

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

UNIVERSITE CONSTANTINE -1-



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET
DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
(I.N.A.T.A.A.)

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de magister en sciences alimentaires

Option : Biochimie et Technologies Alimentaires

La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*).

Présenté par:

ZIKIOU Abdellah

Soutenu le :

Devant le Jury composé de :

Président :	BOUDJELLAL A.	M.C.C.A.	INATAA-UC1
Rapporteur :	ZIDOUNE M. N.	Professeur	INATAA-UC1
Co-promoteur :	BENATALLAH L.	M.C.	INATAA-UC1
Examineurs:	KHELIFI D.	Professeur	SNV-UC1
	KHERROUB K.	Professeur	INATAA-UC1

Année universitaire 2012-2013.

Remerciements

Avant tout je tiens à remercier celui qui nous a créés, protégé, aidé et celui qui m'a donné la patience et le courage pour pouvoir accomplir entre autre mon mémoire de magister dans les meilleures conditions en disant « Dieu Merci ».

Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans la patiente assistance, les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigué mon promoteur, Pr. ZIDOUNE M.N. qui a accepté de m'encadrer. Je lui témoigne ici, de ma gratitude et reconnaissance.

Je tiens également à remercier :

M. BOUDJELLAL A. pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Pr. KHELIFI D. et Pr. KHERROUBK. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie les sociétés LE FERMIER et SAFILAIT ainsi que l'ensemble de leurs personnel pour m'avoir accueilli et permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail.

Je remercie particulièrement, les membres de l'équipe T.E.P.A. du laboratoire L.N.T.A. et aussi M. GAGAOUA M. pour leur contribution et le temps qu'ils ont bien voulu consacrer pour la réalisation de ce mémoire.

Le soutien et l'encouragement de : Omar, Adel, Ghenima, Azouaou, Monbir (Abderzak), Koukou Djamal, et l'intellectuel agricole (Bellal) ont été très importants pour la réussite de mes études. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde affection.

Je remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé ou encouragé, à quelque titre ou degré que ce soit, à entreprendre et achever ce mémoire, qui est ma modeste contribution au domaine de la Recherche Scientifique.

DEDICACES

A ma très chère mère qui s'est tant sacrifiée pour les besoins de nos études,

A mon très cher père pour tous les efforts consentis afin de nous armer du savoir,

A mes soeurs (Nadia, Samia, Souad, Yasmine et Roumayssa) pour leur affectueux soutien moral,

A toutes celles et à tous ceux qui m'aiment,

A tous mes amies et amis et plus particulièrement celles et ceux que j'ai connus à INATAA, Constantine.

Abdellah.

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Revue bibliographique

I. Généralités sur le lait	3
I.1. Aspect et définition légale.....	3
I.2. La composition du lait 3	
I.2.1. L'eau.....	4
I.2.2. Le lactose.....	4
I.2.3. La matière grasse.....	4
I.2.4. L'azote non protéique.....	5
I.2.5. Matière minérale et saline	6
I.2.6. Les vitamines.....	6
I.2.7. Les protéines du lait	6
I.2.7.1. Les protéines du lactosérum	6
I.2.7.2. Généralité sur les caséines du lait.....	8
A. Composition et structure chimique	8
B. Micelles de caséine	8
C. Les différents modèles structuraux des micelles.....	10
II. La coagulation du lait	12
II.1. Mécanismes de la coagulation	12
II.1.1. La coagulation acide	12
II.1.2. La coagulation enzymatique	13
II.2. Les interactions impliquées dans la formation d'un gel	14
II.3. Généralités sur les protéases coagulant le lait	16
II.3.1. La présure.....	17
II.3.2. Etat de la recherche sur les succédanés de présure	18
II.3.3. Cas de l'extrait des fleurs de cardon comme succédané de présure .	21
II.3.3.1. Etude botanique et milieu d'origine	21
II.3.3.2. Etude technologique.....	23
A. Caractéristiques du système enzymatique.....	23
B. Composition du système enzymatique.....	24

C. Localisation du système enzymatique dans le végétal	25
II.3.3.3. L'utilisation de l'extrait des fleurs de cardon en Algérie...	25
III. La fabrication des fromages	26
III.1. Principes généraux de la technologie fromagère.....	26
III.2. La technologie des fromages à pâte molle	27
III.2.1. Définition des fromages à pâte molle	27
III.2.2. Procédé de fabrication des fromages type pâte molle	28

Partie expérimentale

Chapitre I. Matériel et méthodes

I.1. Matière première utilisée	30
I.1.1. Le lait	30
I.1.2. La présure.....	30
I.1.3. La pepsine de poulet.....	30
I.1.3.1. Préparation des proventricules	30
I.1.3.2. Extraction de la pepsine	30
I.1.4. La fleur de cardon	31
I.1.4.1. La récolte des fleurs de cardon.....	31
I.1.4.2. La conservation des fleurs.....	31
I.1.4.3. Extraction du système enzymatique des fleurs de cardon.....	33
I.2. Caractérisation du lait utilisé	34
I.2.1. Mesure du pH	34
I.2.2. Détermination de l'acidité titrable	34
I.2.3. Détermination de l'extrait sec total	34
I.4. Caractérisation de l'extrait des fleurs de cardon.....	34
I.4.1. Taux de protéines totales.....	34
I.4.2. Détermination de l'activité coagulante	36
I.4.3. L'activité spécifique.....	37
I.4.4. Etude de l'activité protéolytique	37
I.4.5. Détermination du profil électrophorétique.....	37
I.4.5.1. Préparation des échantillons.....	38
I.4.5.2. Dépôt des échantillons.....	38
I.4.5.3. Révélation des protéines.....	38
I.5. Détermination des conditions optimales de coagulation	39

I.6. Etude des interactions impliquées dans la formation du gel cardosine	39
I.7. Application fromagère	41
I.7.1. Essais de fabrication d'un fromage à pâte molle type Brie.....	41
I.7.1.1. Le lait utilisé.....	41
I.7.1.2. La technologie de fabrication	41
I.7.1.3. Analyses physico-chimiques des fromages fabriqués	42
I.7.1.3.1. Mesure du pH	42
I.7.1.3.2. Mesure du taux de matière grasse.....	43
I.7.1.3.3. Mesure de l'extrait sec total	43
I.7.1.3.4. Calcul du rendement fromager	43
I.7.1.3.5. Détermination de l'acidité titrable.....	43
I.7.1.4. Analyses microbiologiques des fromages fabriqués	44
I.7.1.4.1. Préparation des solutions fromagères	44
I.7.1.4.2. Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale	44
I.7.1.4.3. Recherche et dénombrement des levures et moisissures..	44
I.7.1.4.4. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.	45
I.7.1.5. Analyse sensorielle des fromages fabriqués.....	45
I.7.1.5.1. Le panel de dégustation ou les sujets	45
I.7.1.5.2. Le test triangulaire	46
I.7.1.5.3. Le test de préférence.....	47
I.7.1.5.4. Le test descriptif	47
I.7.2. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert	48
I.7.2.1. Echantillonnage	49
I.7.2.2. Suivi de l'évolution de la texture	49
I.7.2.3. Suivi de l'évolution de la protéolyse.....	50
I.7.2.3.1. Fractionnement des protéines à pH= 4,6	50
I.7.2.3.2. Suivi qualitatif par électrophorèse UREA-PAGE	51
I.7.2.3.2. Suivi quantitatif par dosage des protéines solubles.....	52
I.7.2.4. Suivi de l'évolution des caractéristiques organoleptiques	52
I.7.2.4.1. Le test de classement par rang.....	52
I.7.2.4.2. Le test descriptif	53

Chapitre II. Résultats et discussions

II.1. Caractéristiques du lait utilisé.....	54
II.2. Caractérisation de l'extrait brut des fleurs de cardon	54
II.2.1. Le rendement de l'extraction	54
II.2.2. L'activité protéolytique.....	56
II.2.3. Le profil électrophorétique	57
II.3. Détermination des conditions optimales de coagulation	58
II.3.1. Effet du pH du lait	58
II.3.2. Effet de la température du lait.....	59
II.3.3. Effet de la concentration de CaCl ₂	60
II.4. Les interactions impliquées dans le gel obtenu par l'extrait de fleurs de cardon	61
II.4.1. Dissociation des protéines par l' SDS.....	61
II.4.2. Dissociation des protéines par l'urée	63
II.4.3. Dissociation des protéines par l'EDTA	64
II.5. Application fromagère	66
II.5.1. Essai de fabrication d'un fromage pâte molle type Brie.....	66
II.5.1.1. Composition physico-chimique du lait utilisé	67
II.5.1.2. Composition physico-chimique des fromages fabriqués	67
II.5.1.3. Le rendement fromager	68
II.5.1.4. Résultats d'analyses microbiologiques	69
II.5.1.5. Résultats de l'analyse sensorielle.....	69
II.5.1.5.1. Résultats du test triangulaire	69
II.5.1.5.2. Résultats du test de préférence	70
II.5.1.5.3. Résultats du test d'intensité.....	70
II.5.1.5.4. Profil sensoriel	71
II.5.2. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert	72
II.5.2.1. Evolution de la texture des fromages	74
II.5.2.2. Evolution de la protéolyse	74
II.5.2.2.1. Evolution qualitative	75
II.5.2.2.2. Evolution quantitative	78
II.5.2.3. Evolution des caractéristiques organoleptiques	79
Conclusion.....	85

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un globule de matière grasse.....	5
Figure 2 : Micelle de caséine vue au microscope électronique à balayage.....	9
Figure 3 : Micelle et submicelle de caséine	9
Figure 4 : Pont phosphate de calcium	10
Figure 5 : Les différents modèles structuraux des micelles	11
Figure 6 : Coagulation du lait en fromagerie	12
Figure 7 : Changement de la structure de micelle de caséine durant l'acidification.....	13
Figure 8 : Formation du gel lactique	13
Figure 9 : Représentation schématique de la structure primaire d'une chymosine bovine.....	18
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de quelques aspartyl-protéases d'origine animale et fongique.....	19
Figure 11 : Inflorescence de <i>Cynara cardunculus</i>	22
Figure 12 : Cardosine A et B.....	24
Figure 13 : La diversité des fabrications fromagère.....	27
Figure 14 : Processus de fabrication des fromages à pâte molle.....	29
Figure 15 : Protocole d'extraction de la pepsine de poulet.....	31
Figure 16 : Capitule et fleurs de cardon utilisés.....	32
Figure 17 : Obtention de l'extrait brut des fleurs du cardon	33
Figure 18 : Courbes d'étalonnage	35
Figure 19 : Diagramme de fabrication d'un fromage à pâte molle type Brie adopté par la fromagerie « LE FERMIER »	42
Figure 20 : Diagramme de fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert adopté par la laiterie « SAFILAIT »	48
Figure 21 : Préparation de l'échantillon pour le test de pénétrométrie	50
Figure 22 : Extraction des fractions protéiques solubles et insolubles à pH= 4,6	51
Figure 20 : Extrait enzymatique des fleurs de cardon obtenu	55
Figure 21 : Profils électrophorétiques sur SDS-PAGE des extraits de différentes parties de la fleur de cardon.....	57

Figure 22 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure	58
Figure 23 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure.....	59
Figure 24 : Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure	60
Figure 25 : Dissociation des protéines des gels présure et cardosine par le SDS	62
Figure 26 : Dissociation des protéines des gels présure et cardosine par l'urée	63
Figure 27 : Dissociation des protéines des gels présure et cardosine par l'EDTA	64
Figure 28 : Le fromage obtenu avec l'extrait de cardon et le fromage témoin, après 20 jours de production.....	66
Figure 29 : Profils sensoriels du fromage obtenu avec l'extrait de cardon et du fromage témoin.	72
Figure 30 : Les fromages à pâte molle type Camembert obtenus	73
Figure 31: Evolution de la distance de pénétration parcourue par le cône du pénétromètre dans les trois fromages au cours de l'affinage	74
Figure 32: Comportement électrophrétique des protéines du fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon	76
Figure 33: Comportement électrophrétique des protéines du fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet.....	77
Figure 34: Comportement électrophrétique des protéines du fromage témoin.....	77
Figure 35: Evolution du taux de protéines solubles à $\text{pH} = 4,6$ par rapport aux protéines totale des différents fromages au cours de l'affinage.....	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition moyenne en g/l des laits de différentes espèces animales	4
Tableau 2 : Principales caractéristiques des caséines	8
Tableau 3 : types d'interactions impliqués dans la formation et le maintien des gels acides et des gels présures	16
Tableau 4 : Spécificités de quelques succédanés de présure d'origine végétale	20
Tableau 6 : Composition microbiologique moyenne de l'extrait des fleurs du cardon	25
Tableau 7 : Les valeurs des différents paramètres à faire varier.....	39
Tableau 8 : Concentration des différents agents dissociant	40
Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques de la poudre de lait et du substrat de BERRIDGE...	54
Tableau 10 : Caractéristiques de l'extrait obtenu à partir de 10g de fleurs sèches de cardon	55
Tableau 11 : Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication.....	67
Tableau 12 : Résultats des analyses physico-chimiques des fromages fabriqués.....	67
Tableau 13 : Résultats d'analyses microbiologiques pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon	69
Tableau 14 : Résultats d'analyses microbiologiques pour le fromage témoin	69
Tableau 15 : Résultats du test triangulaire	70
Tableau 16 : Test ANOVA pour les notes ¹ des attributs des deux fromages	71
Tableau 17 : Les notes ¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J = 1 jour	80
Tableau 18 : Les notes ¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J = 6 jour	80
Tableau 19 : Les notes ¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J= 13 jour.....	81
Tableau 20 : Les notes ¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J= 20 jour.....	81
Tableau 21 : Les notes ¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J= 30 jour.....	82

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française De Normalisation

ANOVA : Analyse de la variance

ANP : Azote Non Protéique

APs : Protéases à Acide aspartique

BSA : Bovine Sérum Albumine

CMP : Caséinomacropéptide

EDTA : Ethyle Diamine Tétra Acétique

ESD : extrait sec dégraissé

EST : Extrait Sec Total

FAO : Food and Aliment Organisation

FIL : Fédération Internationale de la Laiterie

FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile

INATAA : Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire

ISO : Internatiol Standard Organisation.

Met : Methionine

MG : matière grasse

OGA : Oxytétracycline Glucose Agar

ONS : Office National des Statistiques

PCA : Plat Count Agar

Phe : Phenilalanine

Rdt : rendement

SAB : Sérum Albumine Bovine

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Ser-P : sérine phosphorylée

TCA : Acide Trichloracétique

TEPA : Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires

UAC : Unité D'activité Coagulante

UFC/g : Unité Forme Colonie par gramme.

UP : Unité Présure

VRBL : bouillon lactosé vert brillant

α_{s1} -CN : caséine α_{s1}

β -CN : caséine β

Introduction

Introduction

La fabrication du fromage est apparue il y a 8000 ans, peu après la domestication des animaux. A l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. De nos jours, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles indéniables (FREDOT, 2005).

Aujourd'hui, Selon l'organisation mondiale de l'alimentation (F.A.O.), 40% du lait fabriqué dans le monde est transformé en fromage, ce chiffre qui ne cesse d'augmenter d'année en année, ont fait que l'industrie fromagère soit en tête des industries de transformation des laits. Selon cette même organisation, la production mondiale du fromage, a passé de 17,5 millions de tonnes en 2003, jusqu'à 25 millions de tonnes en 2011, voire une augmentation de 2% par an.

L'étape clé de la réussite d'un fromage quel que soit son type est la coagulation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimique intervenant sur les micelles de caséines du lait. L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau non sevré. D'après ALAIS (1984), il faut en moyenne deux caillettes de veau pour produire 1 litre de présure, et selon BAUER *et al.* (2010), il faut environ 2 litres de présure pour produire une tonne de fromage, Autrement dit : « *il faut sacrifier 4 jeunes veaux pour produire une tonne de fromage !* ».

L'augmentation de la production et de la consommation du fromage d'une part, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure d'autre part, ont causé une pénurie mondiale en approvisionnement en cet agent coagulant ce qui a engendré des fluctuations très importantes dans son prix. Ces problèmes sont aggravés notamment dans les pays musulmans, pour des raisons religieuses, dues aux rituelles de l'abattage.

Ainsi, cette situation a suscité la recherche de produits de remplacement de la présure, susceptibles de remplir un certain nombre de conditions dont les principales sont l'obtention de produits fromagers comparables à ceux de la présure de veau, garantit d'hygiène et de non toxicité et un - prix de revient inférieur à celui de la présure.

L'Algérie ne fait pas l'exception, en 2011, selon l'Office National des Statistiques (O.N.S.), près de 25 mille tonnes de fromages ont été vendu dans le marché Algérien. Soit une consommation de l'ordre de 0,62 Kg/habitant. Et les fromageries Algériennes ont utilisé 1,5

tonne de présure et/ou ses succédanés ; cette quantité totalement importée a coûté une valeur de plus de 102 mille dollars l'équivalent d'environ 7,5 millions de DA.

Cette grande dépendance de l'Algérie vis-à-vis des fournisseurs étrangers en présure traditionnelle et/ou ses succédanés, a attiré notre attention sur la recherche de sources locales productrices d'agents coagulant le lait.

Bien que leur nombre puisse être considéré comme faible, certains travaux ont déjà traité ce sujet, à l'instar de ceux menés par l'Equipe de Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) qui ont porté sur la pepsine extraite des proventricules du poulet (ADOUI, 2007 ; BOUGHALUOT, 2007 ; BENYAHIA-KRID, 2010), vue l'importance de ce genre d'enzymes, nous avons jugé intéressant d'entreprendre une suite de recherches en explorant une autre piste cette fois-ci ; celle des agents coagulants d'origine végétale, il s'agit d'enzymes extraites à partir des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*).

L'extrait en question est connu et utilisé depuis une époque lointaine pour la fabrication des fromages traditionnels Algériens. L'objectif du présent travail est de bien connaître ces enzymes obtenus à partir des fleurs de cardon (une matière première largement ré pondue en Algérie), et d'étudier en même temps les possibilités de leur emploi dans l'industrie fromagère. Pour atteindre cet objectif nous avons procédé comme suit :

- Récolte et lyophilisation des fleurs de cardon ;
- Extraction du système enzymatique à partir des fleurs séchées ;
- Détermination des principales caractéristiques de l'extrait des fleurs de cardon par comparaison à la présure animale ;
- Caractérisation du gel obtenu avec l'extrait de cardon par comparaison à la présure animale et aux résultats trouvés par les membres de l'équipe T.E.P.A. caractérisant le gel pepsine du poulet ;
- Contribution à la production des fromages à pâte molle type Brie et type Camembert, dans deux fromageries locales différentes, pour voir l'effet de l'extrait de cardon sur la qualité des fromages, par comparaison à la pepsine de poulet et aux chymosines microbiennes utilisées par les deux unités.

Première partie :
Revue bibliographique

I. Généralité sur le lait

I.1. Aspect et définition légale

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune (JEANTET *et al.* 2008).

Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6.6 à 6.8) légèrement acide, proche de la neutralité, il peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse (ALAIS, 1984).

Le lait a été défini en 1908 au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum. » (LUQUET, 1985).

La Fédération Internationale de la Laiterie (F.I.L.), dans son dictionnaire de terminologie de 1983 définit le lait comme : « le produit de sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ou soustraction » (LEVIEUX, 1999).

Le lait est ainsi le seul aliment des mammifères nouveau-nés et il y a autant de laits différents qu'il existe de mammifères au monde (DEBRY, 2001). Le terme lait sans aucun qualificatif est réservé au lait de vache (FREDOT, 2005).

I.2. La composition du lait

De très nombreux facteurs peuvent intervenir sur la composition du lait dont l'espèce, la race, le stade de lactation, la saison, l'état sanitaire, l'alimentation (MAHAUT *et al.*, 2000).

Le lait est constitué de quatre phases :

- ✓ Une émulsion de matière grasse ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D) ;
- ✓ Une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelles ;
- ✓ Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamine B et C, sels minéraux, azote non protéique) ;
- ✓ Une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de CO₂ dissous qui représentent environ 5% du volume du lait.

Ces phases sont en suspension les unes dans les autres. Il existe des facteurs qui permettent de rompre cette suspension (pH acide, présure) qui font coaguler la phase colloïdale. Ces techniques seront utilisées lors de la fabrication des dérivés du lait (FREDOT, 2005).

Tableau 1 : Composition moyenne en g/l des laits de différentes espèces animales (ALAIS, 1984 ; LUQUET, 1985 ; BELITZ *et* GROSCH, 1987).

Lait de	Protéines totales	Caséine	Lactose	Matière grasse	Minéraux totaux
Vache	32	28	40-60	39	9
Brebis	55	45	47	71,9	9
Chèvre	28	23	44-47	33,8	5-8
Chamelle	30	28	33	53,8	7

I.2.1. L'eau

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion (VIGNOLA, 2002). Elle représente environ 87 à 88% du poids total du lait, elle se trouve sous deux formes : l'eau libre (96%) et l'eau liée (4%). L'eau libre sert de solvant aux éléments hydrophiles du lait (le lactose, les minéraux, les protéines solubles et certaines vitamines). L'eau liée est impliquée dans la structure des micelles de caséines (LUQUET, 1985).

I.2.2. Le lactose

La quasi-totalité des glucides contenus dans le lait est sous forme de lactose (FREDOT, 2005). Il est le constituant majeur de la matière sèche du lait, il constitue environ 40% des solides totaux, ainsi, le lait contient environ 4,8% de lactose (VEISSEYRE, 1975). D'autres glucides peuvent être présents en faibles quantités, comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose (VIGNOLA, 2002). Il joue un rôle important, notamment à sa fermentescibilité qui intervient lors de l'élaboration de divers produits laitiers (MAHAUT *et al.*, 2000).

I.2.3. La matière grasse

La matière grasse du lait est principalement sous forme globulaire à l'état d'émulsion (MAHAUT *et al.*, 2000). Le diamètre des gouttelettes varie de 0,1 à 22 µm (SCOTT, 1981).

L'enveloppe globulaire possède, à pH 6,7 une charge électrique négative à l'origine de la répulsion des globules (MATHIEU, 1998).

La matière grasse du lait se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol (VIGNOLA, 2002).

Les globules gras (figure 1) dans le lait sont en émulsion huile dans l'eau, chaque globule est formé de différentes couches de triglycérides : les triglycérides liquides, à bas point de fusion, sont au centre du globule et les triglycérides solides, à haut point de fusion se superpose au précédents. Le globule est entouré à la périphérie d'une sorte d'enveloppe contenant des phospholipides, qui jouent le rôle d'émulsifiant dans la stabilité du globule gras, et des lipoprotéines (KEENAN *et* PATTON, 1995).

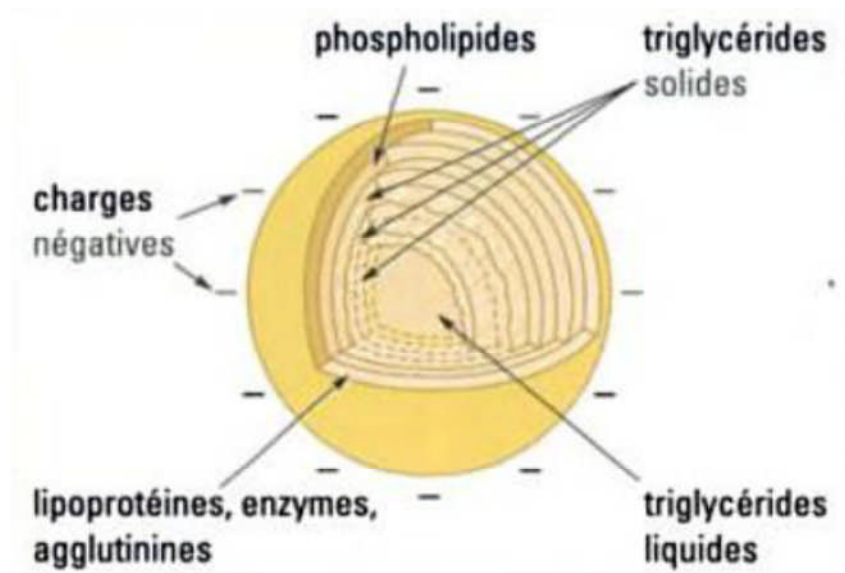


Figure 1 : Structure d'un globule de matière grasse (VIGNOLA, 2002).

I.2.4. L'azote non protéique (ANP)

L'ANP correspond à toutes les molécules renfermant de l'azote, autres que les protéines (RIBADEAU-DUMAS, 1981). Selon ALAIS (1984), ce sont des substances de bas poids moléculaire. Elles ne précipitent pas dans les conditions de précipitation des protéines du lait : acidification, élévation de température ou addition de présure. Elles sont peu abondantes 1,5 à 16 g/L dans le lait de vache (VEISSEYRE, 1975). L'urée constitue la majeure partie de l'ANP : 33 à 79% (RIBADEAU-DUMAS, 1981).

I.2.5. Matière minérale et saline

Le lait apporte de nombreux minéraux. Les plus importants sont: Le calcium : 1,25 g.L⁻¹ ; le potassium : 1,5 g.L⁻¹ ; le chlore : 1,2 g.L⁻¹ ; le phosphore : 0,95 g.L⁻¹ ; le sodium : 0,5 g.L⁻¹ ; le magnésium : 0,13 g.L⁻¹. Ils sont pour une partie à l'état dissous et pour une autre à l'état colloïdal associés aux caséines au sein des micelles. La fraction saline colloïdale représente 65% du calcium, 50% du phosphore inorganique et 60% du magnésium (MAHAUT *et al.*, 2000) . Entre formes solubles et colloïdales, il existe un équilibre qui dépend de plusieurs facteurs comme la température et le pH (SCOTT, 1981). Le lait apporte également des oligoéléments à l'état de traces : zinc (3,5 mg.L⁻¹), iode (20 à 100 µg.L⁻¹), cuivre (20 à 50 µg.L⁻¹) (MAHAUT *et al.*, 2000).

I.2.6. Les vitamines

On distingue d'une part les vitamines hydrosolubles (vitamine du groupe B et vitamine C), et d'autre part les vitamines liposolubles (A, D, E, K) (FREDOT, 2005).

D'une manière générale, le lait ne permet pas de satisfaire tous les besoins vitaminiques. Cependant, il existe des laits sur le marché à teneur garantie en vitamines pour s'affranchir des facteurs exogènes. Ce sont surtout les vitamines A, B₁, B₂ ; qui constituent la valeur nutritive du lait (JEANTET *et al.*, 2008).

I.2.7. Les protéines du lait

Le lait contient en moyenne 3,5% de protéines. Cette teneur varie selon l'alimentation de l'animal, les saisons et le cycle de lactation (FREDOT, 2005). Différentes structures et propriétés physicochimiques distinguent les protéines du lait. On les classe en deux catégories d'après leur solubilité dans l'eau et leur stabilité : d'une part, les différentes caséines qui sont en suspension colloïdale, qui se regroupent sous forme de micelles, d'autre part les protéines du sérum qui sont en solution colloïdale et qui précipitent sous l'action de la chaleur (VIGNOLA, 2002).

I.2.7.1. Les protéines du lactosérum

Elles représentent 15 à 28% des protéines du lait de vache et 17% des matières azotées. Elles demeurent en solution dans le «sérum isoélectrique» obtenu à pH = 4,6 à 20°C

ou dans le sérum présure exsudé par le coagulum formé lors de l'emprésurage (VIGNOLA, 2002).

➤ **La β -lactoglobuline**

La β -lactoglobuline est la plus importante des protéines du sérum puisqu'elle en représente environ 55%. Son point isoélectrique est 5,1 et elle a un poids moléculaire de 18,3 kDa (DEBRY, 2001). Sa structure primaire compte 162 résidus d'acides aminés. La structure tertiaire montre une petite poche hydrophobe qui lui permet de fixer la vitamine A et certains acides gras (VIGNOLA, 2002).

➤ **L' α -lactalbumine**

L' α -lactalbumine est une métalloprotéine qui représente environ 22% des protéines du sérum. Son point isoélectrique est 4,8 et elle a un poids moléculaire de 14,1 kDa (CAYOT et LORIENT, 1998). C'est une petite protéine qui compte 123 résidus d'acides aminés et un cation, soit Ca^{2+} , elle possède également une portion hydrophobe qui semble être le site de fixation de la galactosyltransférase, laquelle joue un rôle dans la biosynthèse du lactose (VIGNOLA, 2002).

➤ **Les immunoglobulines**

Elles constituent environ 13% des protéines du sérum. Ce sont des glycoprotéines jouant le rôle d'anticorps réparti en cinq catégories : IgG₁, IgG₂, IgA, IgM, IgE. Leurs points isoélectriques varient de 5,5 à 8,3 (CAYOT et LORIENT, 1998 ; VIGNOLA, 2002)

➤ **La sérum albumine bovine SAB**

Représente environ 7 % des protéines du sérum, elle est constituée de 582 résidus d'acides aminés, son poids moléculaire est de 66 kDa et elle a la particularité de posséder 35 résidus cystéine (BRULE, 1996).

➤ **La lactoferrine**

La lactoferrine représente environ 4 % des protéines du sérum, elle est constituée de 689 résidus d'acides aminés, comme son nom l'indique c'est une protéine porteuse de fer sous la forme d'ions ferriques (Fe^{3+}), c'est la seule protéine capable d'être stable en présence d'ions ferriques, son point isoélectrique se situe entre 8,4 et 9 (VIGNOLA, 2002).

I.2.7.2. Généralités sur les caséines

A. Composition et structure chimique

Les caséines représentent 80% des protéines totales du lait et se composent de quatre protéines majeures, les caséines α_1 , α_2 , β , et κ dont les proportions relatives respectivement sont : 33, 11, 33, 11 %, (DALGLEISH *et* CORREDIG, 2012).

Ces protéines possèdent un certain nombre de caractères communs : la présence de phosphore sous forme de groupements phosphoséryls, leur richesse en certains acides aminés (glu, leu, pro) et la forte proportion de résidus apolaires (MAHAUT *et al.*, 2000).

Leur point isoélectrique est de 4,65, l'élucidation de la structure tridimensionnelle permet d'affirmer que les caséines se regroupent sous forme sphérique appelée micelle (VIGNOLA, 2002).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des caséines (FOX, 1989 ; CREAMER, 2002).

	α_1	α_2	β	κ
Résidus d'acides aminés par mole	199	207	209	169
Poids moléculaire (Dalton)	23600	25200	24000	19000
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupements phosphoséryls	8-9	10-13	4-5	1
Groupements glycosylés	0	0	0	0-5
Groupements hydrophobes	88	69	111	88
Charge à pH 6.6	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0

B. Micelles de caséine

La micelle de caséine (figure 2) est une particule sphérique d'environ 180 nm constituée de submicelles (figure 3) de 8 à 20 nm, elle est très hydratée (2 à 4 g d'eau par g de protéine) et 7% environ de son extrait sec est composé de (LENOIR *et al.*, 1997). L'augmentation de la teneur en caséine κ s'accompagne de la baisse de la taille des micelles et suggère une localisation de cette caséine à la surface des micelles, Cette caséine serait un facteur limitant de la croissance des micelles, les micelles les plus petites étant les plus riches en caséine κ (LOVISI *et al.*, 2003 ; DALGLEISH *et* CORREDIG, 2012).

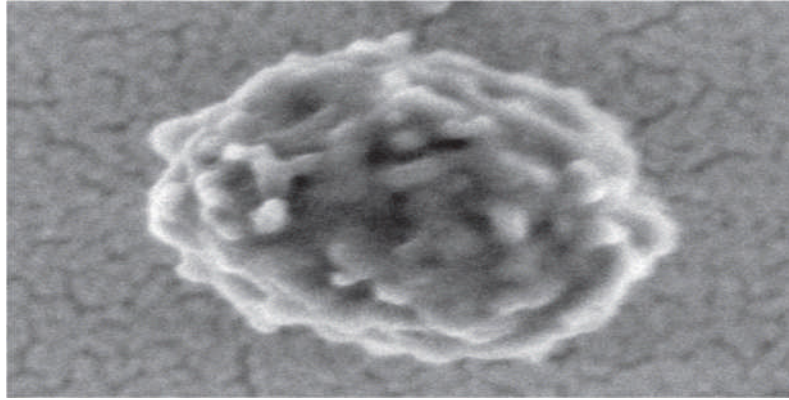


Figure 2 : Micelle de caséine vue au microscope électronique à balayage (DALGLEISH *et* CORREDIG, 2012).

Les submicelles pourraient être constituées d'environ 10 molécules des 4 caséines en proportion variable avec une répartition de caséine κ (hydrophile) en surface ; les sub-micelles les plus riches en caséine κ sont situées en surface de la micelle, ce qui la stabilise (CAYOT *et* LORIENT, 1998).

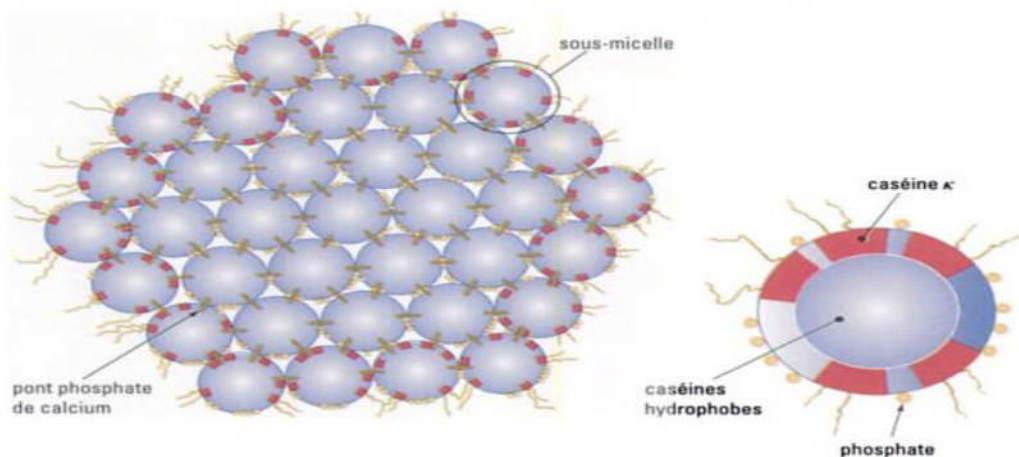


Figure 3 : Micelle et submicelle de caséine (VIGNOLA, 2002)

Selon DALGLEISH *et al.* (1989), la répartition des caséines s'effectuerait de la façon suivante : la surface des micelles serait composée de 39 à 47% de caséine κ , de 0 à 10 % de caséine β et de 47 % de caséine α et l'intérieur serait constitué majoritairement des caséines α et β avec des proportions d'environ 47% chacune et seulement de 1% de caséine κ .

