

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

**UNIVERSITE MOULOU D MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES**



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de diplôme de Master en Sciences Alimentaires

Spécialité : Agroalimentaire et contrôle de qualité

Thème

**Utilisation des enzymes d'artichauts dans la coagulation du lait.
(Thème bibliographique)**

Présenté par :

- MAZOUZ Lydia
- MOKRAOUI Liza

Devant le jury :

- | | | | |
|------------------|-----------------------|-----|-------|
| • Présidente : | CHENAH M. | MCB | UMMTO |
| • Examinatrice : | HAMMAD-
DOUFENE I. | MCB | UMMTO |
| • Encadrante : | ADDAR L. | MCB | UMMTO |

Année universitaire : 2023/2024

Remerciement

Tout d'abord, louange à "ALLAH" qui nous a guidées sur le droit chemin tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier profondément notre encadrante Dr. ADDAR L., qui a orienté ce travail avec beaucoup de patience et de gentillesse.

Nos remerciements vont également aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Un grand merci à nos familles et en particulier à nos parents, pour leur amour, leur soutien, leur encouragement et leur patience.

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont apporté leur aide ou leur soutien à ce travail.

À vous tous, je vous dis merci.

Dédicace

A mes chers parents pour leur soutien et leur patience tout au long de mes études.

A mes frères, sœurs pour leur présence.

A mon cher Dada Rayan pour son amour.

A mes amies : Lydia, Kenza, Sonia, Samia, Hanane, Tassadit, Dihia.

À mon binôme Liza, à ma partenaire de galère et de rire. Merci d'avoir partagée cette aventure avec moi, nos délires et nos moments de panique resteront gravés dans ma mémoire.

À tous ceux qui ont cru en moi,

Ce mémoire est dédié à vous, avec toute ma reconnaissance et mon affection.

Merci d'être toujours près de moi.

Lydia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Tout d'abord à Dieu qui m'a donné le courage et la volonté de continuer mes études et faire ce travail.

À la mémoire de mon père décédé trop tôt, qui est mon premier Encadrant depuis ma naissance et qui m'a toujours appris, qui m'a poussé et motivé et qui m'a toujours fourni tous les efforts nécessaires pour mon éducation et mon bonheur jusqu'à son dernier souffle. J'aurais souhaité ta présence en ce moment pour partager ma joie, tu es toujours présent dans mon esprit et dans mon cœur. Puisse Dieu, le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde.

À ma très chère mère la source de mes efforts aucune dédicace ne saurait à exprimer l'amour, l'estime le respect, que j'ai pour toi, rien ne sera à la hauteur de tes sacrifices et tes prières pour moi. Que dieu t'accorde une longue et paisible vie.

À ma chère sœur Lila, la sœur la plus merveilleuse et ma confidente, merci d'avoir toujours été à mes côtés, de m'avoir soutenue et encouragée et de me donner la force. Je t'aime. Que dieu protège et t'offre la chance et le bonheur.

À mes chers deux frères, Ameyas et Walid mes protecteurs, merci pour votre amour et votre soutien dans les moments difficiles, je vous aime. Que dieu vous bénisse et vous accorde tout le bien.

À ma famille, mes proches, mes amis et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité. A ceux et celles qui ont été à mes côtés dans les moments difficiles.

À mon binôme Lydia, à ma partenaire de galère et de rire. Merci d'avoir partagée cette aventure avec moi, nos délires et nos moments de panique resteront gravés dans ma mémoire.

