

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Mémoire

*De fin d'études pour l'obtention du diplôme de **Master***

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie de la Conservation

Intitulé du thème :

***Valorisation de l'extrait enzymatique
des feuilles de *Silybum marianum* L.
pour la coagulation du lait***

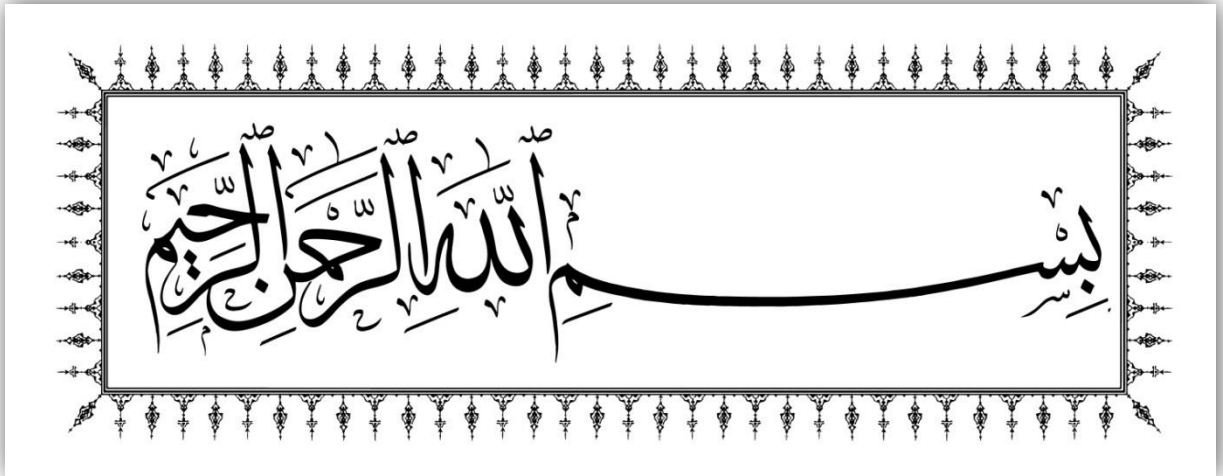
Présenté par : **Melle : Allaoui Soumia**

Melle : Benaouda assia

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury	: Mme S. Mahroug	(Prof UDL de Sidi Bel Abbés)
Examineur	: Mme Ch. Mouri	(MCB UDL de Sidi Bel Abbés)
Promoteur	: Mme F.Z Bessam	(MCA UDL de Sidi Bel Abbés)

Année universitaire 2020 – 2021





Remerciements

Avant tout, je remercie Allah, le tout puissant, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience d'accomplir ce travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur :

Mme F.Z Bessam

Pour ses appréciations, ses précieux conseils et surtout pour nous avoir fait confiance.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et de l'enrichir par leur proposition

Mme S. Mahroug d'avoir accepté de présider le jury,

Mme Ch. Mouri d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes personnes qui ont de près ou de loin apporté leurs conseils et leurs encouragements pour la réalisation de ce modeste travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents qui m'ont toujours suivi et encouragé dans ma scolarité ainsi que dans mes études supérieurs ;

A ma très chère mère

A mon très cher père

A ma chère sœur et mes chers frères

Je remercie mon cher père « **Allaoui Ali** » et ma chère mère « **Belhadj Amra** » pour m'avoir aidé et soutenu techniquement et moralement, et pour son disponibilité, et je remercie aussi ma chère sœur « **Amina** », et mes chers frères.

A ma chère amie : « **Assia** ».

Allaoui Soumia

Dédicace

Je dédie ce travail à A ma mere Nacira : Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon PèreAbedelkader : Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. (rabi yarhmek papa).

A mes très chères belles sœurs : Hanan et Nasma,Nawal , Sabine, Aicha, setti,leurs maris et leurs enfans.

A tous la famille Benaouda.

A ma chère amie :Soumia.

A tous ceux qui aiment Assia

Remerciements.

Dédicace.

Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures.....	V
Résumé.....	VI
ملخص.....	VII
Abstract.....	VIII
Introduction.....	1

PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : *Silybum marianum L.*

1- Historique.....	3
2- Systématique.....	3
3- Aire de répartition géographique et écologique.....	4
4- Description de morphologie de l'espèce.....	4
5- Constituants chimique des Akènes de <i>Silybum marianum L.</i>	7
6- Propriétés dz la plante.....	7

CHAPITRE II : RAPPELS SUR LES ENZYMES COAGULANTS.

1- Les protéases végétales.....	9
1- Généralités.....	9
2-1- Role physiologique des protéases.....	9
2-2- Classification des protéases végétales.....	9

CHAPITRE III : COAGULATION DU LAIT.

I- Généralités sur le lait.....	13
---------------------------------	----

I-1- Définition du lait.....	13
I-2- Compositions et caractéristiques du lait.....	13
I-2-1- Caractéristiques organoleptiques.....	13
I-2-2- Caractéristiques physiques et chimiques.....	14
I-2-3- Caractéristiques microbiologiques du lait.....	14
II- Principales activités des microorganismes du lait.....	15
III- Protéines du lait.....	15
IV- Généralités sur les caséines.....	16
IV-1- Composition et structure chimique.....	16
IV-2- Mécanismes de la coagulation.....	17
IV-2-1- Coagulation du lait.....	17
V- Caractéristiques des différents gels obtenus.....	19
VI- Facteurs de la coagulation.....	19

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES.

I- Matériels biologique.....	21
I-1- Préparation du matériels végétal.....	21
I-2- Préparation des solutions de présure.....	21
I-3- Préparation du matériel d'étude.....	22
II- Calcul de la force de présure.....	22
III- Effet de la température.....	23
IV- Le temps de caillage (coagulation).....	23
V- Solution de présure sans NaCl ₂ et CaCl ₂	23

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.

I- Résultats et discussion.....	24
I-1- Temps de coagulation.....	24
I-2- Temps de coagulation sans NaCl ₂ et CaCl ₂	25
I-3- Force de présures à la température de 30°C.....	25
I-4- Force de présures à la température de 40°C.....	27
I-5- Force de présures à la température de 50°C.....	28
Conclusion générale.....	31

Références bibliographiques.

Numéro de tableaux	Titre des tableaux	Pages
1	Les caractéristiques physiques du lait	14
2	Les caractéristiques physiques du lait	14
3	Résultats de la durée de coagulation des solutions de présures aux différentes concentrations et températures	24
4	Résultats de solutions de présures sans (CaCl_2 et NaCl) à la température de 20°C	25
5	Forces des solutions de présure à température de 30°C	26
6	Force des solutions de présures à la température de 40°C	27
7	Force des solutions de présures à la température de 50°C	29

Figures	Titres	Pages
1	Racine de <i>Silybum marianum</i> L.	4
2	Tige de <i>Silybum marianum</i> L.	5
3	Feuille de <i>Silybum marianum</i> L.	5
4	Fleur de <i>Silybum marianum</i> L.	6
5	Akènes de <i>Silybum marianum</i> L.	7
6	Force des solutions de présures à la température de 30°C	26
7	Force des solutions de présures à 40°C	28
8	Force des solutions de présures à 50°C	29

RÉSUMÉ

Le sujet concerne à une contribution à la connaissance de l'activité coagulante de l'espèce végétale *Silybum marianum* L. (chardon Marie) du lait de vache.

L'objectif est de connaître la réponse de la durée et de la force de la coagulation.

Dans ce travail, quatre concentrations croissantes. Ces concentrations varient de 5 à 20 g avec une progression géométrique de 5.

Quatre paramètres de coagulation ont été utilisés pour évaluer ce phénomène. Il s'agit de la température, la dose de l'extrait enzymatique du végétale (présure), et les concentrations du NaCl et CaCl₂.

Les résultats ont montré que en augmentant la dose de la présure à 20 g et la température à 50°C, le temps de coagulation du lait de vache est réduit à une durée de 20 minutes et la force de la présure devient importante de l'ordre de 6000.