Les minéraux contenus dans les micelles de caséine sont qualifiés de colloïdaux. Ils sont constitués de calcium, de phosphore, et du magnésium (WALSTRA *et* JENNESS, 1984). Les submicelles sont reliées entre elles par le biais des ponts phosphate de calcium (DE KRUIF *et al.*, 2012), La figure 4 illustre un modèle du pont calcium phosphate, on peut

remarquer que les liaisons en question se font à partir de la chaîne latérale d'un résidu de sérine phosphorylée (Ser-P). Il est bon de noter que certains acides, par leurs chaînes latérales $-\text{COO}^-$, peuvent également être engagés dans certains ponts phosphates de calcium (VIGNOLA, 2002)

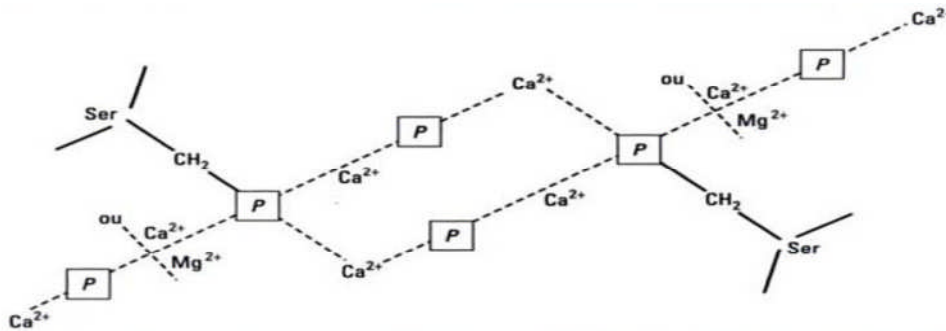


Figure 4 : Pont phosphate de calcium (CAYOT *et* LORIENT, 1998)

La stabilité des micelles peut s'expliquer par des répulsions électrostatiques qui s'opposent à leur agrégation, par la forte proportion (MAHAUT *et al.*, 2000).

C. Les différents modèles structuraux des micelles

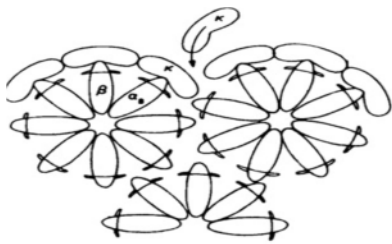
De nombreux modèles (figure 5) ont été proposés au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur les caractéristiques physico-chimiques des micelles de caséine. Ces modèles reposent sur des méthodologies différentes et peuvent se classer en trois catégories : les modèles cœur-enveloppe, les modèles à sous unités et les modèles à structure ouverte (DALGLEISH *et* CORREDIG, 2012).

✓ **Modèle cœur-enveloppe :** Cette modélisation (WAUGH *et al.*, 1970) est basée d'une part, sur la présence de complexes constitués de caséines α_s et β au cœur de la micelle, capable de fixer le calcium et d'autre part, sur la capacité de la caséine κ à stabiliser les caséines sensibles au calcium. En effet, en présence de calcium, la précipitation des complexes $\alpha_s - \beta$ est évitée par la formation de complexes α_{s1-k} situés en monocouche en surface de la micelle.

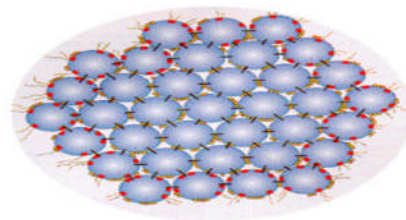
✓ **Modèle à sous unités (à submicelles) :** La micelle serait composée de sous unités, appelées submicelles de 10 à 20nm de diamètre qui seraient l'unité de base de la macrostructure. Ces submicelles sont structurées comme dans le modèle de Waugh, mais elles sont reliées entre elles par du phosphate de calcium colloïdal (SCHMIDT, 1982).

✓ **Modèle à structure ouverte** : Le modèle à structure ouverte est basé sur l'existence d'interactions spécifiques entre les caséines individuelles, conduisant à la formation d'un gel protéique poreux, dont le phosphate de calcium ferait partie intégrante et ne serait plus un simple agent de pontage. Cette modélisation rétablit la notion d'une répartition plus homogène des caséines au sein de la micelle avec, non seulement la présence de la caséine k à la surface des micelles, mais aussi celle de caséines α et β (HOLT, 1992).

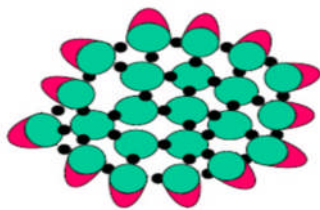
HORNE, (2002) propose un modèle basé sur la polymérisation du réseau caséinique, c'est le modèle à double liaison. Il s'agit d'un assemblage de caséines individuelles par des liaisons hydrophobes et des ponts de phosphate de calcium colloïdal. La formation et l'intégrité des micelles sont contrôlées par un équilibre entre les forces attractives et répulsives des micelles de caséines (forces hydrophobes, forces électrostatiques). D'un autre côté, du fait que la caséine k ne peut avoir que des liaisons hydrophobes avec les autres caséines, elle semble agir comme une chaîne terminale (superficielle) stabilisante.



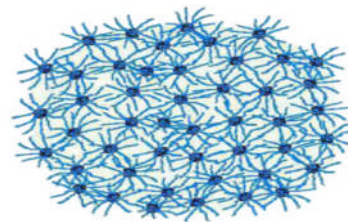
Modèle cœur-enveloppe (WAUGH, 1970)



Modèle à submicelles (SCHMIDT, 1982).



Modèle à double liaison (HORNE, 2002)



Modèle à structure ouverte (HOLT, 1992)

Figure 5 : Les différents modèles structuraux des micelles (DE KRUIF *et al.*, 2012).

En conclusion, et vue la diversité des modèles proposés et les techniques utilisées pour appuyer les différentes hypothèses, il est impossible d'admettre de façon irrévocable ou de favoriser un modèle précis. Cependant, la plupart des travaux récents semblent être d'accord sur certaines données structurales et fonctionnelles. Il s'agit en particulier, de la localisation superficielle de la caséine k, de la composition de sous unité protéique de composition variable reliée par des interactions hydrophobes, électrostatiques et des liaisons calciques.

II. La coagulation du lait

II.1. Mécanismes de la coagulation

La coagulation du lait (figure 6) résulte d'un changement irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi solide appelé gel ou coagulum (CECCHINATO *et al.*, 2012). Il s'agit de l'étape la plus importante pour réussir un fromage, en effet, Les caractéristiques physico-chimiques du gel conditionnent l'aptitude à l'égouttage et les caractéristiques finales du fromage (HSIEH *et PAN*, 2012).

Les mécanismes de la formation du coagulum diffèrent totalement suivant que ces modifications sont induites par acidification ou par action d'enzymes coagulantes (LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998).

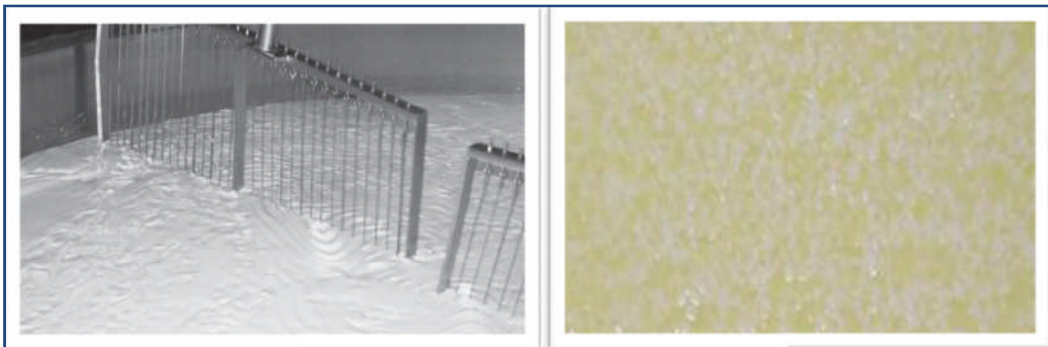


Figure 6 : Coagulation du lait en fromagerie.

II.1.1. La coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (à $pH_i=4,6$) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide (DALGLEISH *et CORREDIG*, 2012).

Elle est consécutive à l'abaissement du pH, qui a pour effet de réduire l'ionisation des caséines. Il en résulte une réduction de la charge des molécules protéiques avec solubilisation du phosphate de calcium micellaire conduisant à la précipitation des caséines à leur pH isoélectrique (FREDOT, 2005).

Lors d'une acidification du lait de pH 6,7 à un pH=5, la structure de la micelle de caséine change (figure 7), sa taille diminue et elle perd sa surface hétérogène, ce qui indique que cette structure est fortement sensible aux variations des constituants minéraux et à la

charge de la caséine (OUANEZAR *et al.*, 2012). En effet, à un pH=5,3 la micelle perd la majorité des ions de calcium, de phosphate et du magnésium (MARCHIN *et al.*, 2007) ; tout le phosphate inorganique sera perdu lorsqu'on atteint un pH=5,2 ; quant au ions de calcium ils seront complètement perdus à un pH= 4,6 (GAUCHERON *et al.*, 1997).

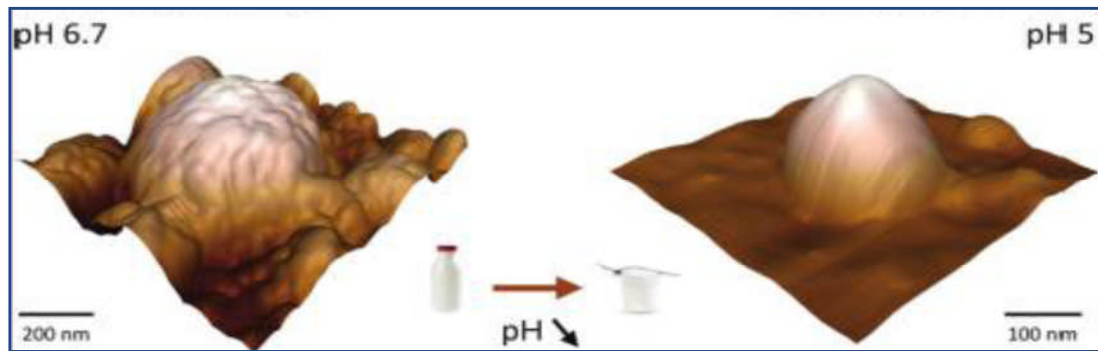


Figure 7 : Changement de la structure de micelle de caséine durant l'acidification (OUANEZAR *et al.*, 2012)

Le gel formé par une acidification acide (figure 8) est un gel qui présente une perméabilité satisfaisante mais une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. Les liaisons sont de faible énergie de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques (LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998 ; MAHAUT *et al.*, 2000).

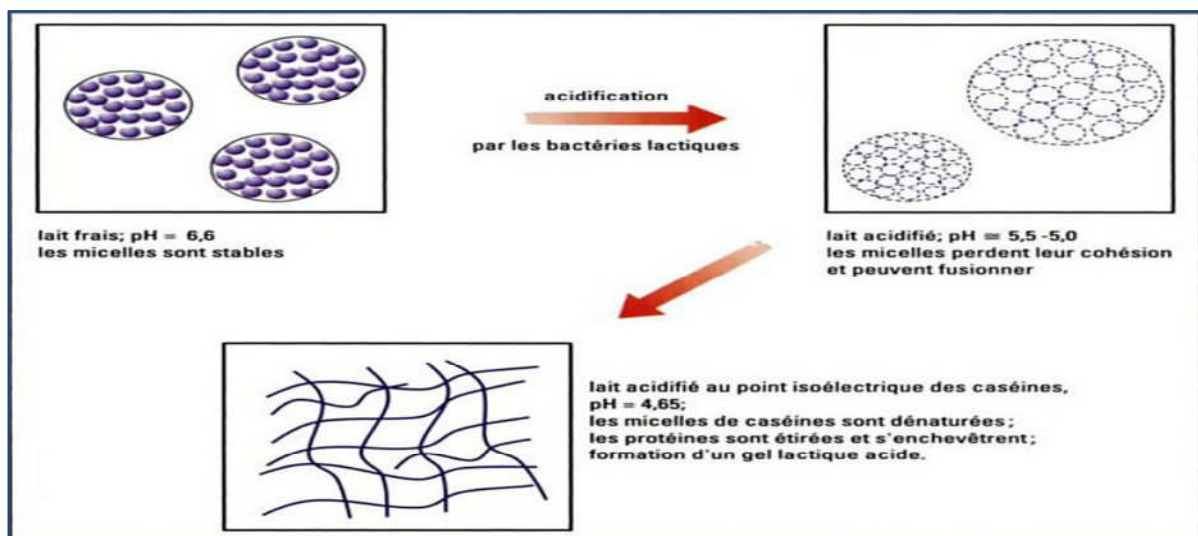


Figure 8 : Formation du gel lactique (VIGNOLA, 2002)

II.1.2. La coagulation enzymatique

Elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes protéolytiques (DALGLEISH *et* CORREDIG, 2012).

La coagulation enzymatique du lait peut se décomposer en trois étapes (ECK *et* GILLIS, 1997 ; MAHAUT *et al.*, 2000) :

✓ La phase primaire ou enzymatique déclenche la coagulation par hydrolyse de la caséine k au niveau de la liaison phénylalanine (105) et méthionine (106). Il y a libération du caséinomacropeptide (CMP 106-169) et diminution des répulsions électrostatiques qui, à l'état initial, contribuent à la stabilité du système colloïdal.

✓ La phase secondaire correspond à la coagulation proprement dite ; elle commence lorsque, à pH 6,6, 80 à 90% de la caséine k est hydrolysée. La chaîne peptidique de la caséine k est ainsi coupée en 2 segments de caractéristiques différentes. Le segment 1-105 ou para caséine k est hydrophobe, basique et reste intégré à la micelle, le segment 106-169 ou caséinomacropeptide est très hydrophile, acide et passe dans le lactosérum. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent alors entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel.

✓ La phase tertiaire, durant laquelle les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être de ponts disulfures entre les para caséines.

II.2. Les interactions impliquées dans la formation d'un gel

L'association des micelles de caséine lors de la coagulation nécessite un équilibre entre les interactions protéiques, entre protéine et solvant d'un côté, et entre les forces répulsives entre les chaînes polypeptidiques adjacentes de l'autre côté. La force, la flexibilité, la géométrie de la matrice et le comportement rhéologique du gel dépendent de la nature des interactions impliquées, du type de la coagulation (acide ou présure) ainsi que des conditions de la coagulation tels que le pH, la température et la force ionique (LUCEY *et* SINGH, 1998 ; LUCEY *et al.*, 2003 ; BOUGHELLEOUT, 2007 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010).

Lors de l'hydrolyse de la caséine k, l'élimination du glycomacropéptide réduit la charge de surface de la micelle d'un tiers et diminue par conséquent les répulsions électrostatiques inter-micellaires, ce qui facilite leur association. Les interactions ioniques sont également possibles entre les charges positives de la paracaséine k et les charges négatives des caséines α et β . Des ponts phosphocalciques peuvent également s'établir entre les micelles (ERNSTROM, 1983 ; MICKAEL ESKIN, 1990 ; DALGLEISH, 1997 ; CAYOT *et* LORIENT, 1998).

Les interactions électrostatiques dues aux groupements ionisables engendrent des forces attractives et contribuent à la stabilité de la structure secondaire ou tertiaire des micelles de caséine (BERNAHRDT, 1969). Les interactions électrostatiques impliquent des énergies comprises entre 42 et 84 kJ/mole, et sont détruites par des solutions salines et des pH faibles ou forts (CHEFTEL *et al.*, 1985).

Les liaisons hydrogènes s'établissent entre un atome électronégatif possédant au moins un doublet électronique et un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome électronégatif. Dans les protéines, les liaisons hydrogènes peuvent apparaître entre l'oxygène d'un groupement carbonyle d'une liaison peptidique et l'hydrogène du NH d'une autre liaison peptidique (C=O...H-N). L'énergie de ces liaisons est comprise entre 8 à 40kJ/mole. Ces liaisons jouent un rôle important dans la stabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines. Elles sont renforcées avec le froid et détruites par la chaleur, les détergents et l'urée (TANFORD, 1968 ; CHEFTEL *et al.*, 1985).

Les interactions hydrophobes sont des interactions impliquant les résidus d'acide aminé à chaîne latérale aliphatique ou aromatique qui auront tendance à s'associer dans des régions hydrophobes internes de la protéine. Elles ont une énergie comprise entre 4 et 12 kJ/mole et sont détruites par l'addition de détergent et de solvants organiques, et renforcées par la chaleur (TANFORD, 1968 ; CHEFTEL *et al.*, 1985).

La diminution du pH lors de la coagulation acide, réduit la barrière énergétique, les répulsions d'hydrogènes permettent la formation des interactions électrostatiques entre particules. Cette création de nouvelles interactions, peut faciliter d'avantage les liaisons intermoléculaires tels que les liaisons hydrophobes et hydrogène entre protéines voisines ou polypeptides de la matrice du gel. Dans les gels présure, les micelles de caséines sont liées par des interactions entre le calcium, les groupes carboxyliques et les phosphosérine (LUCEY *et SINGH*, 1998 ; LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998 ; LUCEY, 2002).

Selon LUCEY *et SINGH*, (1998), la matrice du gel est composée de particules de caséine reliées ensemble par des forces de natures diverses, les interactions impliquées dans la formation du gel et sa stabilité, et par conséquent ceux responsables de ses propriétés rhéologiques sont constituées spécialement de ponts calciques, de forces de Van Der Waals, d'interactions hydrophobes et des interactions électrostatiques. Les liaisons covalentes sont

importantes dans les gels acides cuits à température élevée tels que la *ricotta* et le *quarg*. Le tableau 3 montre les différents types d'interactions impliqués dans un gel acide et gel présure.

Tableau 3 : types d'interactions impliqués dans la formation et le maintien des gels acides et des gels présures (CAYOT *et* LORIENT, 1998).

Types d'interactions	Gel acide (pH= 4.6)	Gels présure (pH=6.65)
Interactions hydrophobes	+	++
Attractives via charges +/-	++	+
Phosphates de calcium micellaire	0	++
Calcium ionisé	+	++
Répulsives	+	++

Peu de littérature explique avec exactitude, la nature et le type d'interactions responsables de la formation et de la rhéologie des différents gels.

ROEFS *et* VAN VLIET, (1990), ont pu montrer l'importance des interactions électrostatiques, hydrophobes et des attractions de type Van Der Waals dans la formation d'un gel acide.

Les travaux de LEFEBVRE-CASES *et al.*, (1998) et KEIM *et* HINRICHS (2003) sur les interactions impliquées dans la formation et la stabilité des gels présure et acide, en utilisant des agents dissociant ont permis de conclure que les interactions hydrogènes sont impliquées dans la formation des deux types de gel, et que les interactions hydrophobes et les liaisons calciques sont principalement impliquées dans la formation et le maintien du gel présure.

II.3. Généralités sur les protéases coagulant le lait

Les protéases ou peptidases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Dans certains cas, les enzymes sont hautement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d'une protéine donnée. Dans d'autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou conformation déterminées. Les peptidases ont une ample distribution, pouvant être rencontrées chez tous les organismes vivants (CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007).

Les enzymes qui constituent le groupe des coagulases sont des protéases à acide aspartique (APs) (BARRET, 1998 ; CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007) ; leur utilisation

dans la fabrication des fromages est une des plus anciennes applications des enzymes dans la transformation des produits alimentaires, qui remonte à approximativement 6000 A.J. (FOX *et* MCSWEENEY, 2003).

Les APs sont très différentes des peptidases à sérine, à cystéine et à thréonine, dans la mesure où le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d'eau activée. Les résidus, impliqués dans le mécanisme catalytique, sont des acides aminés qui agissent comme des ligands. Les peptidases à aspartate sont ainsi dénommées car c'est les résidus d'acide aspartique qui sont les ligands de la molécule d'eau activée (BARRET, 1998).

De point de vue structurale, et comme les autres enzymes les APs sont synthétisées autant que préproenzymes (figure 9), après clivage du signal peptide, le proenzyme est sécrété et autocatalytiquement activé. En général, les enzymes activées se composent d'une chaîne simple de peptides d'environ 320-360 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire de 32-36 kDa. Dans la plupart des temps, elles ont une structure secondaire disposée dans une conformation à deux lobes (COOPER *et al.*, 1990; DAVIES, 1990; GILLILAND *et al.*, 1990; NEWMAN *et al.*, 1991; AGUILAR *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997). Les deux lobes sont homologues et ils sont développés par duplication de gènes (TANG, 2004). Le site catalytique est localisé entre les deux lobes et contient une paire de résidus d'aspartate, un dans chaque lobe, qui sont essentiels pour l'activité catalytique (JAMES, 2004).

II.3.1. La présure

La présure (mélange de chymosine et de pepsine) est une enzyme extraite à partir d'estomac des jeunes ruminants, elle est la plus anciennement utilisée en industrie fromagère (CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007). Il est bien connu que le principal agent coagulant le lait est la chymosine (figure 9), c'est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure (MAHAUT *et al.*, 2000) ; elle est une Aps gastrique qu'est responsable de la coagulation du lait présente chez les jeunes ruminants (FOX *et* MCSWEENEY, 2003). Chez les mammifères, la chymosine est sécrétée principalement dans le fœtus et l'estomac des nouveaux nés, et son taux diminue graduellement pendant la période postnatale jusqu'à ce qu'elle devienne absente chez l'adulte (FOLTMANN, 1992).

La première étape de la biosynthèse de la chymosine (323 acides aminés, 35.6 kDa) par les cellules de la muqueuse intestinale consiste à la synthèse du prochymosine (365 acides aminés et 40,8 kDa), L'activation de la proenzyme en chymosine se fait spontanément dans la

caillette aux pH inférieurs à 5,0 par hydrolyse de l'extrémité N-terminale du signal peptide (FOLTMANN, 1992).

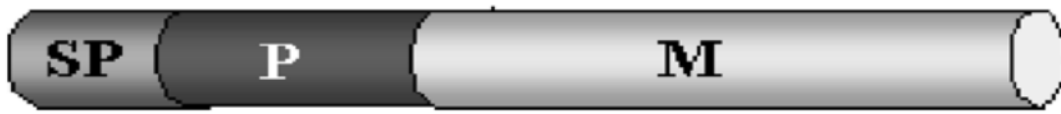


Figure 9 : Représentation schématique de la structure primaire d'une chymosine bovine, SP : signal peptide, P : prosegment, M : l'enzyme mature, (CLAVERIE et HERNANDEZ, 2007).

La présure est toujours considérée comme étant l'enzyme la plus adaptée pour coaguler le lait dans la production fromagère, cependant, son utilisation est confrontée à la contrainte de sacrifice des jeunes veaux (MOHANTY *et al.*, 1999). En conséquence l'industrie fromagère subit une crise dans l'approvisionnement de ce coagulant et cette situation a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure, elles concernent diverses sources potentielles de protéases (SARDINAS, 1968 ; ARIMA *et al.*, 1970 ; MARTIN *et al.*, 1980 ; ARECES *et al.*, 1992; HASHEM, 1999 ; CLAVERIE *et HERNANDEZ*, 2007 ; GERMONVILLE, 2012).

II.3.2. Etat de la recherche sur les succédanés de présure

Cette situation de pénurie prévaut depuis plus de 40 ans. Elle a été clairement définie et officiellement étudiée par la F.A.O. en Avril 1986 sous la forme d'une consultation sur la pénurie mondiale de présure dans la fabrication fromagère. Ce rapport a fait une large place à l'étude de substituts de présure (figure 10) d'origine animale (pepsine), microbienne, fongique et végétale (NOUANI *et al.*, 2009).

Les premiers travaux sont ceux effectués sur les succédanés d'origine animale ; en 1929, NORTHROP parvint à obtenir la pepsine sous forme cristallisée à partir d'extraits de muqueuse gastrique bovine quelques années plus tard, HERRIOT, en 1938, entreprit la même démarche sur la pepsine porcine (MOLL *et MOLL*, 1998). Les deux enzymes se sont révélées adéquates et sont, par conséquent, largement utilisées en fromagerie sous forme de mélange avec la présure (BANGA-MBOKO *et al.*, 2002). Les viscères de poissons sont connus pour être une source riche en protéase du lait (REECE, 1988) ; ainsi, Plusieurs pepsines de poissons, tels que : la sardine (NODA *et MURAKAMI*, 1981), le saumon de l'océan pacifique (PERES, 1981 ; HAARD, 1994), la morue d'Atlantique (BREWER *et al.*, 1984) et la morue polaire (ARUNCHALAM *et HAARD*, 1985) et le requin (NUNGARAY *et LEGOFFIC*,

1996) ont été purifiées et partiellement caractérisées. La pepsine extraite du proventricule du poulet est également considérée comme un bon substitut de présure et elle a été employé avec succès dans la fabrication de plusieurs type de fromages (GREEN, 1972 ; GORDIN *et* ROSENTHAL, 1978 ; FINDLAY *et al.*, 1984 ; BOUGHELLOUT, 2007 ; ADOUI, 2007 ; TEMIZ, 2009 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010).

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulant le lait à partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie, où plusieurs souches de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Irpex lacteus*, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* et *Escherichia coli* (OLSON 1995; CHANNE *et* SHEWALE,1998). Des études comparatives de ces enzymes coagulantes et de la présure ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait et plusieurs variétés de fromages préparées avec ces extraits sont semblables à ceux obtenus avec la présure traditionnelle (DESMAZEAUD *et* SPINLER, 1997 ; RAMET, 1997 ; GOURSAUD, 1999). Dans le souci d'améliorer les rendements de production et la réduction de l'activité protéolytique qui affecte la qualité des fromages, des études font toujours l'objet de travaux sur la recherche de nouvelles sources microbiennes (CAVALCANTI *et al.*, 2004; ALAM *et al.*, 2005 ; ESAWY *et al.*, 2006 ; CHWEN-JEN *et al.*, 2009).

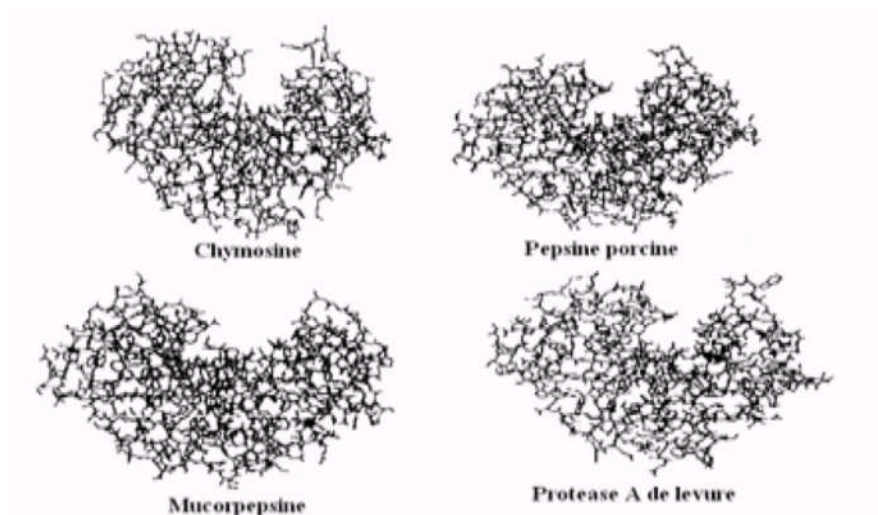


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de quelques aspartyl-protéases d'origine animale et fongique (PITTS *et al.*, 1992).

Parallèlement aux travaux menés sur les présures de remplacement d'origine animale et fongique, et depuis quelque temps, l'intérêt porté sur les enzymes de remplacement

d'origine végétale a permis de valoriser la recherche par des essais de fabrication à grande échelle de divers types de fromages locaux portant le label du terroir dans de nombreux pays du bassin méditerranéen et de l'Amérique du sud (LOPES *et al.*, 1998). Par ailleurs, des travaux récents menés sur des substrats de plantes ont été publiés montrant le nouvel intérêt que suscite les protéases d'origine végétale (LOW *et al.*, 2006 ; EGITO *et al.*, 2007; CHAZARRA *et al.*, 2007 ; TEJADA *et al.*, 2008 ; PEREIRA *et al.*, 2008; FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2008). En effet, les recherches ont été menées sur plusieurs espèces végétales, *Ananas comosus* (CATTANEO *et al.*, 1994), *Calotropis procera* (SANNI *et al.*, 1999), *Opuntia phylloclades*, *Cereus triangularis*, *Euphorbia caducifolia*, *Ficus bengalensis*, *F. elastica*, *E. hista*, *Ficus carica* (UMAR DAHOT *et al.*, 1990; ONER *et al.*, 1993), *Lactuca sativa* (LO PIERO *et al.*, 2002), *Cynara scolymus* (SIDRACH *et al.*, 2005) , *Cynara cardunculus* (SOUSA *et al.*, 2002), *Helianthus annuus* (PARK *et al.*, 2000), *Albizia lebbek* (EGITO *et al.*, 2007). Par conséquent ; Différentes préparations enzymatiques obtenues à partir de certains organes de ces végétaux sont capable de cailler le lait ; les plus connues sont : la ficine, la papaïne, la broméline et particulièrement la cardosine (MACEDO *et al.*, 1993). 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 et produisent des fromages amers (LO PIERO *et al.*, 2002). Une exception a cette règle générale est représentée par l'extrait aqueux des fleurs du cardon (VERISSIMO *et al.*, 1995). Cet extrait connu depuis une époque lointaine est utilisé pour la production des fromages de haute qualité dans de nombreux pays méditerranéens (MACEDO *et al.*, 1993).

Tableau 4 : Spécificités de quelques succédanés de présure d'origine végétale (ROSEIRO *et al.*, 2003).

Noms vulgaires	Noms spécifiques	Noms des enzymes
Cardon	<i>Cynara cardunculus</i>	
Chardon	<i>Cynara humilis L</i>	Cynarase, cardosines (A,B)
Artichaut	<i>Cynara scolymus</i>	
Figuiers	<i>Ficus glabrata</i>	
	<i>Ficus carica L</i>	Ficine
	<i>Ficus religiosa L</i>	
Papayer	<i>Carica papaya</i>	Papaïne

II.3.3. Cas de l'extrait des fleurs de cardon comme succédanés de présure

II.3.3.1. Etude botanique et milieu d'origine

Le cardon (*cardo* ou *wild thistle* en Anglais et *Khourchef* ou *Kernoun berri* en Arabe) est une plante connue sous une multitude de noms dont nous ne mentionnerons que ceux qui sont véritablement des synonymes et non pas ceux qui lui ont été faussement attribués. Les noms communs du cardon sont : artichaut sauvage, chardon de castille ou encore cardon de Tours qui en fait, n'est autre chose que la variété de cardon la plus connue. Le nom spécifique du cardon est *Cynara cardunculus* L. On peut aussi rencontrer le nom scientifique beaucoup moins fréquent de *Cynara silvestris*, (BONNIER, 1927 ; CHRISTEN *et VIRASORO*, 1935 ; GRISVARD *et CHAUDUN*, 1964 ; CAMPOS *et al.*, 1990).

Le cardon est de façon générale une plante spontanée typique du pourtour méditerranéen. On le trouve au niveau des plaines basses, montagnes pâturage champs incultes à terrains argileux, coteaux arides de : l'Afrique du nord, l'Espagne, Portugal, la France, la Corse, l'Italie, la Grèce, et la Turquie (JAHANDIER, 1931 ; COSTE ,1983 ; ROSEIRO *et al.*, 2003). Avec cela, le cardon se trouve en Amérique du sud ou les conquistadors espagnols l'ont probablement introduit d'une manière fortuite. En Argentine, il est tellement présent qu'il y'est considéré comme une plaie de l'agriculture (CHRISTEN *et VIRASORO* ,1935). Il a été aussi signalé au Chili ou il a suscité un grand intérêt qui a eu pour effet de créer un axe de recherche pour sa protéase (CAMPOS *et al.*, 1990).

❖ Systématique

Selon QUEZEL *et SANTA* (1963), on peut classier le cardon comme suit :

Groupe :	<i>Dicotylédones</i>
Sous-groupe :	<i>Claciflores</i>
Série :	<i>Claciflores Gamopétales</i>
Famille :	<i>Composées ou Astéracées</i>
Sous famille :	<i>Carduacées ou Cynarocéphales</i>
Tribu :	<i>Carduinées</i>
Genre :	<i>Cynara</i>
Espèce :	<i>Cynara cardunculus</i>

❖ Caractéristiques de la plante

Le cardon est une plante vivace, robuste, raide, dressée d'une taille de 80 à 150cm, (QUEZEL *et* SANTA, 1963 ; COSTE, 1983). Elle ne forme la première année qu'une rosette de feuilles stériles, (BAYER *et al.*, 1990). Elle diffère de l'artichaut par ses feuilles profondément divisées en lobes qui se terminent par des épines et par les bractées d'involucre finissant par une pointe dure et aigue (PERROT, 1944).

Selon QUEZEL *et* SANTA (1963) et BAYER *et al.*, (1990), les caractéristiques de la plante sont comme suit :

- Feuilles : Radicales en rosette, elles sont longues de 30 à 60cm. Elles sont blanches tomenteuses en dessous, aranéeuses en dessus, dentées, épineuses comportant des lobes triangulaires ou lancéolés.
- Hampes : Bien qu'un peu rameuses dans le haut, elles sont puissantes et ont une taille de 40 à 60cm.
- Involucre : Il est sphérique à feuilles très larges de forme ovoïde. Sessiles, il comporte généralement des pointes piquantes.
- Capitules : Gros, ils sont de 4-5cm de large. Ils sont isolés, terminaux, ovoïdes à écailles lancéolées. Leur base est étalée, charnue et termine en fortes épines (figure 11).
- Akènes : Non ailées, elles ont une couleur jaunâtre souvent maculée de brun.
- Fleurs : De couleur allant du bleu au violet, elles ont toutes la même forme. Elles sont androgynes tubulaires se terminant par 5 pointes.



Figure 11 : Inflorescence de *Cynara cardunculus* **A** : le capitule contenant un nombre indéfinie de fleurs ayant un réceptacle commun, **B** : la partie supérieure d'une fleur montrant le stylet (sy) et le stigma (st) dont des grains de pollen sont attachés (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1997).

II.3.3.2. Etude technologique

A. Caractéristiques du système enzymatique

L'enzyme qu'on rencontre dans le cardon a été appelée cynarase du nom scientifique du végétal *Cynara cardunculus* L. Ce nom a ensuite été remplacé par celui de cyproisine, avant que celui de cardosine ne soit utilisé (CORDEIRO *et al.*, 1994 ; VERISSIMO *et al.*, 1995 ; CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007). Cette enzyme appartient à la famille des aspartyl-protéases au même titre que la chymosine et la pepsine (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

En fait, au lieu de parler de l'enzyme, il serait plus juste de parler d'un système enzymatique (VIEIRA, 2001). En effet, d'après les multiples recherches effectuées sur la question, il s'est avéré que l'enzyme extraite du cardon est en réalité composée d'un mélange de deux enzymes : la cardosine A et la cardosine B (figure 12) (MACEDO *et al.*, 1993 ; SILVA *et* MALCATA, 1999 ; FRAZAO *et al.*, 1999 ; VIOQUE *et al.*, 2000).