Liza

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction générale.....01

I/ Généralités

1.1. Le lait	02
1.1.1. La composition du lait	02
1.2. Fromage	03
1.2.1. Composition de fromage.....	04
1.2.2. Classification des fromages	05
1.2.3. Les différents fromages traditionnels en Algérie	06
1.2.4. Mécanisme de la coagulation du lait	08
1.2.4.1 Coagulation acide.....	08
1.2.4.2 Coagulation enzymatique du lait.....	08
1.2.4.3 Coagulation mixte	09
1.2.5 Etapes de coagulation	09
1.2.5.1 Phase primaire.....	09
1.2.5.2 Phase secondaire	10
1.2.5.3 Phase tertiaire.....	10
1.2.6 Facteurs de la coagulation	11
1.2.7 Evaluation de la coagulation.....	12
1. 3. Les protéases coagulantes du lait.....	13
1.3.1. Classification des protéases	14
1.3.2. Les principales sources de protéases coagulantes du lait.....	15

II/ Artichaut et coagulation du lait

2.1. Artichaut sauvage (<i>cynara cardunculus L</i>).....	18
2.1.1. Description du cardon	18
2.2. Artichaut cultivé (<i>Cynara scolymus L</i>)	19
2.2.1. Description du l'artichaut	19

2.3. Les différents domaines d'utilisations d'artichauts (<i>Cynara cardunculus</i> et <i>Cynara scolymus</i>)	20
2.4. Comparaison de la capacité coagulante des deux espèces d'artichaut (<i>Cynara cardunculus</i> et <i>Cynara scolymus</i>)	21
2.4.1. Extraction des enzymes des fleurs de cardon et d'artichaut	21
2.4.2. Activité protéolytique et activité coagulante des extraits enzymatiques des fleurs de cardon et d'artichaut	22
2.4.3. Détermination de l'activité protéolytique et du temps de coagulation	23
2.5. Caractéristiques des fromages issus de la coagulation par protéases végétales	26
Conclusion	28
Références bibliographiques	30

Liste des abréviations

- **CMP** : Caséinomacropéptide
- **CPC** : Chymosine
- **EC** : Commission des enzymes
- **E.coli** : Escherichia coli
- **FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
- **FAOSTAT**: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
- **FPC** : Chymosine produite par fermentation.
- **IMCU** : International Milk Clotting Units
- **IUBMB** : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire
- **Lys** : Lysine
- **Met** : Méthionine
- **Phe** : Phénylalanine
- **UP** : Unité présure
- **Thr** : Thréonine

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Fromage traditionnel « Jben »	06
2	Fromage traditionnel « Kemariya »	07
3	Fromage traditionnel « Aghoughlou »	07
4	Hydrolyse de la caséine κ par la présure	10
5	Formation d'un caillé présure par action de la présure sur les caséines du lait	11
6	Production mondiale des enzymes coagulantes	14
7	Aspect morphologique du carbon	19
8	Aspect morphologique du l'artichaut	20

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
I	Composition moyenne du lait	03
II	Variations des teneurs en calcium selon les types de fromages	05
III	Principales classes d'enzymes dans le système E.C	14
IV	Temps de la coagulation selon les concentrations de l'extrait	24

Résumé

L'objectif du présent travail vise à contribuer à une meilleure compréhension d'utilisation des protéases dans l'industrie fromagère. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressées aux protéases végétales comme alternatives à la présure animale, en mettant accent sur les résultats de recherches concernant la capacité des extraits aqueux des fleurs des deux espèces d'artichaut *Cynara cardunculus* et *Cynara scolymus* à coaguler le lait.

La recherche d'alternatives végétales à la présure animale est motivée par des préoccupations éthiques et religieuses, ainsi que par la disponibilité et le coût réduits des sources végétales. L'évaluation de l'effet coagulant des enzymes végétales implique la caractérisation de leurs propriétés biochimiques et cinétiques, et l'étude de leur efficacité de coagulation sur différents types de lait.

Les études analysées montrent que ces deux espèces d'artichaut soient efficaces pour la production de fromage, tandis que l'espèce *Cynara cardunculus* à présenter une activité coagulante et protéolytique supérieure à celle de *Cynara scolymus*. Cette propriété est attribuée à la présence de la protéase cynarase dans les fleurs.