Mots clés : Lait, présure, température, coagulant, *Silybum marianum* L.

ملخص

يتعلق الموضوع بالمساهمة في معرفة نشاط التخثر للنوع النباتي *Silybum marianum* L. (شوك الحليب) على حليب البقرة.

الهدف هو معرفة استجابة مدة وقوة التخثر.

في هذا العمل، توجد أربعة تراكيز متزايدة. هذه التراكيز تتراوح من 5 إلى 20 جم مع زيادة تقدر بـ 5 جم . تم استخدام أربع معاملات تخثر لتقييم هذه الظاهرة. تتمثل في درجة الحرارة وجرعة مستخلص الإنزيم النباتي

(المنفحة) وتركيزات كلوريد الصوديوم و $CaCl_2$.

أظهرت النتائج أنه بزيادة جرعة المنفحة إلى 20 جم ودرجة الحرارة إلى 50 درجة مئوية، يقل وقت تخثر حليب

البقرة إلى 20 دقيقة وتصبح قوة المنفحة مهمة تصل إلى 6000.

الكلمات المفتاحية: الحليب ، المنفحة ، الحرارة ، المخثر ، *Silybum marianum* L.

Abstract

The topic is related to the contribution to the knowledge of the coagulation activity of the botanical species *Silybum marianum* L. (milk thistle) from cow's milk.

The goal is to know the response of the duration and strength of the coagulation.

In this work, four concentrations are increased. These concentrations vary from 5 to 20 g with a geometric progression of 5.

Four coagulation parameters were used to evaluate this phenomenon. These are the temperature, the dose of the plant enzyme extract (rennet), and the concentrations of NaCl and CaCl₂.

The results showed that by increasing the dose of the rennet to 20 g and the temperature to 50 ° C, the coagulation time of cow's milk is reduced to a duration of 20 minutes and the strength of the rennet becomes significant to the order of 6000.

Key words : Milk, rennet, temperature, coagulant, *Silybum marianum* L.



INTRODUCTION

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans les molécules protéiques. La large diffusion de protéases chez les plantes, les animaux et les microorganismes montre qu'elles sont nécessaires pour tous les organismes où elles jouent des rôles physiologiques importants dans des processus biologiques diverses (Sandhya *et al.*, 2004).

Leur importance sur le marché mondial d'enzymes industrielles est liée au rôle important qu'elles jouent dans la biotechnologie, étant donné que la protéolyse modifie les propriétés immunologiques, chimiques, physiques et biologiques des protéines.

L'hydrolyse de protéines alimentaires, par exemple, est mise en œuvre pour diverses raisons: l'amélioration des caractéristiques nutritionnelles, la modification des différentes propriétés fonctionnelles (la solubilité, le moussage, la coagulation), la prévention des interactions non souhaitées, le changement de saveurs et les odeurs, et la suppression des facteurs toxiques ou inhibiteurs (Pardo *et al.*, 2000).

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les produits végétaux naturels a augmenté rapidement. Les protéases d'origine végétales font l'objet d'une attention renouvelée, non seulement en raison de leur grande spécificité de substrat, mais aussi parce qu'elles sont actives sur une large gamme de températures et de pH et en présence de divers ions métalliques, des inhibiteurs et des solvants organiques. (Haddar *et al.*, 2009).

Elles peuvent être extraites efficacement en grande quantité et aux moindres coûts. Toutes ces qualités font des protéases végétales un excellent choix pour les industries alimentaires, médicaux, la biotechnologie et la pharmacologie (Rai et Mukherjee 2009).

Les protéases végétales ont été identifiées et étudiées à partir de plusieurs familles de plantes telles que : *Asteraceae*, *Caricaceae*, *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* et *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008). Les extraits de plantes à haute teneur en enzymes protéolytiques ont été utilisés dans la médecine traditionnelle pour une longue période.

Ils ont été utilisés pour le traitement du cancer et comme antitumoraux, pour les troubles de la digestion, le gonflement et les problèmes immunitaires, etc (Mello *et al.*, 2008 ;

Otsuki *et al.*, 2010). Un exemple est la bromélaïne, extraite de l'ananas, qui est capable d'empêcher les oedèmes, l'agrégation plaquettaire et les métastases en raison de sa capacité à modifier les structures de surface cellulaire par clivage du peptide (Salas *et al.*, 2008).

Plusieurs plantes endémiques riches en protéases sont traditionnellement utilisées pour la préparation de fromage par des méthodes artisanales tant en Algérie que dans de nombreux autres pays.

Ainsi, plusieurs extraits de plantes sont utilisés, tels que les extraits de fleurs de *Cynara cardunculus*, les extraits de deux espèces *Cynara humilis* et/ou *Cynara scolymus*, *Silybum marianum*, *Centaurea calciprata*, *Onopordum turcicum* et *Onopordum acanthium*.

Parmi les plantes endémiques locales, nous nous sommes intéressées à l'espèce *Silybum marianum* L. (chardon Marie) qui est utilisée depuis toujours pour la fabrication des fromages traditionnels algériens.

L'objectif visé à travers ce mémoire consiste à déterminer les conditions optimales de la coagulation en augmentant la dose des présures et des températures.

Notre travail est subdivisé en deux parties :

- ☀ la première partie est une revue bibliographique, dans laquelle sont développés plusieurs chapitres se rapportant à la monographie de l'espèce étudiée, les enzymes coagulants d'origine végétales, la coagulation du lait.

- ☀ la deuxième partie correspond à l'étude expérimentale, dans laquelle sont présentés le matériel végétal étudié, la technique d'analyse adoptée ainsi que les résultats et discussion relatifs à la dose de la solution de la présure à partir des feuilles de l'espèce *Silybum marianum* L. et l'augmentation des températures.

- ☀ Notre travail est sanctionné par une conclusion générale et des perspectives.



PARTIE I
ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE :
Sylibum marianum L

1- HISTORIQUE

Silybum marianum L. (chardon Marie) est une plante spontanée qu'on pourrait qualifier de mauvaise herbe, identifiée depuis deux mille ans et utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Elle a été utilisée comme médicament populaire et traditionnel en Europe et en Asie.

Ses graines se répartissent au niveau et en dessous de la surface du sol, ce qui en fait une plante assez résistante. Le nom de chardon-marie proviendrait d'une légende datant du Moyen-âge : lors d'un voyage de l'Égypte vers la Palestine, la Vierge Mériam voulant dissimuler son enfant Jésus aux troupes d'Hérode le Grand l'aurait déposé dans les larges feuilles de chardon-marie. D'après cette légende, les taches blanches au niveau des nervures des feuilles caractéristiques de l'espèce sont des traces héréditaires qui proviendraient des gouttes de lait de la Vierge Marie.

Les propriétés du chardon-marie sont connues depuis des millénaires : au Ier siècle, le médecin et Apothicaire Dioscoride citait le *Silybum* comme une plante médicinale ; le nom dérive du grec « Silybon » ou « Silybos » qui veut dire houppe. Au dix-neuvième siècle, cette plante était employée pour des troubles du foie, du rein, de la rate, de calculs biliaires et aussi pour des problèmes de grossesse et de menstruation.

2- SYSTÉMATIQUE

La systématique du chardon marie selon (Deysson, 1979 ; (Guignard, 1998 ; Anonyme, 2007 ; Spichiger *et al.*, 2000) est comme suit :

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae (Composées)

Sous-famille : Tubuliflores

Genre : *Silybum*

Espèces : *Silybum marianum* (L).

3- AIRE DE RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE ET ÉCOLOGIQUE

Silybum marianum L. est endémique à la région méditerranéenne (Hauf, 1982). Selon (Bayer et Buller, 1990), il s'étend de la mer à 700-1100 m d'altitude sur les terrains incultes secs et rocaillieux de toute l'Europe occidentale (au nord jusqu'au Danemark) et méridionale, ainsi qu'en Afrique du Nord.