La cardosine A est la plus abondante des cardosines, elle s'accumule dans les vacuoles et dans les cellules du tissu épidermique (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1997). Le précurseur de la cardosine A est constitué de 504 acides aminés, l'enzyme mature est formée de deux peptides de 31 et 15 kDa et elle a une faible activité protéolytique (ROSEIRIO *et al.*, 2003). La conversion vers la forme active de l'enzyme se fait probablement à l'intérieur des vacuoles (CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007). Contrairement à la cardosine A, la cardosine B est accumulée dans les parois cellulaires et dans la matrice extracellulaire des tissus, son précurseur contient 506 acides aminés quant à l'enzyme mature, elle est formée par deux polypeptides de 34 et 14 kDa (VIEIRA, 2001). Les deux cardosines montrent une activité coagulante maximale au pH 5,1 à une température qui s'est avérée beaucoup plus élevée que dans le cas des présures animales et qui se situerait aux environs de 65°C, (CHRISTEN *et* VIRASORO, 1935 ; BARBOSA *et al.*, 1981 ; HEIMGARTNER *et al.*, 1990). Après toutes les recherches menées, il s'est avéré que l'extrait enzymatique de cardon ressemble beaucoup plus à la présure qu'on ne le pensait : Comme la chymosine, la cardosine A serait la principale responsable de l'activité coagulante, et au même titre que la pepsine, la cardosine B aurait en majeure partie une activité protéolytique, (VERISSIMO *et al.*, 1996).

Dans un travail plus récent, SARMENTO *et al.*, (2009) ont pu caractériser à partir des fleurs de *Cynara cardunculus* quatre nouvelles cardosines E, F, G et H qui sont similaires aux cardosines A et B mais pas identiques.



Figure 12 : Cardosine A et B (VIEIRA *et al.*, 2001).

B. Composition de l'extrait enzymatique

❖ Composition chimique

Bien que la composition exacte de l'extrait enzymatique du cardon soit influencée par le climat, la nature du sol sur lequel pousse la plante, et par la saison durant laquelle elle est cueillie ; il reste qu'une composition moyenne pourrait être donnée, et qui se résume dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Composition physico-chimique moyenne de l'extrait des fleurs du cardon (ROSEIRO *et al.*, 2003).

Facteur	Valeur
pH	5,8
Matière sèche	95,0%
Protéines	26,0%
Glucides	42,5%
Chlorures	9,5 %
Tanins	4,5 %

❖ Composition microbiologique

Il est clair que la qualité microbiologique dépend avant tout de l'hygiène générale tout au long de la manipulation. Elle reste toutefois influencée dans une certaine mesure par le type d'extraction appliquée. Il serait intéressant de noter qu'il a été trouvé que la composition microbiologique de l'extrait de cardon contient des micro-organismes très utiles technologiquement, dont la présence peut conduire, et de manière favorable, le processus d'affinage (ROSEIRO *et al.*, 2003).

Tableau 6 : Composition microbiologique moyenne de l'extrait des fleurs du cardon
(ROSEIRO *et al.*, 2003).

Germes	Nombre
Germes totaux (UFC/g)	9,8.10 ⁴
Lactobacilles (UFC/g)	5,10.10 ⁴
Germes protéolytiques (UFC/g)	3.10 ³
Germes lyolytiques (UFC/g)	5.10 ⁴
Coliformes (UFC/0,1g)	Négatifs
Entérocoques (UFC/0,1g)	Négatifs
Staphylocoques (UFC/0,1g)	Négatifs
Clostridium (UFC/0,1g)	Négatifs
Germes fongiques (UFC/0,1g)	98

C. Localisation du système enzymatique dans le végétal

Très nombreux travaux ont été effectués sur la protéase du cardon. Les premiers sont ceux de CHRISTEN et VIRASORO en 1935. Déjà à cette époque ces deux auteurs affirmaient que l'enzyme se trouve exclusivement dans les fleurs. Bien que les fleurs de cardon ont été la partie du végétal utilisée pour la fabrication fromagère depuis une époque très lointaine (HEIMGARTNER *et al.*, 1990), il a été prouvé que les cardosines sont des enzymes organo-spécifiques, ce qui veut dire qu'elles sont spécifiques aux fleurs. Plus que cela, on a découvert que ces cardosines se trouvent à concentration élevée dans la partie violette des corolles, et plus les fleurs sont matures, plus la partie violette de leur corolle est grande donc leur concentration en enzyme est élevée (TSOULI, 1974). Ceci dit, la concentration maximale est celle se trouvant au niveau des stylés et de manière exacte, dans les cellules épidermiques des stylés. Cependant, aucune protéase n'a pu être détectée dans les feuilles aussi bien que dans les graines (CORDEIRO *et al.*, 1994 ; ROSEIRO *et al.*, 2003).

II.3.3.3. utilisation de l'extrait des fleurs de cardon dans la fabrication des fromages en Algérie

Dans les hauts plateaux, et plus exactement dans les petits villages qui entourent la région des *Aures*, on avait l'habitude de fabriquer un des fromages les plus communs du pays le *Djben* à base de lait de brebis. En été, la fabrication de ce fromage se fait en utilisant un extrait des fleurs de cardon. Ces fleurs cueillies des capitules de cardon, sont utilisées

directement sans être préalablement séchées ; Une touffe de fleurs est prise et mise dans un peu de laine lavée ; Cette touffe est bien écrasée durant quelques minutes à l'intérieur de la laine, pour faire sortir l'extrait enzymatique des fleurs ; Le tout est bien essoré au-dessus d'une quantité de lait (1 à 5 litres) et ceci jusqu'à l'obtention de quelques gouttes d'un liquide jaunâtre qui seront ajoutées au lait. Le lait est bien mélangé et mis au soleil durant environ 30 min. Le caillé obtenu est débarrassé de son sérum par un égouttage assez poussé à l'aide d'une toile ; Le *Djben* obtenu peut être consommé directement ou après salage (MENNANE *et al.*, 2007 ; NOUANI *et al.*, 2009 ; AQUILANTI *et al.*, 2011).

III. La fabrication des fromages

III.1. Principes généraux de la technologie fromagère

Le fromage correspond à une véritable conserve alimentaire, obtenue grâce à l'élimination plus au moins poussée de l'eau du lait et de la récupération des matières sèches (Brûlé *et al.* 1997). Selon JEANTET *et al.* (2008), la transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales :

- La coagulation du lait qui correspond à des modifications physicochimiques des micelles de caséines sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) de l'acide lactique, entraînant la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel ;
- L'égouttage du caillé qui assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum ;
- L'affinage qui se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, essentiellement sous l'action d'enzymes microbiennes.

Dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau.

Selon les paramètres mis en œuvre au niveau des différentes étapes de transformation du lait en fromage, une grande variété de produits peut être obtenue tel que traduit par LENOIR *et al.* (1985) dans la figure 13.

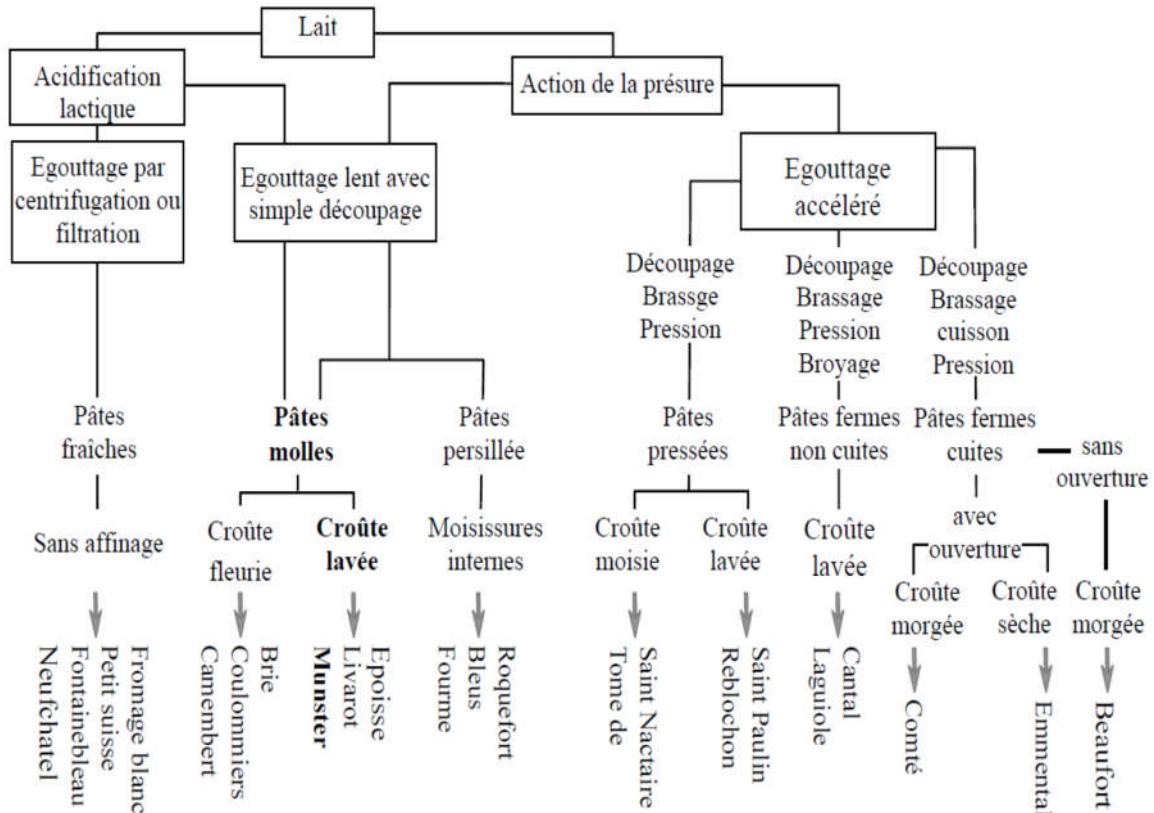


Figure 13 : La diversité des fabrications fromagère (LENOIR *et al.*, 1985).

III.2. La technologie des fromages à pâte molle

III.2.1. Définition des fromages à pâte molle

Les fromages à pâte molle sont des fromages affinés ou non, dont la pâte n'est ni cuite ni pressée (VIGNOLA, 2002). Selon FREDO (2005), on distingue deux types de fromages à pâte molle :

- Les fromages pâte molle à croûte fleurie : Ces fromages sont élaborés à partir de lait de vache ou de chèvre, cru ou pasteurisé. Le caillage est mixte, l'égouttage spontané. L'ensemencement se fait avec du *Penicillium* qui donnera à la croûte son aspect de duvet blanc feutré appelé « fleur ». *Exemple* : le Brie, le Camembert et le Coulommiers.
- Les fromages pâte molle à croûte lavée : Ils sont fabriqués avec du lait cru ou pasteurisé et sont volumineux. Le caillage est mixte et l'égouttage spontané. La lenteur de l'affinage nécessite un lavage de la croûte afin qu'elle reste souple d'où leur appellation de croûte lavée. Ce lavage s'effectue à l'eau salée qui favorise le développement de certaines bactéries protéolytiques donnant à ces fromages leur goût et leur odeur caractéristique. La croûte devient alors jaune-orangée. *Exemple* : le Maroilles le Munster et le Livarot.

III.2.2. Procédé de fabrication des fromages type pâte molle

Selon JEANTET *et al.* (2008) (figure 14), les fromages à pâte molle sont le plus souvent élaborés à partir de lait de vache, les laits sont triés en éliminant ceux impropres à la transformation fromagère (laits plus ou moins acides ayant une charge microbienne importante), puis ils vont subir certains traitements technologiques (l'homogénéisation, standardisation et traitement thermique) qui ont pour objectifs de permettre l'obtention d'un fromage de qualité appréciable et ce avec un bon rendement de fabrication.

La seconde étape est la coagulation, dans ce type de fromage, elle est mixte : elle est obtenue par l'action conjuguée de la voie acide (acidification lactique ou pré-maturation par des ferments lactique mésophiles) et de la voie enzymatique (présure) ou ses succédanés.

Après la coagulation, les opérations d'égouttage commencent par le décaillage, qui consiste à trancher le cailler pour permettre au lactosérum de se séparer du coagulum, environ 10 minutes plus tard, on procède au brassage pour éviter l'agglomération et la sédimentation des grains de caillé.

Le moulage est réalisé après soutirage de 20 à 30 % du lactosérum, pour répartir un mélange homogène caillé/lactosérum à l'intérieur des moules. Il permet de poursuivre l'égouttage et donc l'élimination du sérum, ainsi pour donner une forme précise aux fromages.

Après généralement 24 heures de moulage, les pièces de fromages sont démoulées et salées, deux méthodes de salage sont couramment utilisées : la première est le salage en masse, qui consiste à saupoudrer ou à frotter régulièrement chacune des surfaces de fromage avec du sel ; la deuxième est le salage en saumure réalisée en plongeant les fromages dans un bac de saumure, pendant un temps qui varie suivant la taille des pièces, la concentration en sel et la température de la saumure.

La dernière étape de fabrication des fromages à pâte molle est l'affinage, c'est une étape très importante, elle correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé égoutté, sous l'action d'enzymes, pour la plupart sécrétées par la flore microbienne présente, plusieurs types de dégradations s'effectuent simultanément ou successivement dans la pâte fromagère à savoir : la fermentation du lactose, l'hydrolyse des protéines et la

dégradation de matière grasse, ce qui engendre des modifications dans la pâte et donne au fromage sa saveur, son arôme et sa texture caractéristique.

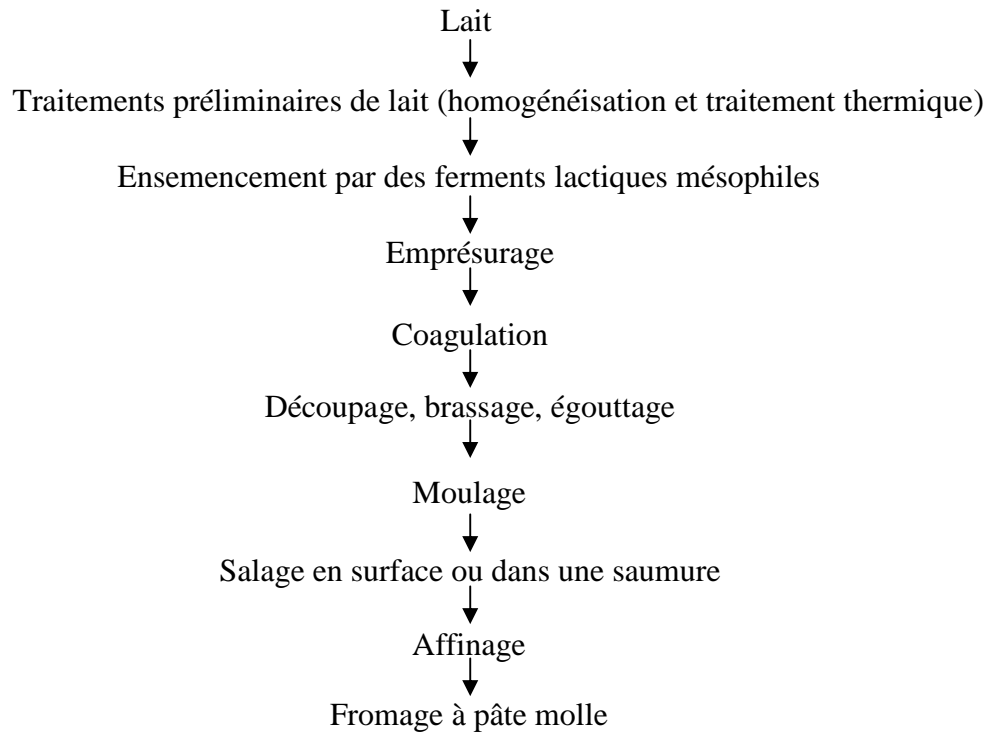


Figure 14 : Processus de fabrication des fromages à pâte molle (JEANTET *et al.*, 2008).

Deuxième partie :
Partie expérimentale

Chapitre I :
Matériel et Méthodes

I.1. Matière première utilisée

I.1.1. Le lait

Le lait employé est du lait écrémé en poudre, de qualité moyen chauffage (SOLAREC S.A. ; Belgique).

Il est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M (BERRIDGE, 1955).

Le lait écrémé ainsi reconstitué est appelé substrat de BERRIDGE. Le lait sera stocké à 4°C pendant 12 h avant utilisation afin de permettre l'équilibre physico-chimique.

La poudre du lait utilisée provienne du même lot, et conservée à température ambiante et à l'abri de lumière et d'humidité.

I.1.2. La présure

La présure utilisée est une présure en poudre commerciale (Rhodia food, Marshall TM, France) de force 1/100.000 à 520 mg de chymosine /1 g de poudre de présure.

La poudre de présure est conservée à 4°C. A partir de cette poudre, nous avons préparé une solution mère par reconstitution de 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C durant 3 jours maximum.

Lors de chaque utilisation nous avons procédé à des dilutions dans de l'eau distillée à partir de la solution mère d'une façon à avoir un temps de floculation à 30°C compris entre 12 et 15 min.

I.1.3. La pepsine de poulet

I.1.3.1. Préparation des proventricules

Après abattage, les proventricules sont récupérés du tube digestif de poulets. Ces proventricules sont rincés à l'eau courante et égouttés, ils sont répartis, dans du papier aluminium, en lots de 100 g et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

I.1.3.2. Extraction de la pepsine

La pepsine est extraite à partir de proventricules de poulets selon la méthode de BOHAK, (1969). Le protocole d'extraction est résumé en figure 15.

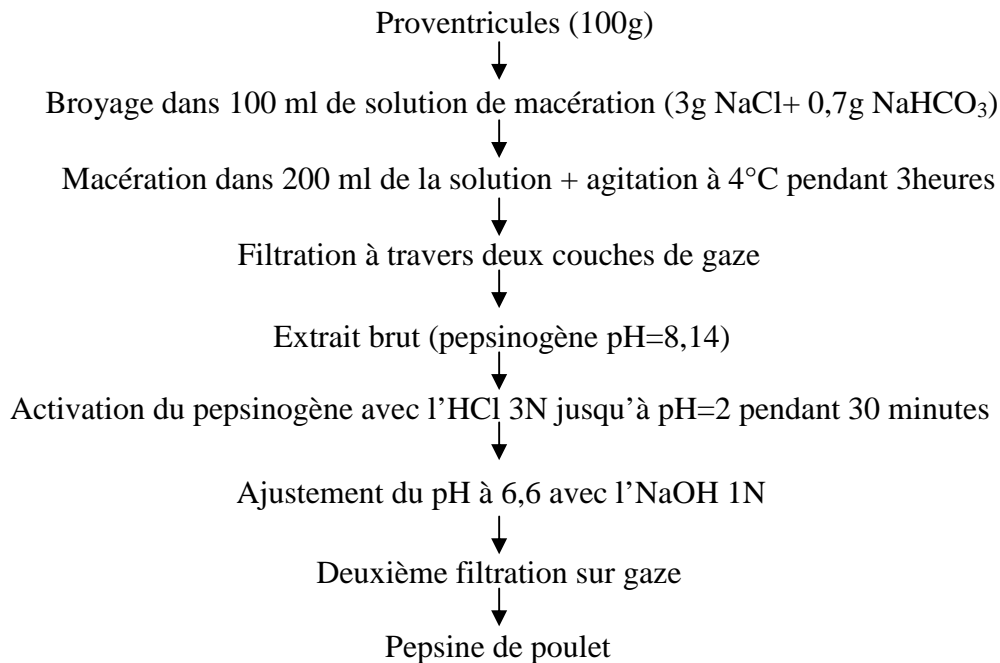


Figure 15 : Protocole d'extraction de la pepsine de poulet (BOHAK, 1969)

I.1.4. La fleur de cardon

I.1.4.1. Récolte des fleurs de cardon

Afin d'obtenir une activité coagulante optimum et un meilleur rendement d'extraction, les fleurs du cardon doivent être récupérées à un stade avancé de floraison (violet foncé), à partir de capitules frais et bien développés (TSOULI, 1974 ; ROSEIRO *et al.*, 2003). Les capitules (figure 16-1) de *Cynara cardunculus* ont été récoltées en fin du mois de juin dans un champ à Biziou, un village situé pas loin de la région d'Akbou, agglomération du nord d'Algérie.

I.1.4.2. Conservation des fleurs

Traditionnellement, les fleurs sont conservées dans une toile par un séchage à température ambiante et à l'abri des rayons solaires, dans un endroit bien aéré durant 10-20 jours (ROSEIRO *et al.*, 2003 ; AQUILANTI *et al.*, 2011). Cependant, MARTINS *et al.*, (1996), ont montré que cette méthode cause beaucoup de pertes sur les caractéristiques de l'extrait coagulant. ils ont précisé que la lyophilisation est la méthode qui conserve le mieux ces caractéristiques. La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit.

Elle autorise une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit (RENE *et al.*, 1993). Son principe repose en pratique sur deux opérations : la congélation et la déshydratation. La congélation est considérée comme une étape préalable à l'opération de déshydratation, cette dernière recouvre deux principes physiques : la sublimation de la glace et la désorption finale de la quantité d'eau résiduelle, non congelée (GENIN *et al.*, 1996).

Les fleurs, enlevées de leurs capitules (figure 16-2), ont été préalablement congelées à une température de -20°C , puis lyophilisées à une pression de 0,07 bar et à une température de -55°C pendant 10-14 heures. Les fleurs ainsi lyophilisées (figure 16-3) sont mises dans des sacs étanches à la vapeur d'eau et conservé dans un endroit à l'abri de la lumière et de l'humidité.

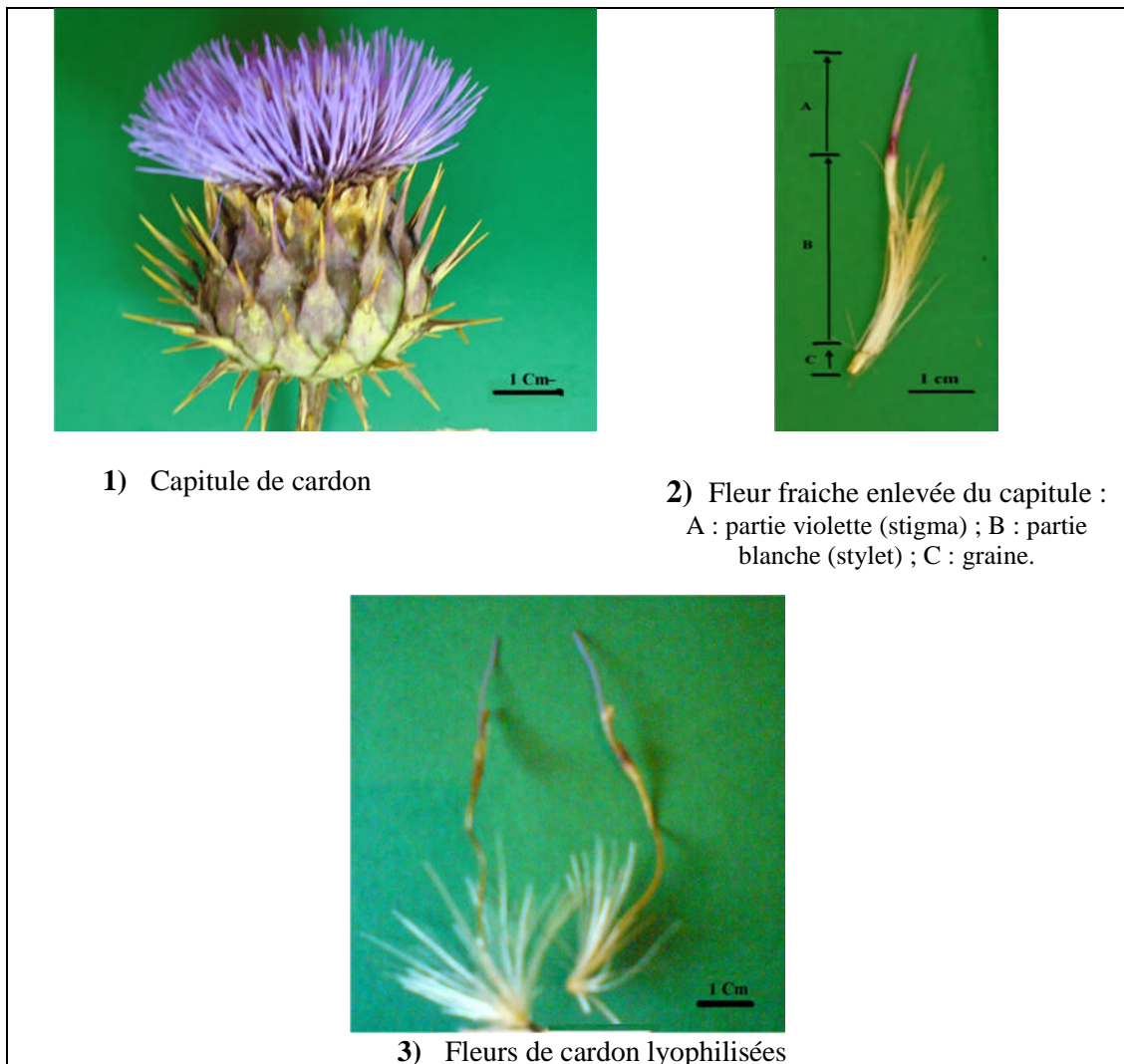


Figure 16 : Capitule et fleurs de cardon utilisés.

I.1.4.3. Extraction du système enzymatique des fleurs de cardon

Pour extraire le système enzymatique des fleurs sèches de cardon, plusieurs types d'extractions ont été appliqués et de nombreux protocoles ont été décrit ; il peut s'agir d'une extraction aqueuse par macération des fleurs soit dans de l'eau (FERNANDEZ *et al.*, 2008 ; AQUILANTI *et al.*, 2011), dans une solution saline (TSOULI, 1974 ; MARTINS *et al.*, 1996) ou dans une solution tampon (SOUSA *et MALACATA*, 2002 ; LAMAS *et al.*, 2001). Aussi, d'une extraction alcoolique par macération dans de l'éthanol (CHRISTEN *et VIRASORO*, 1935 ; TSOULI, 1974). Ou encore, d'une extraction à l'azote liquide (VERISSIMO *et al.*, 1996).

Le protocole utilisé dans ce travail (figure 17) est celui décrit par TSOULI, 1974 et optimisé par NOUANI *et al.*, (2009) : broyage et macération pendant 24h à l'obscurité de 10g de fleurs sèches dans 100ml du tampon d'acétate de sodium (0,1M à pH 5) additionné de 0,2% d'acide borique afin d'éviter ultérieurement toute prolifération de microorganismes, et dans le but d'extraire le maximum de matière enzymatique le tous est congelé à -20°C pendant 6h puis décongelé à température ambiante sous une agitation douce pendant 1h, le liquide est ensuite centrifugé à 11000g pendant 10 minutes, le surnageant est ensuite filtré et l'extrait brut des fleurs de cardon est obtenu.

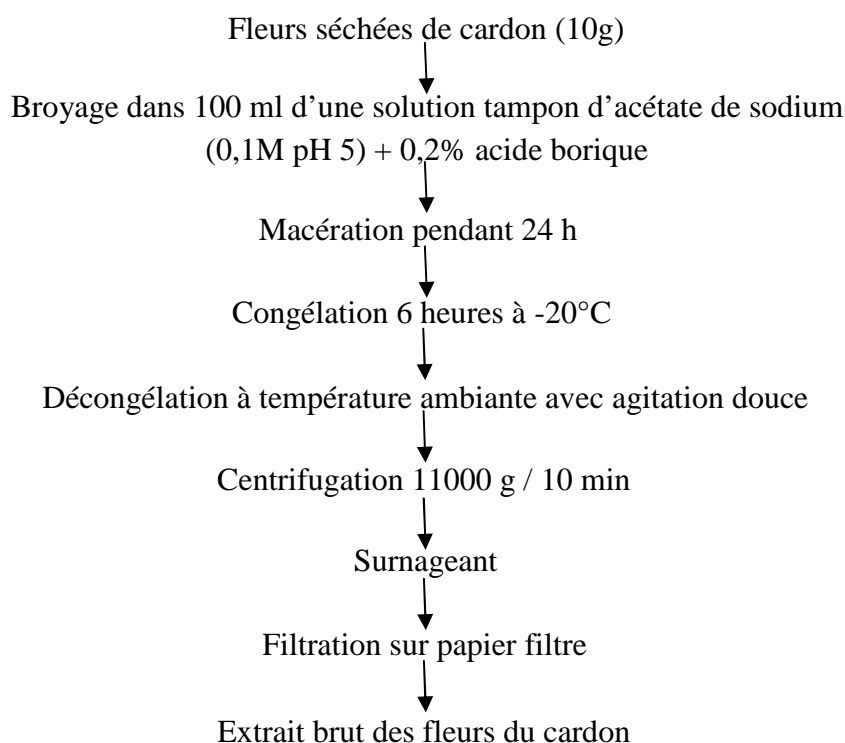


Figure 17 : Obtention de l'extrait brut des fleurs du cardon (NOUANI *et al.*, 2009).

I.2. Caractérisation du lait utilisé

Dans le but de caractériser le lait utilisé dans notre travail, quelques analyses physico-chimiques ont été faites :

I.2.1. Mesure du pH

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre selon la méthode AFNOR, (1986)

I.2.2. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité est mesurée par dosage de l'acide lactique à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N. La phénolphthaléine indique la limite de neutralisation par changement de couleur. L'acidité du lait est exprimée en degré Dornic (°D) où : 1°D représente 0,1 g d'acide lactique dans un litre de lait (AFNOR, 1986).

I.2.3. Détermination de l'extrait sec total

La matière sèche correspond au poids du résidu restant après dessiccation de l'échantillon (1 g pour la poudre du lait écrémé et 1 ml le lait reconstitué) à 105°C dans un humidimètre.

I.4. Caractérisation de l'extrait des fleurs de cardon

I.4.1. Taux de protéines totales

Le dosage des protéines totales se fait par la méthode décrite par LOWRY *et al.*, (1951) (BAROS *et* MALACATA, 2006).

La méthode de Lowry est une technique basée sur deux étapes, premièrement, la réaction de Biuret qui consiste à la réduction du cuivre (Cu^{2+} au Cu^+) par les protéines dans une solution alcaline, suivie par une réaction au réactif de Folin- Ciocalteu Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate réagit avec la tyrosine le tryptophane et dans une moindre mesure avec la cystéine et l'histidine, pour donner une coloration bleue. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750 nm (NOBLE *et* BALEY, 2009).

Pour déterminer la quantité des protéines totales contenues dans l'extrait enzymatique et pour mesurer son activité protéolytique, des solutions de bovine sérum albumine (BSA), de

caséine et de tyrosine de concentration variant entre 0 et 100 µg/ml sont utilisées pour tracer les courbes d'étalonnage (figure 18).

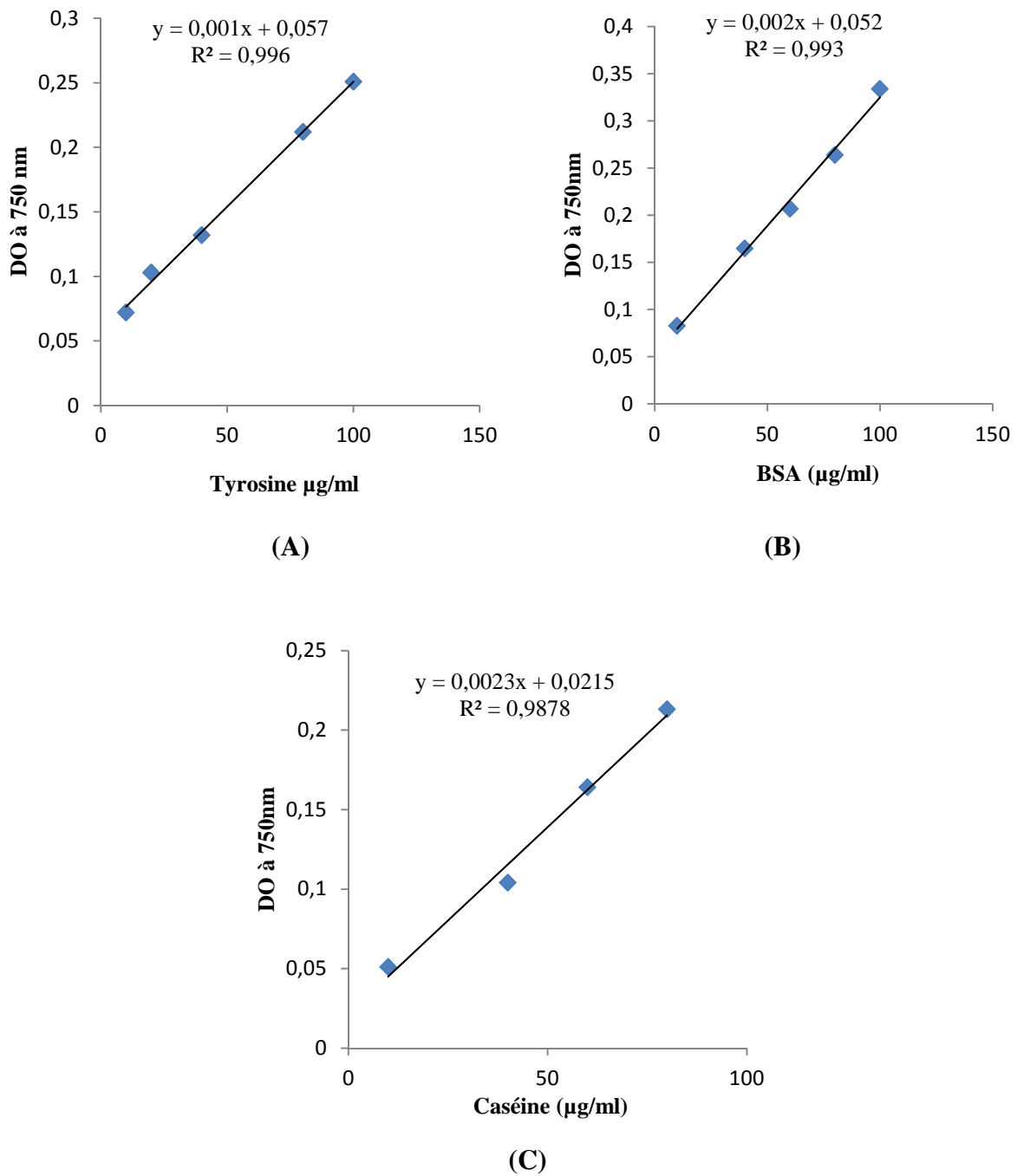


Figure 18 : Courbes d'étalonnage : (A) : à la tyrosine ; (B) : à la BSA ; (C) : à la caséine

I.4.2. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante d'un extrait enzymatique est exprimée soit par l'unité d'activité coagulante (U.A.C.) nommée aussi unité présure (U.P.) selon la méthode de BERRIDGE (MARTINS *et al.*, 1996 ; LIBOUGA *et al.*, 2006), ou par la notion de force coagulante définie par SOXHLET (TSOULI, 1974 ; NOUANI *et al.*, 2009). Les deux méthodes se basent sur la mesure du temps de floculation, qui consiste à l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu (ALAIS, 1984).

L'unité d'activité coagulante (U.A.C.) ou "unité présure" (U.P.) est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat de BERRIDGE en 100 sec à 30 °C (RAMET, 1997).