Cette modeste étude bibliographique met en relief le potentiel des enzymes végétales comme alternatives durables et éthiques pour la production de fromage, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour l'avenir de l'industrie.

Mots clés : Protéases végétales, présure animale, fromage, cardon, artichaut, activité coagulante.

Abstract

The objective of this work is to contribute to a better understanding of the use of proteases in the cheesemaking industry. In this context, we have focused on plant proteases as alternatives to animal rennet, with an emphasis on research results concerning the ability of aqueous extracts of the flowers of the two artichoke species, *Cynara cardunculus* and *Cynara scolymus* to coagulate milk.

The search for plant-based alternatives to animal rennet is motivated by ethical and religious concerns, as well as by the reduced availability and cost of plant sources. The evaluation of the coagulating effect of plant enzymes involves the characterization of their biochemical and kinetic properties, and the study of their coagulation efficiency on different types of milk.

The studies analyzed show that both artichoke species are effective for cheese production, while the species *Cynara cardunculus* exhibits a higher coagulating and proteolytic activity than *Cynara scolymus*. This property is attributed to the presence of the protease cynarase in the flowers.

This comprehensive literature review underscores the potential of plant-derived enzymes as sustainable and ethical alternatives for cheesemaking, thereby opening promising avenues for the future of the industry.

Keywords: Plant-based proteases, Animal rennet, Cheese, Cardoon, Artichoke, Milk-clotting activity.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو المساهمة في فهم أفضل لاستخدام البروتياز في صناعة الجبن. وفي هذا السياق، نهتم بالبروتياز النباتي كبديل للمنفعة الحيوانية، مع التركيز على النتائج البحثية للمستخلص المائي لزهور نوعين من الخرشوف البري (*Cynara cardunculus*) والخرشوف الشوكي (*Cynara scolymus*)، وهما نوعان معروفان بقدرتهما على تخثر الحليب.

إن البحث عن بدائل نباتية للمنفعة الحيوانية مدفوع بمخاوف أخلاقية ودينية، فضلا عن انخفاض توافر المصادر النباتية وتكلفتها. يتضمن تقييم الإنزيمات النباتية توصيف خواصها البيوكيميائية والحركية، ودراسة كفاءة تخثرها على أنواع مختلفة من الحليب.

وأخيرا، تشير الدراسات إلى أن أنواع الخرشوف البري لديها نشاط تخثر وتحلل بروتيني أكبر من الخرشوف الشوكي، على الرغم من أن كلاهما فعال في إنتاج الجبن. تُعزى هذه الخاصية إلى وجود إنزيم البروتياز سيناريز في الأزهار.

تسلط هذه الدراسة الببليوغرافية المتواضعة الضوء على إمكانات الإنزيمات النباتية كبديل مستدامة وأخلاقية لإنتاج الجبن، مما يفتح آفاقاً واعدة لمستقبل الصناعة.

الكلمات المفتاحية: البروتيازات النباتية، المنفعة الحيوانية، جبن، خرشوف بري، خرشوف شوكي، نشاط التخثر.

INTRODUCTION

Introduction

Les protéases dominent le marché des enzymes commerciales, représentant 60 % des ventes grâce à leur large éventail d'applications dans divers secteurs industriels (Corzo *et al.*, 2012 ; Sawant et Nagendran, 2014). Elles jouent un rôle essentiel dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et biotechnologiques. L'industrie alimentaire est la principale utilisatrice de protéases, notamment en fromagerie (Sawant et Nagendran, 2014).

La coagulation du lait est une étape clé de la fabrication du fromage, elle est traditionnellement induite par l'action de la présure animale qui est une enzyme extraite des caillettes de veaux (Abakar, 2012). Depuis les années 1950, la présure était l'enzyme dominante dans la fabrication fromagère, cependant, aujourd'hui elle ne répond qu'à 20 à 30 % de la demande globale en coagulants, entraînant ainsi une hausse des prix et une pénurie sur le marché mondial.