Silybum marianum L. est cultivé dans les jardins ornementaux (Roche, 1991). Selon (Quezel et Santa, 1963) cette plante est cosmopolite, préfère les sols secs et les endroits chauds et ensoleillés. On la trouve dans les champs, les terrains incultes, les décombres et les bords des routes.

En Algérie, cette espèce est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides.

Selon (Sindel, 1991 et Gabay *et al.*, 1994), elle est aujourd'hui répandue en Amérique du Nord, si bien qu'on le trouve tant au Canada qu'au Mexique, la Nouvelle-Zélande, l'Australie, l'Afrique du Sud, le Chili et l'Argentine.

4- DESCRIPTION DE MORPHOLOGIQUE DE L'ESPÈCE

RACINES

D'après (Sindel, 1991), la plante Chardon marie est caractérisée par une racine pivotante, forte, longue, épaisse et fibreuse (figure 1).

TIGES

Les tiges sont généralement ramifiées, atteignant environ 20 à 150 cm de haut, portent peu de feuilles sur la partie supérieure (figure 2) (Hauf, 1982, Guittonneau et Huon, 1983 et Caremes, 1990).



Figure 2 : Tige de *Silybum marianum* L. (www.discoverlife.org).

FEUILLES

Selon (Bayer et Buller 1990) et (Caremes, 1990), le chardon marie est caractérisé par ses grandes feuilles vert pâle brillantes, tachées de blanc lobées et ondulées, sont bordées de dents épineuses à pointe jaune très acérée. Les feuilles de la base sont pétiolées, découpées en lobes à bords dentés épineux, en rosettes, très grandes d'environ 1 m (Sindel, 1991).

Les feuilles supérieures sont plus petites et plus étroites réduites et embarrassantes, à bord moins découpé, mais très épineux. Elles présentent toutes de nombreuses nervures blanches, donnant l'impression que la feuille est maculée de lait (figure 3) (Caremes ,1990).



Figure 3 : Feuille de *Silybum marianum* L. (Allaoui, 2021)

FLEURS

Selon (Guittonneau Et Huon ,1983), elles sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6cm de diamètre, dont la plupart sont pourvues d'une forte épine atteignant jusqu'à 5cm et se réfléchissant vers l'arrière. La corolle est dentée de couleur pourprée, 5 étamines formant un tube autour du style (figure 4) (Guignard, 1998).



Figure 4 : Fleur de *Silybum marianum* L. fraîches et sèches (www.freeflowerpictures.net)

FLORAISON

La floraison est caractérisée par une inflorescence parsemée de capitules, par une pollinisation autogame et par une répartition hermaphrodite (Guittonneau Et Huon ,1983). La période de la floraison s'étale du mois d'octobre jusqu'au printemps.

FRUIT

Selon (Guittonneau et Huon 1983), les fruits sont des akènes oviforme luisants, de 6 à 7 mm, plats, lisses, et brillants et la couleur s'étend du noir au brun chiné ou marbré de jaune, surmontés d'une aigrette légèrement pendante de poils soyeux et blancs blanche (figure 5). D'après (Sindel ,1991), les graines ont une aigrette, tombent quand les graines mûrissent.



Figure 5 : Akènes de *Silybum marianum* L. (Bessam, 2020)

REPRODUCTION

Le *Silybum marianum* L. est une plante annuelle. La germination se produit en général en automne. Une plante peut produire jusqu'à 6350 graines. Presque la quasi-totalité (95%) des graines sont capables de germer au cours du cycle suivant.

La floraison débute dès le mois de juin jusqu'au mois d'août. La pollinisation est autogame (par autofécondation, car le *Silybum marianum* est une espèce hermaphrodite) ou encore entomogame (la fécondation se fait au moyen des insectes, du vent,...) Grâce à son cycle de vie et à sa croissance, le chardon-marie peut envahir une importante superficie.

5- CONSTITUANTS CHIMIQUES DES AKÈNES DE *SILYBUM MARIANUM* L.

L'huile extraite des graines de chardon-marie contient essentiellement des lipides, de la vitamine E et des flavonoïdes. Sa teneur élevée en acides gras insaturés (56% de polyinsaturés et 21 % de mono-insaturés) lui permet d'être un allié intéressant dans les régimes anti-cholestérol et pour l'équilibre cardio-vasculaire.

Les flavonolignanes présents dans la silymarine au niveau des graines sont principalement la silychristine, la silydianine et la silybine. Le composé le plus actif biologiquement étant la silybine (Meyer et Bouchteler, 1999).

6- PROPRIÉTÉS DE LA PLANTE

La silymarine est connue pour sa capacité à limiter les dommages provoqués par l'alcool, les drogues, les pesticides et quelques poisons, ce qui lui confère des propriétés hépato-protectrices.

Elle est aussi capable d'agir sur l'empoisonnement par certains champignons vénéreux (notamment l'amanite phalloïde) et on a aussi reconnu son rôle dans la limitation du phénomène de carcinogénèse.


Des études réalisées sur la cirrhose alcoolique et non alcoolique ont montré que l'administration d'extrait de chardon-marie était associée à des améliorations notables. Par l'action de ces différents mécanismes (action antioxydante, stabilisateur de la membrane cellulaire), la silymarine permet de limiter les phénomènes inflammatoires.

Il existe plusieurs mécanismes d'action connus pour la silymarine : elle inhibe les systèmes de transport membranaires des hépatocytes, rendant plus difficile l'absorption des toxiques, elle limite la peroxydation des lipides et augmente la captation des radicaux libres produits par les substances hépatotoxiques ; elle contribue également à la détoxification hépatique et aide à protéger les cellules vis-à-vis du stress oxydatif.

La silymarine stimule également la capacité de régénération hépatique en augmentant l'activité de plusieurs enzymes et protéines spécifiques.

Le *Silybum marianum* L. est utilisé en médecine traditionnelle notamment pour ses propriétés bénéfiques sur la digestion, également comme tonique, diurétique. Des études réalisées sur divers désordres hépatiques montrent l'intérêt de cette espèce pour améliorer certains paramètres cliniques.

Au niveau du rein, les composés de cette espèce favoriseraient la réduction des dommages liés au stress oxydant. Ils peuvent également empêcher la synthèse du cholestérol et aider à la réduction des taux de lipides sanguins.



CHAPITRE II
RAPPELS SUR LES
ENZYMES
COAGULANTS

1-LES PROTÉASES VÉGÉTALES

1- Généralités

Les enzymes se retrouvent chez tous les êtres vivants, que ce soit chez les animaux, les végétaux ou les microorganismes, les enzymes y sont présentes sous plusieurs formes et types : les protéases, les amylases, les lipases, les phytases, les cellulases, les hémicellulases, les mannases, les laccases, les lactases et bien d'autres (Olé et *al.*, 2002).

2-1- Rôle physiologique des protéases

Les enzymes protéolytiques jouent un rôle clé dans la physiologie des plantes. La large diffusion des protéases chez les plantes, les animaux et les microorganismes montre qu'elles sont nécessaires pour les organismes vivants où elles jouent un rôle physiologique important dans divers processus biologiques (Rao et *al.*, 1998).

Chez les plantes elles sont impliquées presque dans tous les aspects de croissance et du développement, la germination, les rythmes circadiens, elles sont impliquées dans divers processus intra- et extracellulaires tels que la sénescence et la mort cellulaire programmée (Domsalla et Matthias, 2008), La dégradation des protéines de stockage de graines en germination, le développement et la maturation des fruits, les mécanismes de régulation et autres (Pande et *al.*, 2006), elles sont impliquées dans le maintien du pool de protéine de la cellule.

Les végétaux ont été l'objet de nombreuses recherches en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*), la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie, 2001), la papaine ; extraite du latex de la plante équatoriale (*Carica papaya*), La kératinase, une autre protéase produite par quelques groupes de plantes (Rao et *al.*, 1998). Il en est de même pour les préparations enzymatiques provenant de chardons, d'artichauts, de gaillets et de courges (Alais, 1975).