Elle est calculée par la formule : $U.A.C. = \frac{100}{V \cdot T}$

Où : V : Volume du lait en ml ;

V' : Volume de la solution enzymatique en ml ;

T : Temps de floculation en secondes ;

100 : 100 secondes ;

La force coagulante représente le volume du lait coagulable par unité de volume d'une enzyme ou d'un extrait enzymatique, en 40 minutes, à 35°C et pH égale à 6,4 (TSOULI, 1974 ; ALAIS, 1984).

Elle est exprimée selon la formule : $F = \frac{2400}{V \cdot T}$

Avec : F : force de l'enzyme ;

V : volume du lait ;

V' : volume de la solution enzymatique ;

T : temps de floculation en secondes ;

2400 : 40 minutes.

Le temps de floculation est mesuré à l'aide d'un chronomètre qui est déclenché lors de l'ajout de 1 ml de la solution enzymatique à 10 ml du substrat de BERRIDGE contenus dans un tube à essai et maintenue au bain Marie à 30°C (pour calculer les U.P.) ou à 35°C (pour déterminer la force coagulante), Le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons.

I.4.3. L'activité spécifique

Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité coagulante et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique et exprimée en U.P/mg :

$$\text{Activité spécifique} = \text{activité coagulante (U.P.)} / \text{teneur en protéines (mg)}.$$

I.4.4. Etude de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée en mesurant les unités aspartyl-protéases selon la méthode décrite par GREEN *et* STACKPOOLE (1975) citée dans MOUZALI (2001) Utilisant la caséine du lait comme substrat. Son principe consiste à mesurer l'accroissement des produits d'hydrolyse obtenus par action enzymatique sur la caséine solubilisée dans l'acide trichloracétique (T.C.A.) à 12% concentration finale.

Dans notre étude, l'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséine) pendant la réaction d'hydrolyse est réalisée par le dosage de la tyrosine soluble dans le T.C.A. à 12% selon la méthode de LOWRY *et al.*, (1951). Le mélange réactionnel est constitué de 2 ml de la solution de caséine 1% (1g de caséine dans 100 ml du tampon acétate de sodium, pH=5,2) à laquelle est ajouté 1 ml de d'extrait enzymatique. Le mélange est incubé à 35°C pendant 1 heure, la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 ml de T.C.A. à 12%, après un temps de repos de 15 min les produits d'hydrolyse sont séparés par une centrifugation à 6200g pendant 10 min. Finalement, La tyrosine contenue dans le est dosée par la méthode de LOWRY *et al.*, (1951).

Les résultats s'expriment en termes de μg de tyrosine libérés par ml d'extrait enzymatique et par heure d'hydrolyse. Par référence à une courbe étalon établie à partir de concentration croissante en tyrosine variant de 10-100 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 18).

L'activité protéolytique de l'extrait de la fleur est comparée à celle de la présure, prise comme témoin.

1.4.5. Détermination du profil électrophorétique

La séparation des différentes fractions protéiques contenues dans l'extrait des fleurs du cardon est réalisée par électrophorèse en milieu dénaturant en présence de SDS ; Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) selon la méthode décrite par LAEMMLI, (1970).

C'est une technique de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide sous conditions dénaturantes selon leurs poids moléculaire. Ce gel est un réseau avec mailles de tailles variables en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide dont il est constitué. Il se comporte comme un tamis moléculaire. Le SDS, en solubilisant les protéines et en leur conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction du poids des protéines et de la taille des mailles du gel (GARFIN, 2003 ; VOET *et* VOET, 2005).

1.4.5.1. Préparation des échantillons

Dans le but de localiser les protéines responsables de l'activité coagulante et pour connaître leur distribution au niveau des deux parties (violette et blanche) de la fleur, trois extraits sont préparés en utilisant : la partie violette de la fleur, la partie blanche de la fleur et fleur complète (partie violette + partie blanche).

De chaque extrait, 40 à 60 µl sont prélevés avec ajout de 10 à 15 µl de tampon dénaturant. Il se compose de 312,5 mM de Tris/HCl, 0,4 mM de EDTA, 7,5 % de SDS, 25 % de glycérol, 150 mM de DTT et bleu de bromophénol à 0,05 %, le tout est ajusté à pH 6,8. Les échantillons sont ensuite chauffés dans un bain mari à une température de 90°C pendant 5 minutes afin de pousser la dénaturation, puis ils sont conservés à - 20°C jusqu'à utilisation.

1.4.5.2. Dépôts des échantillons

Les échantillons sont déposés dans des puits formés dans le gel après polymérisation. Pour pouvoir déterminer les poids moléculaires des protéines contenues dans les différents échantillons, une solution contenant des marqueurs de masses moléculaires est déposée dans le premier puits. Le gel est ensuite placé dans une cuve d'électrophorèse remplie avec le tampon de migration qui se compose de : Tris, 25 mM, glycine, 192 mM, SDS, 0,1 %. le tampon est ajusté à pH 8,3. La migration se produit sous une tension de 90 volts pendant 15 à 20 min. Ensuite elle se poursuit à 140 volts pendant 2 à 3 heures.

1.4.5.3. Révélation des protéines

Après migration, les protéines sont fixées dans une solution dite de fixation (éthanol 30 %, acide acétique 5 % concentration finale). Le gel est ensuite coloré à l'aide d'une solution contenant 40% de l'éthanol, 10 % d'acide acétique et 2,9 mM du bleu de Coomassie

R 250. La coloration est réalisée pendant en moins 20 minutes sous agitation. Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs et sous agitation dans la solution de décoloration, qui est la même solution qui a servi à la fixation. La décoloration se poursuit jusqu'à bonne lisibilité des bandes protéiques.

I.5. Détermination des conditions optimales de coagulation

Pour mieux caractériser l'extrait des fleurs du cardon, nous avons essayé de déterminer les conditions optimales de l'activité coagulante, en faisant varier les paramètres suivants : le pH, la température et la concentration en CaCl_2 du lait. L'activité coagulante est exprimée en U.P. et mesurée selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante où tous les paramètres sont fixés sauf celui à étudier.

Tableau 7 : Les valeurs des différents paramètres à faire varier.

Paramètre	Valeurs					
pH	5	5,5	6	6,5	7	-
Température (°C)	20	30	40	50	60	70
CaCl_2 (M)	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	-

I.6. Etude des interactions impliquées dans le gel cardosine

La méthode utilisée est celle proposée par LEFEBVRE-CASES *et al.*, (1998) ; BOUGHELLOT, (2007) et BENYAHIA-KRID *et al.*, (2010). Le principe est basé sur la destruction des interactions impliquées dans la formation et le maintien des structures des gels présure ou pepsine par des agents dissociant : Sodium dodecyl sulfate (SDS), urée, et acide éthyle diamine tétra acétique (EDTA).

L'urée établit des liaisons hydrogènes fortes avec les liaisons peptidiques et dénature la protéine en rompant les liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les détergents ioniques tels que le SDS sont incapables de détruire les liaisons hydrogènes des peptides qui stabilisent la structure secondaire des protéines. Cependant le SDS réagit avec les groupes chargés des chaînes latérales des protéines provoquant des répulsions électrostatiques intramoléculaires conduisant à une destruction compétitive des interactions hydrophobes. L'EDTA est utilisé comme agent chélateur du calcium et permet de situer l'importance des liaisons calciques.

Le lait destiné à l'approche des interactions est maintenu à 30°C pendant 2 heures pour qu'un équilibre s'établisse, puis, un volume de présure ou d'extrait des fleurs de cardon est additionné.

Après un temps de floculation de 15 min, suivie de 15 min supplémentaires, le gel formé est dilué avec la solution dissociant à raison de 1/5 (V/V) (4 ml de gel dans 16 ml de l'agent dissociant). Pour l'échantillon témoin, le gel est dilué dans de l'eau distillée. L'échantillon est ensuite homogénéisé rapidement à l'aide d'un Polytron pendant 30 secondes à 20000 t/min. ensuite une centrifugation des dispersions de gel obtenues à 32000g pendant 90 min. Les concentrations des agents dissociant utilisées sont regroupées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Concentration des différents agents dissociant

Agent dissociant	Concentrations						
SDS (g/l)	0	2	4	6	8	10	-
L'urée (M)	0	1	2	3	4	5	6
EDTA (mM)	0	2	4	6	-	-	-

Le surnageant est délicatement récupéré et stocké à 4 °C jusqu'à analyse. L'estimation des protéines libérées dans le surnageant est déterminée par dosage selon la méthode de LOWRY, 1951. Pour chaque type d'agent nous avons procédé à trois répétitions. Les résultats seront exprimés en moyenne \pm écart type. Le niveau de signification des différences de l'effet de chaque agent dissociant par type de gel sera étudié par une analyse de la variance, ANOVA au seuil de 5%.

I.7. Application fromagère

Afin d'étudier la possibilité d'employer l'extrait coagulant des fleurs de cardon dans l'industrie fromagère, nous avons réalisé à l'échelle industrielle, dans deux fromageries différentes, des essais de fabrication de deux types de fromages à pâte molle, le Brie et le Camembert.

I.7.1. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type Brie

Le but de cette partie du travail est d'étudier l'influence de notre extrait sur la qualité physico-chimique, bactériologique et sur les propriétés sensorielles du fromage à pâte molle type Brie.

Cet essai a été réalisé au sein de la fromagerie « LE FERMIER » (située au centre-ville de Tizi-Ouzou) selon le diagramme technologique adopté par cette unité. Les essais sont menés à l'échelle pilote sur un volume d'environ 50 litres de lait cru de vache. Les fromages expérimentaux sont comparés aux échantillons témoins préparés dans les mêmes conditions avec l'agent coagulant utilisé par l'unité.

I.7.1.1. Le lait utilisé

Le lait utilisé pour les fabrications provenait du centre de collecte de « FREHA » une localité sise à environ 40 Km de la laiterie, le temps que passe le lait de la traite jusqu'à son arrivée à l'unité est d'environ 17 heures et pendant tout ce temps le lait est stocké et transporté à 4°C. Avant la fabrication, des analyses physico-chimiques ont été faites (annexe n°1), afin de caractériser le lait, il s'agit de :

- ✓ La mesure du pH (AFNOR, 1986) ;
- ✓ La détermination de l'acidité titrable (AFNOR, 1986) ;
- ✓ La détermination du taux de matière grasse (MG) par la méthode de GERBER
- ✓ La détermination de l'extrait sec totale

I.7.1.2. La technologie de fabrication

Une fois arrivé à l'unité, Le lait de la collecte est préalablement pasteurisé à 80°C pendant 10 secondes, il est maintenu à une température voisine de 30°C, enrichi par une quantité de CaCl₂ afin de favoriser la coagulation, puisensemencé par une suspension congelée de ferments lactiques mésophiles pendant 30 minutes. Le lait est ainsi réparti dans

des bassines pour l'emprésurage (50 litres de lait pour chaque bassine). Un volume de l'extrait des fleurs de cardon est ajouté dans l'une des bassines. Tel que le temps de coagulation soit voisin des autres bassines (environ 15 minute).

Ensuite, la fabrication était conduite de la même façon pour toutes les bassines, selon une technique qui comportait un découpage grossier du caillé rapidement suivi d'un égouttage et d'un moulage à l'aide d'un multi-moule pendant 24 heures.

Après démoulage, les fromages sont salés dans une saumure (concentration finale en sel est de $1,115\text{g}/\text{Cm}^3$), puis affinés pendant 10 jours dans un hâloir à 12°C et à une humidité d'environ 85%, les échantillons sont ensuite stockés à 4°C jusqu'à analyse (figure 19).

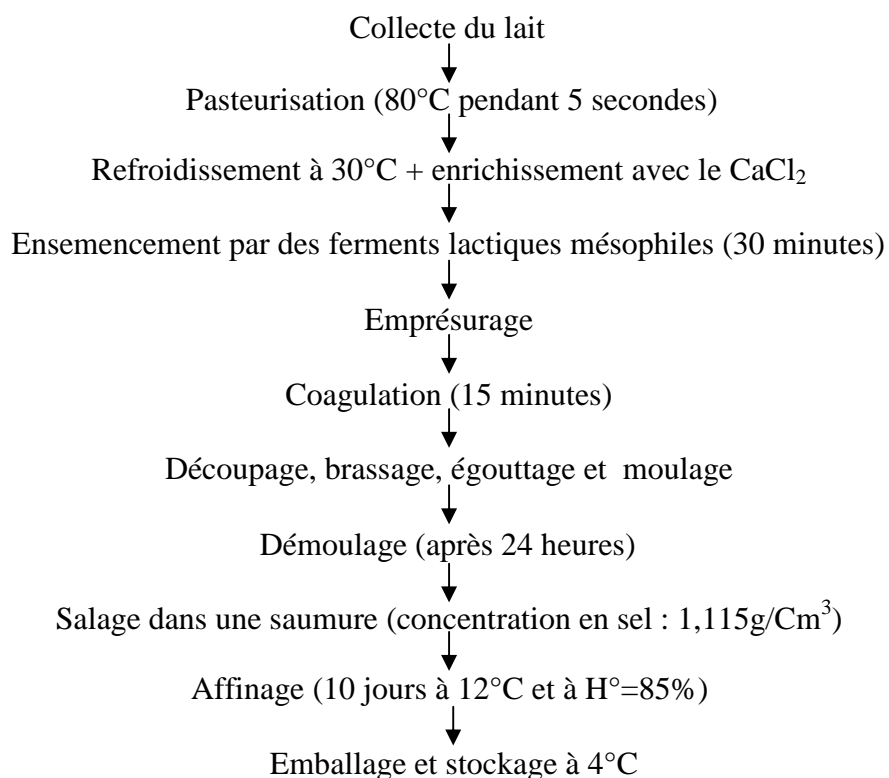


Figure 19 : Diagramme de fabrication d'un fromage à pâte molle type Brie adopté par la fromagerie « LE FERMIER ».

I.7.1.3. Analyses physico-chimiques des fromages fabriqués

I.7.1.3.1. Mesure du pH

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre en introduisant directement les deux sondes (pH et température) dans un échantillon de la pâte de fromage à une température de 20 à 25°C . Les mesures ont été faites en triple.

I.7.1.3.2. Mesure du taux de la matière grasse

La matière grasse est déterminée par la méthode de Gerber (ISO : 3433-2002). La matière grasse du fromage est séparée par centrifugation au butyromètre, après avoir dissous les protéines du fromage par l'acide sulfurique. La séparation de la matière grasse est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool isoamylique. La teneur en matière grasse est obtenue par lecture directe sur l'échelle du butyromètre.

I.7.1.3.3. Mesure de l'extrait sec total

Elle consiste en une dessiccation du produit et pesée de son résidu. La détermination de l'extrait sec est réalisée par un dessiccateur. Son principe repose sur l'élimination de toute l'eau à une température de 105°C par l'émission de radiations infrarouges et à contrôler en continu son poids à l'aide d'une balance intégrée jusqu'à obtention d'un poids constant de la prise d'essai analysée.

Une prise d'essai de 3 g est étalée sur toute la surface d'une capsule en aluminium préalablement tarée, puis introduite dans le dessiccateur et l'analyse est lancée, l'extrait sec total est exprimé en % et donné par l'afficheur numérique du dessiccateur.

I.7.1.3.4. Calcul du rendement fromager

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait (souvent 100 L ou 100 kg) (VANDEWEGH, 1997). Le rendement fromager est exprimé selon la formule suivante (HANNO *et al.*, 1991 ; LIBOUGA *et al.*, 2006) :

$$\text{Rdt} = \frac{\text{EST (lait)} - \text{EST (sérum)}}{\text{EST (coagulum)} - \text{EST (sérum)}}$$

I.7.1.3.5. Détermination de l'acidité titrable

La quantité de l'acide lactique contenu dans le fromage est déterminée selon la norme (AFNOR, 1986). Elle consiste en un titrage par la soude en présence de phénolphtaléine.

Une quantité de 10 grammes de fromage est dispersée dans une fiole de 250 ml avec de l'eau distillée chauffée à 45°C. Après refroidissement à 25°C la suspension est filtrée et la mesure de l'acidité est effectuée sur 10 ml de filtrat par titrage avec de la soude (0,1N) en présence de phénolphtaléine. Les résultats sont exprimés en gramme d'acide lactique pour 100 gramme de fromage et sont donnés par la formule :

$$\text{Acidité} = \frac{n. 0,1. V. K. 10}{V . P}$$

n : Volume de la chute de burette ;
V : Volume de la fiole (250 ml) ;
K : Coefficient de l'acide lactique (pour 1ml K= 0,09) ;
V' : Volume du filtrat (10 ml) ;
P : Poids de la prise d'essai (10 g).

I.7.1.4. Analyses microbiologiques des fromages fabriqués

Dans le but d'estimer la charge microbienne de notre fromage, nous avons effectué quelques analyses microbiologiques. Il s'agit de la recherche et du dénombrement de la flore mésophile totale (FTAM), des levures et moisissures et des coliformes totaux et fécaux.

La recherche et l'identification des différents micro-organismes sont basées sur leurs exigences nutritionnelles particulières. Pour cela, il existe des milieux spécifiques permettant de stimuler ou d'inhiber leur croissance et par conséquent, pouvoir les cultiver séparément (GUIRAUD, 1998).

I.7.1.4.1. Préparation des solutions fromagères

Les deux parties interne et externe du fromage sont homogénéisées au mortier, 10 g de l'échantillon à analyser ont été introduit dans un Erlenmeyer à 90 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi une dilution mère de 10^{-1} à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} (SCHMIDT *et* LENOIR, 1978).

I.7.1.4.2. Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale

Ce sont des micro-organismes aérobies et aéro-anaérobies facultatifs, se développant dans un milieu nutritif gélosé défini non sélectif (PCA), ayant une croissance optimale à 30°C. Ces germes apparaissent en colonies de tailles et de formes différentes, après 72 heures d'incubation (GUIRAUD, 1998).

I.7.1.4.3. Recherche et dénombrement des levures et moisissures

Ce sont des micro-organismes respectivement unicellulaires et filamenteux, qui peuvent provoquer des accidents de fabrication comme l'altération de goût, de texture et des gonflements. Ils se développent à des pH acides (pH < 4,4) et à des températures avoisinant 20 – 25°C.

Leur dénombrement s'effectue sur des milieux acides ou rendus sélectifs par addition d'antibiotique comme le milieu Oxytétracycline Glucose Agar (O.G.A) (GUIRAUD, 1998).

I.7.1.4.4. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Ce sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme. Leur présence dans l'aliment traduit une contamination fécale par manque d'hygiène, ils se caractérisent par leur aptitude à fermenter le lactose avec ou sans production de gaz, Leur détection consiste à incuber l'échantillon à 30°C pendant 48 heures (pour les coliformes totaux) ou à 44°C pendant 24 heures (pour les coliformes fécaux) dans un bouillon lactosé rendu sélectif par addition de bile et de vert brillant (VRBL) (BOURGEOIS *et* LEVEAU, 1991).

N.B : La composition et la méthode de préparation des différents milieux de culture utilisés sont détaillés dans l'annexe n°2.

I.7.1.5. Analyse sensorielle des fromages fabriqués

L'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes des sens, c'est une science multidisciplinaire qui fait appel à des dégustateurs et à leur sens de la vue, de l'odorat, du goût, du toucher et de l'ouïe pour mesurer les caractéristiques sensorielles et l'acceptabilité des produits alimentaires d'une façon extrêmement objective (FELIX *et* STRIGLER, 1998).

Dans le but d'identifier les changements des caractéristiques organoleptiques du fromage dues au remplacement de l'agent coagulant utilisé à la fromagerie par notre extrait et de voir leur degré d'acceptabilité ; on a procédé à trois tests sensoriels : le test triangulaire, le test de préférence et le test descriptif.

Avant l'analyse, les deux fromages à analyser sont au préalable équilibrés à la température ambiante et découpés en portions triangulaires de 10 g.

I.7.1.5.1. Le panel de dégustation ou les sujets

L'instrument de vérification pour l'analyse sensorielle est le panel de personnes (les sujets) qui ont été recrutées pour réaliser des tâches précises d'évaluation sensorielle (FELIX *et* STRIGLER, 1998).

Notre panel de dégustation est constitué de 11 sujets ils sont étudiants en post-graduation et enseignants dans l'Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro- Alimentaire (I.N.A.T.A.A.) de l'Université Constantine 1, ils sont habitués à faire ce genre d'analyse et certains d'entre eux ont fait une formation dans ce sens, ils sont recrutés selon leurs motivation et leur disponibilité pour participer aux tests. Il leur a été recommandé d'éviter l'utilisation de produits à l'odeur prononcée, comme les savons, les lotions et les parfums avant de participer à un panel et d'éviter de manger, de boire ou de fumer au moins 30 minutes avant de procéder aux essais.

I.7.1.5.2. Le test triangulaire

Le test triangulaire est conçu dans le but de déterminer s'il est possible de distinguer deux échantillons l'un de l'autre au moyen de l'analyse sensorielle, c'est un test qui sert à déterminer s'il y a eu une modification perceptible de l'apparence, de la saveur ou de la texture d'un aliment à la suite de l'entreposage, d'un changement des méthodes de préparation ou de la modification d'un ingrédient (WATTS *et al.*, 1991).

➤ Le déroulement du test

Trois échantillons codés sont présentés aux dégustateurs, deux identiques et un différent, et on leur demande d'identifier l'échantillon différent. Ils doivent choisir un échantillon, même s'ils ne peuvent pas distinguer de différence entre les échantillons (c'est-à-dire qu'ils doivent choisir au hasard en cas de doute). Les deux échantillons distincts (A et B) sont présentés aux dégustateurs par groupes de trois, c'est-à-dire qu'ils reçoivent soit deux échantillons A et un B ou deux échantillons B et un A. Les trois échantillons sont présentés dans des contenants identiques codés avec des numéros aléatoires à 3 chiffres. Les trois numéros de codes des échantillons remis à chaque dégustateur sont différents, même si deux échantillons sont identiques. Chaque dégustateur est invité à remplir un bulletin préparé pour le test triangulaire (Annexe n°3).

➤ Traitement des résultats

La signification des résultats est analysée à l'aide d'un test binomial à une queue. Ce test convient puisque nous savons qu'il y a un échantillon qui est différent et qu'il n'y a donc qu'une réponse «correcte». Le nombre de dégustateurs ayant identifié l'échantillon différent

est totalisé et on vérifie la signification du total en se servant du Tableau I comme indiqué en Annexe n°4. Le seuil de signification est de 5%.

I.7.1.5.3. Le test de préférence

Le test de préférence permet aux dégustateurs de faire un choix entre deux échantillons; il choisit un échantillon par rapport à un autre.

➤ Le déroulement du test

Nous demandons aux dégustateurs lequel de deux échantillons codés ils préfèrent. Ils doivent en choisir un, même s'ils leur semblent égaux. Les deux échantillons sont présentés dans des contenants identiques codés avec des numéros aléatoires à trois chiffres. Chaque dégustateur est invité à remplir un bulletin préparé pour le test de préférence (Annexe n°3)

➤ Traitement des résultats

Les résultats sont analysés en se servant d'un test binomial à deux queues. Ce test convient bien puisque chaque échantillon pourrait être préféré et on ignore la préférence au départ. Le total du nombre de juges préférant chaque échantillon est déterminé, ensuite la signification des totaux est vérifiée en se servant du tableau II en Annexe n°4. Le seuil de signification est de 5%.

I.7.1.5.4. Le test descriptif

Au cours de ce test, les dégustateurs doivent noter les échantillons, sur des échelles linéaires ou des échelles de catégories, d'après l'intensité perçue d'une caractéristique sensorielle (un descripteur sensoriel). Les dégustateurs donnent ainsi une description sensorielle totale de l'échantillon concernant : l'apparence, l'odeur, la saveur, la texture et l'arrière-goût. Le test descriptif permet donc de déterminer le profil sensoriel de l'échantillon et de mesurer l'importance de la différence entre les échantillons.

➤ Le déroulement du test

Les échantillons sont présentés dans des contenants identiques, codés avec un numéro aléatoire à 3 chiffres. Chaque échantillon a un numéro distinct, et dans une fiche conçue pour le test descriptif (Annexe n°3) chaque dégustateur note l'intensité perçue des descripteurs

sensoriels de chaque échantillon sur une échelle d'intervalles allant d'une faible intensité à une forte intensité (de 1 à 9).

➤ Traitement des résultats

Les notes de chaque échantillon sont présentées sous forme de tableau et analysées au moyen de l'analyse de variance (ANOVA) afin de déterminer s'il y a des différences significatives entre les échantillons au seuil de signification de 5%.

I.7.2. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert

L'essai de fabrication du fromage à pâte molle type Camembert était fait au sein de la laiterie SAFILAIT (sise à Ain Smara une localité à environ 12 Km du centre-ville de Constantine) selon le diagramme technologique adopté par cette unité (Figure 20).

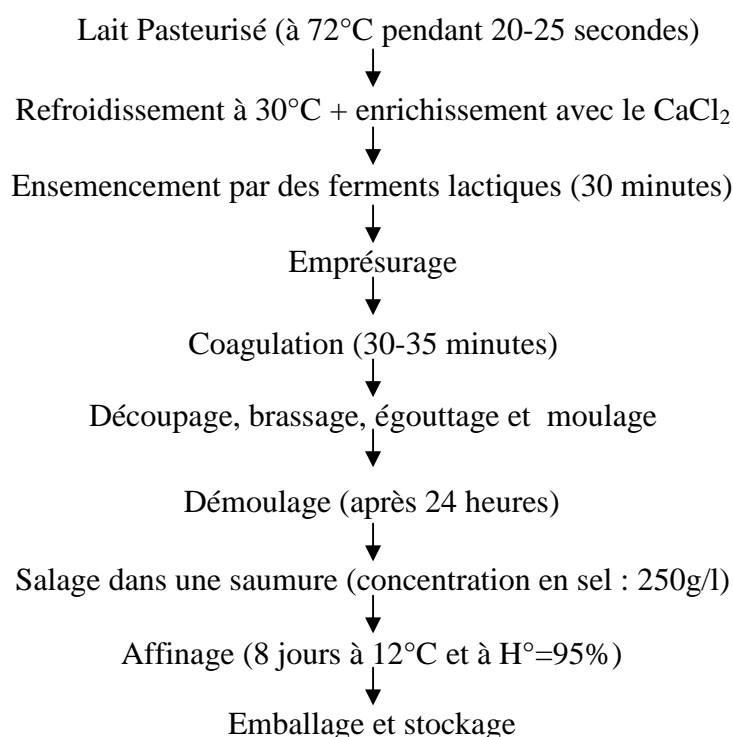


Figure 20 : Diagramme de fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert adopté par la laiterie « SAFILAIT ».

Après pasteurisation, le lait estensemencé avec des ferments lactiques et maintenu à une température voisine de 34°C, quand l'abaissement de pH était jugé suffisant (de 6,6 à 6,5 environ), le lait est réparti dans plusieurs bassines, à raison de 80 litres par bassine, deux d'entre elles ont servi pour notre essai (une été emprésuré avec l'extrait des fleurs de cardon,

et l'autre avec la pepsine du poulet), quant aux autres bassines elles étaient emprésuré par l'agent coagulant utilisé par l'unité (une chymosine microbienne). En suite la fabrication est conduite de la même façon pour tous les lots. Afin de voir l'influence de nos extraits coagulants sur l'évolution de la texture, de la protéolyse et des caractéristiques organoleptiques du fromage type Camembert, Nous avons comparé les fromages expérimentaux (obtenus en utilisant l'extrait des fleurs de cardon et la pepsine du poulet comme agents coagulants) aux fromages témoins fabriqués par l'unité en utilisant la chymosine microbienne.

I.7.2.1. Echantillonnage

Les échantillons ayant servi aux différents tests analytiques ont été prélevé aux stades suivants :

- Le jour d'introduction des fromages au hâloir d'affinage (J+1) ;
- Après 6 jours de production (6^{ème} jour d'affinage dans le hâloir) (J+6) ;
- Après 13 jours de production (fin d'affinage dans le hâloir) (J+13) ;
- Après 20 jours de production (J+20) ;
- Après 30 jours de production (J+30).

Après affinage, les pièces de fromage ont été mises dans un frigo à une température comprise entre 6 et 10°C.

1.7.2.2. Suivi de l'évolution de la texture

La texture est un élément majeur de la qualité des fromages à pâte molle. Dans le cas précis du camembert, on assiste au cours de la maturation à l'amollissement de la partie externe du fromage. Cette zone modifiée s'étend progressivement vers l'intérieur, dans certains cas on peut même observer des pâtes coulantes, ce changement de texture est, généralement, attribué à l'activité des différentes protéases présentes dans le fromage y compris l'agent coagulant utilisé (ABRAHAM *et al.*, 2006).

Le suivi de l'évolution des caractéristiques des trois fromages est réalisé par des tests pénétrométriques qui permettent une évaluation de la texture de la pâte en plusieurs endroits d'une même tranche de fromage (figure 21). Une tranche de 2 Cm d'épaisseur était découpée selon un diamètre du fromage.

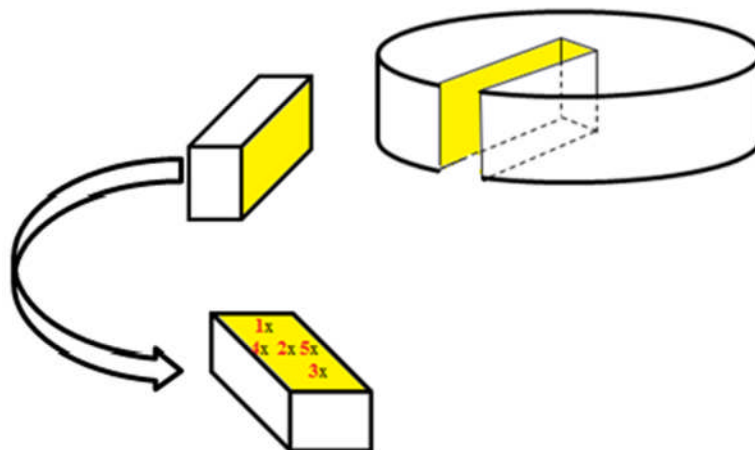


Figure 21 : Préparation de l'échantillon pour le test de pénétrométrie.

Les tests de pénétrométrie étaient effectués sur la tranche perpendiculairement à la coupe, après que l'échantillon soit équilibré à la température ambiante. Un pénétromètre (PNR10) est utilisé dans ce test, il est muni d'un cône qui pénètre en chute libre (sous l'action de son propre poids) dans l'échantillon, pendant une durée de 3 secondes, la moyenne des 5 profondeurs de pénétration mesurées en mm, nous donne ainsi une idée sur la fermeté du fromage.

1.7.2.3. Suivi de l'évolution de la protéolyse

1.7.2.3.1. Fractionnement des protéines à pH= 4,6

Pour la caractérisation de la protéolyse, nous avons utilisé le protocole décrit par FALLICO *et al.* (2004) (figure 22), il s'agit tout d'abord, d'extraire les fractions protéiques solubles et insolubles à pH= 4,6 : Une masse de 25 g de fromage est homogénéisée avec 50 ml d'eau distillée pendant 10 min. Après homogénéisation, le pH est ajusté par addition de l'HCl (1N) jusqu'à stabilisation à 4,6. Les échantillons sont en suite, chauffés au bain-marie pendant 1h à 40°C. Une centrifugation à 11000 g pendant 30 min à 4°C est nécessaire pour la séparation des protéines insolubles. Le culot est récupéré et le surnageant est filtré.

Une séparation des protéines du culot par UREA-PAGE est faite pour l'évaluation qualitative de la protéolyse, l'évaluation quantitative de la protéolyse est réalisée par un dosage des protéines du surnageant avec la méthode de LOWRY, (1951).

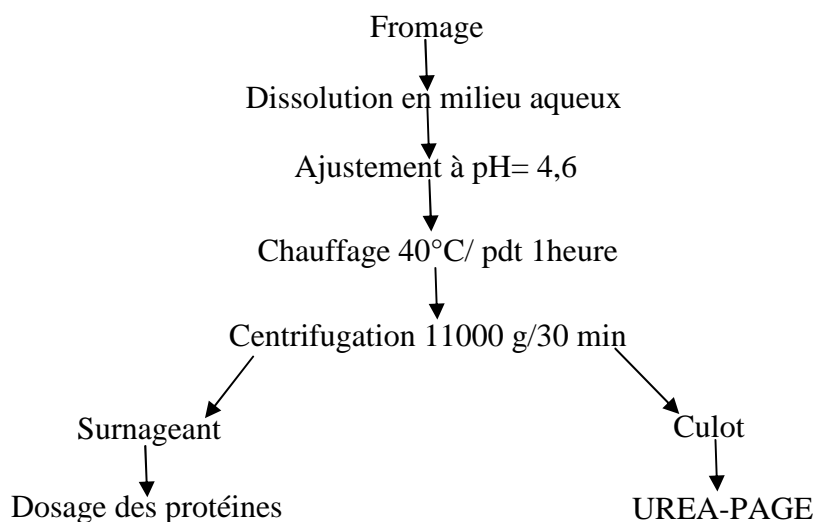


Figure 22 : Extraction des fractions protéiques solubles et insolubles à pH= 4,6
(FALLICO *et al.*, 2004)

1.7.2.3.2. Suivi qualitatif par électrophorèse UREA-PAGE

L'électrophorèse UREA-PAGE est particulièrement adaptée pour la séparation des protéines non globulaires comme les caséines (PELLISSIER, 1984). La sensibilité et le pouvoir de résolution de cette technique lui ont valu d'être considérée comme un outil performant dans l'évaluation de la protéolyse des caséines. Ceci est rendu possible par l'action des agents dissociant utilisés dont le rôle est de rompre les liaisons hydrogènes (cas de l'urée) et les ponts disulfures (cas du β -mercaptoethanol), permettant ainsi aux entités protéiques de migrer sous leur forme la plus simple (DAMERVAL *et al.*, 1993).

L'UREA-PAGE est réalisée selon la méthode décrite par ANDREWS (1983) en utilisant un système de deux gels complémentaires : le premier est le gel concentration (4% p/v d'acrylamide) son tampon est composé de : l'urée (8M) et du tris (60mM) à pH= 7,6. Le second c'est le gel de séparation (12% p/v d'acrylamide) son tampon est composé de : l'urée (4,5M) et du tris (380mM) à pH= 8,9.

Dix mg de chaque fromage sont mélangés avec 1ml du tampon échantillon (7,5g/L Tris, 490g/L urée, 7mL/L de β -mercaptoethanol). Le mélange est additionné de 10 μ l du bleu de bromophénol et homogénéisé jusqu'à solubilisation complète du fromage. Ensuite, 15 μ l de chaque échantillon sont déposés dans les puits.

La migration s'effectue dans une cuve en appliquant un courant de 90v pendant 20 minutes (jusqu'à ce que le front de migration atteigne le gel de séparation), puis il est

maintenu à 180v pendant 2 heures, le tampon de migration contient le Tris (0,025M) et la glycine (0,192M) à pH= 8,3. Après fin de migration, le gel est coloré en l'agitant pendant 1 heure dans une solution de coloration (0,025% bleu de Coomassie R-250, 10 % acide acétique 30% alcool et 60% eau) puis décoloré dans une solution de décoloration (5% d'acide acétique 30% d'alcool et 65% d'eau).