Cette situation est exacerbée par les restrictions sur l'abattage des jeunes ruminants et les exigences Halal, qui limitent l'approvisionnement en présure (Benani, 2017). Pour ces raisons, la recherche scientifique s'est orientée vers l'exploitation des alternatives enzymatiques de sources variées, capables de coaguler le lait (García *et al.*, 2012).

Dans cette quête de substituts, les protéases microbiennes, notamment celles issues de microorganismes génétiquement modifiés ont montré des résultats prometteurs (Jacob *et al.*, 2011 ; Mahajan et Chaudhari, 2014).

Cependant, ces dernières années, les protéases végétales ont suscité un intérêt considérable, non seulement en raison de leur capacité protéolytique, mais aussi pour leur activité stable sur une large plage de températures et de pH, ce qui en fait une alternative viable et respectueuse des exigences alimentaires et éthiques (Feijoo-Siota et Villa, 2011).

Dans ce cadre, nous nous sommes proposés de mener une étude bibliographique orientée spécifiquement sur les enzymes dites succédanées de présure, capable de coaguler le lait et produire de fromage.

Le but assigné à ce présent travail est de contribuer à avoir une meilleure connaissance des protéases végétales coagulantes du lait issu des plantes à fleurs locales, particulièrement sur l'extrait aqueux des fleurs des deux espèces d'artichaut *Cynara cardunculus* et *Cynara scolymus*.

PARTIE I

I. Généralités

1.1. Le lait

Le lait est un liquide naturellement produit par les glandes mammaires des animaux de traite, extrait de manière intacte à partir d'une ou plusieurs traites, sans aucune modification, et destiné à être consommé comme lait liquide ou à subir une transformation ultérieure (FAO, 2000).

Ce liquide, opaque et blanc, peut présenter une teinte jaunâtre en fonction de sa teneur en matières grasses et en β -carotènes. Il a une odeur légèrement caractéristique, mais discrète. Le goût du lait, qui varie selon l'espèce animale productrice, est généralement agréable et légèrement sucré (Marcel, 2007).

La définition du lait destiné à la consommation humaine a été fixée pour la première fois en 1909 par le Congrès international pour la répression des fraudes, Il doit être obtenu dans des conditions hygiéniques et exempt de toute contamination, car il constitue la partie essentielle d'une séance de traite complète d'une vache laitière en bonne santé, bien nourrie et non fatiguée. Aucun colostrum ne doit être inclus dans le lait lors de sa collecte. (Goursaud, 1985).

1.1.1. La composition du lait

D'une manière générale, le lait se compose principalement de lipides, protéines, glucides et eau. Cependant, il contient également de nombreux autres composants à savoir les vitamines, les minéraux et les enzyme (Dillon et Berthier, 2006). La composition du lait (tableau I) varie en fonction de l'espèce, la race, la période de lactation et de la méthode de production (Jean-paul, 2009).

Tableau I : Composition moyenne du lait de vache (Fredot, 2006).

Composants	Teneurs (g/100g)
Eau	89.5
Dérivés azotés	3.44
Protéines	3.27
Caséine	2.71
Protéines solubles	0.56
Azote non protéique	0.17
Matières grasses	3.5
Lipides neutres	3.4
Lipides complexes	<0.05
Composés liposolubles	<0.05
Glucides	4.8
Lactose	4.7
Gaz dissous	5% du volume du lait
Extrait sec total	12.8g

1.2. Fromage

Selon la norme Codex STAN 283-1978, le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou mi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé dont le rapport entre les protéines de lactosérum et les caséines dans le fromage ne doit pas dépasser le rapport observé dans le lait. Autrement dit, le fromage doit conserver un équilibre similaire à celui du lait en termes de ces deux types de protéines.

Le fromage est un produit laitier obtenu par coagulation du lait sous l'action de la présure ou d'autres agents coagulants, suivi d'un égouttage partiel du lactosérum, et présentant des caractéristiques physico-chimique et organoleptiques spécifiques (Eck, 1997).

