes pour l'enzyme commerciale, respectent la norme FIL fixée entre 960 secondes à 1920 secondes pour obtenir un caillé fromager enzymatique conforme.

CONCLUSION

Conclusion

L'ensemble des résultats aux quels a abouti notre étude constitue une première évaluation de la caractérisation des étapes de la coagulation lors de la substitution de l'enzyme commerciale par de une enzyme végétale de fleurs de chardon.

L'extraction de l'enzyme végétale typique aux fleurs de chardon a permis de donner à partir de 100 g de pétales de fleurs de chardon 75 ml d'extrait enzymatique, donnant un temps de floculation moyen de 125 secondes, un temps de prise de 250 secondes et une activité coagulante de 0,8 U.A.C/ml. Pour obtenir un temps technologique de floculation compris entre 8 et 15 minutes l'extrait obtenu doit être dilué à raison de 0,5%

Les résultats ne décèlent aucun inconvénient à substituer l'enzyme commerciale par l'enzyme végétale typique aux fleurs de chardon pour une coagulation mixte à dominance enzymatique.

Au contraire nous avons remarqué des aptitudes avantageuses à la coagulation avec la maîtrise des temps technologiques (de la floculation à la prise totale du coagulum).

La capacité de rétention du lactosérum est un autre avantage avec un taux d'hydratation élevée des deux gels issus des deux activités enzymatiques. Cette capacité de rétention est essentielle à la bonne maîtrise des rendements fromagers escomptés.

La maîtrise de la concentration enzymatique (dilution étudiée de l'extrait enzymatique) de l'extrait enzymatique de fleur de chardon donne des cinétiques de coagulation contrôlées avec de faibles déperditions d'azote non protéique NPN soluble dans le lactosérum

Cette étude mérite d'être complétée par le suivi du comportement de cette enzyme extraite au niveau de l'affinage du fromage

En perspectives, il est intéressant de poursuivre cette étude par :

- La détermination du rendement et du coût de l'extraction de l'enzyme végétale typique aux fleurs de chardon;

Conclusion

- La détermination des produits de la protéolyse par électrophorèse lors des différentes phases de la coagulation;
- La détermination des conditions optimales, de pH, de température pour obtenir les meilleures caractéristiques du gel (fermeté, synérèse ...);
- L'application à échelle industrielle de cette enzyme pour sa valorisation dans des formulations fromagères.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abiazar R., 2007 : Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus, thèse AgroParisTech, 142p.

Adoui F., 2007 : Extraction d'une enzyme coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.

Alais C., Linden G., Miclo L. 2008. Abrégé en biochimie alimentaire. Paris, Dunod, 260p.

Amiot J., Fournier S., Le Boeuf Y., Paquin P. et Simpson R. 2002. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait pp, in Science et technologie du lait transformation du lait coordonnateur Vignola C.C, Fondation de technologie laitière du Québec 395p.

Aquilanti L., Babini V., Santarelli S., Osimani A., Petruzzelli A., Clementi F. 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. Letters in Applied Microbiology, 52, 651–659p.

Attia H., Kheronatou N. et Ayadi J. 2000. Acidification chimique directe du lait. Corrélations entre la mobilité du matériel micellaire et micro et macrostructure des laits acidifiant. SCI. des aliments, 20, 289-307.

Aworh O.C. and Nakai S. 1986 : Extraction of milk enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*). Journal of Food Science, 51 (6), pp : 1569–1570.

Beghdad M.C.H. 2010. Etude phytochimique et activité antioxydante de Quelques Espèces végétales du Nord-ouest Algérien. These de Doctotat. Pp 122-146.

Bellal M.M., Dadie A. 2009. Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. J. Food Technol., 7(1), 20-29.

Références bibliographiques

Benani Souad Touatia, 2017 : Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention du diplôme de master valorisation et optimisation de l'utilisation d'un coagulant végétal pour la fabrication d'un fromage traditionnel.

Bennett R.J. and Johnston K.A. 2004. General Aspects of Cheese Technology. Pp 23-50. In Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2 Major Cheese Groups. Third edition, Ed. P.F.

Benyahia-krid F.A., Attia H., Zidoune M.N. 2010. Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. J. of Agriculture, Biotechnology and Ecology, vol.3, pp: 75-86.

Brickeil C.H. 2004. Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin. Ed, Larousse. ISBN. 2-03-56038 1-1. 1104 p.

Cecchinato A., Penasa M., Cipolat Gotet C., De Marchi M., Bittante G. 2012 : Short communication : Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. J. Dairy Sci.; 95:1709-1713.

CNIEL « Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière ». 2024. Economie laitière Mondiale en Chiffres, Octobre 2024. 204p.

Croguennec T., Jeanet R., Brule G. 2008 : Fondement Physicochimiques De La Technologie Laitière. Edition Tec & Doc. 11, Rue Lavoisier 75008 Paris.