1.7.2.3.2. Suivi quantitatif par dosage des protéines solubles à pH= 4,6

Le suivi quantitatif de l'évolution de la protéolyse dans les trois fromages obtenus, est assuré par le dosage de la fraction protéique soluble à pH= 4,6 contenues dans le surnageant, en utilisant la méthode décrite par LOWRY, 1951. Les résultats sont exprimés par le rapport : protéines solubles/protéines totales.

1.7.2.4. Suivi de l'évolution des caractéristiques organoleptiques

Une analyse sensorielle a été faite afin de suivre l'évolution des caractéristiques des trois fromages obtenus, il s'agit de deux tests sensoriels effectués suivant la méthode décrite par WATTS *et al.* (1991) : le test de classement par rang et le test descriptif.

1.7.2.4.1. Le test de classement par rang

Le test de classement par rang a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit. Ce type de test peut servir également, à obtenir des renseignements préliminaires sur des différences entre les produits préparés avec les différents agents coagulants étudiés.

➤ Le déroulement du test

Nous présentons, aux dégustateurs, trois échantillons dans des contenants identiques, codés au moyen d'un numéro aléatoire à 3 chiffres. Chaque échantillon a un numéro de code différent. Tous les échantillons sont présentés simultanément à chaque dégustateur dans un ordre qui a été prévu ou choisi au hasard. Les dégustateurs ont le droit de goûter aussi souvent que nécessaire les échantillons pour établir les comparaisons nécessaires entre eux. En suite et sur une fiche dégustation (annexe n°3) ils doivent classer les échantillons codés en fonction de l'appréciation par ordre croissant en allant du moins apprécié au plus apprécié.

➤ **Le traitement des résultats**

Le total des classements attribués à chaque échantillon est réalisé. Ensuite la signification des différences est déterminée en comparant les totaux des classements pour toutes les paires possibles des échantillons en se servant du test de Friedman. Les différences entre toutes les paires possibles des classements totalisés sont comparées à la valeur critique du tableau donné dans l'annexe n°4, pour un niveau de signification de 5 %.

1.7.2.4.2. Le test descriptif

Le déroulement et le traitement des résultats du test descriptif, se font de la même manière indiquée précédemment (chapitre I.7.1.5.4), sauf que, dans ce cas, trois échantillons présentés aux dégustateurs au lieu de deux échantillons.

Chapitre II :
Résultats et discussion

II.1. Caractéristiques du lait utilisé

Les caractéristiques physico-chimiques de la poudre de lait écrémé utilisé dans notre travail ainsi que celles du lait écrémé reconstitué selon la méthode de BERRIDGE sont données par le tableau 9. Le lait est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Le lait ainsi préparé présente un extrait sec total (E.S.T.), un pH et une acidité qui sont proches à ceux décrits par différents auteurs : un E.S.T. de 10 à 13%, un pH de 6,6 à 6,8 et une acidité de 16°D (RIBADEAU-DUMAS, 1991 ; SILVA *et* MALCATA, 2005).

Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques de la poudre de lait et du substrat de BERRIDGE.

	Substrat de Berridge	Poudre du lait
E.S.T. (%)	10,67	93,58
Acidité (°D)	16,33	-
pH	6,51	-

II.2. Caractérisation de l'extrait brut des fleurs de cardon

II.2.1. Le rendement de l'extraction

La quantité moyenne de fleurs de cardon qui peut être récupérée varie selon les dimensions des capitules, pour un kilogramme de capitule, 200 g de fleurs fraîches sont récupérées. Après séchage, nous n'avons récupéré qu'environ 60g, soit un rendement de 6% (6g de fleurs sèche pour 100g de capitule).

Le diagramme de base appliqué pour l'extraction du système enzymatique des fleurs de cardon consiste, essentiellement, à une macération de 10g de fleurs sèches dans 100 ml du tampon acétate de sodium (0,1M et pH=5) soit un rapport de 1/10 (p/v). De ce fait, nous avons pu récupérer une quantité de 86 ml d'extrait. Le tableau 10 donne les caractéristiques de l'extrait brut obtenu à partir de 10g des fleurs sèches de cardon.

Tableau 10 : Caractéristiques de l'extrait obtenu à partir de 10g de fleurs sèches de cardon.

	Extrait brut des fleurs de cardon
Volume de l'extrait (ml)	86
pH	5,9
Extrait sec total (%)	6,14
Protéines (mg/ml)	26
UAC (U.P.)	3,23
Force coagulante	1/888
Activité spécifique (UP/mg)	0,12

L'extrait des fleurs de cardon que nous avons obtenu (figure 20), est une solution brunâtre et se caractérise par un pH égal à 5,9, d'un extrait sec total égal à 6,14 g/100g et d'une teneur en protéines de 26mg/ml, ces paramètres sont proches à ceux des extraits des fleurs du genre *Cynara* rapportés par ROSEIRO *et al.* (2003) : pH= 5,8, extrait sec égal à 5% et un taux de protéine égal à 28 mg/ml.

**Figure 20** : Extrait enzymatique des fleurs de cardon obtenu.

L'activité coagulante est de 3,23 UP pour 1ml de l'extrait, et 27,78 UP pour 1g de fleurs sèches, une activité inférieure à celle mentionnée par MARTINS *et al.* 1996, qui ont obtenu un extrait ayant une activité de 47,64 UP/g de fleurs sèches.

En termes de force coagulante, 1ml de l'extrait des fleurs de cardon que nous avons obtenu peut coaguler 888ml de lait, donc, 10g de fleurs sèches peuvent coaguler environ 76,37 litres de lait, une force qui semble inférieure à celles de la caillette de veau et de proventricule de poulet. En effet, selon ALAIS (1984), 10g de caillette de veau peut coaguler environ 830 litres, et selon ADOUI (2007), la même quantité de proventricules de poulet peut coaguler jusqu'à 125 litres de lait.

D'autre part, afin d'optimiser le rendement d'extraction du système enzymatique des fleurs de cardon, il serait intéressant de tester d'autres solutions de macération tout en modifiant les paramètres temps et température d'extraction.

II.2.2. L'activité protéolytique

Toutes les coagulases qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes, sont capables d'hydrolyser la caséine κ , provoquant ainsi la coagulation du lait. Toutefois cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (ALAIS, 1984). Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître sur les fromages, ces coagulases doivent présenter une protéolyse générale faible.

Pour cela, nous avons étudié l'activité protéolytique de l'extrait des fleurs de cardon par comparaison à la présure animale, en utilisant la méthode décrite par GREEN *et* STACKPOOLE (1975). Les résultats ont montré que l'activité protéolytique de l'extrait des fleurs de cardon est presque le double de celle de la présure animale, en effet, nous avons obtenu des valeurs de 22,34 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait des fleurs de cardon contre uniquement 11,57 $\mu\text{g/ml}$ pour la présure animale.

Ces résultats sont confirmés par plusieurs auteurs qui ont parlé de cette activité excessive de l'extrait floral comparé à celle de la présure, en effet, CORDEIRO *et al.* (1992) ont remarqué que l'extrait des fleurs de cardon a une activité protéolytique trois fois plus importante que celle de la présure. Le même résultat était constaté par MACEDO *et al.*, (1996). Quant à ROSEIRO *et al.* (2003) et CLAVERIE *et* HERNANDEZ (2007) ont mentionné que l'activité protéolytique des extraits des leurs du genre *Cynara* est environ le double de celle de la présure traditionnelle.

II.2.3. Le profil électrophorétique

Dans le but de localiser et de visualiser les bandes protéiques de l'extrait des fleurs de cardon, une électrophorèse SDS-PAGE est réalisée.

Les profils électrophorétiques des trois extraits (extrait de la fleur complète, extrait du stigma et celui du stylet) sont présentés dans la figure 21.

Dans les profils des trois extraits, nous remarquons deux bandes très intenses qui ont des poids moléculaires d'environ 31 et 15 kDa. Selon la littérature, elles représentent les deux peptides de la cardosine A, deux autres bandes, moins intenses, ayant des poids d'environ 34 et 14 kDa sont détectées, elles représentent les deux peptides de la cardosine B (VERISSIMO *et al.*, 1995). Les deux peptides ayant les poids proches de 25 et 20 kDa sont supposés être des impuretés.

Nous remarquons, également, que toutes les bandes sont présentes dans les trois extraits, cependant, elles sont plus intenses dans l'extrait de la partie violette que dans l'extrait de la partie blanche, ceci nous mène à dire que les cardosines A et B sont présentes dans les deux parties de la fleur mais d'une façon plus importante dans la partie violette (Stigma). Ces résultats sont confirmés par la littérature, en effet, d'après RAMALHO-SANTOS *et al.* (1997) la cardosine A se localise en grande partie dans les vacuoles du stigma et elle est également présente mais d'une façon moins abondante dans les vacuoles épidermiques du stylet. la cardosine B est également présente en majorité dans le stigma (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

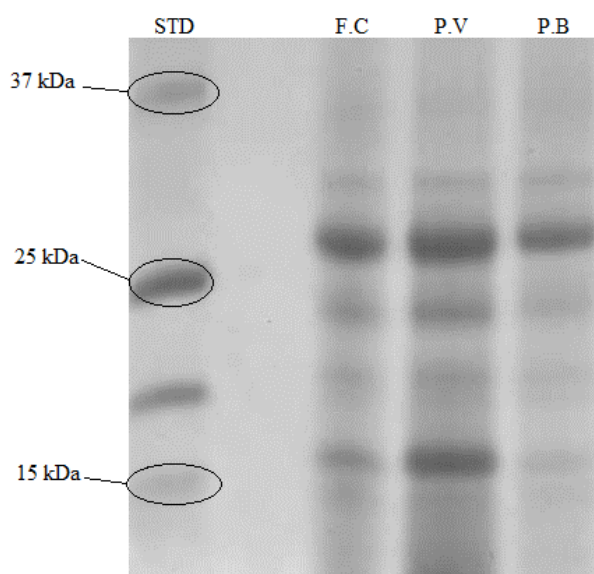


Figure 21 : Profils électrophorétiques sur SDS-PAGE des extraits de différentes parties de la fleur de cardon. STD : marqueurs de taille ; F.C : extrait de la fleur complète ; P.V : extrait de la partie violette de la fleur (stigma) ; P.B : extrait de la partie blanche de la fleur (stylet).

II.3. Détermination des conditions optimales de coagulation

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de l'extrait des fleurs de cardon, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur son activité coagulante par comparaison à celle de la présure.

II.3.1. Effet du pH du lait

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5 à 7. La température d'incubation est fixée à 30 °C.

Le pH optimum de coagulation du lait est déterminé en observant le temps de floculation le plus court. La figure 22 donne l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon en fonction du pH du lait en comparaison avec celle de la présure.

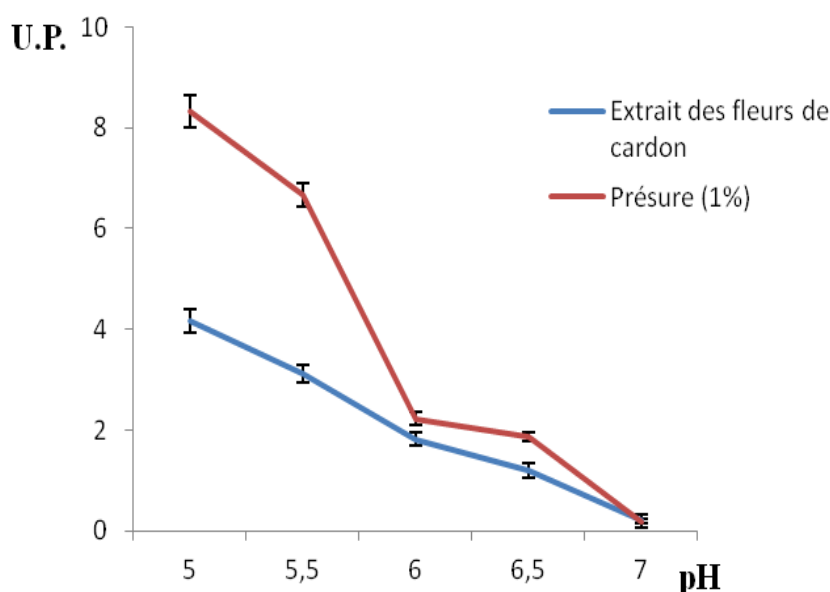


Figure 22 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure.

Les résultats illustrés par la figure ci-dessus indiquent une diminution de l'activité coagulante des deux préparations enzymatiques au fur et à mesure que le pH du lait augmente. En effet, pour l'extrait des fleurs de cardon l'activité passe de 4,16 U.P., à pH 5,0 pour se stabiliser à 0,2 U.P. à pH 7,0 et pour la présure animale, elle passe de 8,33 U.P. à pH 5,0 pour arriver à 0,19 U.P. à pH 7,0.

Ces résultats sont proches de ceux mentionnés par CLAVERIE *et* HERNANDEZ, (2007) qui indiquent que la présure et l'extrait enzymatique des fleurs de cardon sont plus actifs à des pH acides allant de 3 à 5, et perdent l'essentiel de leurs efficacités à des pH qui se rapprochent de la neutralité.

Le même effet du pH a été remarqué par ADOUI (2007) sur la pepsine extraite du proventricule de poulet. Et qui rapporte que la pepsine de poulet est d'autant plus active que le pH est bas.

II.3.2. Effet de la température du lait

La température optimale est déterminée par la mesure de l'activité coagulante des préparations enzymatiques sur un lait maintenu à des températures allant de 20 à 70°C. La figure 23, montre l'effet de la température du lait sur l'activité de l'extrait des fleurs de cardon et celle de la présure.

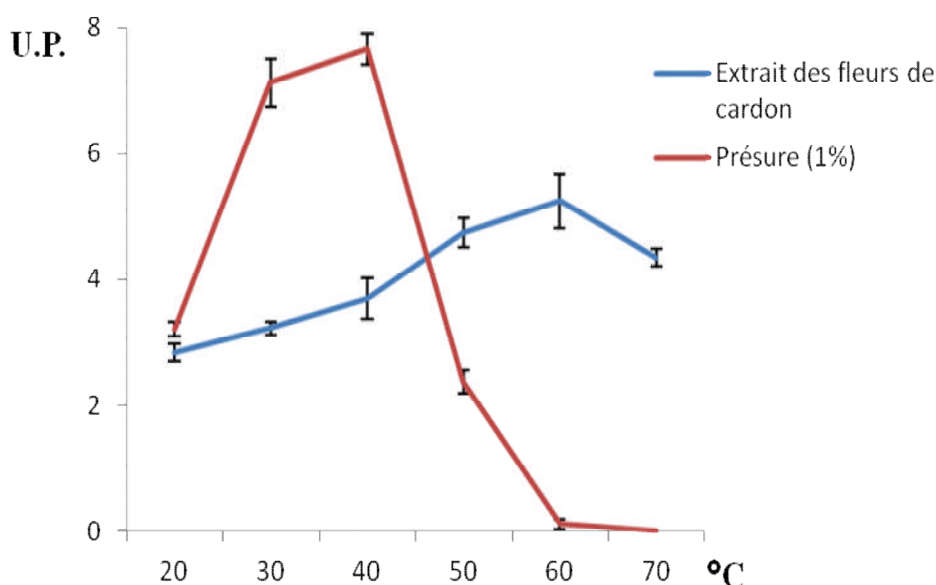


Figure 23 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure.

Nous constatons un comportement différent des deux préparations enzymatique suivant les températures étudiées, l'optimum d'activité coagulante pour l'extrait brut des fleurs de cardon et de la présure animale est obtenu aux températures du lait égales à 60°C et 40°C respectivement, au-delà de ces températures nous notons une baisse d'activité. Par ailleurs, et contrairement à la présure animale, l'extrait coagulant des fleurs de cardon se

montre encore actif à des températures élevées ($> 60^{\circ}\text{C}$). À ces températures, la présure perd complètement son activité. Dans un autre travail, ADOUI (2007) a rapporté que la température optimale d'activité coagulante pour la pepsine du poulet est de 55°C et elle a mentionné également qu'aux températures de lait dépassant 65°C la pepsine est inactive.

Ces résultats confirment ceux rapportés par plusieurs auteurs, qui ont précisé que les protéases d'origine végétales sont très thermostables, et elles ont généralement une température optimum d'activité beaucoup plus élevée que celle des protéases d'origine animale (ROSEIRO *et al.*, 2003 ; SIDRACH *et al.*, 2005 ; CHAZZARRA *et al.*, (2007) ; CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007).

II.3.3. Effet de la concentration de CaCl_2

L'addition du chlorure de calcium au lait, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et accroître la fermeté de coagulum (ECK, 1997). La figure 24 montre l'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure.

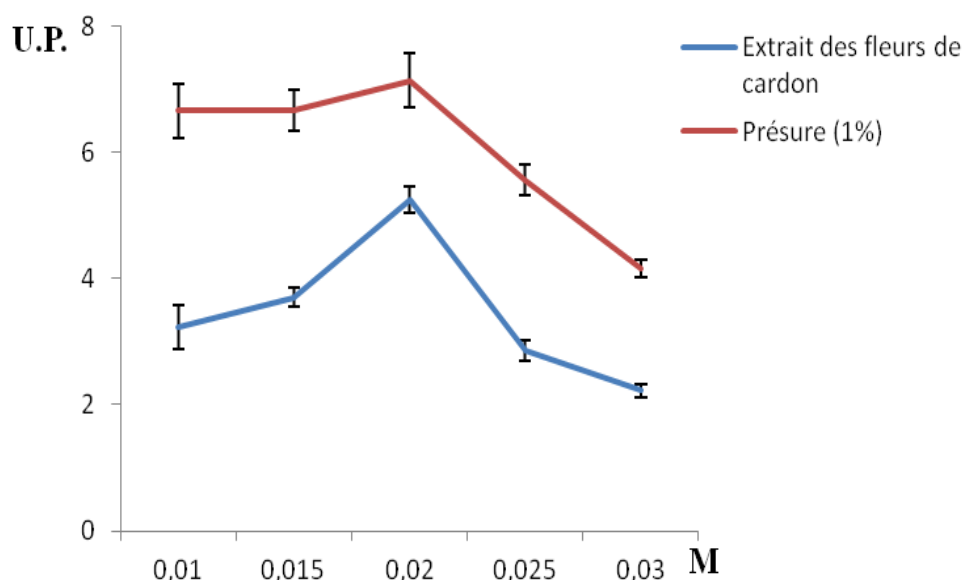


Figure 24 : Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'extrait des fleurs de cardon et de la présure.

D'après ces résultats, nous constatons que dans l'intervalle de concentration du lait en CaCl_2 utilisé en fromagerie (0,01 à 0,02M), l'activité coagulante augmente en fonction de la concentration en CaCl_2 avec un optimum à 0,02M pour les deux préparations enzymatiques.

Notons que cet accroissement d'activité se montre plus progressif avec l'extrait de fleurs de cardon (de 3,23 U.P. à 5,26 U.P.) par comparaison à la présure animale (de 6,67 à 7,14), indiquant ainsi la grande sensibilité de l'extrait de cardon à la concentration du lait en CaCl_2 . Pour des concentrations supérieures à 0,02 M, une baisse d'activité coagulante est remarquée pour les deux solutions coagulantes par effet inhibiteur de l'ion Ca^{2+} , cet effet est plus marqué pour la présure animale.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par CHAZARRA *et al.* (2007) qui ont mis en évidence l'effet des ions Ca^{2+} dans le processus de coagulation enzymatique des laits, et qui ont rapporté qu'au-dessus d'une concentration de 0,025 mole de CaCl_2 par litre, la coagulation du lait est inhibée par le calcium.

II.4. Les interactions impliquées dans le gel obtenu par l'extrait de fleurs de cardon

L'utilisation d'agents dissociant, permet de mettre en évidence la nature des interactions impliquées dans la formation et le maintien de la structure du réseau protéique du coagulum. Le pourcentage des protéines dissociées par rapport aux protéines totales, reflète l'action de l'agent utilisé sur le réseau du gel, et par conséquent la présence d'interactions spécifiques détruites par cet agent. Les liaisons hydrogènes sont détruites par l'urée alors que les liaisons hydrophobes sont sensibles à l'action des détergents tels que le SDS, les liaisons calciques sont détruites par les agents chélateurs tels que l'EDTA (CHEFTEL *et al.*, 1985 ; LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998 ; BOUGHELLOUT, 2007 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010). Durant cette partie du travail, nous avons étudié les interactions impliquées dans la formation et le maintien du gel obtenu par l'extrait des fleurs de cardon par utilisation de différents agents coagulants : le SDS pour identifier les liaisons hydrophobes, l'urée pour les liaisons hydrogène et l'EDTA pour les liaisons calciques.

II.4.1. Dissociation des protéines par l' SDS

Le sodium dodecyl sulfate (SDS) interagit avec les groupements non-polaires des chaînes protéiques ce qui implique la destruction des liaisons hydrophobes. Les taux de dissociation des protéines des gels présure et cardosine en fonction de la concentration du SDS sont montrés par la figure 25.

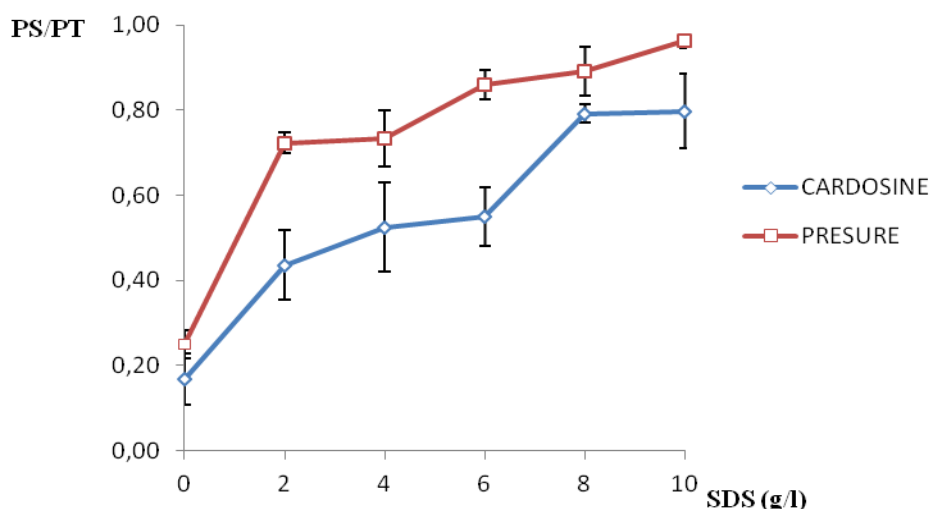


Figure 25 : Dissociation des protéines des gels présure et cardosine par le SDS. (PS/PT : Taux de protéines dissociées par rapport aux protéines totales ; SDS : concentration du sodium dodecyl sulfate en g/l ; CARDOSINE : gel issu d'une coagulation par l'extrait des fleurs de cardon ; PRESURE : gel issu d'une coagulation par la présure animale).

Les résultats obtenus montrent que le SDS semble avoir un effet important sur le gel cardosine. En effet, à une concentration de 6 g/l de SDS, 55% des protéines sont dissociées et à 10g/l, le taux de dissociation des protéines atteint environ 80%. Cependant, cet effet dissociant reste moins important que celui constaté sur le gel présure ; 76% des protéines sont dissociées à 6g/l et 96% à une concentration de 10g/l.

Dans un travail précédant, BENYAHIA-KRID *et al.* (2010) ont étudié l'effet du SDS sur les gels pepsine et présure, aucune différence significative n'a été constatée entre les deux gels au seuil de probabilité égal à 5%. En effet, pour une concentration de 10g/l d' SDS ; 94,9% des protéines du gel pepsine sont dissociées contre 96,9% pour les protéines du gel présure. Dans un autre travail, LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998) ont essayé de faire une comparaison entre les effets du SDS sur un gel acide et sur un gel présure, pour une concentration d' SDS égale à 6 g/l, ils ont constaté une dissociation de 55% des protéines du gel acide contre 90% pour le gel présure.

En comparant les travaux précédant aux résultats que nous avons obtenus, nous remarquons que l'effet du SDS sur le gel cardosine est faible par rapport aux gels pepsine et présure, et comparable à celui remarqué sur le gel acide. Ceci nous mène à dire que les liaisons hydrophobes dans le gel cardosine sont comparables à celles du gel acide, et moins importantes que dans les gels pepsine et présure.

II.4.2. Dissociation des protéines par l'urée

Le dosage des protéines dissociées suite à l'action de l'urée nous permet de faire l'approche des liaisons hydrogène impliquées dans la formation des gels cardosine et présure.

Les taux de dissociation des protéines des gels présure et cardosine en fonction de la concentration de l'urée sont montrés dans la figure 26.

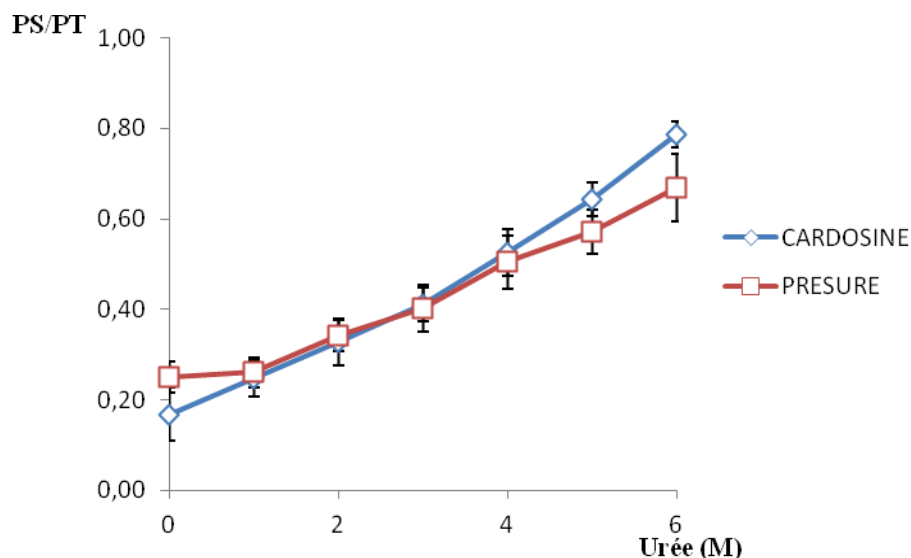


Figure 26 : Dissociation des protéines des gels présure et cardosine par l'urée. (PS/PT : Taux de protéines dissociées par rapport aux protéines totales ; CARDOSINE : gel issu d'une coagulation par l'extrait des fleurs de cardon ; PRESURE : gel issu d'une coagulation par la présure animale).

L'urée également, joue un rôle dissociant important sur le gel obtenu par une coagulation avec l'extrait des fleurs de cardon. Les résultats obtenus montrent que pour une concentration de l'urée de 1M le taux de dissociation est de 25%. Ce taux augmente pour atteindre 53% à une concentration de 4M, et en fin à une concentration de 6M, environ 80% des protéines sont dissociées.

Pour les concentrations d'urée de 1M, 2M, 3M et 4M, les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ne montrent pas de différence entre les deux gels, cependant, aux concentrations égales à 5M et 6M, la différence est significative au seuil de probabilité de 5%, en effet, les taux de dissociations sont respectivement de 64% et 79% pour le gel cardosine, et 57% et 67% pour le gel présure.

BENYAHIA-KRID *et al.* (2010), ont rapporté que pour une concentration de l'urée de 6M le taux de dissociation des protéines est de 61,6% pour le gel présure et 59,2% pour le gel

pepsine. Quant à LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998), ils ont mentionné pour la même concentration d'urée (6M) que le taux de dissociation est de 64% pour le gel présure, et il est de 81% dans le cas du gel acide.

Ainsi, Le taux de protéines dissociées du gel cardosine est comparable à celui d'un gel acide et nettement supérieur à ceux des gels présure et pepsine, ceci implique que les liaisons hydrogène dans les gels cardosine et acide sont plus importantes que dans les gels présure et pepsine.

II.4.3. Dissociation des protéines par l'EDTA

L'éthylenediamine tetracetic acide (EDTA), est considéré comme étant un agent chélateur de calcium, son effet sur les gels cardosine et pepsine est montré dans la figure 27.

L'analyse de la variance des résultats obtenus montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux gels au seuil de probabilité de 5%.

En effet, la dissociation causée par l'EDTA est très importante pour les deux gels : pour une concentration d'EDTA égale à 2mM, le taux de dissociation est de 72% pour le gel cardosine et 77% pour le gel présure. Ces taux augmentent avec la concentration d'EDTA et atteignent respectivement 86% et 91% à une concentration de 6mM.

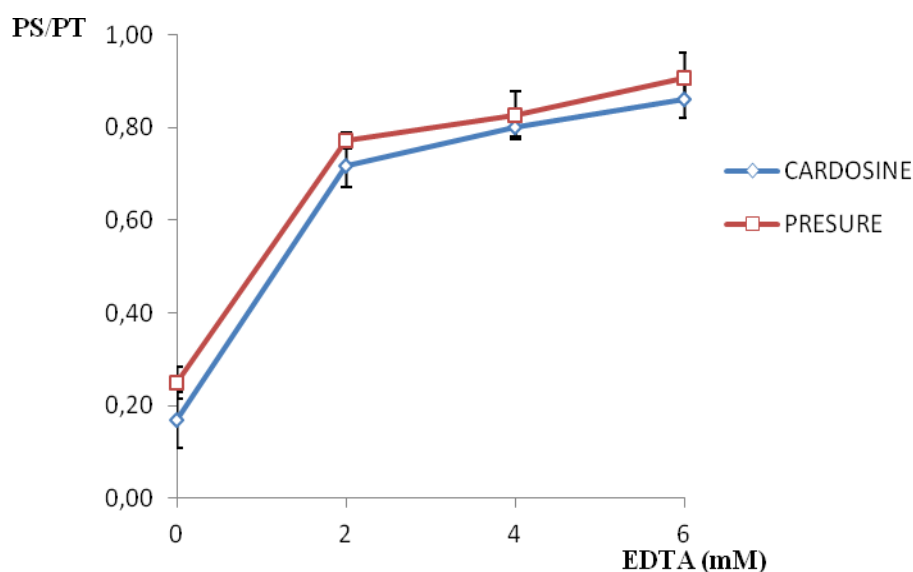


Figure 27 : Dissociation des protéines des gels présure et cardosine par l'EDTA. (PS/PT : Taux de protéines dissociées par rapport aux protéines totales ; EDTA : concentration de l'éthylenediamine tetracetic acide en mM ; CARDOSINE : gel issu d'une coagulation par l'extrait les fleurs de cardon ; PRESURE : gel issu d'une coagulation par la présure animale).

Les résultats obtenus sont similaires à ceux mentionné par LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998), qui ont rapporté que pour une concentration de 2mM le taux de dissociation des protéines est de 75,9% pour le gel présure et 26,7% pour le gel acide. Contrairement à BENYAHIA-KRID *et al.* (2010) qui ont obtenu des résultats moins élevés ; à une concentration de 100 mM d'EDTA le taux de dissociation était seulement de 44,1% pour le gel présure et 41,4% pour le gel pepsine.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- ✓ Les trois types de liaisons (hydrophobes, hydrogène et calciques) jouent un rôle important dans la formation et le maintien du gel cardosine ;
- ✓ Les liaisons hydrophobes dans le gel cardosine sont moins importantes que dans les gels pepsine et présure et comparables à celles du gel acide ;
- ✓ Les liaisons hydrogène dans le gel cardosine sont comparables à celles du gel acide et plus importantes que dans les gels pepsine et présure ;
- ✓ Les liaisons calciques dans le gel cardosine contribuent de la même manière que dans le gel présure et elles sont plus importantes que dans le gel acide.

II.5. Application fromagère

Le but de cette partie du travail était d'étudier l'influence de l'extrait coagulant des fleurs de cardon sur la technologie de fabrication, la qualité et les propriétés organoleptiques de deux fromages à pâte molle type Brie et type Camembert fabriqués à l'échelle industrielle.

II.5.1. Essai de fabrication d'un fromage pâte molle type Brie

Sur les fromages obtenus (figure 28), nous avons procédé aux différentes analyses physico-chimiques, microbiologiques et organoleptiques afin de déterminer d'éventuelles modifications apportées par l'introduction de l'extrait des fleurs de cardon sur le fromage type Brie.

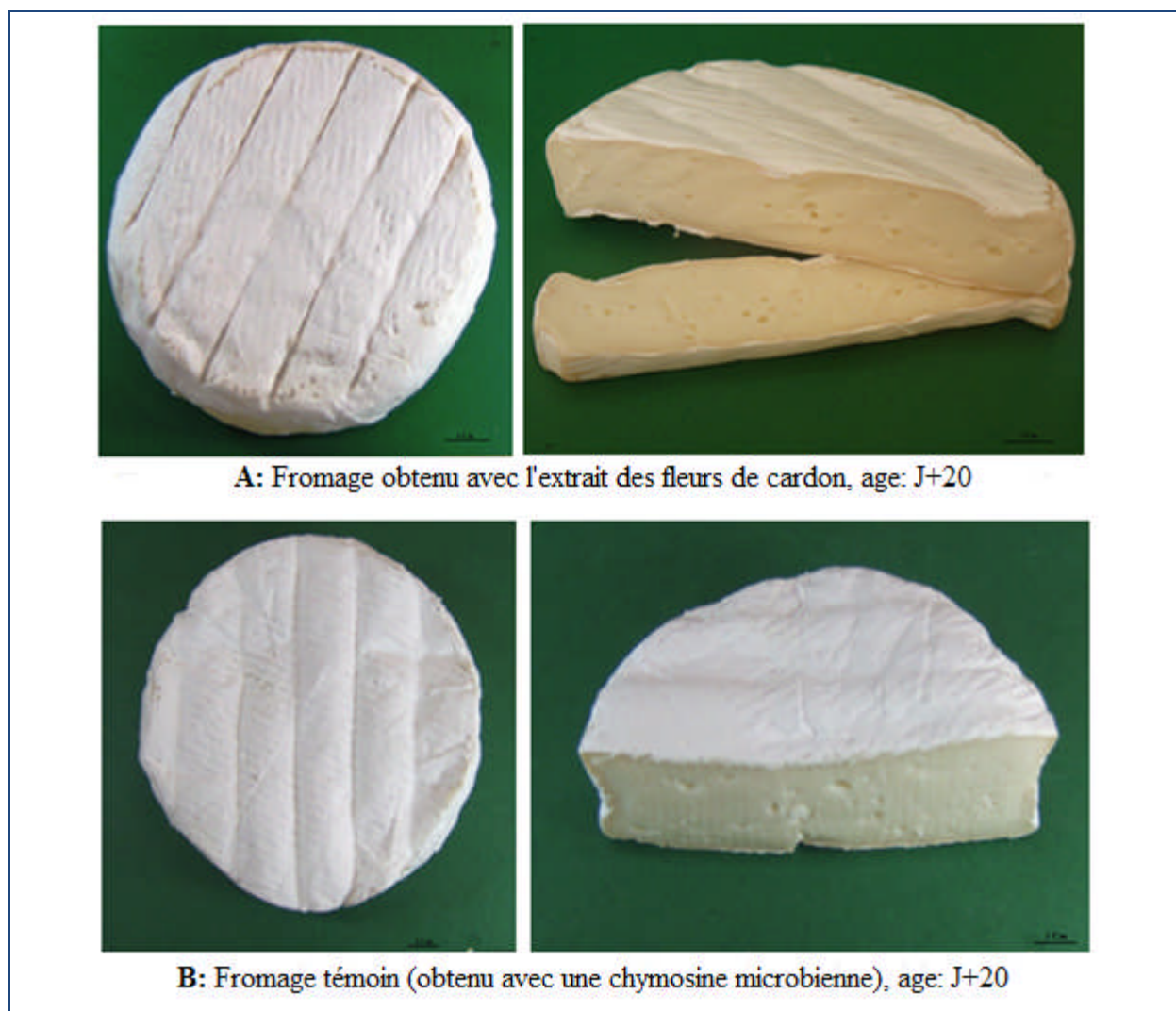


Figure 28 : Le fromage obtenu avec l'extrait de cardon et le fromage témoin, après 20 jours de production.