1.2.1. Composition de fromage

Le fromage contient principalement des glucides sous forme de lactose dont la teneur varie en fonction du type de fromage. Elle est généralement entre 3 et 4 % dans les fromages blancs, 2% dans le cas des fromages affinés et fondus, tandis qu'elle est négligeable ou quasiment absente dans les fromages à pâte pressée.

Ces différences peuvent être attribuées aux changements que subissent le lactose lors du processus de fabrication. Le lactose peut être éliminé lors de l'égouttage du lactosérum, ou il peut être transformé par des bactéries lactiques lors du processus de coagulation ou de maturation (Luquet, 1990).

Concernant les protéines, selon leur mode de fabrication, les fromages contiennent entre 10 à 30% de protéines. Ce sont les aliments les plus riches en protéines, notamment les fromages à pâte dure qui ont une teneur en protéines (30%) plus élevée que la viande. Ces protéines proviennent de la caséine modifiée, lors de l'affinage une partie importante est décomposée et dissoute en oligopeptides et acides aminés sous l'action de diverses enzymes ce qui confère au produit sa texture et sa saveur (Dillon et Berthier, 2006).

Quant à la teneur en lipides, elle aussi varie en fonction du type de fromage. Elle est généralement élevée de l'ordre de 33% dans les fromages à pâte pressée, moyenne (29 %) dans le cas des fromages affinés et fondus, tandis qu'elle est très faible dans les fromages blancs avec une de 8%. Ces variations sont liées à la façon dont le lait est traité lors de la fabrication des fromages (Dillon et Berthier, 2006).

Les fromages présentent aussi des vitamines dans leur composition, particulièrement les vitamines liposolubles (A, D, E et K) dont leurs teneurs dépendent de la teneur du lait en matière grasse et de processus de fabrication. L'ajout de la crème entière ou légère au lait et la concentration en matière sèche lors de l'affinage influencent la présence de ces vitamines dans le fromage (Mahaut *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les vitamines hydrosolubles (B2, PP, B5 et B6), leur teneur diffère significativement selon le type de fromage. En effet, leur teneur résulte de deux facteurs opposés : une perte se produit pendant l'égouttage, mais un enrichissement peut avoir lieu pendant l'affinage, en particulier lorsque des microflore de surface se développent et synthétisent certaines vitamines comme la B6 et la B9 (Dillon et Berthier, 2006). Par ailleurs, Les fromages sont une excellente source de minéraux, notamment en calcium et phosphore (Mahaut *et al.*, 2000).

Tableau II : Variations des teneurs en calcium selon les types de fromages.

Type de fromage	Teneur en Calcium (mg/100 g)	Références
Fromage à pâte dure (Cheddar)	35,4	Andria (2017)
Fromage à pâte molle (Darfiyeh)	36,72 - 38,51	Serhan (2008)
Fromage à pâte molle (Camembert)	200 - 700	Taleb (2017)
Fromage à pâte persillée (Roquefort)	662	Louhichi (2008)
Fromage à pâte dure (Cheddar)	721	Louhichi (2008)

1.2.2. Classification des fromages

Il existe une multitude de variétés de fromages qui diffèrent par leur goût, leur odeur, leur texture et leur forme. Les fromages peuvent être classés en trois grandes familles.

- **Fromage à pâte fraîche**

Ce sont des fromages qui n'ont pas subi d'affinage et qui ont simplement été égouttés légèrement après la coagulation du lait par l'action des ferments lactiques (acidification) (Chamba et Irlinge, 2004). Ces fromages se caractérisent par un taux d'humidité très élevé, variant de 60 à 80 %, ainsi qu'une faible teneur en matière grasse comprise entre 0,5 et 30 % (Majdi, 2009). Ces fromages présentent une pâte à texture molle, qui peut être granuleuse ou lisse, crémeuse et veloutée selon le type de fromage. Le caillé égoutté peut être aromatisé avec divers ingrédients tels que l'ail, les fines herbes, le poivre, l'oignon haché ou encore les raisins secs.