Les études menées sur la plupart des extraits végétaux ont permis de classifier les protéases.

2.2. Classification des protéases végétales

Les protéases végétales peuvent être classées en 4 groupes selon le type catalytique: les aspartyl-protéases, les séril-protéases, les cystéyl-protéases et les métallo-protéases.

Les protéases à serine et à cystéine sont du point de vue catalytique très différentes des protéases aspartiques et des métallo-protéases en ce que le nucléophile du site catalytique fait partie d'un acide aminé, alors qu'il y a une molécule d'eau activée dans les deux autres groupes (Bruno et *al.*, 2006).

Aspartyl-protéases

Les aspartyl-protéases (APs) sont les plus actives à pH acide et sont spécifiquement inhibées par la pepstatine. Elles ont deux résidus aspartyl responsables de l'activité catalytique et montrent une spécificité préférentielle pour le clivage au niveau des liaisons peptidiques entre les résidus d'acides aminés hydrophobes (Domingos et *al.*, 2000).

Les (APs) végétales ont été caractérisées et purifiées à partir d'une grande variété d'espèces de plantes telles que les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Mutlu et *al.*, 1999), de chanvre (St. Angelo et *al.*, 1970), de concombre et de courge (Polanowski et *al.*, 1985), le riz (Doi et *al.*, 1980) et l'orge (Sarkinen et *al.*, 1992). Elles sont également présentes au niveau des fleurs de chardon (Verissimo et *al.*, 1996), des feuilles de tomate (Rodrigo et *al.*, 1989), des feuilles et des tubercules de pomme de terre (Guevara et *al.*, 2004).

La présence de l'activité coagulante du lait a été rapportée chez diverses espèces de plantes appartenant à la famille des Asteraceae comme l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (Llorente et *al.*, 1997), où la protéase, la cenprosine a été exprimée dans des quantités assez élevées dans les graines et les feuilles du (Domingos et *al.*, 2000). Le chardon-Marie (*Silybum marianum* L. Gaertn.) dont les fleurs et les feuilles étaient utilisées pour la production de fromages (Vairo-Cavalli et *al.*, 2005).

Les (APs) peuvent être impliquées dans la digestion des insectes par les plantes carnivores (Garcia Martinez et Moreno, 1986), dans la dégradation des protéines végétales en réponse à des pathogènes, au cours des processus de développement (Asakura et *al.*, 1997), dans les mécanismes de gestion des protéines de stockage (Doi et *al.*, 1980), les réponses au stress (de Carvalho et *al.*, 2001) et la sénescence (Bhalerao et *al.*, 2003).

Cystéyl-protéases

Également appelées protéases à thiol, la majorité des cystéyl-protéases (CPs) végétales présentent un pH optimal entre 5,0 et 8,0 (Dubey et *al.*, 2007).

Plusieurs (CPs) ont été isolées de nombreuses plantes, comme la papaïne, l'actinidine, la protéinase Ω , la chymopapaïne et la bromélaïne. La plupart d'entre elles appartiennent à la famille de la papaïne (Grudkowska et Zagdanska, 2004).

Les (CPs) sont impliquées dans la sécheresse (Jones et Mullet, 1995). Elles jouent également un rôle dans l'accumulation des protéines de réserve dans les graines et dans la mobilisation de protéine de stockage (Okamoto et Minamikawa, 1995). dans la protéolyse

pendant la sénescence (Noh et Amasino, 1999), et au cours de la mort cellulaire programmée (de Jong et *al.*, 2000).

Ainsi, Elles participent à la fois aux processus anaboliques et cataboliques, et sont impliqués dans les voies de signalisation ainsi que la maturation des protéines, la dégradation et la reconstruction des protéines en réponse à différentes stimulations externes et jouent aussi une fonction de ménage pour éliminer les protéines anormales ou mal repliées (Grudkowska et Zagdanska, 2004).

Séryl-protéases

Les séryl-protéases (SPs) représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes protéolytiques ; elles sont répandues parmi tous les groupes taxonomiques ; les arbres ; les légumes et les herbes. Elles sont présentes dans presque toutes les parties des plantes, mais elles sont plus abondantes dans les fruits. (Rawlings et Barrett, 2004).

La plupart des (SPs) végétales caractérisées sont des protéases ATP-dépendantes chloroplastiques (Crafts- Brandner *et al.*, 1996).

Les (SPs) agissent principalement comme des enzymes de dégradation. Les subtilases végétales (subtilisine SP), cependant sont impliquées dans divers processus physiologiques, y compris la pathogenèse dans des plantes infectées par les virus (Tornero et *al.*, 1997), la signalisation (Dery et *al.*, 1998), la germination (Sutoh et *al.*, 1999), la sénescence (Distefano et *al.*, 1999), l'infection des cellules végétales (Laplaze et *al.*, 2000) , la mort cellulaire programmée (Beers et *al.*, 2000), la dégradation et traitement des protéines (Antao et Malcata, 2005), et la symbiose (Takeda et *al.*, 2007).

Métallo-protéases

Les métallo-protéases (MPs) dépendent d'un cation divalent pour l'activité, le plus souvent le zinc, mais également du cobalt ou du manganèse (Robert et Vian, 2004). Elles sont les plus diversifiés en termes de structure et de fonction. Plus de 50 familles ont été identifiées dans 24 clans.

Les MPs ont été localisées dans les feuilles de soja (Graham et *al.*, 1991). Elles sont impliquées dans la régulation de la demi-vie de la protéine dans les plantes, (Varshavsky, 1996) et sont exprimées dans les organes reproducteurs dans les conditions de stress ; le stress osmotique, les blessures et les infections pathogènes (Hildmann et *al.*, 1992; Pautot et *al.*, 1993 ; Chao et *al.*, 1999 ; Gu et *al.* , 1999; Schaller et *al.*, 2001).

Les MPs végétales comprennent des exo et endoprotéases dans de nombreux compartiments cellulaires, avec une fonction de dégradation très spécifique. Seulement très peu de ces enzymes ont été caractérisés à ce jour (Schaller, 2004).



CHAPITRE III
COAGULATION DU
LAIT

I- GÉNÉRALITÉS SUR LE LAIT :

I-1- Définition du lait :

Le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites sans rien y ajouter ou en soustraire, destinée à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur (FAO, 2000).

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en β carotènes. Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique. Son goût, variable selon les espèces animales est agréable et douceâtre.

En 1909, le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le Congrès International de la Répression des Fraudes, comme étant le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum. (Goursaud, 1985).

I-2- Composition et caractéristiques du lait

Le lait est un produit d'origine biologique fortement altérable par voie microbienne et par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines). Cette composition varie selon différents facteurs liés aux animaux, les principaux étant la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge (Vignola, 2002).

I-2-1 Caractéristiques organoleptiques

La qualité organoleptique (couleur, odeur et texture) d'un produit se dégrade au fil du temps. La durée de stockage, la température et leur action combinée affectent considérablement les attributs sensoriels totaux (Raynaud, 2006).

Un lait de bonne qualité organoleptique présente des caractéristiques particulières qui concernent la couleur, l'odeur, la saveur, la viscosité etc. (Luquet, 1990).

I-2-2- Caractéristiques physiques et chimiques

Caractéristiques physiques	valeurs
PH	6.6-6.8
Densité	1.030-1.033
Température de congélation (°C)	-0.53

Tableau 1 : les caractéristiques physiques (bourgeois *et al.*, 1990)

Caractéristiques chimiques (g/100g)	valeurs
Extrait sec total	12.7
Taux de matière grasse	3.9
Teneur en matière azotée totale	3.4
Teneur en caséines	2.8
Teneur en albumines et globulines	0.5
Teneur en cendres	4.9
Vitamines, enzymes, et gaz dissous	traces

Tableau 2 : les caractéristiques chimiques (bourgeois *et al.*, 1990)

I-2-3- Caractéristiques microbiologiques du lait

Le lait contient peu de microorganismes (moins de 103 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain. Il s'agit essentiellement des microcoques mais aussi des streptocoques lactiques (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) qui sont des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores (Guiraud, 1998).

Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées "Lacténines" mais leur action est de très courte durée (1 heure environ) (Guiraud, 1998).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade. Ils sont généralement dangereux au point de vue sanitaire.

II- PRINCIPALES ACTIVITÉS DES MICROORGANISMES DU LAIT

Les activités métaboliques des microorganismes présents dans le lait peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'apparence, l'odeur, la consistance ou la texture et le goût des produits laitiers. Parmi ces activités on peut citer.

- ❖ **l'acidification** : c'est une production d'acide lactique à partir du lactose par les bactéries lactiques lors de leur croissance.
- ❖ **la protéolyse** : c'est la dégradation des protéines du lait avec formation de peptides, dont certains donnent des mauvais goûts aux produits laitiers.
- ❖ **la lipolyse** : c'est la libération d'acides gras à partir des triglycérides du lait, entraînant un goût de rance.
- ❖ **la production de gaz** : certaines bactéries (hétéro fermentaires, bactéries telluriques) au cours de leur croissance produisent des gaz. Dans le cas de certains fromages on peut assister à l'apparition d'un défaut d'aspect, dû à la production de gaz, associé ou non à un défaut de goût.

Enfin, certains microorganismes ne semblent pas présenter les inconvénients cités plus haut. Leur présence en grand nombre dans le lait est toutefois l'indication d'une mauvaise hygiène générale au stade de la production. Ces microorganismes peuvent être considérés comme « indicateurs » d'une hygiène défectueuse (Vignola, 2002).

III- PROTÉINES DU LAIT

Du point de vue physico-chimique, le lait peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse contenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissout (lactose, sels, vitamines, protéines et composés azotés solubles) et les autres sous la forme colloïdale (micelles de caséines, phosphate de Ca et Mg) (Luquet, 1990).

Dans cet ensemble de constituants, les protéines, dont la teneur moyenne estimée à 34 g/l à 28g/l par les caséines. Celles-ci sont primordiales parce qu'elles confèrent une bonne valeur nutritionnelle au produit (couverture des besoins azotés de l'organisme) et, une valeur ajoutée au lait grâce à leurs aptitudes technologiques et leurs propriétés fonctionnelles reconnues (Cayot et Lorient, 1998).

Ces protéines ont une finalité alimentaire et elles constituent la base de la transformation du lait en fromage.

IV- GÉNÉRALITÉS SUR LES CASÉINES

IV-1- 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 %, (Dalglish et Corredig, 2012).

Ces protéines possèdent un certain nombre de caractères communs : la présence de phosphore sous forme de groupements phosphorylases, leur richesse en certains acides aminés (glutamate, leucine, proline) 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).

Les composés azotés

La fraction azotée forme la partie la plus complexe du lait. Elle est probablement moins bien connue dans sa constitution et dans les transformations qu'elle peut subir (Vétier et coll, 2000).

Cette fraction est constituée des protéines 30 gr.L-1 pour le lait de vache. On y retrouve également des substances non protéiques. Parmi les protéines on distingue essentiellement les caséines, les protéines du lactosérum et les protéoses peptones (Vétier et coll., 2000).

Micelles de caséine

La micelle de caséine est une particule sphérique d'environ 180 nm constituée de submicelles de 8 à 20 nm, elle est très hydratée (2 à 4 g d'eau par g de protéine).

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; Dalglish 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 submicelles les plus riches en caséine κ sont situées en surface de la micelle, ce qui la stabilise (Cayot et Lorient, 1998).

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 (Dekruif *et al.*, 2012).

Les substances azotées non protéiques

Elles constituent 5 % de la matière azotée. Ce sont des substances de faible poids moléculaire telles que l'urée et les acides aminés libres. Ces substances sont dialysables et restent en solution dans les conditions qui amènent la précipitation des protéines.

Cependant certains esters comme la phospho-glycéroéthanol-amine est particulièrement abondante dans le lait avec une teneur de 50 mg.L-1 (Alais, 1975).

Les éléments minéraux :

Tous les éléments minéraux ne se retrouvent pas à l'état dissous. Une partie se trouve à l'état colloïdal, une autre est dissoute dans la phase aqueuse et une dernière se retrouve sur des protéines diverses et à la périphérie des globules gras (Adrian, 1973).

Le phosphore et le calcium sont les deux éléments qui forment l'essentiel de la partie minérale-colloïdale. Les 2/3 du calcium et plus de la moitié du phosphore font principalement partie du complexe phospho-caséinate de calcium.

IV-2- Mécanismes de la coagulation

La coagulation du lait 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 physicochimiques 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).

IV-2-1- Coagulation du lait

La coagulation du lait constitue une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (Abiazar, 2007) en industrie fromagère. Le procédé choisie pour la coagulation à un large effet sur la texture du produit fini (Herbert *et al.*, 1999).

Coagulation acide

La coagulation par voie acide est provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne, qui transforme le lactose en acide lactique. Le pH du lait de fromagerie diminue avec la production d'acide, ce qui provoque une solubilisation du phosphate et du calcium colloïdal, un élément important dans la stabilité des micelles de caséine. Ces dernières vont se lier entre elle pour former un gel cassant très friable et peu élastique (Mietton, 1995).

Si l'acidification est rapide par addition d'un acide minéral ou organique, il y a floculation des caséines à pH 4,6 sous la forme d'un précipité plus ou moins granulé dispersé dans le lactosérum.

Par contre, une acidification progressive, obtenue soit par fermentation lactique, soit par hydrolyse de la gluconolactone, conduit à la formation d'un gel lisse homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (Mietton *et al.*, 1994). La teneur en protéines agit sur la coagulation acide. Un lait riche en protéines formera un caillé lactique plus ferme (Carole et Vignola, 2002).

Coagulation par les extraits de plantes :

La coagulation du lait est devenu une pratique que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux (Froc, 2001).

Il existe, dans divers pays, des plantes susceptibles de fournir des enzymes ayant la propriété de coaguler le lait, 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).

En Algérie l'utilisation des fleurs du chardon, de l'extrait de l'artichaut, des graines de citrouille, ou de la sève du figuier sont des pratiques connues pour la production du Jben traditionnel (Mouzali *et al.*, 2006).

Coagulation enzymatique du lait :

La coagulation enzymatique est assurée par un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne, ayant la propriété de coaguler le lait. Il faut aussi tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur permet d'hydrolyser les caséines α et β avec libération de peptides (Mietton, 1995).

Si cette hydrolyse est trop élevée, il peut en résulter une baisse du rendement fromager, une texture molle et l'apparition de goûts anormaux. La présure est une enzyme protéolytique provenant de la caillette du veau non sevré. Cette enzyme correspond à deux fractions actives: l'une mineure (20 %), constituée par la pepsine, l'autre majeure (80 %) est représentée par lachyosine qui est le coagulant le plus utilisé (Eck, 1990).

En pratique, la coagulation du lait peut se caractériser par trois paramètres : le temps de floculation, la vitesse de raffermissement et la fermeté maximale du gel (Caron *et al.*, 1997).

V- CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS GELS OBTENUS

Propriétés de coagulum obtenu par voie enzymatique

Le gel de présure est rigide, de grande cohésion, contracté et imperméable.

Propriétés de coagulum obtenu par voie acide

Le coagulum formé par voie acide possède des propriétés rhéologiques caractéristiques : il est friable, peu élastique, son raffermissement est très limité et très long, sa porosité est bonne, sa perméabilité élevée, mais son aptitude à l'égouttage est limitée (Ramet, 1985).