II.5.1.1. Composition physico-chimique du lait utilisé

Le tableau 11, récapitulatif de la composition du lait utilisé pour la réalisation de notre essai, indique un profil physicochimique qui se rapproche de celui du lait de vache décrit par la littérature (VIGNOLA, 2002 ; FREDOT, 2005 ; JEANTET *et al.*, 2008).

Tableau 11: Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication

	Lait cru	Normes (AFNOR)
pH	6,7	6,6
Acidité (°D)	17	15-18
E.S.T. (g/l)	123	102-125
M.G. (g/l)	36	32-36
E.S.D. (g/l)	87	87,5-89,9

E.S.T. : extrait sec total ; M.G. : matière grasse ;
E.S.D. : extrait sec dégraissé = E.S.T.-M.G.

II.5.1.2. Composition physico-chimique des fromages fabriqués

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sont présentés sur le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats des analyses physico-chimiques des fromages fabriqués

	F.Cardon	F.Témoin
pH	4,89	4,65
Acidité (°D)	60,63	60,59
E.S.T. (%)	48	42
M.G. (%)	21	22
E.S.D. (%)	27	20
M.G./E.S.T.	0,44	0,52

E.S.T. : extrait sec total ; M.G. : matière grasse ; E.S.D. : extrait sec dégraissé = E.S.T.-M.G. ;
F.Cardon : fromage issu à partir d'une coagulation par l'extrait floral ;
F.Témoin : fromage issu à partir d'une coagulation par une chymosine microbienne.

L'utilisation de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon donne un fromage avec une acidité et une teneur en matière grasse qui sont comparables à celles trouvées dans le fromage emprésuré avec la chymosine microbienne. Ceci d'ailleurs était confirmé par plusieurs auteurs qui ont rapporté dans leurs travaux que l'acidité et le taux de matière grasse des fromages ne dépendent que de la nature et de la composition initiale du lait utilisé pour la fabrication (SOUSA *et* MALACATA, 2002 ; ROSEIRO *et al.*, 2003 ; AQUILANTI, 2011).

Cependant, nous notons une différence dans le taux d'extrait sec total (E.S.T.) entre les deux fromages, il est de 48 g/100g pour le fromage issu de la coagulation par les fleurs de cardon, et de 42 g/100g pour le fromage témoin. Selon ALAIS (1984), le taux de l'extrait sec varie d'un type de fromage à un autre, dans de larges limites, et dépend d'une part de la composition initiale du lait et d'autre part de la manière dont sont effectués la coagulation et l'égouttage. D'après NUNEZ *et al.* (1991), le caillé à base d'extrait de fleurs de cardon sauvages donne, lors du découpage, des graines de caillé de taille réduite en comparaison avec un caillé présuré, ce qui explique l'égouttage particulièrement rapide et qui serait la cause de son extrait sec élevé.

Le rapport Matière Grasse/ Extrait sec total, caractéristique importante des fromages. Il permet d'apprécier d'une façon précise la teneur en matière grasse dans 100g d'extrait sec total (VEISSEYRE, 1975). Nous remarquons que ce rapport est plus faible dans le cas du fromage obtenu par la coagulation avec l'extrait enzymatique des fleurs de cardon comparé à la présure témoin. Ceci a pour cause, entre autre, le taux d'extrait sec total qui est plus élevé dans le fromage en question.

II.5.1.3. Le rendement fromager

Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflète globalement la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage. Il permet donc de juger pour un type de fromage donné si la fabrication a été menée dans de bonnes conditions. Les rendements fromagers obtenus lors de la réalisation des essais sont respectivement : 35,02 et 39,58 pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon et le fromage témoin. Cette différence provenait en partie de la différence de teneur en matière sèche existant entre le caillé obtenu par la chymosine microbienne et celui obtenu par l'extrait des fleurs de cardon : 21,32% et 25,56% respectivement. La différence de 4,56 (39,58–35,02) représente la perte de rendement imputable à l'extrait des fleurs de *Cynara cardunculus*. Ainsi, contre 100 kg de fromage « chymosine » nous obtenons 88,48 kg de fromage « *Cynara cardunculus* » soit une perte d'environ 11,52%. Ce rendement relativement faible de l'extrait des fleurs de cardon a été mentionné par plusieurs auteurs (BARBOSA *et al.*, 1986 ; SOUSA *et MALACATA*, 2002 ; ROSEIRO *et al.*, 2003 ; CLAVERIE *et HERNANDEZ*, 2007).

II.5.1.4. Résultats d'analyses microbiologiques

Les résultats du dénombrement des grands groupes microbiens (Tableaux 13 et 14) montrent que globalement il n'y a pas de différences sensibles dans l'évolution de ces populations pour le cas des deux types de fromages fabriqués, ceci mène à dire que l'extrait des fleurs de cardon n'influe pas sur la qualité microbiologique du fromage.

Tableau 13 : Résultats d'analyses microbiologiques pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Flore totale	IND	IND	IND	IND	27	13	ABS
Levures et moisissure	IND	IND	IND	13	03	ABS	ABS
Coliformes totaux	02	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Coliformes fécaux	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS

Tableau 14 : Résultats d'analyses microbiologiques pour le fromage témoin

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Flore totale	IND	IND	IND	IND	21	14	03
Levures et moisissure	IND	IND	IND	02	03	ABS	ABS
Coliformes totaux	05	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Coliformes fécaux	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS

IND : nombre indénombrable (>30) de germes ;

ABS : absence de germes ; $10^{-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7}$: les dilutions.

II.5.1.5. Résultats de l'analyse sensorielle

Après avoir comparé les deux fromages du point de vue composition physico-chimique et microbiologique, nous avons soumis ces produits à une analyse sensorielle d'une part pour détecter d'éventuelles différences organoleptiques qui peuvent exister entre les deux fromage type Brie, et d'autre part, pour déterminer leurs profils sensoriels. Il s'agit de trois tests sensoriels : un test triangulaire, un test de préférence et un test d'intensité.

II.5.1.5.1. Résultats du test triangulaire

Les résultats sont présentés dans le tableau 15. Pour mettre en évidence la différence entre les deux fromages, nous avons utilisé un test binomial à une queue, le niveau de

signification de la différence est déterminé à l'aide du tableau I de l'annexe n°4 en tenant compte du nombre de dégustateurs ayant donné le résultat juste.

Tableau 15 : Résultats du test triangulaire.

Dégustateurs	Résultats
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	-
7	+
8	-
9	+
Total de bonnes réponses	7

+ : le dégustateur a répondu avec une bonne réponse ;

- : le dégustateur a répondu avec une mauvaise réponse.

Pour un ensemble de 9 dégustateurs et 7 bonnes réponses, nous avons noté une probabilité de 0,008 (tableau I de l'annexe 4), comme il s'agit d'une probabilité inférieure à 0,05, nous concluons que la différence entre les deux fromages est significative au seuil de probabilité égale à 5%, cette différence est due à la nature de l'agent coagulant utilisé.

II.5.1.5.2. Résultats du test de préférence

Ce test permet aux dégustateurs de classer les deux fromages selon leurs préférences, ils attribuent la cote 1 pour le fromage le plus apprécié et la cote 2 pour le moins apprécié. La totalité des dégustateurs classent le fromage issu de la coagulation par les fleurs de cardon au premier rang, le tableau de l'annexe 3, indique une probabilité de 0,004 ce qui signifie qu'au seuil de signification de 5%, le fromage préféré est celui issu de la coagulation par les fleurs de cardon.

II.5.1.5.3. Résultats du test d'intensité

C'est un test qui permet de mettre en évidence les différences existant entre les deux fromages pour chaque attribut, et permet aussi de définir les profils sensoriels. Les résultats du test ANOVA (tableau 16) mentionnent au seuil de probabilité égale à 5%, une différence

significative entre les deux fromages au niveau des attributs de texture. En effet, le fromage témoin a une rugosité plus élevée. Quant au fromage fabriqué avec l'extrait floral, il présente une texture plus lisse et plus moelleuse. Les résultats montrent aussi que ce dernier a un aspect plus crémeux et une meilleure solubilité dans la bouche.

Tableau 16 : Test ANOVA pour les notes¹ des attributs des deux fromages

Attributs	F. Cardosine	F. Agent microbien
Couleur jaune	3,12 ^a	3,11 ^a
Rugosité	3,45 ^a	6,12 ^b
Texture lisse	5,12 ^b	3,37 ^a
Texture moelleuse	6,53 ^b	2,58 ^a
Odeur lactique	5,2 ^a	5,17 ^a
Odeur de levures	1,37 ^a	1,62 ^a
Odeur animale	2,03 ^a	1,97 ^a
Odeur de l'herbe	0,50 ^a	0,50 ^a
Odeur de rance	0,12 ^a	0,25 ^a
Gout salé	4,60 ^a	4,85 ^a
Gout amer	0,70 ^a	0,37 ^a
Gout acide	1,62 ^a	2,37 ^a
Gout d'astringence	0,75 ^a	0,62 ^a
dispersion dans la bouche	3,62 ^a	3,00 ^a
Solubilité dans la bouche	5,42 ^b	3,18 ^a
Aspect crémeux	6,25 ^b	3,37 ^a

^{a,b} : Les valeurs de la même ligne notées avec les mêmes descriptifs ne présentent pas une différence significative au seuil de 5%.

¹ : Les notes sont attribuées sur une échelle de 1-9.

F : Fromage.

II.5.1.5.4. Profil sensoriel

Les profils sensoriels des deux fromages type Brie sont présentés dans la figure 29, les deux profils sont similaires aux profils sensoriels des fromages à pâte molle décrit par RIBADEAU-DUMAS, (1984).

A travers les notes attribuées aux différents descripteurs, nous constatons que les membres du panel de dégustation décrivent le fromage issu de la coagulation par l'extrait des

fleurs de cardon comme suit : c'est un fromage ayant une couleur qui vire vers le jaune, il a une texture lisse et très moelleuse, avec une odeur lactique prononcée, son goût est moyennement salé avec un léger arrière-goût d'amertume non désagréable, et caractérisé par un aspect crémeux et une très bonne solubilité dans la bouche.

D'après ces mêmes dégustateurs, les deux fromages se ressemblent et ont des qualités organoleptiques comparables, cependant, le fromage témoin a une texture moins moelleuse, il est caractérisé par une surface plus rugueuse et moins lisse, il a un aspect pâteux et sa solubilité dans la bouche est inférieure.

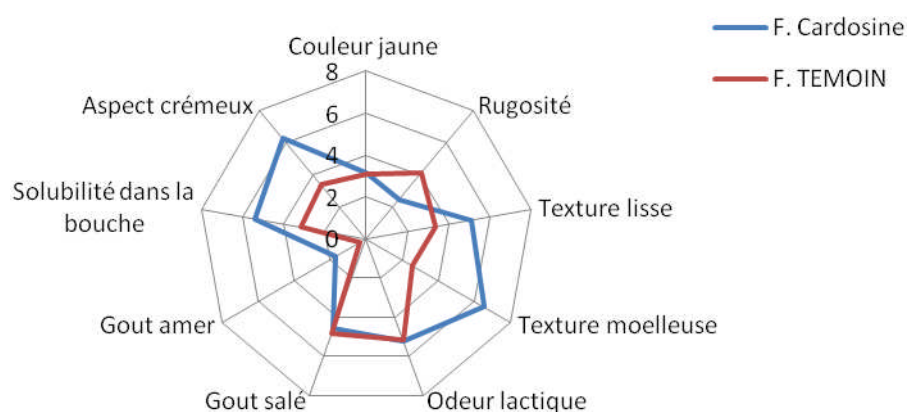


Figure 29 : Profils sensoriels du fromage obtenu avec l'extrait de cardon et du fromage témoin. (F.CARDOSINE : fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon, F.TEMOIN : fromage témoin issu d'une coagulation par une chymosine microbienne).

II.5.2. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert

Des fromages à pâte molle type Camembert ont été fabriqués à l'échelle industrielle, en utilisant l'extrait des fleurs de cardon et la pepsine extraite à partir des proventricules de poulet comme agents coagulants.

Les fromages obtenus (Figure 30) ont été comparés aux fromages témoins produits et commercialisés par la fromagerie, leur fabrication est assurée par un agent coagulant d'origine microbienne.

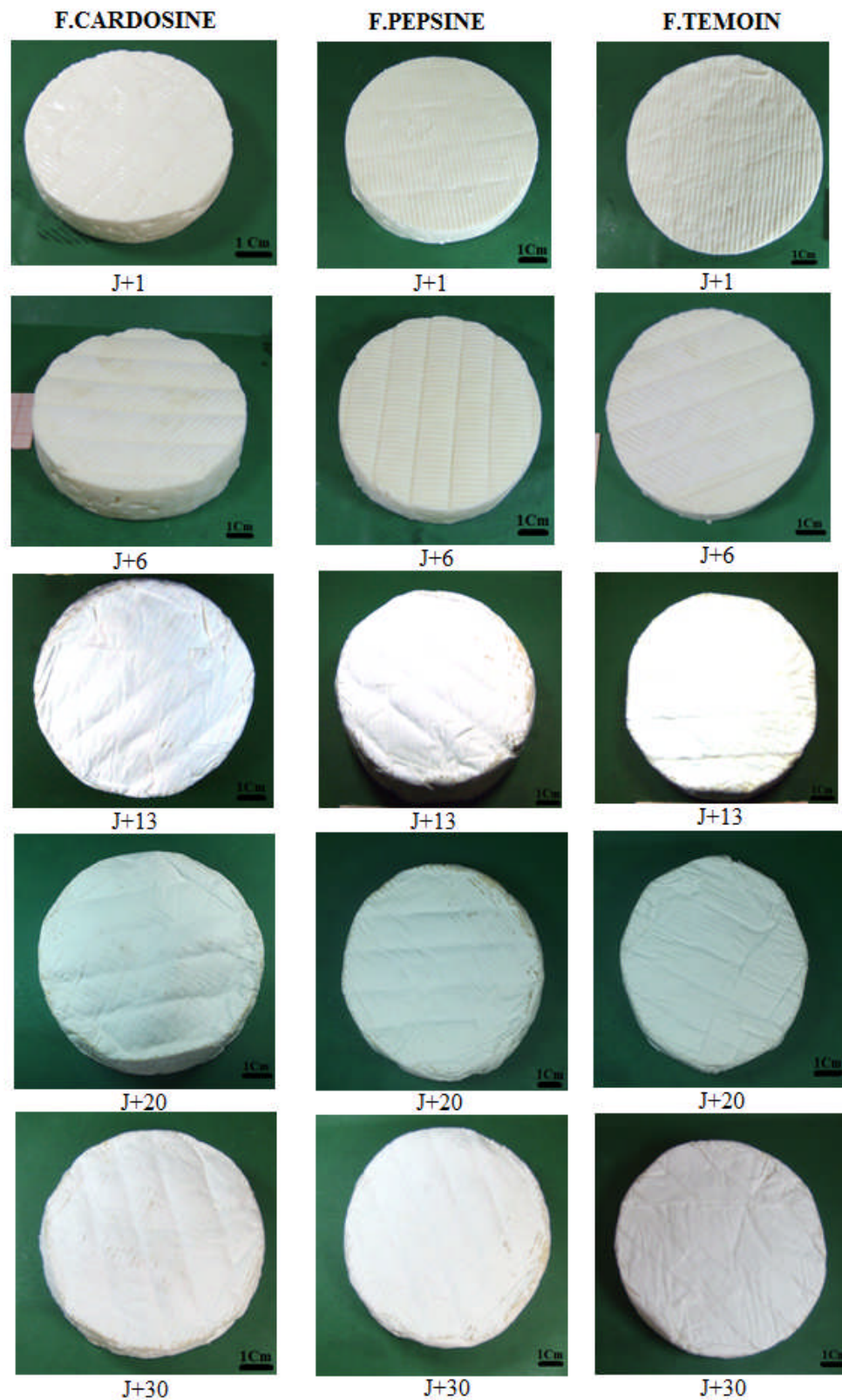


Figure 30 : Les fromages à pâte molle type Camembert obtenus. F.CARDOSINE : fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon ; F.PEPSINE : fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet ; F.TEMOIN : fromage issu de la coagulation par la chymosine microbienne ; Pénétration : la distance de pénétration du cône en mm ; J+1 : 1^{er} jour d'affinage ; J+6 : 6^{ème} jour d'affinage ; J+13 : 13^{ème} jour d'affinage ; J+20 : 20^{ème} jour d'affinage ; J+30 : 30^{ème} jour d'affinage.

II.5.2.1. Evolution de la texture des fromages

Les propriétés texturales des fromages sont déterminées par mesures instrumentales à l'aide d'un pénétromètre. Le test de pénétrométrie est utilisé couramment pour évaluer les propriétés texturales des aliments (WRIGHT *et al.*, 2001; ANAND *et* SCANLON, 2002 ; ABRAHAM *et al.*, 2006 ; VERDIER-METZ *et al.*, 2009).

Les résultats du test de pénétrométrie pour les trois fromages au cours d'affinage sont présentés dans la figure 31, nous remarquons que la distance de pénétration du cône de pénétromètre évolue progressivement durant l'affinage pour tous les fromages, ce qui signifie que la texture devienne moins ferme. Le test de l'analyse de la variance ANOVA, au seuil de 5%, ne révèle pas de différence significative entre les trois fromages lors du premier jour d'affinage (J+1), cependant, à partir du 6^{ème} jour d'affinage (J+6) une différence significative était perçue entre le fromage témoin (issu d'une coagulation par une chymosine d'origine microbienne) et les autres fromages. En effet, la fermeté du fromage témoin est nettement supérieure à celles des autres fromages.

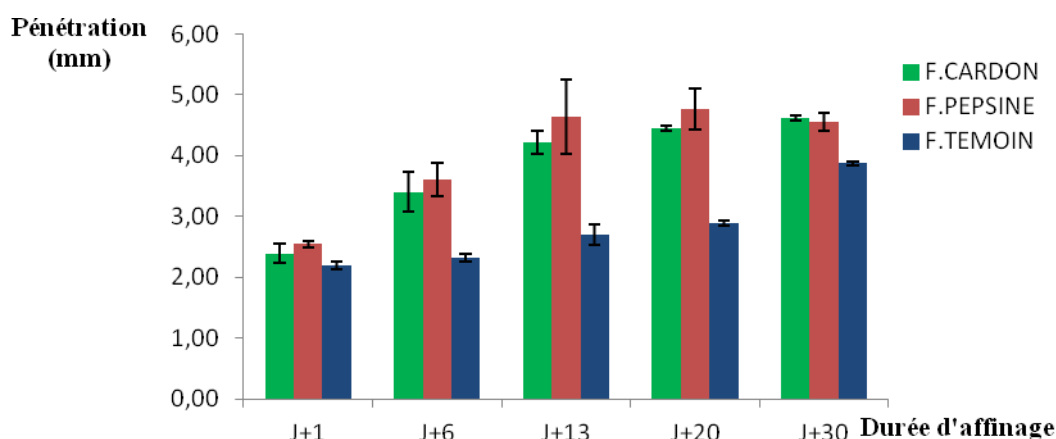


Figure 31: Evolution de la distance de pénétration parcourue par le cône du pénétromètre dans les trois fromages au cours de l'affinage. (F.CARDON : fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon ; F.PEPSINE : fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet ; F.TEMOIN : fromage issu de la coagulation par la chymosine microbienne ; Pénétration : la distance de pénétration du cône en mm ; J+1 : 1^{er} jour d'affinage ; J+6 : 6^{ème} jour d'affinage ; J+13 : 13^{ème} jour d'affinage ; J+20 : 20^{ème} jour d'affinage ; J+30 : 30^{ème} jour d'affinage).

II.5.2.2. L'évolution de la protéolyse

Les caractères organoleptiques des fromages résultent des modifications des composants du caillé au cours de l'affinage (SILVA *et* MALACATA, 2005). La dégradation enzymatique des caséines, pendant la période d'affinage d'un fromage, joue un rôle

déterminant en libérant des composés qui contribuent à donner au fromage sa texture et son arôme caractéristiques (JEANTET *et al.*, 2008).

Dans le but de connaître l'impact des agents coagulants utilisés, nous avons procédé à un suivi qualitatif de la protéolyse lors de l'affinage par électrophorèse UREA-PAGE de la fraction non soluble à pH= 4,6 et à un suivi quantitatif par le dosage des protéines solubles à pH= 4,6.

II.5.2.2.1. Evolution qualitative

l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée UREA-PAGE est une performance technique qui permet l'évaluation de la protéolyse des caséines (PAVIA *et al.*, 2000). En effet, l'appréciation qualitative par le suivi du comportement électrophorétique des principales protéines du fromage (à savoir les caséines) permet de suivre la dégradation enzymatique de ces dernières lors des différents stades d'affinage.

Plusieurs travaux indiquent que l'agent coagulant est le premier intervenant dans la protéolyse lors de l'affinage des fromages. Il attaque préférentiellement la caséine α_{s1} en scindant la liaison (Phe23-Phe24), ensuite, c'est la caséine β qui est hydrolysée (BERTRANT, 1988 ; FOX *et al.*, 1994 ; GERMONVILLE, 2012).

En UREA-PAGE, les caséines majeures migrent suivant l'ordre croissant de leur mobilité comme suit : la caséine β (β -CN), les peptides issus de la dégradation de la caséine β , la caséine α_{s1} (α_{s1} -CN) et enfin, les peptides issus de la dégradation de la caséine α_{s1} : α_{s1} -CN(f102-199) et α_{s1} -CN(f24-199) (FOX *et al.*, 1994 ; MEYER, 2001 ; FALLICO *et al.*, 2005 ; O'SULLIVAN *et al.*, 2005).

Effectivement, les électrophorogrammes obtenus pour les trois échantillons de fromage testés (figures 32, 33 et 34), montrent la présence de trois bandes très intenses lors du premier jour d'affinage (J+1) il s'agit : de la caséine β (β -CN), la caséine α_{s1} (α_{s1} -CN) et le fragment α_{s1} -CN(f24-199) issu de la dégradation de la caséine α_{s1} . Cependant, à partir du 6^{ème} jour d'affinage (J+6) des différences notables sont observées entre la protéolyse ayant lieu avec les différents agents coagulants utilisés.

Pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon, le profil électrophorétique de la fraction d'azote insoluble à pH 4,6 (figure 32), montre une dégradation

de la caséine α_{s1} dès le 6^{ème} jour d'affinage (J+6) ce qui explique la texture moelleuse du fromage. En effet, d'après SILVA *et* MALACATA., (2000), le ramollissement des fromages est dû, principalement, à la dégradation de la caséine α_{s1} . Cependant, la dégradation de la caséine β semble être très lente durant les 20 premiers jours d'affinage. Ce n'est qu'au 30^{ème} jour d'affinage (J+30) que nous observons un début de dégradation de cette fraction.

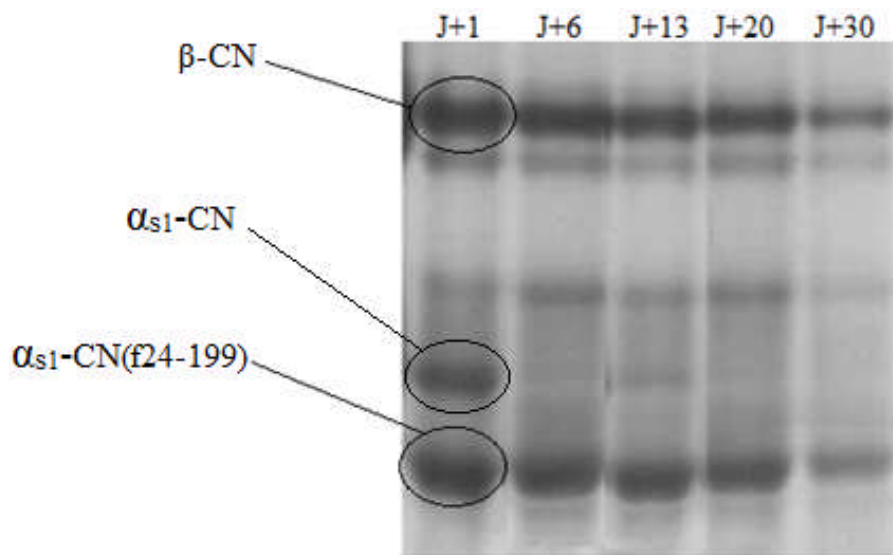


Figure 32: Comportement électrophorétique des protéines du fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon. (β -CN : caséine β ; α_{s1} -CN : caséine α_{s1} ; α_{s1} -CN(f24-199): fragment issu de la dégradation de la caséine α_{s1} . J+1 : 1er jour d'affinage ; J+6 : 6ème jour d'affinage ; J+13 : 13ème jour d'affinage ; J+20 : 20ème jour d'affinage ; J+30 : 30ème jour d'affinage).

Quant au fromage obtenu de la coagulation par la pepsine du poulet, le profil électrophorétique (figure 33) montre, clairement, l'hydrolyse de la caséine α_{s1} et sa disparition dès le 6^{ème} jour d'affinage (J+6). Et en plus du fragment α_{s1} -CN(f24-199) il y'a apparition d'un autre peptide issu de la dégradation de la caséine α_{s1} , il s'agit du fragment α_{s1} -CN(f102-199), ces deux peptides qui vont être dégradés à leur tour plus tard durant l'affinage. Contrairement au fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon, nous remarquons la forte dégradation de la caséine β ce qui indique l'action excessive de la pepsine du poulet. En effet, l'action relativement poussée de la pepsine a été rapportée par certains auteurs (GREEN, 1972 ; FINDLEY *et al.*, 1984 ; EMMON *et* BECKETT, 1990 ; KRAUSE *et al.*, 1998).

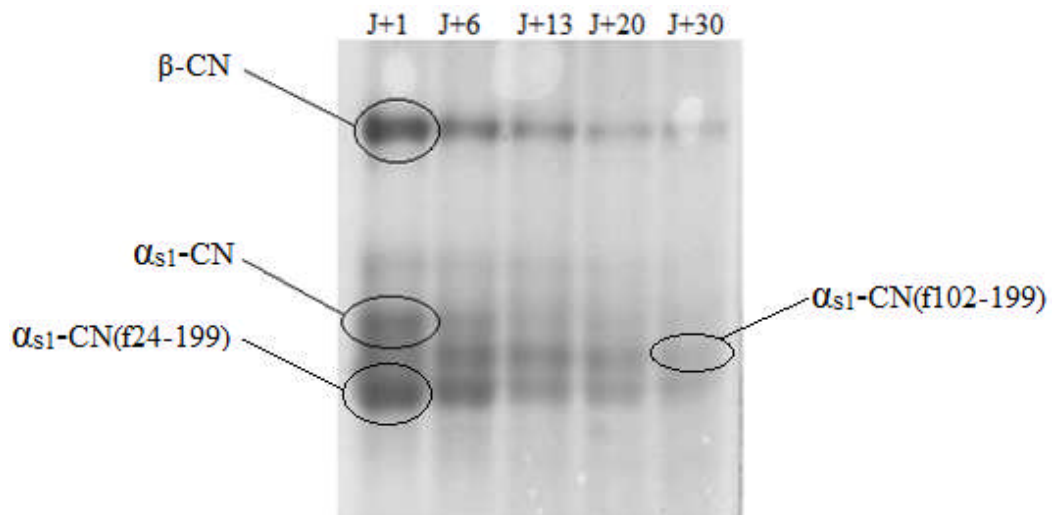


Figure 33: Comportement électrophrétique des protéines du fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet. β -CN : caséine β ; α_{s1} -CN : caséine α_{s1} ; α_{s1} -CN(f24-199) et α_{s1} -CN(f102-199) : fragments issus de la dégradation de la caséine α_{s1} . J+1 : 1^{er} jour d'affinage ; J+6 : 6^{ème} jour d'affinage ; J+13 : 13^{ème} jour d'affinage ; J+20 : 20^{ème} jour d'affinage ; J+30 : 30^{ème} jour d'affinage.

Contrairement aux deux fromages précédents, le fromage témoin (issu d'une coagulation par une chymosine d'origine microbienne) montre une lente dégradation de la caséine α_{s1} , et une stabilité de la caséine β durant les 30 jours du suivi. C'est cette faible activité protéolytique qui explique la fermeté de la pâte et la stabilité de la texture observée lors de l'affinage. En effet, selon GOURSAUD, (1999), les chymosines produites par les micro-organismes ont une grande spécificité et l'évolution de la protéolyse dans les fromages fabriqués avec ces agents coagulant est très ralentis (figure 34).

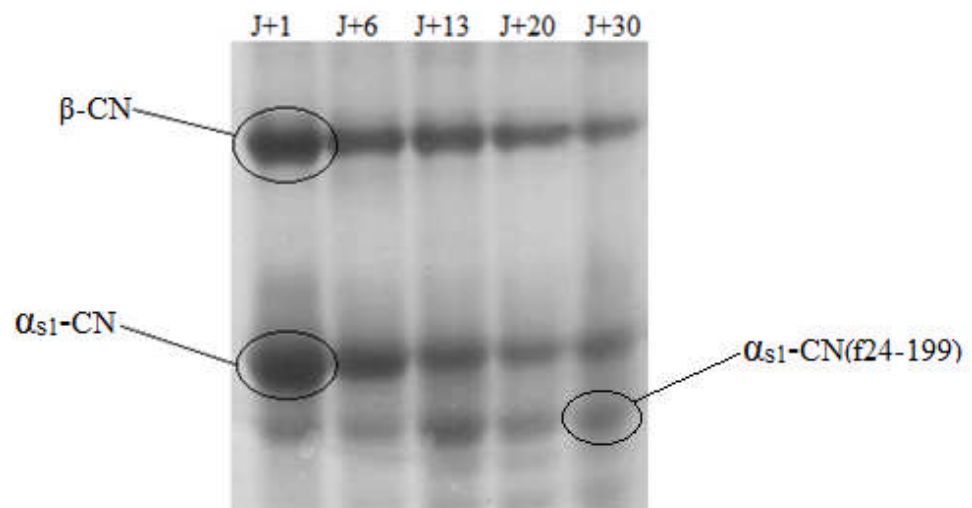


Figure 34: Comportement électrophrétique des protéines du fromage témoin (issu de la coagulation par une chymosine microbienne). β -CN : caséine β ; α_{s1} -CN : caséine α_{s1} ; α_{s1} -CN(f24-199) : fragment issu de la dégradation de la caséine α_{s1} . J+1 : 1^{er} jour d'affinage ; J+6 : 6^{ème} jour d'affinage ; J+13 : 13^{ème} jour d'affinage ; J+20 : 20^{ème} jour d'affinage ; J+30 : 30^{ème} jour d'affinage.

II.5.2.2.2. Evolution quantitative

Parmi les méthodes de suivi de protéolyse figure celle basée sur le dosage des protéines solubles à pH = 4,6 (KUCHROO *et* FOX, 1982). Cette dernière permet de suivre l'évolution de la fraction de l'azote soluble à pH 4,6 par rapport à l'azote total, et qui est souvent utilisée comme un indicateur du degré de maturation des fromages (REVILLE *et* FOX, 1978 ; BYNUM *et* BARBANO, 1985 ; LABORDA *et* RUBIOLLO, 1999 ; GOROSTIZA *et al.*, 2004).

L'évolution du taux des protéines solubles à pH 4,6 par rapport aux protéines totales est présentée par la figure 35. Les résultats obtenus montrent une évolution progressive du rapport protéines solubles / protéines totales (PS/PT) au cours de l'affinage pour les trois fromages. En effet, pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon, ce rapport passe de 7% lors du premier jour d'affinage pour atteindre les 18% au bout du 30^{ème} jour, alors que pour le fromage obtenu de la coagulation par la pepsine du poulet, une protéolyse plus élevée est constatée, le rapport PS/PT pour ce fromage passe de 8% à 27%. Quant au fromage témoin (issu d'une coagulation par une chymosine d'origine microbienne) la protéolyse est moins accentuée, le rapport PS/PT passe de 6% à J+1 pour arriver à 15% au 30^{ème} jour d'affinage.

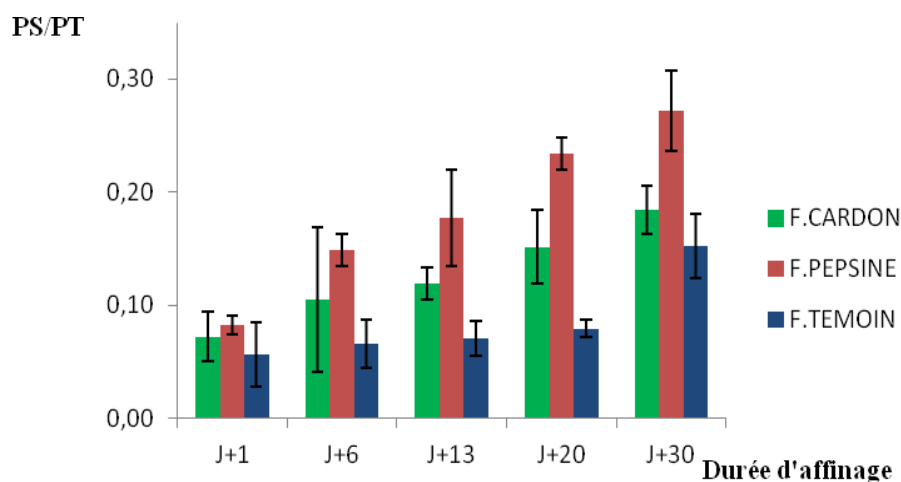


Figure 35: Evolution du taux de protéines solubles à pH = 4,6 par rapport aux protéines totales des différents fromages au cours de l'affinage. (F.CARDON : fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon ; F.PEPSINE : fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet ; F.TEMOIN : fromage issu de la coagulation par la chymosine microbienne ; PS/PT : rapport protéines solubles à pH 4,6/protéines totales ; J+1 : 1^{er} jour d'affinage ; J+6 : 6^{ème} jour d'affinage ; J+13 : 13^{ème} jour d'affinage ; J+20 : 20^{ème} jour d'affinage ; J+30 : 30^{ème} jour d'affinage).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par certains auteurs qui ont signalé une progression de la fraction d'azote soluble à pH = 4,6 par rapport à l'azote total. Pour MICHALSKI *et al.* (2003), le fromage type camembert a un rapport PS/PT qui varie entre 15% et 17%, au bout de 30 jours d'affinage. Il est de l'ordre de 9% à 12% pour SOUSA *et MCSWEENEY*, (2001), et pour O'SULLIVAN *et al.* (2005) ce même rapport passe de 8,1% lors du premier jour d'affinage à 18% lors du 50^{ème} jour. Aussi, GRIPON *et al.* (1976), rapportent que la libération des peptides sous l'action de l'agent coagulant, dans le fromage type camembert, est suffisamment importante et que le taux d'azote soluble peut atteindre 32% de l'azote total, en fin de l'affinage.