- **Fromage à pâte pressé**

Ce sont des fromages dont le caillé est pressé après soutirage, puis affinés. Ils se caractérisent par une pâte compacte contenant moins d'eau que les fromages frais, mais enrichie en sels minéraux, notamment en sels de calcium. Cette catégorie inclut les fromages à pâte pressée non cuite ainsi que les fromages à pâte pressée cuite (Parente et Cogan, 2004 ; Yildiz, 2010).

- **Fromage à pâte molle**

Les fromages à pâte molle sont définis par la norme internationale Codex Alimentarius (Codex Stan A-6-1978, Revise 1-1999, Amende, 2001) comme des fromages ayant une teneur en eau supérieure à 67 % après élimination de la matière grasse. Ces fromages affinés sont fabriqués à partir de lait pasteurisé ou cru de chèvre, de vache ou de brebis. Ils se caractérisent par une pâte ni cuite ni pressé avec une texture crémeuse, onctueuse avec une légère élasticité. En fonction de la méthode d'affinage utilisée, on distingue deux types de fromages à pâte molle : fromages à pâte molle à croûte fleurie et fromage à pâte molle à croûte lavée.

1.2.3. Les différents fromages traditionnels en Algérie

Comme beaucoup d'autres pays, l'Algérie possède des produits laitiers traditionnels dont les méthodes sont issues du patrimoine culturel de la population locale. Les propriétés organoleptiques varient d'un produit à l'autre et d'une région à l'autre, en fonction du processus de fabrication et des additifs utilisés. La fabrication traditionnelle du fromage utilise principalement des enzymes végétales. Ces enzymes issues de plantes locales coagulent le lait et donnent la saveur et la texture du fromage algérien (Nouani *et al.*, 2009). Parmi ces fromages on retrouve :

- **Jben**

La production de ce fromage traditionnel implique l'utilisation de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus*), du latex de figuier (*Ficus carica*) et parfois de l'extrait séché de la caillette. Pour obtenir un extrait purifié, la fleur mature de l'artichaut est immergée dans le lait, ce qui permet de produire une protéase aspartique qui a une activité protéolytique sur les caséines (Nouani, 2009).



Figure 01 : Fromage traditionnel « Jben » (Khater et Ghefar, 2017).

- **kammérite (Kemariya)**

Le kémariya frais est un type de fromage très apprécié dans la wilaya de Ghardaïa et dans la région du M'zab. Ce fromage traditionnel est fabriqué à partir du lait de vache entier non transformé, du lait de chèvre ou du brebis salé (traité avec du sel de table ou de l'alun). Le lait est chauffé à une température précise de 37°C avant d'être caillé à l'aide de gésier de poulet, de caillette de chevreau ou de fleur de cardon. Après une période de coagulation de 30 minutes, le caillé est délicatement découpé et placé dans un chèche pour s'égoutter pendant une durée allant de 30 minutes à une journée complète. Une fois que la kémariya a pris la forme d'une galette plate, elle est traditionnellement dégustée avec du thé et du pain (McSweeney *et al.*, 2017).



Figure 02 : Fromage traditionnel « Kemariya » (khitouche, 2023)

- **Aghoughlou**

L'Aghoughlou, un fromage algérien de la région de Kabylie, ressemble au Jben. Il est fabriqué avec du lait frais de vache ou de chèvre, caillé à l'aide de la sève de figuier. Le fromage obtenu est consommé frais (Mahamedi, 2015 ; Tounkob, 2016).



Figure 03 : Fromage traditionnel « Aghoughlou » (Tabèche, 2009).

- **Imadghass**

Imedghass, originaire de la région des Aurès, est composé d'un mélange de lait frais et de Klila fraîche. Il est conçu pour être savouré en tant que dessert (Bendimerad, 2013).