Dahou A.A., Medjahed M., Aissaoui C., Homrani A. 2021. Approche préliminaire sur la fromageabilité des laits collectés au niveau d'une fromagerie industrielle. Volume 6, Issue 1: 34-39, Janvier 2021. Revue Algérienne des Sciences/ <http://univ-eltarf.dz/fr/> ISSN : 2661-7064.

Dalgleish D.G. et Corredig M. 2012 : The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. Annu. Rev. Food Sci. Technol.; 3:449–467.

Dalgleish D.G. 2007 : The casein micelle and its reactivity. Lait (87): 385-387.

Références bibliographiques

De Kruif C.G., Huppertz T., Urban V. S., Petukhov A.V. 2012 : Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science* 171–172, 36–52.

Djerromi A., Nacef M. 2004. 100 Plantes médicinales d'Algérie. Ed : Palais du livre. ISBN, 9961-749-25-1. pp 55.

FAO/OMS. 2000 : Codex Alimentarius : Lait et produit laitiers, 2e édition- Rome : FAO ; OMS- 136p.

F.I.L. 2018. Référence ISO 707/ F.I.L octobre 2018 (Normes définies pour les analyses microbiologiques et chimique des laits, produits laitiers et des laits en poudre

Gallacier J.P., Ayerbe A., Gillis J.C. 2018. Fromage. Collection TEC et Documentation, 891p.

Getachew B.A., Netsanet T.M., Tsehayneh G.Y., Abebe W.N., Tamene M.J. 2024. Exploring cheese production enzymes from various plants as an alternative to Calf rennet. *Discover Food* (2024) 4:141 | <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00226-0>.

Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. 2010. The production, action and application of rennet and coagulants. *Technology of cheesemaking*, Chapter 2. DOI: [10.1002/9781444323740.ch3](https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch3).

Hsieh J.F., Pan P.H. 2012. Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin ; *J. Agric. Food Chem.*; 60:2039-2045.

I.D.F (International Dairy Federation) Reference ISO 707/ F.I.L. (2018). Standards set for microbiological and chemical analyses of milks and dairy products. Rome. pp 358.

Kaur S., Huppertz T., Vasiljevic T. 2024. Plant proteases and their application in dairy systems. *International Dairy Journal* 154 (2024) 105925.

Liu N., Parra H.A., Pustjens A., Hettinga K., Mongondry P., Van Ruth S.M. 2018. Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. *Talanta*. 2018, 184, 128–135.

Références bibliographiques

Lo Piero A.R., Puglisi I., Petrone G. 2002 : Characterization of lettuce, a serine like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. J. Agric. Food Chem. 50: 2439- 2443.

Lovisi P., Jolivet P., Jagic F., Dalgleish D.G., Chardot T. 2003 : A protein kinase is located in the micellar fraction of fresh pasteurized skimmed farm milk. J. Dairy Sci., 86, 1147-1156.

Mahaut M., Jeantet R., Schuck P., Brule G. 2000 : Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. – Lavoisier : pp. 26-40.

Mandy J., Doris J., Harald R. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. Review, International Journal of Dairy Technology Vol 64, 1 : 14-33.

Marchin S., Putaux J.L., Pignon F., Léonil J. 2007. Effects of the Environmental Factors on the Casein Micelle Structure Studied by Cryo Transmission Electron Microscopy and Small- angle X-Ray Scattering/ Ultrasmall-Angle X-Ray Scattering. J. Chem. Phys; 126:045101-045110.

Mc-Sweeney P.L.H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. Vol 57, No 2/3, Int. J. of Dairy Technol, 127-144p.

Mir Khan U., Selamoglu Z. 2020. Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress. Arch. Razi. Inst. 2020 Mar 1; 75 (1): 131–136.

doi: 10.22092/ARI.2019.126286.1341

Ouanezar M., Guyomarc H.F., Bouchoux A. 2012. AFM Imaging of Milk Casein Micelles: Evidence for Structural Rearrangement upon Acidification. Langmuir ; 28: 4915-4919.

Pradal M. 2012. La transformation fromagère caprine fermière: Bien fabriquer pour mieux valoriser ses fromages de chèvre. Lavoisier, 295p.

Références bibliographiques

Pougheon S. 2001. Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 3-102 p.

Ramet J.P. 2021. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen, étude de la FAO sur la production et la santé animale. Edit 48. M-26 ISBN 92-5-202169-8.

Ronez F. 2012. Exploration fonctionnelle et valorisation industrielle de la protéine laitière : Le lait et sa coagulation ; Thèse de doctorat. Ecole doctorale Environnements et Santé, Dijon, France. 10-68p.

Roseiro L.B., Barbosa M., Ames J., Wilbey R.A. 2003. Cheese making with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. International Journal of Dairy Technology, 56, 76-85p.

Smit G. 2003. The major constituents of milk. Dairy product safety and qualité. Dairy processing ed: wood head publishing limited. cambridge england. Pp 546-546.

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, 82, 151– 170.

Talantikite-Kellil S. 2015. Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de doctorat en technologie alimentaire, Université de Boumerdès. p27.