VI- FACTEURS DE LA COAGULATION

De Nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la coagulation du lait et les caractéristiques physiques des coagulums. Ces facteurs sont principalement liés à la concentration en enzyme, à la température, au pH, à la teneur en calcium, à la teneur en caséines et à la dimension des micelles (Mahaut *et al.*, 2000, Li et Dalgleish, 2006).

Concentration en enzyme

La concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation. Cependant, elle est proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse de la caséine κ (phase enzymatique) et à la vitesse d'agrégation des micelles (phase physique).

Température

La température optimale d'activité de la chymosine et de la pepsine est de 40-42°C. A cet intervalle de température, le temps de floculation est minimal, puis augmente aux températures plus élevées et devient nul à 65°C où la présure est inactivée. On note que le temps de raffermissement du gel diminue avec l'élévation de la température.

pH

En passant de pH 6.7 à 5.6, la vitesse de coagulation est accrue. Ceci résulte d'un accroissement de la vitesse d'hydrolyse et par suite une augmentation de la vitesse de raffermissement du gel.

La fermeté est significativement importante de pH 6.6 à pH 6.0 due à une plus grande disponibilité du calcium ionisé.

Teneur en calcium

La réticulation du gel lors de la coagulation du lait par la présure, impliquant des liaisons phosphocalciques, est particulièrement influencée par la teneur et la nature du calcium présent. L'addition du CaCl_2 entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence un temps de coagulation plus court et une fermeté du gel plus élevée.

Teneur en caséines

La vitesse d'hydrolyse enzymatique est proportionnelle à la teneur protéines. Ainsi, la vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent avec la teneur des caséines.

Dimension des micelles

La relation entre les dimensions des micelles et le temps de coagulation est proportionnelle. Pour les micelles de faible diamètre, riches en caséine k, la vitesse d'hydrolyse est plus rapide.



PARTIE II
ÉTUDE
EXPÉRIMENTALE



CHAPITRE I
MATÉRIELS ET
MÉTHODES

I-MATÉRIELS BIOLOGIQUE

L'espèce *Silybum marianum* L. (chardon Marie) a été récoltée à Sidi Bel Abbés dans l'enceinte de l'université (Campus), au mois d'Avril 2021.

I-1- Préparation du matériel végétal

Les feuilles prélevées sont nettoyées, lavées à l'eau distillée puis séchées à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours, pour être ensuite pulvérisées à l'aide d'un broyeur. La poudre de feuille est conservée dans un flacon sombre à l'abri de la lumière et de l'humidité, jusqu'aux analyses.

Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation.

I-2- Préparation des solutions de présure

I-2-1 La présure

La présure qui est l'extrait enzymatique obtenu à partir des feuilles de *S. marianum* L.

Solution (1) de présure

5g de poudre de feuilles de la plante est macérée dans un mélange de 500 ml d'eau distillée, 10 g de NaCl et 8 g de CaCl₂ et placée dans un agitateur électrique. Cette macération se fait pendant 3 jours successifs à température ambiante. Le macérât est filtré deux fois sur papier filtre jusqu'à obtention d'une solution (1) de présure limpide.

5 ml de cette solution est additionné à 250 ml de lait de vache frais dans un bécher puis plonger dans un bain-marie en changeant à chaque fois la température de 20 ; 30 ; 40 et 50°C. Le chronomètre est déclenché en effectuant de légères rotations, de façon à ce qu'il y ait un film de lait sur les parois du bécher. Lorsqu'un début de floculation apparaît, on arrête le chronomètre.

Solution (2) de présure

10g de poudre de feuilles de la plante est macérée dans un mélange de 500 ml d'eau distillée, 10 g de NaCl et 8 g de CaCl₂ et placée dans un agitateur électrique. Cette macération se fait pendant 3 jours successifs à température ambiante. Le macérât est filtré deux fois sur papier filtre jusqu'à obtention d'une solution (2) de présure limpide.

5 ml de cette solution est additionné à 250 ml de lait de vache frais dans un bécher puis plonger dans un bain-marie à la température de 20 ; 30 ; 40 et 50°C. Le chronomètre est déclenché en effectuant de légères rotations, de façon à ce qu'il y ait un film de lait sur les parois du bécher. Lorsqu'un début de floculation apparaît, on arrête le chronomètre.

Solution (3) de présure

15g de poudre de feuilles de la plante est macérée dans un mélange de 500 ml d'eau distillée, 10 g de NaCl et 8 g de CaCl₂ et placée dans un agitateur électrique. Cette macération se fait pendant 3 jours successifs à température ambiante. Le macérât est filtré deux fois sur papier filtre jusqu'à obtention d'une solution (3) de présure limpide.

5 ml de cette solution est additionné à 250 ml de lait de vache frais dans un bécher puis plonger dans un bain-marie à la température de 20 ; 30 ; 40 et 50°C. Le chronomètre est déclenché en effectuant de légères rotations, de façon à ce qu'il y ait un film de lait sur les parois du bécher. Lorsqu'un début de floculation apparaît, on arrête le chronomètre.

Solution (4) de présure

20 g de poudre de feuilles de la plante est macérée dans un mélange de 500 ml d'eau distillée, 10 g de NaCl et 8 g de CaCl₂ et placée dans un agitateur électrique. Cette macération se fait pendant 3 jours successifs à température ambiante. Le macérât est filtré deux fois sur papier filtre jusqu'à obtention d'une solution (4) de présure limpide.

5 ml de cette solution est additionné à 250 ml de lait de vache frais dans un bécher puis plonger dans un bain-marie à la température de 20 ; 30 ; 40 et 50°C. Le chronomètre est déclenché en effectuant de légères rotations, de façon à ce qu'il y ait un film de lait sur les parois du bécher. Lorsqu'un début de floculation apparaît, on arrête le chronomètre.

I-3- Préparation du matériel d'étude

I-3-1- Lait de vache

Le lait de vache frais provient d'une ferme de la région, de Tilmouni, Sidi Bel Abbés. Après la réception du lait, il a été placé dans un réfrigérateur avant d'effectuer les tests pour la coagulation.

II- CALCUL DE LA FORCE DE PRÉSURE

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut (présure) est déterminée selon la méthode rapportée par Shieh *et al.*, (2009). Cette activité exprimée en force coagulante correspond au volume du lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique.

En pratique, la force de la présure liquide qui est définie comme la quantité d'enzyme doit être de 1/10.000 (1 litre de présure coagule 10.000 litres de lait à 35°C en 40 minutes).

Le calcul de la force de la présure (F) se fait selon la formule suivante :

$$F = \frac{2400 \times V}{T \times v}$$

Où :

Le nombre « 2400 » représente le temps standard du test en 40 minutes

F : force de présure.

V : volume de lait en ml.

v : volume de présure en ml.

T : temps de floculation (coagulation) en minutes.


III- EFFET DE LA TEMPÉRATURE

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures de 20 °C ; 30°C ; 40°C et 50°C avec un accroissement de 5° C.

IV- LE TEMPS DE CAILLAGE (COAGULATION)

Le temps de caillage est la période qui s'écoule entre le moment de l'emprésurage et la fin de la coagulation qui peut être déterminé en observant si la consistance est bonne et par la fermeté du coagulum.

V- SOLUTION DE PRÉSURE SANS NaCl ET CaCl₂

 5g de poudre de feuilles de la plante est macérée dans un mélange de 500 ml d'eau distillée, et placée dans un agitateur électrique. Cette macération se fait pendant 3 jours successifs à température ambiante. Le macérât est filtré deux fois sur papier filtre jusqu'à obtention d'une solution de présure limpide.

5 ml de cette solution est additionné à 250 ml de lait de vache frais dans un bécher puis plonger dans un bain-marie à la température ambiante de 20°C en déclenchant le chronomètre et en effectuant de légères rotations, de façon à ce qu'il y ait un film de lait sur les parois du bécher. Lorsqu'un début de floculation apparaît, on arrête le chronomètre.