II.5.2.3. Evolution des caractéristiques organoleptiques

Selon GALLARDO-ESCAMILLA, (2005), le type de la coagulation du lait influe sur la qualité sensorielle finale du fromage. Une analyse sensorielle a été faite sur les trois fromages fabriqués, afin de suivre l'évolution des caractères sensoriels lors de l'affinage et ainsi voir d'éventuelles différences qui peuvent exister entre les fromages.

Durant cette analyse, nous avons fait appel à deux tests sensoriels, le premier est le test de classement par rang qui a un double objectif : classer les fromages selon la préférence, et savoir si les dégustateurs peuvent apercevoir une différence entre les fromages. Le second est le test d'intensité. Il a pour but de déterminer le profil sensoriel de chacun des fromages et voir la différence entre les descripteurs ou attributs sensoriels.

Les résultats du test de classement par rang montrent au seuil de probabilité de 5% une différence significative entre les trois fromages à partir du 6^{ème} jour d'affinage. Tous les fromages ont été jugés acceptables. Cependant, et durant toute la cinétique : 6^{ème}, 13^{ème}, 20^{ème} et 30^{ème} jour, les dégustateurs ont classé les fromages par l'ordre d'appréciation suivant : le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon était le mieux apprécié, puis le fromage témoin issu de la coagulation par l'agent microbien et le fromage issu de coagulation par la pepsine du poulet était le moins apprécié.

Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA des descripteurs du test d'intensité sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 17 : Les notes¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J = 1 jour

Attributs	F. Cardosine	F. Pepsine	F. Agent microbien
Couleur jaune	2,12 ^a	2,50 ^a	2,00 ^a
Rugosité	4,75 ^a	5,50 ^a	6,12 ^a
Texture lisse	3,12 ^a	2,75 ^a	3,37 ^a
Texture moelleuse	3,87 ^a	3,25 ^a	2,50 ^a
Odeur lactique	5,62 ^a	5,62 ^a	5,37 ^a
Odeur de levures	1,37 ^a	0,87 ^a	1,62 ^a
Odeur animale	2,25 ^a	2,12 ^a	1,37 ^a
Odeur de l'herbe	0,50 ^a	0,37 ^a	0,50 ^a
Odeur de rance	0,12 ^a	0,25 ^a	0,25 ^a
Gout salé	4,50 ^a	5,12 ^a	4,75 ^a
Gout amer	0,50 ^a	1,37 ^a	0,37 ^a
Gout acide	1,62 ^a	2,00 ^a	2,37 ^a
Gout d'astringence	0,75 ^a	0,75 ^a	0,62 ^a
dispersion dans la bouche	3,62 ^a	4,00 ^a	3,00 ^a
Solubilité dans la bouche	3,62 ^a	3,87 ^a	3,18 ^a
Aspect crémeux	2,25 ^a	2,87 ^a	2,37 ^a

Tableau 18 : Les notes¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J = 6 jour

Attributs	F. Cardosine	F. Pepsine	F. Agent microbien
Couleur jaune	3,33 ^a	4,50 ^a	3,41 ^a
Rugosité	3,08 ^a	5,75 ^b	6,16 ^b
Texture lisse	6,42 ^b	2,41 ^a	3,09 ^a
Texture moelleuse	5,56 ^a	4,83 ^a	4,50 ^a
Odeur lactique	5,08 ^a	5,67 ^a	5,33 ^a
Odeur de levures	4,92 ^a	5,08 ^a	4,67 ^a
Odeur animale	0,68 ^a	1,25 ^a	0,83 ^a
Odeur de l'herbe	0,42 ^a	0,58 ^a	0,58 ^a
Odeur de rance	0,50 ^a	0,83 ^a	0,83 ^a
Gout salé	5,42 ^a	5,25 ^a	5,83 ^a
Gout amer	0,75 ^a	4,33 ^b	0,83 ^a
Gout acide	2,68 ^a	3,42 ^a	3,68 ^a
Gout d'astringence	0,33 ^a	1,08 ^a	0,68 ^a
Dispersion dans la bouche	5,17 ^a	4,08 ^a	3,75 ^a
Solubilité dans la bouche	4,58 ^a	5,08 ^a	4,08 ^a
Aspect crémeux	3,17 ^b	1,75 ^a	1,92 ^{ab}

Tableau 19: Les notes¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J= 13 jour

Attributs	F. Cardosine	F. Pepsine	F. Agent microbien
Couleur jaune	4,44 ^a	3,89 ^a	4,33 ^a
Rugosité	2,89 ^a	6,33 ^b	5,66 ^b
Texture lisse	6,22 ^b	2,44 ^a	3,33 ^a
Texture moelleuse	5,66 ^a	4,77 ^a	4,55 ^a
Odeur lactique	4,00 ^a	4,89 ^a	4,44 ^a
Odeur de levures	2,89 ^a	3,78 ^a	4,72 ^a
Odeur animale	1,22 ^a	1,57 ^a	1,11 ^a
Odeur de l'herbe	1,11 ^a	0,89 ^a	1,00 ^a
Odeur de rance	1,00 ^a	1,44 ^a	1,00 ^a
Gout salé	4,33 ^{ab}	5,33 ^b	3,78 ^a
Gout amer	1,44 ^a	6,11 ^b	1,22 ^a
Gout acide	2,78 ^a	4,11 ^a	2,44 ^a
Gout d'astringence	0,78 ^a	2,22 ^a	0,68 ^a
Dispersion dans la bouche	5,78 ^a	4,22 ^a	3,89 ^a
Solubilité dans la bouche	5,68 ^b	3,89 ^{ab}	3,33 ^a
Aspect crémeux	5,89 ^b	2,67 ^a	2,56 ^a

Tableau 20: Les notes¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J= 20 jour

Attributs	F. Cardosine	F. Pepsine	F. Agent microbien
Couleur jaune	5,09 ^a	4,73 ^a	4,64 ^a
Rugosité	2,44 ^a	5,18 ^b	5,91 ^c
Texture lisse	6,46 ^c	3,00 ^a	3,82 ^b
Texture moelleuse	6,36 ^b	4,54 ^a	5,00 ^a
Odeur lactique	5,36 ^a	5,54 ^a	5,63 ^a
Odeur de levures	6,00 ^b	5,45 ^{ab}	4,72 ^a
Odeur animale	3,00 ^b	2,00 ^{ab}	1,54 ^a
Odeur de l'herbe	1,18 ^a	1,18 ^a	0,47 ^a
Odeur de rance	1,54 ^a	1,59 ^a	1,90 ^a
Gout salé	5,45 ^b	4,36 ^a	5,09 ^{ab}
Gout amer	1,81 ^a	6,63 ^b	1,45 ^a
Gout acide	4,09 ^a	4,54 ^a	4,36 ^a
Gout d'astringence	1,36 ^a	4,00 ^b	0,78 ^a
Dispersion dans la bouche	6,18 ^c	2,36 ^a	4,54 ^b
Solubilité dans la bouche	6,63 ^c	5,09 ^b	3,72 ^a
Aspect crémeux	6,54 ^c	2,54 ^a	3,63 ^b

Tableau 21: Les notes¹ des attributs sensoriels attribuées aux différents fromages à J= 30 jour

Attributs	F. Cardosine	F. Pepsine	F. Agent microbien
Couleur jaune	5,44 ^a	5,44 ^a	5,44 ^a
Rugosité	2,44 ^a	4,89 ^c	3,89 ^b
Texture lisse	7,46 ^c	2,11 ^a	5,44 ^b
Texture moelleuse	6,44 ^c	3,11 ^a	5,33 ^b
Odeur lactique	5,00 ^a	5,33 ^a	4,67 ^a
Odeur de levures	4,67 ^a	5,78 ^a	5,00 ^a
Odeur animale	4,11 ^a	5,00 ^a	4,22 ^a
Odeur de l'herbe	0,78 ^a	0,67 ^a	0,67 ^a
Odeur de rance	3,67 ^a	4,00 ^a	3,89 ^a
Gout salé	4,87 ^a	4,67 ^a	4,00 ^a
Gout amer	3,44 ^b	6,67 ^c	1,33 ^a
Gout acide	4,67 ^a	4,44 ^a	4,33 ^a
Gout d'astringence	1,22 ^a	3,78 ^b	1,44 ^a
Dispersion dans la bouche	6,89 ^c	2,89 ^a	5,44 ^b
Solubilité dans la bouche	5,67 ^a	4,89 ^a	5,44 ^a
Aspect crémeux	6,67 ^c	2,11 ^a	5,44 ^b

^{a,b,c}: Les valeurs de la même ligne notées avec les mêmes descriptifs ne présentent pas une différences significative au seuil de 5%.

¹: Les notes sont attribuées sur une échelle de 1-9.

F : Fromage.

Au seuil de probabilité de 5%, les résultats ne montrent aucune différence significative entre les fromages lors du premier jour, cependant, à partir du 6^{ème} jour des différences dans la texture et le goût ont été perçues.

✓ La texture

- Le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon : sa texture semble la mieux appréciée par les dégustateurs, ce fromage se caractérise par une pâte lisse et homogène, ceci peut être expliqué selon NUNEZ *et al.* (1991), par le fait que le caillé, obtenu suite à une coagulation avec l'extrait des fleurs de cardon, donne, après découpage, des grains de caillé de taille très réduite. Il est à remarquer aussi que dès le 6^{ème} jour ce fromage présente la texture la plus molle, et au fur et à mesure qu'on avance durant l'affinage la pâte devient de plus en plus moelleuse. Ce résultat concorde avec ceux obtenus par d'autres auteurs (BARBOSA *et al.*, 1981 ; MACEDO *et al.*, 1993 ; SAMSON, 2002 ; PEREIRA *et al.*, 2008 ; AQUILANTI *et al.*, 2011) qui ont constaté un développement plus rapide de la texture des fromages pendant l'affinage. Ces auteurs suggèrent que cet état est dû à l'activité protéolytique

plus élevée de l'agent coagulant extrait à partir des fleurs de cardon comparé à la présure traditionnelle.

- Le fromage obtenu de la coagulation par la pepsine du poulet : sa texture été la moins appréciée par les dégustateurs. Contrairement au fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon, ce fromage a une pâte moins moelleuse et présente une texture rugueuse, hétérogène et à caractère friable, durant toute la période d'affinage.

- Le fromage témoin : ce fromage se caractérise par une pâte homogène et plus au moins lisse, il présente la texture la plus ferme et la plus stable, en effet, le développement de la texture de ce fromage pendant l'affinage est trop lent, selon CLAVERIE *et* HERNANDEZ, (2007) cette stabilité est due à la faible activité protéolytique que possèdent les chymosines d'origine microbienne.

✓ Le goût

- Le fromage issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon : les dégustateurs ont apprécié son goût, ils l'ont jugé moyennement salé avec un goût acide très acceptable. Cependant, on a observé au 30^{ème} jour un léger arrière-goût d'amertume non désagréable. ROSEIRIO *et al.* (2003) ont mentionné cette amertume dans les fromages fabriqués avec l'extrait des fleurs de cardon, et selon SOUSA *et* MALACATA (2002), des peptides hydrophobes à faibles poids moléculaires (issus d'une protéolyse excessive des caséines du lait) sont responsables de l'amertume des fromages fabriqués avec l'extrait coagulant de *Cynara cardunculus*.

- Le fromage obtenu de la coagulation par la pepsine du poulet : c'est un fromage qui a été jugé moyennement salé, son goût acide était acceptable, cependant il est caractérisé par un arrière-goût d'amertume très prononcé et ceci dès le 6^{ème} jour de fabrication, ceci peut être expliqué par l'activité protéolytique très élevée de la pepsine extraite des proventricules de poulet et son action non spécifique sur les caséines du lait ce qui donne naissance à des peptides hydrophobes de faibles poids moléculaires responsables du goût amer des fromages (LEMIEUX *et* SIMARD, 1991 ; CARRERA *et al.*, 1995). Pour remédier à ce problème, il sera peut être intéressant de diminuer la quantité de pepsine ajoutée au départ ce qui implique un temps de coagulation plus élevé.

- Le fromage témoin (issu d'une coagulation par une chymosine d'origine microbienne) : ce fromage a montré une grande stabilité dans le goût durant toute la période du suivi, en effet, il a été qualifié par un fromage moyennement salé et ayant un goût acide optimum, et l'arrière-goût d'amertume était absent même au 30^{ème} jour de fabrication.

✓ **La couleur et l'odeur**

Sur le plan couleur et odeur, aucune différence significative au seuil de probabilité de 5% n'a été observée au cours de toute la période du suivi.

Ainsi, les paramètres couleur, texture, odeur et goût de tous les échantillons répondent aux exigences requises pour les fromages à pâte molle type « Camembert ». Par ailleurs, nous remarquons que l'ensemble des lots de fromages fabriqués avec les différents agents coagulants (extrait des fleurs de cardon, pepsine de poulet et chymosine microbienne) présentent des qualités organoleptiques comparables et appréciables par le jury dégustation.

Conclusion

Conclusion

Cette étude entre dans le cadre des travaux menés par l'équipe T.E.P.A. portant sur la recherche de potentiels succédanés de présure. À travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à la possibilité de substituer la présure par des protéases extraites à partir des fleurs de cardon. L'extrait en question est très anciennement employé dans la fabrication des fromages traditionnels Algériens.

L'objectif de ce travail est de mieux connaître l'agent coagulant de cardon et de voir la possibilité de son utilisation dans l'industrie fromagère. Pour atteindre cet objectif, notre travail a porté sur l'extraction de l'agent coagulant de cardon, la caractérisation de l'extrait obtenu et l'évaluation de son activité coagulante et protéolytique par comparaison à la présure et à la pepsine de poulet, En outre, la caractérisation du coagulum obtenu avec l'extrait des fleurs de cardon par l'estimation des types des interactions impliquées dans la formation et le maintien du gel par comparaison à ceux obtenus avec la présure et la pepsine du poulet. Et enfin, la réalisation des essais de fabrication industrielle de fromages à pâtes molles type Brie et Camembert au sein de deux fromageries différentes, et voir ainsi l'effet de notre extrait sur le rendement fromager, la protéolyse et les qualités organoleptiques des fromages. Ceci est depuis l'étape de coagulation jusqu'à l'affinage, par comparaison à la pepsine de poulet et aux agents coagulants (des chymosines d'origine microbienne) utilisés par les deux unités de production.

Le diagramme d'extraction que nous avons appliqué nous a permis d'avoir un extrait ayant les caractéristiques suivantes :

- Le profil électrophorétique montre que les enzymes présentes majoritairement dans l'extrait sont les cardosines A et B ;
- Une force coagulante nettement inférieure à celle de la présure et de la pepsine de poulet. En effet, en 40 minutes, 10g de fleurs sèches coagule 76,37 litres de lait, tandis que la même quantité de proventricule de poulet et de caillette de veau peuvent coaguler respectivement environ 125 et 830 litres ;
- Le pH optimal de coagulation est similaire à celui de la présure et de la pepsine de poulet (pH= 5), l'optimum d'activité est obtenu à une température égale à 60°C, nettement supérieure à celles de la présure et la pepsine de poulet (35°C et 50°C respectivement), et

l'adjonction d'une quantité de 0,02 mole de CaCl_2 à un litre de lait peut induire une amélioration de l'activité de l'extrait.

- L'activité protéolytique générale de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon est environ le double de celle de la présure.

L'approche des interactions par l'utilisation des agents dissociants, nous a montré l'importance des liaisons hydrophobes, hydrogène et des ponts calciques dans la formation et le maintien du gel issu de la coagulation par l'extrait des fleurs de cardon. Les interactions hydrophobes, dissociées par le SDS, sont moins importantes dans le gel obtenu avec l'extrait de cardon par comparaison à ceux obtenus avec la présure et la pepsine de poulet, par contre, les liaisons hydrogènes, dissociées par l'urée, semblent contribuer d'une façon plus importante dans le gel cardon. Quant aux ponts calciques, dissociés par l'EDTA, ils semblent être similaires dans les trois gels.

Suite aux essais de fabrication des fromages type pâte molle, menés à l'échelle industrielle, nous avons constaté que les fromages obtenus en utilisant l'extrait des fleurs de cardon, comme agent coagulant, présentent une qualité organoleptique meilleure que celles des fromages pepsine et des fromages témoins commercialisés par les fromageries, Toutefois, un rendement fromager relativement faible est noté. En effet, l'application de l'extrait de cardon a engendré une perte d'environ 11,52%. Ainsi, ces résultats laissent présager que l'extrait floral de cardon peut être utilisé comme succédané de présure pour l'élaboration des fromages.

L'apport de cette étude est non négligeable, car, les résultats obtenus mettent en évidence la possibilité d'obtention d'un extrait brut coagulant le lait, à partir d'une matière première non exploitée jusque-là en Algérie. Ainsi, et pour des impératifs économiques et technologiques, l'extrait des fleurs de cardon doit être pris en considération.

Ce travail a donné lieu à deux productions scientifiques (annexe 5) sous forme de communications affichées :

ZIKIOU A., BENYAHIA-KRID F., & ZIDOUNE M.N., Caractérisation d'un extrait obtenu à partir des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*), et possibilité de son utilisation comme succédané de présure en industrie fromagère. Premières Journées Scientifiques de l'Agroalimentaire : 24, 25 et 26 mai 2013 Sousse- Tunisie.

ZIKIOU A., NAMOUS H., BOUREKOUA H. *et* ZIDOUNE M.N. Essay of manufacture of a soft cheese using *Cynara cardunculus* flowers extract as a coagulant agent. The 4th Internationalworkshop On Industrial Biotechnology IWIB 2013: Tlemcen 10-11 April, 2013.

Néanmoins, les conclusions nées de cette étude, il est intéressant de poursuivre ce travail, ainsi, de nombreuses perspectives visant à le compléter s'ouvrent à nous, tel que :

- L'étude des différents facteurs influençant l'extraction de l'agent coagulant à partir des fleurs de cardon afin d'optimiser le diagramme d'extraction ;
- L'étude des différentes méthodes de conservation, afin de déterminer le meilleur moyen pour conserver l'extrait floral ;
- Il est intéressant d'essayer d'appliquer l'extrait des fleurs de cardon pour la fabrication d'autres types de fromages pour mettre en évidence son effet sur la qualité du produit ;
- Enfin, pour permettre une utilisation efficace de l'extrait coagulant des fleurs de cardon dans l'industrie fromagère, sans désavantage, il serait intéressant de trouver un moyen pour promouvoir un meilleur rendement fromager.

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.

ABRAHAM S., CACHONA R., COLASC B., FERONA G., DECONINCKA J., 2006. Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *International Dairy Journal*.

ADOUI F., 2007. Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir du proventricules de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.

AGUILAR C.F., CRONIN N.B., BADASSO M., DREYER T., NEWMAN M.P., COOPER J.B., HOOVER D.J., WOOD S.P., JOHNSON M.S., BLUNDELL T., 1997. The three-dimensional structure at 2.4Å resolution of glycosylated proteinase A from the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.*, 267, 899–915.

ALAIS C., 1984. Science du lait. Principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC, 4^{ème} édition, 814p.

ALAM S.I., DUBE S., REDDY G.S.N., BHATTACHARYA B.K., SHIVAJI S., SINGH L., 2005. Purification and characterization of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 824–831.

ANAND A., and SCANLON M.G., 2002. Dimensional effects on the prediction of texture-related mechanical properties of foods by indentation. *Transactions of the ASAE*, 45, 1045-1050.

ANDREWS A.T., 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on the caseins. *J. Dairy Res.* 50 : 45–55.

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, 651–659.

ARECES L.B., BONINO M.B.I., PARRY M.A.A., FRAILE E.R., FERNANDEZ H.M., CASCONO O., 1992. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 37, pp: 283-294.

ARIMA K., YU J., IWASAKI S., 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus*. Methods in Enzymology, 19, pp: 446–460.

ARUNCHALAM K., HAARD N.F., 1985. Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). Comp. Biochem. Physiol., 80, 467- 473.

BANGA-MBOKO H., GODEAU J.M., DRION P.V., EL AMIRI B., DRION V., PERENYI Z., SOUSA N.M., BECKERS J.F., 2002. Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme bio marqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc. Ann. Méd. Vét., 146, 339-346.

BARBOSA M., CORRADINI C., BATTISTOTTI B., 1986. Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus* L.). Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 32, 203–221.

BARRETT A.J., RAWLILGS N.D., WOESSLER J.F., 1998. Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press, Londres, 1666p.

BARROS R.M., MALCATA F.X., 2006. Molecular characterization of peptides released from beta- lactoglobulin and alpha-lactalbumin via cardosins A and B. J Dairy Sci., 89, pp:483- 494.

BAUER W.J., BADOUD R., LOLIGER J., 2010. Sciences et technologies des aliments. Ed. ALAIN ETOURNAUD, pp : 539-562.

BAYER E., BUTTLER K.P., FINKINZELLER X., 1990. Guide de la flore méditerranéenne. Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. Ed. Neufchatel, Suisse, 287p.

BELITZ H.D. et GROSCH W., 1987. Food Chemistry. Ed. Springer-Verlag, 992 p.

BENCINI R. 2002. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 82, 705–719.

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.

- BERNAHRD S.A., 1969. Structure et fonction des enzymes. *Ed science université d'Oregon*, 456p.
- BERRIDGE, N. J. 1955. Purification and assay of rennin In: *Methods in enzymology*, Acad.Press Inc., New York ,V. 2, p. 69-77, 987p.
- BERTRAND F. 1988. Le fromage grand œuvre des microbes. *Revue générale de froid*, vol 78, pp : 519-527.
- BOHAK, Z. 1969. Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin *J. biological chemistry*. Vol. 244, N°.17: p.4638-4648.
- BONNIER G., 1927. Flore complète de France, Suisse et Belgique. *Ed. E.Orlhac*, Paris, 675p.
- BOUGHELLOUT H., 2007. Coagulation du lait par la pepsine du poulet. *Mémoire magister*, université Mentouri constantine, 69p.
- BOURGEOIS C., LEVEAU J. Y., 1991. *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Techniques et documentation ; Lavoisier, Paris. pp :
- BREWER P., HELBIG N., HAARD N.F., 1984. Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. *Can. Int. Food Sci. and Technol. J.*, 17, 38 – 43.
- BRULE G., 1996. Adaptation des laits aux contraintes technologiques. *In : CREAL. Quel(s) lait(s) pour demain*. ARILAIT-RECHERCHE, Paris, pp: 39-46.
- BRULE G., LENOIR J., et REMEUF, F. 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait. *In Le fromage*. ECK A., et GILLIS J.-C. Lavoisier, Tec & Doc. Paris. pp :7-39.
- BYNUM O.G. and BARBANO D.M., 1985. Whole Milk Reverse Osmosis Retentates for Cheddar Cheese Manufacture: Chemical Changes During Aging. *J. Dairy Sci.* vol. 68, 1-10.
- CAMPOS R., 1990. Chemical characterization of proteinases extracted from wild thistle *Cynara cardunculus L.* *food chemistry*, 35, 89-97.
- CARRERA E., GAYA P., MEDINA M., NUNEZ M., 1995. Formation of hydrophobic peptides during the manufacture of cheese from ewe, goat and cow milk. Production and utilization of ewe and goat milk. *Proceeding of the IDF. CIRVAL*, pp: 191-193.

CATTANEO T.M.P., NIGRO F., MESSINA G., GIANGIACOMO R., 1994. Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, 269–272.

CAVALCANTI M.T.H., TEIXEIRA M.F.S., LIMA FILHO J.L., AND PORTO A.L.F., 2004. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresource Techn.*, 93, 29-35.

CAYOT P., et LORIENT, D., 1998. Structures et techno-fonctions des protéines du lait. *Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris*, 363 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.

CHANNE P.S., SHEWALE J.G., 1998. Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 11-15.

Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, (17): 1393–1400.

CHAZARRA S., SIDRACH L., LOPEZ-MOLINA D. & RODRIGUEZ-LOPEZ J.N., 2007.

CHAZARRA S., SIDRACH L., LOPEZ-MOLINA D., RODRIGUEZ-LOPEZ J.N., 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393–1400.

CHEFTEL J.C., CUQ J.L. LORIENT D., 1985. Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques. *Tec et Doc. Lavoisier*, pp: 20-35.

CHRISTEN C., VIRASORO E., 1935. Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le lait*, 144-145, 354-363.

CHWEN-JEN S., LAN-ANH P.T., ING-LUNG S., 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 85–91.

CLAVERIE-MARTÍN F., HERNÁNDEZ M. C., 2007. Aspartic proteases used in cheese making in POLAINA J. et MACCABE A.P., industrial enzymes, pp: 207-219.

COOPER J.B., KHAN G., TAYLOR G., TICKLE I.J., BLUNDELL T. 1990. X-ray analysis of aspartic proteinases. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 214, 199–222.

CORDEIRO M.C., PAIS M.S., BRODELIUS P.E., 1994. Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia plantarum*, 92, 645-653.

COSTE H., 1983. Flore descriptive et illustrée de la France, la Corse et des contrées limitrophes. Librairie scientifique et technique A. Blanchard, Paris, 627p.

CREAMER L.K., 2002. Casein nomenclature, structure and association properties. *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier science publishers, pp: 1895-1902.

DALGLEISH D.G. 1998. Casein micelles as colloids : Surface, structure and stabilities. *J Dairy Sci.* 81: 3013-3018.

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., HORNE D.S., LAW A.J.R., 1989. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, 991, 383-387.

DAMERVAL C., VIENNE D., ZIVY M., TARROUX P. ET VINCENS P., 1993. Electrophorèse bidimensionnelle des protéines, *Biofutur*. 123 : 3-10.

DAVIES D.R., 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 19, 189–215.

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.

DEBRY G., 2001. Lait ; nutrition et santé. *Ed. Tec & DOC*, Lavoisier, Paris ; pp: 5-35.

DESMAZEAUD M., SPINLER E., 1997. Lait et produits laitiers in LARRETA- GARDE V. *Enzymes en agroalimentaires*. *Ed. Tech & Doc*, Lavoisier.

ECK A., GILLIS J., 1997. Le fromage: de la science a l'assurance qualité. *Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp : 7-39.*

EGITO A.S., GIRARDET J.M., LAGUNA L.E., POIRSON C., MOLLE D., MICLO L., HUMBERT G., GAILLARD J.L., 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal, 17, 816–825.*

EMMON D.B. and BECKETT D.C., 1990. Milk clotting enzymes. 1. Proteolysis during chese making in rela4ion to losses of yield. *J Dairy Sci. 73: 2007-2015.*

ERNSTROM C.A., 1983. Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry *in* WEBB B.H., JOHNSON AH., ALFORD J.A. The Avi Publishing company. 2nd Edition. PP: 663-718.

ESAWY M.A., COMBET-BLANC Y., 2006. Immobilization of *Bacillus licheniformis* 5A1 milk-clotting enzyme and characterization of its enzyme properties. *World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 197–200.*

FALLICO V., McSWEENEY P.L.H., HORNE J., PEDILIGGIERI C., HANNON J.A., CARPINO S. and LICITRA G., 2005. Evaluation of bitterness in RAGOSANO cheese, *J. Dairy Sci. 88: 1288-1300.*

FELIX D. & STRIGLER F., 1998. Evaluation sensorielle : manuel méthodologique. Lavoisier, Paris.

FERNÁNDEZ-GARCÍA E., IMHOF M., SCHLICHTHERLE-CERNY H., BOSSET J.O., NUÑEZ M., 2008. Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal, 18, 147-157.*

FIGUEIREDO R., DUARTE P., PEREIRA S., PISSARRA J., 2006. The embryo sac of *Cynara cardunculus*: ultrastructure of the development and localisation of the aspartic proteinase cardosin B. *Sex Plant Reprod, 19: 93–101*

FIGUEIREDO R., DUARTE P., PREIRA S., PISSARA J., 2006. The embryo sac of *Cynara cardunculus*: ultrastructure of the development and localization of the aspartic proteinase cardosin B. *Sex Plant Reprod.*, 19, 93-101.

FINDLEY C.I., STANLEY D.W. & EMMONS D.B. 1984. Chicken pepsin as rennet substitute. *Can. Int. Food Sci. Technol. J.*, 17(2), pp.97-101.

FOLTMANN B., 1992. Chymosin : a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 210, 65–79.

FOX P.F., 1989. The milk protein system in *Developpements in dairy chemistry ; Functional milk proteins*. Elsevier science publishers, pp: 1-53.

FOX P.F., Mc SWEENEY P. L. H., 2003. *Advances in Dairy Chemistry, Proteins*, vol.1, 3rd ed., pp: 277–310.

FOX P.F., SINGH T.K., and McSWEENEY P.L.H., 1994. *Protéolysis in chees during ripening*, the royal society of chemistry, 150, pp: 1-31.

FRAZAO C., BENTO I., COSTA J., SOARES C.M., VERÍSSIMO P., FARO C., PIRES E., COOPER J., LARRONDO M.A., 1999. Crystal structure of cardosin A, a glycosilated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *J. Biol. Chem.* 274, 27694–27701.

FREDOT E., 2005. *Connaissance des aliments bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*. Ed. Tec & Doc Lavoisier. 424p.

GALLARDO-ESCAMILLA F.J., KELLY A.L., DELAHUNTY C.M., 2005. Sensory Characteristics and Related Volatile Flavor Compound Profiles of Different Types of Whey J. *Dairy Sci.* 88:2689–2699.

GARFIN D.E., 2003. Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, pp: 263-272.

GAUCHERON F., FAMELART M.H., MARIETTE F., RAULOT K., MICHEL F., LE GRAET Y., 1997. Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chem.*; 59:439–447.

GENIN N., RENÉ F., et CORRIEU G., 1996. A method for on-line détermination of residual water content and sublimation end-point during freeze-drying (Une méthode de détermination en ligne de la teneur en eau résiduelle et de l'instant de fin de sublimation pendant la lyophilisation), *Chemical Engineering and Processing*, 35, pp : 255-263.

GERMONVILLE A., 2012. Agents coagulants. *Ed. technique de l'ingénieur*. Paris, 12p.

GILLILAND G.L., WINBORNE E.L., NACHMAN J., WLODAWER A., 1990. The three dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins*, 8, 82–101.

GORDIN S., ROSENTHAL I., 1978. Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *J. Food Protection*, 41, 684-

GOROSTIZA A., CICHOSCKI A.J., VALDUGA A.T., VALDUGA E., BERNARDO A. and FRESNO J.M., 2004. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry*. 85 : 407-414.

GOURSAUD J., 1999. Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière *in* SCRIBAN R. *Biotechnologies*, 5^{ème} ed., pp: 365 – 401.

GREEN M. L., 1972. Assessment of swine , bovine and chicken pepsins as substitutes for Cheddar cheese making. . *J. Dairy Res.*, 39, pp: 421-427.

GREEN M.L., STACKPOOLE A., 1975. The preparation and assesment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase-swine pepsine mixture for Cheeddar cheesemaking. *J. Dairy res.*, 42: 297 – 312.

GRIPON J.C .DEZMAZEAUD M.J.LE BARS D. BERGERE J.L., 1976. Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus Iacits*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicollum* during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 60, 1532-1538.

GRISVARD P., CHAUDUN V., 1964. Le bon jardinier 2, encyclopédie horticole, la maison rustique, Paris, 1667p.

GUIRAUD J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. DUNOD, Paris, 652 p.

- HAARD N.F., 1994. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aquat. Food Product Technol.*, 1, 17-35.
- HANNO R., LEHMANN E., DOLLE K.H., 1991. Centrifuges for milk clarification and bacteria removal. Technical scientific documentation, second edition, 12, pp: 19-29.
- HASHEM A.M., 1999. Optimization of milk clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour Technol.*, 70, 203–207.
- HEIMGARTNER U., PIETRZAK M., GEERSTSEN R., BRODELIUS P., DA SILVA FUGUEIREDO A.C., PAIS M.S.S., 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1405.
- HOLT C., 1992. Structure and Stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.*, 43, 63-150.
- HORNE D.S. 2002. Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Sci.*, 7, 456–461.
- HSIEH J.F. et PAN P.H., 2012. Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin ; *J. Agric. Food Chem.*; 60:2039-2045.
- ISO 3433, 2002. Fromages -Détermination de la teneur en matière Grasse- Méthode acidobutyrométrique, International Organization of Standardization.
- J., 2005. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, vol. 66, 41-49.
- JAHANDIER E., 1931. Catalogue des plantes du Maroc. Imp. Minevera, Alger, 1181p.
- JAMES M.N.G., 2004. Catalytic pathway of aspartic peptidases in BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., WOESSNER J.F., *Handbook of Proteolytic Enzymes. ed. Elsevier, London, pp: 12–19.*
- JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P., BRULE G., 2008. Sciences des aliments. vol.2. *Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 449p.*
- KEENAN T.W., PATTON S., 1995. The milk lipid globule membrane. *In* : JENSEN R.G., *Handbook of milk composition. Academic Press, San Diego, pp: 5-50.*

KEIM S., HINRICHS J., 2003. Rheological characteristics of milk protein gels – influence of stabilising bonds. 3rd International Symposium on food rheology and structure.

KRAUSE W., PATZSH M., HASSAN Z.M.R. and HAUFE T.,(1998). Substrate and binding specificity of aspartic protease with milk clotting properties. *Nahrung*, 42, pp: 162-165.

KUCHROO C.N. and FOX P.F., 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, vol. 37, pp: 331–335.

LABORDA M.A. and RUBIOLO A.C., 1999. Proteolysis of fynbo cheese salted with NaCl/KCl and ripened at two temperatures. *Journal Of Food Science*. 64 (1) : 33-36.

LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

LAGAUE A., FERNANDEZ L., CUQ J.L. & MARCHESSEAU S., 2004. Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International Dairy Journal*, 14, 1033–1039.

LAMAS E.M., BARROS R.M., BALCÃO V.M., MALCATA F.X., 2001. Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme Microb Technol.*, 28, pp:642-652.

LEFEBVRE-CASES E., GASTALDI E., VIDAL V., MARCHESSEAU S., LAGAUE A., CUQ J.L., TARODO DE LA FUENTE B., 1998. Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *J. Dairy Sci.*; 81: 932-938.

LEFEBVRE-CASES E., GASTALDI E., VIDAL V., MARCHESSEAU S., LAGAUE A., CUQ J.L., TARODO DE LA FUENTE B., 1998. Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *J. Dairy Sci.*, 81, 932-938.

LEMIEUX L., SIMARD R.E., 1991. Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait*. 71, pp: 599-636.