Tirard-Coller P., Belanger G., Couture R., Drapeau R. 2002. Fromage. In : Science et technologie du lait : transformation du lait (*Vignola C.L.*). Presses. Int. Polytechnique. 349-407p.

Thapon J.L. 2005. Technologie de la fabrication du lait. Agro campus – Rennes, France. Pp.51. VIGNOLA C.F, 2002. Science et technologie du lait. Montréal, Ecole polytechnique de Montréal. 608 p.

Références bibliographiques

Vignola C.L. 2002 : Science et technologie du lait : Transformation du lait – Montréal : Presse internationale polytechnique 600p.

Vioque M., Gómez R., Sánchez E., Mata C., Tejada L., Fernández Salguero J., 2000 : Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 451–456.

Xiuju W., Zhengtao Z. 2022. Acid-Induced Gelation of Milk: Formation Mechanism, Gel Characterization, and Influence of Different Techniques. *Current Issues and Advances in the Dairy Industry*. 2022; pp. 57-72.

Annexes

Annexe 1: Caractéristiques techniques de la présureCHY-MAX[®] M**Le coagulant de première qualité sur le marché**

Introduit en 2008, CHY-MAX[®] M a rapidement conquis les cœurs de nombreux fabricants de fromage dans le monde en raison de sa supériorité. CHY-MAX[®] M offre aux fabricants de fromage de nombreux avantages qui varient selon l'application.

Exemples d'avantages:

Rendement fromager accru et meilleur contrôle du processus

Texture plus ferme pendant la durée de conservation

Absence d'amertume

Dosage réduit

Lactosérum de qualité supérieure

Empreinte CO₂ réduite

CHY-MAX[®] M est une chymosine (de force 1/125000 à 650 mg de chymosine /100 g) de deuxième génération produite par fermentation (FPC) offrant une spécificité élevée de coagulation du lait associée à une activité protéolytique réduite. CHY-MAX[®] M est proposé dans plusieurs conditionnements et concentrations, sous forme liquide ou granulée. Pour un rendement accru et un meilleur contrôle du caillé, il est possible d'associer CHY-MAX[®] M à YIELDMAX[®].

Annexe 2: Caractéristiques techniques du lait écrémé en poudre

Caractéristiques techniques

Poudre de Lait Ecrémé Low Heat.

AGROPUR CANADA

Poudre solide obtenue directement par élimination de l'eau du lait écrémé de la vache non atteinte de maladies contagieuses ou de mammites par le procédé de concentration sous vide et séchage spray.

Spécifications Physico-chimiques

Critères	Exigences
Humidité	≤ 4%
Matière Grasse	0.15 % Maximum (m/m)
Matière Protéique	34% Minimum sur 100 Grs d'extrait sec dégraissé.
WPN index	≥ 1.51 à 6 mg /g
Lactose	49- 54%
Minéraux	8% Maximum
Acidité (exprimée en % d'acide lactique par 100 g de poudre)	0.15% Maximum
Lactates	≤ 100 mg / 100 g d'extrait sec dégraissé.
Test de Ramsdell	Minimum 1.8 ml
PH (Reconstitution à 10 %)	6.60-6.80
Stabilité Thermique (*)	≥ 12 minutes
Solubilité	≥ 99% minimum
Propreté ADPI	A/B

(*) Aucune floculation ou dépôt ne doit pas être observé sur un lait reconstitué à 10% de matière sèche soumis au test de bain d'huile à une température de 140 °C pendant au moins 12 minutes.

Spécifications Microbiologiques

Critères	Exigences
Germes aérobies à 30°C (CFU)	Maximum 10 000
Coliformes totaux (par gr)	10
Germes anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C	05
Levures et Moisissures (CFU/gr)	Absence
<i>Escherichia coli</i> (/gr)	Absence
<i>Salmonella</i>	Absence dans 30 grammes
Mycotoxines	Absence

Spécifications Toxicologiques

Critères	Exigences
Antibiotiques	Absence
Antiseptiques	Absence
PCB	≤ 100 nano grammes par gramme de matière grasse
Dioxine	1 à 4 pico grammes par gramme de matière grasse
Fer	10 ppm max
Cuivre	1.5 ppm max

Concentrations radioactives maximales

Source	Concentration radioactive
Américium 241	1 Becquerel / Kg
Plutonium 239	1 Becquerel / Kg
Iode 131	67 Becquerels / Kg
Strontium 90	67 Becquerels / Kg
Césium 134	202 Becquerels / Kg
Césium 137	267 Becquerels / Kg

Spécifications Organoleptiques

Critères	Exigences
Goût et Odeur	<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'odeur étrangère et désagréable • Odeur et goût Francs du Lait
Aspect	<ul style="list-style-type: none"> • Homogène, sans grumeaux, ni points brulés ou colorés.
Couleur	<ul style="list-style-type: none"> • Poudre blanche ou légèrement crème de couleur homogène.