CHAPITRE II
RÉSULTATS ET
DISCUSSION

I- RÉSULTATS ET DISCUSSION

I-1- Temps de coagulation

Les résultats représentés sur le tableau 3 mentionnent les valeurs de la durée de la coagulation du lait en fonction des concentrations des présures et des températures.

Concentrations présure (g)	Températures (°C)			
	20°C	30°C	40°C	50°C
5	–	2 h 40 min	1 h	50 min
10	–	2 h 15 min	45 min	35 min
15	–	1 h	35 min	30 min
20	–	45 min	25 min	20 min

Tableau 3 : Résultats de la durée de coagulation des solutions de présures aux différentes concentrations et températures

D'après les résultats du tableau ci-dessus, nous constatons qu'au fur et à mesure que les doses des extraits enzymatiques (présures) de l'espèce *S. marianum* L. augmentent, le temps de coagulation se réduit progressivement jusqu'à atteindre des durées très courtes. Nos résultats corroborent ceux de (Talantikite, 2015). La dose de présure est inversement proportionnelle au temps de floculation. Plus la dose est forte, plus le temps est court.

En effet, nous remarquons à la température de 20°C, la coagulation n'a pas eu lieu pour les quatre concentrations (5 ; 10 ; 15 et 20 g). Néanmoins l'augmentation progressive des températures à 30 ; 40 et 50°C, entraîne également une diminution du temps de coagulation

du lait de vache. L'influence de la température agit sur l'activité coagulante. Nos résultats confirment ceux de (Bensaid, 2011).

I-2- Temps de coagulation sans NaCl₂ et CaCl₂

Les résultats illustrés sur le tableau 4 représentent les valeurs de la durée de la coagulation du lait en fonction de la concentration de la présure en absence des solutions de CaCl₂ et de NaCl à la température ambiante.

Concentration présure (g)	Température	Durée
5	20°C	14h

Tableau 4: Résultats de solutions de présures sans (CaCl₂ et NaCl) à la température de 20°C

L'essai du test de la coagulation du lait de vache avec la solution de présure d'une quantité de 5 g en absence des solutions de NaCl et de CaCl₂ à la température ambiante du laboratoire (20°C), a révélé un temps de coagulation du lait d'une durée prolongée de 14h. L'addition des solutions de NaCl et de CaCl₂ à l'extrait enzymatique entraîne un raccourcissement du temps de coagulation (tableau 4).

La présence du NaCl dans les solutions d'extraction accroît la force ionique augmentant ainsi la solubilité des enzymes coagulants, et entraînant la libération du maximum de protéines coagulantes dans le milieu avec une augmentation du taux d'agrégation des protéines avec réduction du pH du lait.

L'addition du CaCl₂ entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdale ayant pour conséquence, un temps de coagulation plus court et une fermeté de gel plus élevée (Bensaid, 2010).

I-3- Force des présures à la température de 30°C

Sur le tableau 5 et la figure 6 sont représentées les forces de présures en fonction des quantités des extraits enzymatiques à la température de 30°C.

Concentrations (g) présures	Température (°C)	Force de présure
5	30	750
10	30	890
15	30	2000
20	30	2666

Tableau 5 : Forces des solutions de présure à température de 30°C

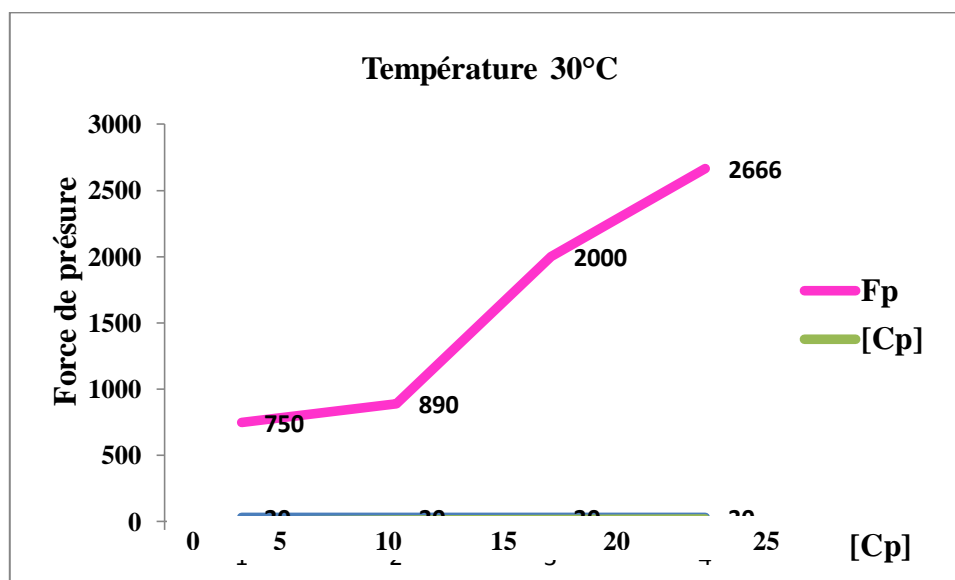


Figure 6 : Force des solutions de présures à la température de 30°C

[Cp] : Concentration de la présure ; Fp : Force de la présure

Les résultats illustrés sur le tableau 5 et la figure 6 à la température de 30°C, nous a permis de constater un profil indiquant l'existence de 3 phases. La première phase enregistre une progression très lente de la force de présure avec des valeurs de 750 et 890 en présence des extraits enzymatiques de *S. marianum* L. aux concentrations variant de 5 à 10 g. Néanmoins, les concentrations croissantes de 15 et 20 g, entraînent une augmentation de façon considérable de la courbe avec des forces de présures qui atteignent de très forte valeurs (doubles et triples) qui sont de l'ordre de 2000 et 2666.

L'activité coagulante est très variable, car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et par les conditions de collecte et de stockage.

I-4- Force de présures à la température de 40°C

Les résultats représentés sur le tableau 6 et la figure 7 mentionnent les forces de présures en fonction des quantités des extraits à la température de 40°C.

Concentrations (g) présures	Température (°C)	Force de présure
5	40	2000
10	40	2666
15	40	3428
20	40	4800

Tableau 6 : Force des solutions de présures à la température de 40°C

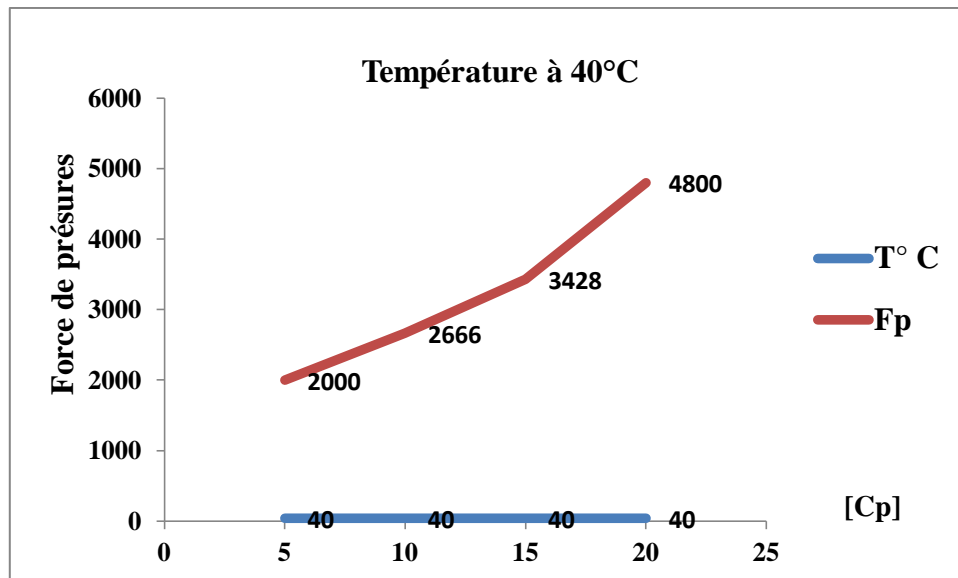


Figure 7 : Force des solutions de présures à 40°C

Fp : Force de présure ; **T°C** : Température ; **[Cp]** : Concentration de la présure

Les essais des tests de coagulation du lait de vache en présence des extraits enzymatiques de *S. marianum* L. à la température de 40°C ont révélé que les deux premiers essais aux concentrations de 5 et 10 g présentent une courbe ascendante avec une force de présure d'une valeur de 2000 et 2666. Au fur et à mesure que la quantité des extraits augmente de 15 et 20 g, nous avons enregistré une phase exponentielle indiquant une force de présure beaucoup plus importante et qui varie de 3428 à 4800.