LENOIR J., REMEUF F., SCHNEID N., 1997. L'aptitude du lait a la coagulation par la présure. In: *Le Fromage*, 3^{ème} édition, Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp: 229-256.

LEVIEUX D., 1999. Le colostrum, un lait particulièrement riche en nombreux composants : peut on en déceler la présence dans les livraisons de lait de vache. *Le lait*, 79: 465-488.

LIBOUGA D.G., VERCAIGNE-MARKO D., DJANGAL S. L., I. CHOUKAMBOU, EBANGI A.L., M. OMBIONYO, BEKA R.G., ABOUBAKAR T.M., GUILLOCHON D., 2006. Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicultura*, 24, pp : 229-238.

LO PIERO A.R., PETRONE G., PUGLISI I., 2002. Characterization of «lettucine », a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 2439–2443.

LOPES A., TEIXEIRA G., LIBERATO M.C., PAIS M.S., CLEMENTE A., 1998. New vegetal sources of milk clotting enzymes. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, 83, 181 p.

LOVISI P., JOLIVET P., JAGIC F., DALGLEISH D., CHARDOT T., 2003. A protein kinase is located in the micellar fraction of fresh pasteurized skimmed farm milk. *J. Dairy Sci.*, 86, 1147-1156.

LOW Y.H., AGBOOLA S., ZHAO J., LIM M.Y., 2006. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*, 16, 335-343.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

LUCEY J.A., 2002. Rennet coagulation of milk *in* ROGINSKI H., FUQUAY J. FOX P. *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier, pp:286-293.

LUCEY J.A., JOHNSON M.E., HORNE D.S., 2003. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.*, 86, 2725-2743.

LUCEY J.A., SINGH H., 1998. Formation and physical properties of acid milk gels. *Food research international*, 30, 7, 529-542.

LUQUET F.M., 1985. Les produits laitiers, transformation, transformation et technologie. *Ed. Technique et Documentation Lavoisier*. Tome 2, 633p.

MACEDO A., MALCATA F.X., OLIVEIRA J.C., 1993. The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.

MACEDO I.Q., FARO C.J., PIRES E.M., 1996. Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1537–1540.

MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G., 2000. *Initiation à la technologie fromagère*. Tec & Doc Lavoisier. pp : 1-21.

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.

MARTIN P., RAYMOND M.N., BRICAS E., RIBADEAU DUMAS B., 1980. Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor Miehei* acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 612, 410-420.

MARTINS A.P.L., VASCONCELOS M.M.P., SOUSA R.B., 1996. Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*, 76, 473–477.

MATHIEU J., 1998. *Initiation a la physicochimie du lait*. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 220p.

MENNANE Z., KHEDID K., ZINEDINE A., LAGZOULI M., OUHSSINE M., ELYACHIOUI M., 2007. Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from raw cow's milk. *World J Dairy Food Sci*, 2, 23–27.

MEYER H.K., 2001. Bitterness in processed cheese caused by an over dose of a specific emulsifying agent? *International dairy journal*. 11: 533-542.

MICHAEL ESKIN N.A., 1990. *Biochemistry of food*. 2nd edition. Academic press.

MICHALSKI M., GASSI J., FAMELART M., LECONTE N., CAMIER B., MICHEL E. and BRIARD V., 2003. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Le Lait*. 83 : 131-143.

- MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY U.K., GROVER S., BATISH V.K., 1999. Bovine chymosin : Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.*, 17, 205–217.
- MOLL M., MOLL N., 1998. Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. *Ed. Dunod*, Paris, 218p.
- MOUZALI L., 2001. Extraction et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (*Cynara cardunculus*). Mémoire de magister. Institut national agronomique. 86p.
- NAJERA A.I., RENOBALLES M., AND BARRON L.R., 2003. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : a multifactorial study. *Food Chem.*, 80 : 345-352.
- NEWMAN M., SAFRO M., FRAZAO C., KHAN G., ZDANOV A., TICKLE I.J., BLUNDELL T.L., ANDREEVA N., 1991. X-ray analyses of aspartic proteinases. IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J. Mol. Biol.*, 221, 1295–1309.
- NOBLE J.E., et BAILEY M.J.A., 2009. Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463, pp: 73-94.
- NODA M., MURAKAMI K., 1981. Studies of proteinases from the digestive organs of sardine. Purification and characterization of two acid proteases from the stomach. *Biochem. Biophys. Acta.*, 658, 27-34.
- NOUANI A., DAKO E., MORSLI A., BELHAMICHE N., BELBRAOUE S., 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.
- NUNEZ M., FERNANDEZ DEL POZO B., ASUUNCIA M.A., RODRIGUEZ M., GAYA P., MEDINA M., 1991. Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, theological and sensory characteristics of La serena cheese. *Journal Dairy Research*, Vol.58, pp:511-519.

NUNGARAY A.J., LEGOFFIC F., 1996. Etude d'une lipase hépatique et de la pepsine d'un requin benthique en vue de la valorisation de ses viscères. Utilisation des pyridines photo activables pour l'immobilisation de protéines sur membranes. INIST-CNRS, Travaux universitaires, Univ.de Paris06, Paris, Fr.

O'SULLIVAN N.A., SOUSA M.J., D. O'GRADY-WALSH, T. UNIACKE, A.L. KELLY and McSWEENEY P.L.H., 2005. Ripening of Camembert-type cheese made from caprine milk using calf rennet or kid rennet as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 58, pp: 13-18.

OLSON N.F., 1995. Cheese *in* Enzymes, Biomass, Food & Feed, Biotechnology,

ONER M.D., AKAR B., 1993. Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilisation in Gaziantep cheese production. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 26, 318-321.

OUANEZAR M., GUYOMARC'H F., BOUCHOUX A., 2012. AFM Imaging of Milk Casein Micelles: Evidence for Structural Rearrangement upon Acidification. *Langmuir* ; 28: 4915–4919.

PARK H., YAMANAKA N., MIKKONEN A., KUSAKABE I., KOBAYASHI H., 2000. Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology*.

PAVIA M., TRUJILLO A. J., GUAMIS B. and FERRAGUT V., 2000. Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *J. of Dairy Sci.*vol 83: pp: 1441–1447.

PELLISSIER J.P., 1984. Protéolyse des caséines. *Sciences des Aliments*, 4 (1), 1-35.

PEREIRA C.L.I., GOMES E.O., GOMES A.M.P., MALCATA F. X., 2008. Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry*, 108, 862-368.

PERES G., 1981. Enzymologie digestive : les protéases, *in* FONTAINE M. Nutrition des poissons, Paris, pp: 55-67.

QUEZEL P., SANTA S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II. *Ed. centre national de la recherche scientifique*, Paris, 1170p.

RAMALHO-SANTOS M., PISSARRA J., VERÍSSIMO P., PEREIRA S., SALEMA R., PIRES E., FARO C.J., 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*. 203, 204–212.

RAMET J.P., 1997. Les agents de transformation du lait *in* Le fromage, 3^{ème} édition, Tech. & Doc. Paris, pp: 165-172.

REECE P., 1988. Recovery of proteases from fish waste. *Process. Biochem.* , 6, 62-66.

RENÉ F., GENIN N., et CORRIEU G., 1993. Procédé et dispositif de contrôle de la lyophilisation sous vide. Brevet Français no 94 0539, et Brevet Européen 959118658.6.

REVILLE W.J. and FOX P.F., 1978. Soluble protein in Cheddar cheese: A comparison of analytical methods. *Ir. J. Food Sci. Technol.* Vol. 2 : 67-76.

RIBADEAU-DUMAS B., 1981. Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Le lait*, 400: 17-32.

ROEFS S.P.F.M., VAN VLIET T., 1990. Structure of acid casein gels 2. Dynamic measurements and type of interaction forces. *Colloids and Surfaces*, 50, 161-175.

ROSEIRO L.B., BARBOSA M., M AMES J., WILBEY R.A., 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.

SAMSON A., 2002. Cheesemaking from ultrafiltered milk using plant rennet. *The Australian journal of dairy technology*, vol.57, n.2, p.143.

SANNI A.I., ONILUDE A.A., MOMOH M.O., 1999. Selection of starters and a starter-mediated novel procedure for production of wara, a West African soft cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 325–333.

SARDINAS J.L., 1968. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.*, 16, 248-253.

SARMENTO A.C., LOPES H., OLIVEIRA C.S., SAMYN R.V.B., SERGEANT K., DEBYSER G., VAN BEEUMEN J., DOMINGUES P., AMADO F., PIRES E.,

DOMINGUES M.R.M., BARROS M.T., 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230, 429-439.

SCHMIDT D.G., 1982. Association of caseins and casein micelle structure. *In: Developments of dairy chemistry 1-proteins*. Applied science publishers, pp: 61-86.

SCHMIDT J.C., LENOIR J., 1978. Contribution à l'étude de la flore de levure du fromage Camembert son évolution au cours de la maturation. *Le lait*, 58, 355-370.

SCOTT R., 1981. *Cheesemaking practice*, Applied Science Publishers, London, pp: 44-165.

SIDRACH L., GARCIA-CANOVAS F., TUDELA J., & NEPTUNO RODRIGUEZ-LOPEZ

SIDRACH L., GARCIA-CANOVAS F., TUDELA J., NEPTUNO RODRIGUEZ-LOPEZ J., 2005. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66, 41-49.

SILVA S.V, & MALCATA, F.X. 2000. Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research*, 67, 449–457.

SILVA S.V. and MALCATA F. X., 2005. Partial Identification of Water-Soluble Peptides Released at Early Stages of Proteolysis in Sterilized Ovine Cheese-Like Systems: Influence of Type of Coagulant and Starter. *J. Dairy Sci.* 88:1947–1954

SILVA S.V., MALCATA F.X., 1999. On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*, 67, 373–378.

SOUSA M.J. and MCSWEENEY P.L.H., 2001. Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camembert type cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.* 40 : 83-95.

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.

STONE H., SIDEL J., OLIVER S., WOOSLEY A., SINGLETON R.C., 1974. Sensory evaluation by quantitative analysis. *Food technology*, 28, 24-34.

TANFORD C. (1968) Protein denaturation *in Advances in protein chemistry*. Edited by ANFINSIN J.R *et al* Volume 23 Academic press.

TANG J., 2004. Pepsin A in BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., WOESSNER J.F., Handbook of Proteolytic Enzymes. ed. Elsevier, London, pp: 19–28.

TEJADA L., ABELLÁN A., CAYUELA J., MARTÍNEZ-CACHA A., FERNÁNDEZSALGUERO J., 2008. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. International Dair y Journal, 18, 139-146.

TSOULI J., 1974. Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre *Cinara Cardunculus* L. sur la coagulation du lait. Le lait, 537, 415-421.

UMAR DAHOT M., YAKOUB KHAN M., MEMON A.N., 1990. Screening of some Pakistani plants for milk clotting activity. Journal of Islamic Academy of Sciences, 3, 284–286.

VANDEWEGH J., 1997. Le rendement en fromage: prédétermination et mesure, in : ECK A. Le fromage. 2^{ème} édition Tec et Doc Lavoisier, pp : 791 – 874.

VEISSEYRE R., 1975. Technologie du lait. 3^{ème} édition. La Maison Rustique, Paris, 713 p.

VERDIER-METZ I., BUCHIN S., HURTAUD C., BERODIER F., PRADEL P., MONTEL M.C., MARTIN B., COULON J.B., 2009. Effet de l'alimentation des vaches sur les caractéristiques sensorielles des fromages selon les types de technologie (pâte molle, pressée ou pressée demi-cuite). Renc. Rech. Ruminants, vol.16, pp: 135-138.

VERISSIMO P., ESTEVES C., FARO C., and PIRES E., 1995. The vegetable rennet of *cynara cardunculus* l. Contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. Biotechnology letters, vol.17, pp: 621-626.

VERISSIMO P., ESTEVES C., FARO C., PIRES E., 1995. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. Biotechnology Letters, 17, 621–626.

VERISSIMO P., FARO C., MOIR A.J.G., LIN Y., TANG J., PIRES E., 1996. Purification, characterization and partial acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. Eur. J. Biochem., 235, 762-768.

VIEIRA M., PISSARR J., VERÍSSIMO P., CASTANHEIRA P., COSTA Y., PIRES E., FARO C., 2001. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an

aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. Plant Mol. Biol. 45, 529–539.

VIGNOLA C.L., 2002. Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Québec; 608p.

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.

VOET D., VOET J.G., 2005. Biochimie, DeBoeck université, 2^{ème} édition, pp : 127-207.

WALSTRA P., JENNESS R., 1984. Dairy Chemistry and Physics, Publication John Wiley & sons, New York, USA, 467p.

WATTS B.M., YLIMAKI G.L., JEFFERY L.E., ELIAS L.G., 1991. Méthodes de base pour l'évaluation sensorielle des aliments. Ed. Centre de recherches pour le développement international, Amérique, 145 p.

WAUGH D.F., CREAMER L.K., SLATTERY C.W., DRESDNER G.W., 1970. Core polymers of casein micelles. Biochemistry, 9, 786-795.

WRIGHT A.J., SCANLON M.G., HARTEL R.W., AND MARANGONI A.G., 2001. Rheological Properties of Milkfat and Butter journal of food science, Vol. 66, pp:1056-1071.

YANG J., TEPLYAKOV A. QUAIL J.W., 1997. Crystal structure of the aspartic proteinase from *Rhizomucor miehei* at 2.15- Å resolution. J. Mol. Biol., 268, 449–459.

Annexes

Annexe 1 : Modes opératoires des analyses physico-chimiques du lait utilisé lors de la fabrication du fromage à pâte molle type Brie.

- **Détermination de l'acidité (AFNOR, 1986):** Prélèvement de 10ml de lait, dans un bêcher de 100ml, aux quels sont ajoutées 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine (1%), titration avec la soude (0,1N) jusqu'à virage de couleur au rose persistant. L'acidité est exprimée en degrés Dornic et donnée par la lecture de millilitres de soude titrée.
- **Mesure du pH (AFNOR, 1986) :** Il est mesuré à l'aide d'un pH-mètre par immersion de l'électrode dans le lait.
- **Détermination du taux de M.G. méthode de GERBER :** Introduire dans un butyromètre de GERBER 10ml d'acide sulfurique, 11ml de lait, 1ml d'alcool isoamélique, le tout est mélangé jusqu'à dissolution totale du lait, puis centrifugé à 1200rpm pendant 5 minutes. Le résultat est exprimé en g/l par lecture directe sur le butyromètre.
- **Détermination du taux de l'extrait sec total :** Dans un dessiccateur infrarouge, 3g de lait sont étalé sur du papier aluminium, le résultat est exprimé en % ou en g/l par lecture directe sur le dessiccateur. L'extrait sec dégraissé est déterminé on faisant la différence entre E.S.T. et la M.G. $ESD=EST-MG$

Annexe 2 : Préparations des milieux de cultures utilisés lors des analyses microbiologiques sur les fromages types Brie.

➤ **Préparation du milieu PCA pour la recherche de la flore totale**

- Tryptone.....: 5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....: 2,5 g
- Glucose.....: 1,0 g
- Agar-Agar.....: 12-18 g
- Eau: 1000 ml
- pH 7 à 25°C
- Stérilisation à 121°C pendant 15min.

➤ **Préparation du milieu OGA (glucose gélosé à l'oxytetracycline) :**

- Extrait de levure.....: 5 g
- Gélose..... : 16 g

- Glucose..... : 20 g
- Eau..... : 1000 ml
- pH = 6,5 à 25°C.
- Stérilisation à 121°C pendant 15min.

➤ **VRBL (Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre).**

- Peptone7g/l
- Extrait de levure.....5g/l
- Sels biliaire1,5g/l
- Lactose.....10g/l
- Chlorure de sodium.....5g/l
- Rouge neutre..... 30g/l
- Cristal violet..... 2 g/l
- Gélose12g/l
- pH = 7, 4 à 25°C
- Stérilisation à 121°C pendant 15 min.

Annexe 3 : Les fiches de dégustation

FICHE DU TEST TRIANGULAIRE

NOM :.....

PRENOM :.....

DATE :.....

Devant vous trois échantillons, deux sont identiques et le troisième il est différent, analysez les et indiquez l'échantillon différent.

Codes

Code de l'échantillon différent

.....

.....

.....

.....

FICHE DU TEST DE PREFERENCE

NOM :.....

PRENOM :.....

DATE :.....

Analysez et goutez les deux échantillons, puis classez les selon votre préférence.

Codes

Classement

.....

.....

.....

.....

FICHE DU TEST DE CLASSEMENT PAR RANG

NOM :.....

PRENOM :.....

DATE :.....

Analysez et goutez les trois échantillons, puis classez les par ordre croissant selon votre préférence (attribuez 1 à l'échantillon que vous préférez puis 2 et ensuite 3 pour le moins apprécié).

Codes

Classement

.....

.....

.....

.....

.....

.....

FICHE DU TEST D'INTENSITE

NOM :

PRENOM :

DATE :

Examinez et goûtez chaque un des trois échantillons, puis donnez une note de 1 à 9 selon l'intensité de chaque caractère.

	A	B	C
Couleur jaune			
Rugosité			
Texture lisse			
Texture moelleuse			
Odeur lactique			
Odeur de levure			
Odeur animale			
Odeur de l'herbe			
Odeur de rance			
Gout salé			
Gout amer			
Gout acide			
Gout d'astringence			
Dispersion dans la bouche			
Solubilité dans la bouche			
Aspect crémeux			

N.B : Si le caractère mentionné dans la fiche n'est pas détecté dans le produit, vous mettez 0.

Annexe n°4 : Tableaux statistiques.

Tableau I : test binomial à une queue
probabilité de jugements corrects égale ou supérieure à X avec n essais (p=1/3).

n \ x	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
5		868	539	210	045	004																							
6		912	649	320	100	018	001																						
7		941	737	429	173	045	007																						
8		961	805	532	259	088	020	003																					
9		974	857	623	350	145	042	008	001																				
10		983	896	701	441	213	077	020	003																				
11		988	925	766	527	289	122	039	009	001																			
12		992	946	819	607	368	178	066	019	004	001																		
13		995	961	861	678	448	241	104	035	009	002																		
14		997	973	895	739	524	310	149	058	017	004	001																	
15		998	981	921	791	596	382	203	088	031	008	002																	
16		998	986	941	834	661	453	263	126	050	016	004	001																
17		999	990	956	870	719	522	326	172	075	027	008	002																
18		999	993	967	898	769	588	391	223	108	043	014	004	001															
19			995	976	921	812	648	457	279	146	065	024	007	002															
20			997	982	940	848	703	521	339	191	092	038	013	004	001														
21			998	987	954	879	751	581	399	240	125	056	021	007	002														
22			998	991	965	904	794	638	460	293	163	079	033	012	003	001													
23			999	993	974	924	831	690	519	349	206	107	048	019	006	002													
24			999	995	980	941	862	737	576	406	254	140	068	028	010	003	001												
25			999	996	985	954	888	778	630	462	304	178	092	042	016	006	002												
26				997	989	964	910	815	679	518	357	220	121	058	025	009	003	001											
27				998	992	972	928	847	725	572	411	266	154	079	036	014	005	002											
28				999	994	979	943	874	765	623	464	314	191	104	050	022	008	003	001										
29				999	996	984	955	897	801	670	517	364	232	133	068	031	013	005	001										
30				999	997	988	965	916	833	714	568	415	276	166	090	043	019	007	002	001									
31					998	991	972	932	861	754	617	466	322	203	115	059	027	011	004	001									
32					998	993	978	946	885	789	662	516	370	243	144	078	038	016	006	002	001								
33					999	995	983	957	905	821	705	565	419	285	177	100	051	023	010	004	001								
34					999	996	987	965	922	849	744	612	468	330	213	126	067	033	014	006	002	001							
35					999	997	990	973	937	873	779	656	516	376	252	155	087	044	020	009	003	001							
36					998	992	978	949	895	810	697	562	422	293	187	109	058	028	012	005	002	001							
37					998	994	963	959	913	838	735	607	469	336	223	135	075	038	018	007	003	001							
38					999	996	987	967	928	863	769	650	515	381	261	164	095	051	025	011	004	002	001						
39					999	997	990	973	941	885	800	689	560	425	301	196	118	066	033	016	007	003	001						
40					999	997	992	979	952	903	829	726	603	470	342	231	144	083	044	021	010	004	001						
41					998	994	983	961	920	854	761	644	515	385	268	173	104	057	029	014	006	002	001						
42					999	995	987	968	933	876	791	683	558	428	307	205	127	073	038	019	008	003	001						
43					999	996	990	974	945	895	820	719	600	471	347	239	153	091	050	025	012	005	002	001					
44					999	997	992	980	955	912	845	753	639	514	389	275	182	111	063	033	016	007	003	001					
45					999	998	994	984	963	926	867	783	677	556	430	313	213	135	079	043	022	010	004	002	001				
46						998	995	987	970	938	887	811	713	596	472	352	246	161	098	055	029	014	006	003	001				
47						999	996	990	976	949	904	836	745	635	514	392	282	189	119	070	038	019	009	004	002	001			
48						999	997	992	980	958	919	859	776	672	554	433	318	220	142	086	048	025	012	006	002	001			
49						999	998	994	984	965	932	879	803	706	593	473	356	253	168	105	061	033	017	008	003	001			
50						999	998	995	987	972	943	896	829	739	631	513	395	287	196	126	076	042	022	011	005	002	001		

Note : Il faut rajouter devant chaque chiffre «0,».

Tableau II : Test binomial à deux queues
 Probabilité qu'il y' est X ou plus de jugement d'accord dans n essais (p=1/2).

X	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37														
5	625	312	062																																														
6	688	219	031																																														
7		453	125	016																																													
8			727	289	070	008																																											
9				508	180	039	004																																										
10					754	344	108	021	002																																								
11						549	227	085	011	001																																							
12							774	388	146	038	006																																						
13								581	267	082	022	003																																					
14									791	424	180	057	013	002																																			
15										607	302	118	036	007	001																																		
16											804	454	210	077	021	004	001																																
17												629	332	142	049	012	002																																
18													815	481	238	098	031	008	001																														
19														648	358	167	064	019	004	001																													
20															874	503	263	115	041	012	003																												
21																664	383	189	078	027	007	001																											
22																	832	523	288	134	052	017	004	001																									
23																		678	405	210	083	035	011	003																									
24																			838	541	307	152	064	023	007	002																							
25																				680	424	230	108	043	015	004	001																						
26																					846	567	327	188	076	028	008	002	001																				
27																						701	442	248	122	052	018	008	002																				
28																							851	572	346	185	087	038	013	004	001																		
29																								711	458	285	138	061	024	008	002	001																	
30																									856	585	382	200	089	043	018	005	001																
31																										720	473	281	150	071	030	011	003	001															
32																											880	587	377	215	100	050	020	007	002	001													
33																												728	487	298	163	080	035	014	005	001													
34																												864	608	387	229	121	058	024	008	003	001												
35																													736	500	310	175	080	041	017	006	002												
36																													868	681	405	243	122	065	029	011	004	001											
37																														743	511	324	188	099	047	020	008	003	001										
38																														871	627	418	256	143	073	034	014	005	002										
39																															749	522	337	200	108	053	024	008	003	001									
40																															875	636	430	288	154	081	038	017	006	002	001								
41																																755	533	349	211	117	080	028	012	004	001								
42																																878	644	441	280	164	088	044	020	008	003	001							
43																																761	542	380	222	126	088	032	014	006	002	001							
44																																880	652	451	291	174	098	048	023	010	004	001							
45																																766	551	371	233	135	072	036	016	007	002	001							
46																																883	669	451	302	184	104	054	028	011	005	002	001						
47																																771	560	382	243	144	079	040	019	008	003	001							
48																																885	685	471	312	193	111	059	029	013	006	002	001						
49																																	775	568	382	253	152	085	044	021	008	004	001						
50																																888	672	480	322	203	119	065	033	015	007	003	001						

Note : Il faut rajouter devant chaque chiffre «0,».

Annexe n°5 : Productions scientifiques



ESSAY OF MANUFACTURE OF A SOFT CHEESE USING *CYNARA CARDUNCULUS* FLOWERS EXTRACT AS A COAGULANT AGENT

ZIKIOU A*, NAMOUS H., BOUREKOUA H. et ZIDOUNE M.N.

Institut de la Nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), université Constantine 1, route Ain el bey, 25000 Constantine.
*akali@live.com

SUMMARY

Although it has a great potential to produce them, Algeria imports the totality of its traditional rennet (issued from young calf abomasums) and/or its substitutes of various origins to meet with the needs of the cheese industry, cardoon flowers extract (*Cynara cardunculus*) is one of the known coagulants, used in our traditions for the cheese making. In order to study the possibilities of its employment in the cheese industry, we tried to manufacture a soft cheese with the extract of cardoon flowers, this work was achieved on the industrialist scale within a cheese dairy according to their technological diagram, after ten days of refining, physicochemical, microbiological and sensory analyzes were carried on in order to compare the obtained cheese and the control samples prepared under the same conditions with the coagulant agent used by the unit. We were able to obtain cheese pieces comparable to those produced by cheese dairy, the results of the different analyzes showed that our cheese are safe from the hygienic point, the texture is softer, and it was preferred by the tasting panel, however, the cheese making yield of the cardoon flowers extract is lower than that of the coagulant usually used by the unit. So we believe that this extract may serve as a coagulant agent for the manufacture of soft cheese.

Key words: cardoon flowers, coagulant agent, soft cheese.

INTRODUCTION

Among the calf rennet substituents, there is the production of enzymes that coagulate milk from cardoon flowers (*Cynara cardunculus*). This extract known from a long time ago is used for the making of traditional cheeses in Algeria and many Mediterranean countries.

Although it has an important potential to produce them, Algeria imports the totality of calf rennet and its substitutes. The aim of the present work is to study the possibility of using the extract of cardoon flowers in cheese industry and thus to give an alternative to replace calf rennet in order to reduce the importation of coagulant agents of various origins which does not cease increasing.

MATERIAL AND METHODS

Our extract is obtained from *Cynara cardunculus* flowers capitola collected at the end of June in a village situated at 36° 29' northern latitude and 4° 36' Eastern longitude, and at an altitude of 203 m, not far from the area of Akbou, located at the north of Algeria.



Figure 1: Capitulum and cardoon flower (A: violet part of the flower, B: white part, C: seed)

The test of manufacture of the soft cheese was carried out on a pilot scale with approximately 50 liters of cow milk in a local cheese dairy according to the technological diagram adopted by the unit.



Figure 2: A member of the degustation panel carrying out a sensory analysis.

Three sensory tests were applied in order to compare the cheeses made with our extract and those produced with the coagulant agent used by the unit, prepared in the same conditions:

- Triangular Test;
- Preferability Test;
- Hedonic Test.

RESULTS AND DISCUSSION



Figure 3: Soft cheese obtained with cardoon flower extract, Age: 20 days.



Figure 4: Soft cheese witness sample, Age: 20 days.

The samples obtained with the cardoon flowers extract is less thick than the witness samples, which can translate the poor yield of the extract.

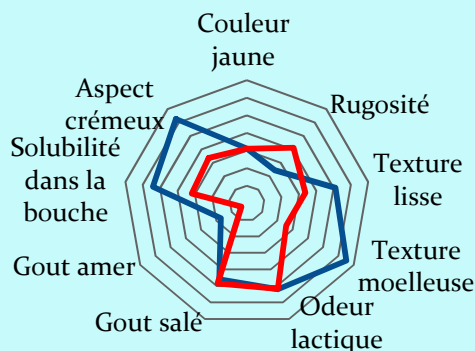


Figure 5: Sensory profile of experimental cheeses and the witness sample after 13 days of aging.

The results of the sensory analysis show that there is a significant difference between the experimental samples and the witnesses, indeed, the cheeses obtained with cardoon flower extract are characterized by a more intense yellow color, a softer texture and a creamy aspect contrary to the control samples who were firm in texture with a higher roughness. Which make the cheese obtained with cardoon flower extract the preferred.

3. CONCLUSION

We believe then that there is a potential of use of the cardoon flower extract as a substitute of calf rennet in the production of soft cheeses.



Caractérisation d'un extrait obtenu à partir des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*), et possibilité de son utilisation comme succédané de présure en industrie fromagère.

ZIKIOU, A* ; BENYAHIA-KRID, F & ZIDOUNE, M.N.

Introduction

L'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) est utilisé depuis une époque lointaine pour la fabrication des fromages traditionnels Algériens.

Objectifs

L'objectif de ce travail est de caractériser l'extrait des fleurs de cardon et de voir la possibilité de son utilisation à l'échelle industrielle comme substitut de présure.

Principaux résultats

Tableau : Caractéristiques de l'extrait obtenu à partir de 10g de fleurs sèches de cardon.

	Extrait brut des fleurs de cardon
pH	5,9
Extrait sec total (%)	6,14
Protéines (mg/ml)	26
UAC (U.P.)	3,23
Force coagulante	1/888
Activité spécifique (UP/mg)	0,12

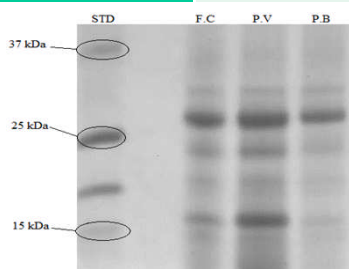


Figure 3: Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'extrait des fleurs de cardon.



Figure 4: Fromage cardon et témoin, Age: 20 jours.

Méthodologie

Notre extrait est obtenu à partir des fleurs récoltées en fin du mois de juin dans la région d'Akbou, agglomération du nord d'Algérie.



Figure 1: Capitule et fleur de cardon (A: partie violette, B: partie blanche, C: graine)



Figure 2: L'extrait des fleurs de cardon obtenu.

Des tests physico-chimiques, ainsi qu'une électrophorèse SDS-PAGE ont été fait pour caractériser l'extrait des fleurs de cardon obtenu.

Des essais de fabrication de fromage avec cet extrait ont été menés à l'échelle pilote sur une quantité de 50 litres de lait de vache selon le diagramme adopté par l'unité, ensuite, Des tests physico-chimiques, microbiologiques et organoleptiques ont été fait pour comparer les fromages expérimentaux aux fromages témoins.

Conclusion

Vue sa grande ressemblance à la présure traditionnelle (extraite à partir de la caillette de veau), nous croyons que l'extrait des fleurs de cardon peut être utilisé comme agent coagulant dans l'industrie fromagère, sans aucun désavantage.

CONTACT

* E-mail: zakalt@live.com

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص وتوصيف الإنزيمات من زهور الخرشف البري (*Cynara cardunculus*)، ودراسة إمكانية استخدامها كبديل عن البريزور (présure) في صناعة الجبن. ركزت الدراسة على استخراج عامل مخثر من زهور الخرشف البري المقطوف محلياً، وتوصيف المستخلص الذي تم الحصول عليه. المقارنة بين مستخلص الأزهار و البريزور الحيواني، تمت بدراسة نشاط اماهة البروتينات و بدراسة أنواع التفاعلات التي تشارك في تشكيل خثرة الحليب. وأخيراً محاولة صناعة جبن طري من نوع بري (Brie) ونوع كاممبير (Camembert) داخل وحدتين لإنتاج الاجبان.

مخطط الاستخلاص المتبع سمح لنا بالحصول على مستخلص مخثر مكون من الكردوزينات أ, ب (cardosine A,B) المليلتر الواحد من المستخلص لديه نشاط مخثر يقدر بـ UP 3.23 وقوة 888/1. نشاطها الامثل يكون في درجة الحموضة 5 و في درجة حرارة 60 درجة مئوية، وتركيز 0.02 مول/لتر من كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$. قوة اماهة البروتينات لهذا المستخلص تقدر بحوالي ضعف نضيرتها من البريزور الحيواني. كما أظهرت دراسة التفاعلات أهمية روابط الهيدروجين , الكارهة للماء و روابط الكالسيوم في تكوين خثرة الحليب.

الجبن اللين الذي تم الحصول عليه بمستخلص زهور الخرشف نوعيته أفضل. لكن مردوده كان ضعيفا نوعا ما. وهكذا، فإننا نقترح إمكانية استبدال البريزور الحيواني بمستخلص زهور الخرشف في صناعة الاجبان، مع النظر في طريقة لتحسين مردوده.

الكلمات الدالة: زهور الخرشف, بديل البريزور, عامل مخثر, التفاعلات, جبن طري.

Abstract

The aim of the present work is the preparation and the characterization of the cardoon flowers (*Cynara cardunculus*) extract, as well as the study of its potential use as a calf rennet substitute.

The work consisted of the coagulant agent extraction from flowers locally harvested, and of the characterization of the enzymatic extract obtained. The comparison between the cardoon floral extract and calf rennet, by studying its proteolytic activity and by approaching the interaction types implied in the gel formation. And finally the realization of production trials of a Brie type soft cheese and Camembert type in two local unites of cheese making.

Extraction diagram used allowed to have a coagulant extract containing mainly cardosines A and B. One milliliter of the prepared extract presents a coagulant activity of 3.23 UP and a power of 1/888. The optimum of its activity is noticed at pH 5, at a temperature of 60°C and at a CaCl₂ concentration of 0/02 mole/liter of milk.

The proteolytic activity of this extract is nearly the double of the calf rennet. The study of interactions showed the importance of the hydrophobic, hydrogenic and calcic bonds in the cardosine gel formation.

Soft cheeses obtained with cardoon flowers extract present a better organoleptic quality, however, the yield is relatively weak.

Thus, we suggest the possibility of the substitution of calf rennet with cardoon flowers extract in the manufacturing of cheese, meanwhile considering the study of means for promoting a better cheese yield.

Keywords: Cardoon flowers, coagulant agent, calf rennet substitute, interactions, soft cheese.

Résumé

L'objectif du présent travail est l'extraction et la caractérisation d'enzymes des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) et l'étude de la possibilité de leur emploi en industrie fromagère comme succédané de présure.

Le travail a porté sur l'extraction de l'agent coagulant à partir de fleurs récoltées localement, et à la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu. La comparaison entre l'extrait floral de cardon et la présure animale, par l'étude de son activité protéolytique et par l'approche des types d'interactions impliquées dans la formation du gel. Et enfin, la réalisation d'essais de production de fromages à pâte molle type Brie et type Camembert, au sein de deux fromageries locales, a été envisagé.

Le diagramme d'extraction utilisé a permis d'avoir un extrait coagulant contenant principalement les cardosines A et B. Un millilitre de l'extrait préparé présente une activité coagulante de 3,23 UP et une force de 1/888. L'optimum de son activité est constaté à pH 5, à une température de 60°C et une concentration en CaCl₂ de 0,02 mole/litre de lait.

L'activité protéolytique de cet extrait est environ le double de celle de la présure animale. L'étude des interactions a montré l'importance des liaisons hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des liaisons calciques dans la formation du gel cardosine.

Les fromages à pâte molle obtenus avec l'extrait des fleurs de cardon présentent une meilleure qualité organoleptique, cependant, le rendement fromager était relativement faible.

Ainsi, nous suggérons la possibilité de substitution de la présure par l'extrait des fleurs de cardon dans la fabrication des fromages, tout en envisageant l'étude des moyens de promouvoir un meilleur rendement fromager.

Mots clés : fleurs de cardon, agent coagulant, succédané de présure, interactions, fromage à pâte molle.