Nous constatons que l'essai à la T° (40°C) enregistre une force de présure plus importante et une coagulation plus rapide par rapport au premier essai à la T° (30°C).

Les enzymes d'origine végétale se caractérisent par des températures d'activité élevés. Ces enzymes sont actives et capables de coaguler le lait. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Bensaid (2011) sur l'extrait aqueux du Chardon.

I-5- Force de présures à la température de 50°C

Les résultats relatifs à la force de présure à la température de 50°C sont représentés sur le tableau 7 et la figure 8.

Concentrations (g) présure	Température (°C)	Force de présure
5	50	2400
10	50	3428
15	50	4000
20	50	6000

Tableau 7 : Force des solutions de présures à la température de 50°C

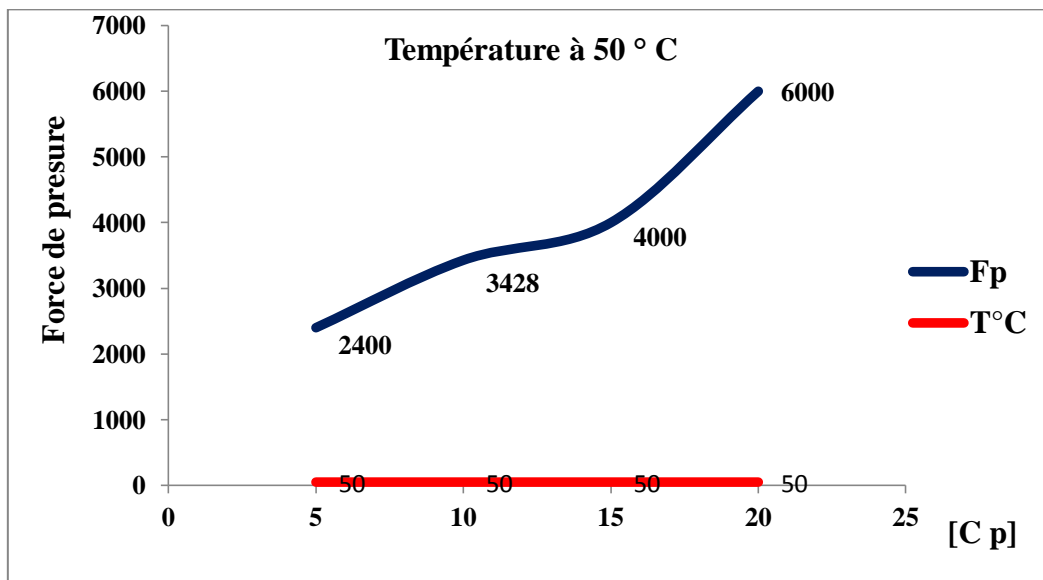


Figure 8 : Force des solutions de présures à 50°C

[C p] : Concentration de la présure ; T°C : température

Les résultats illustrés sur le tableau 7 et représentés par la figure 8 ont fait ressortir que le troisième essai à la température de 50°C présente un profil avec une courbe exponentielle avec une force de présure d'une valeur de 2400 sous le traitement à 5g d'extrait enzymatique de *S. marianum* L. provoquant une coagulation du lait de vache.

Pour la suite des tests, nous avons remarqué que l'augmentation du volume de l'extrait enzymatique entraîne une diminution de la durée de la coagulation du lait et donc une augmentation considérable de la force de présure plus importante avec des valeurs respectives de 3428 ; 4000 et 6000 en présence des concentrations croissantes de 10 ; 15 et 20. Ce sont probablement la cardosine « A » et « B » présente dans les extraits enzymatiques et qui sont responsables de la coagulation et qui se caractérise par une température d'activité élevée, vu l'augmentation de la température à 50°C. Ces deux enzymes végétales supportent bien les températures élevées (Rui *et al.*, 2004).

Des études récentes ont caractérisé, dans l'extrait de chardon, deux protéases aspartiques, les cardosines A et B (Verissimo *et al.*, 1996). Ces enzymes sont semblables respectivement de par leur spécificité et leur activité à la chymosine et à la pepsine (Pires *et al.*, 1994 ; Verissimo *et al.*, 1995).

De nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la coagulation du lait, et les caractéristiques physiques du coagulum. Ces facteurs sont liés à la concentration en enzymes, à la température, au pH, la teneur en caséine et à la dimension des micelles (Bensaid, 2010).



CONCLUSION GENERALE

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que les tests effectués sur les extraits enzymatiques obtenus à partir des feuilles de l'espèce *Silybum marianum* L. ont révélé que l'augmentation de la dose de la présure aux différentes concentrations variant de 5 g à 20 g ainsi que les températures variant de 20°C à 50°C, réduisent le temps de coagulation du lait de vache et augmentent la force de la présure de la solution enzymatique. Ces extraits ont révélé des résultats intéressants.

Il serait intéressant de réaliser une extraction des enzymes la cardosine « A » et la cardosine « B » dans les extraits enzymatique des feuilles et de les purifiés, afin de déterminer leurs propriétés industrielles, biotechnologiques, pharmaceutiques ou autres.

Il serait également intéressant de réaliser des tests sur plusieurs types de lait (vache, brebis, chamelle).

La fabrication du fromage à l'échelle industrielle utilisant les enzymes des feuilles du *S. marianum* L.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- **AMROUNE M.,(2019).** Substitution de la présure animale par un autre coagulant d'origine végétale (chardon de marie, *Silbum marianum.L*) (essai de coagulation sur différents lait). Mémoire de fin d'études, Université Abdelhamid Ben Badis, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 2-4, 7-10, 13-14 p.

-B-

- **Beka, R. G. (2011).** Une alternative végétale en fromagerie: préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*: étude biochimique et application technologique (Doctoral dissertation, Lille 1), 11 p.
- **Bensaid., 2011-** Utilisation de l'extrait enzymatique des fleurs du *Cynara cardenculus L.* pour la fabrication du fromage. Thèse de mémoire, université Abou bekr Belkaïd, Algérie, Tlemcen, 46 p.

-P-

- **Pires E., Faro C., Macedo I., Morgado J., Verissimo P., Dias Pereira, Gomes D., 1994.** Flor dacardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. Revista da Sociedade Portuguesa de quimica, 54, 66-68 p.

-R-

- **Rahal, N. B. (2012).** Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum*. Étude de leurs activités antioxydante et antitumorale (Doctoral dissertation, Université de Lorraine), 23-24 p.

-T-

- **Talantikite-Kellil, S. (2015).** Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie (Doctoral dissertation, Université M'hamed Bougara de Boumerdès, Département de Tec).

-V-

- **Verissimo P.C., Esteves Cl., Faro C.J., Pires E.V., 1995.** The vegetable rennet of *Cynara Cardunculus L.* Contains two protéinases with chymosin and pepsin like specificities. Boitech. Letters; 17 (6) 621 -626 p.

Références bibliographiques

- **Verissimo P., Ramalho-Santos M., Faro C., Pires E., 1996.** Action on Bovine u si casein of cardosins Aand B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara Cardunculus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1297 (1), 83-89 p.

Sites web :

- <https://www.laboratoire-lescuyer.com/nos-actifs/chardon-marie>