1.2.4. Mécanisme de la coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape essentielle de processus de fabrication des fromages. Elle consiste au passage irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi-solide, appelé gel ou coagulum (Cecchinato *et al.*, 2012). Cette étape influence la texture finale du fromage en fonction du type de coagulant utilisé, des conditions de coagulation et de la nature des composants du lait. Ces paramètres peuvent être ajustés pour produire des fromages avec des textures variées (Hsieh et Pan, 2012). Selon le mécanisme de coagulation du lait, on distingue trois types de coagulation :

- ❖ **Coagulation acide**

La coagulation acide est induite par l'acide lactique produit par des bactéries qui transforment le lactose en acide lactique. Cette production d'acide entraîne une diminution du pH du lait ce qui solubilise le phosphate et le calcium colloïdal, éléments essentiels à la stabilité des micelles de caséine. Les micelles se lient alors entre elles pour former un gel cassant, friable et peu élastique (Mietton, 1995).

Lorsque l'acidification est rapide par addition d'un acide minéral ou organique, les caséines flocculent à un pH de 4,6, formant un précipité granuleux dispersé dans le lactosérum. En revanche, une acidification progressive, obtenue par fermentation lactique ou hydrolyse de la gluconolactone, mène à la formation d'un gel lisse et homogène qui occupe tout le volume initial du lait (Mietton *et al.*, 1994). La teneur en protéines du lait influence également la coagulation acide. En effet, un lait riche en protéines produira un caillé lactique plus ferme (Carole et Vignola, 2002).

- ❖ **Coagulation enzymatique du lait**

Elle est obtenue par l'hydrolyse des caséines à l'aide d'enzymes protéolytiques de diverses origines. Certaines de ces enzymes proviennent d'animaux, comme la présure (composée de 80% de chymosine et de 20% de pepsine). D'autres enzymes sont d'origine végétale, telles que la cyprosine et la cardosine (extraites du gaillet, du figuier et du chardon), ou microbienne, comme celles produites par *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica* ou par la chymosine recombinante (Chamba, 2008).

❖ Coagulation mixte

Les fromages frais (comme les petits-suisse et les demi-sels) et les fromages à pâte molle (comme le camembert) sont produits selon un processus qui implique l'hydrolyse enzymatique par la présure et l'acidification (Mahaut *et al.*, 2003). Cette méthode est également utilisée dans la production de gels mixtes à plus grande échelle, ce qui peut être réalisé en utilisant deux techniques différentes :

- ✓ L'accélération de la coagulation et le gel obtenu, possède des qualités intermédiaires entre un gel de présure et un gel lactique.
- ✓ Alternativement, le caillé de présure peut être laissé s'acidifier naturellement, acquérant progressivement des caractéristiques lactiques (Veisseyre, 1979).

1.2.5. Etapes de coagulation

La coagulation du lait passe par trois phases qui sont illustrées dans la figure 05

1.2.5.1. Phase primaire

La composition principale des micelles est constituée de κ -caséine, avec son fragment C-terminal hydrophile s'étendant dans la phase aqueuse du lait. Cette extension sert à assurer la stabilité stérique de micelle de caséines et agit comme une barrière contre l'association micellaire (Eck et Ghilis, 2006).

Durant la première phase enzymatique, l'enzyme cible la caséine- κ , précisément à la liaison entre les acides aminés phénylalanine 105 et méthionine 106. Cette action enzymatique divise la chaîne peptidique en deux fragments distincts : la paracaséine- κ , qui comprend les résidus 1 à 105, et le caséinomaclopeptide (CMP), qui inclut les résidus 106 à 169 (figure 04). La paracaséine- κ reste liée aux caséines α et β dans la micelle hydrophobe, tandis que le CMP, contenant tous les glucides, est libéré dans le lactosérum. Cette libération réduit la charge négative et le niveau d'hydratation des micelles (Lij et Daligleish, 2006).

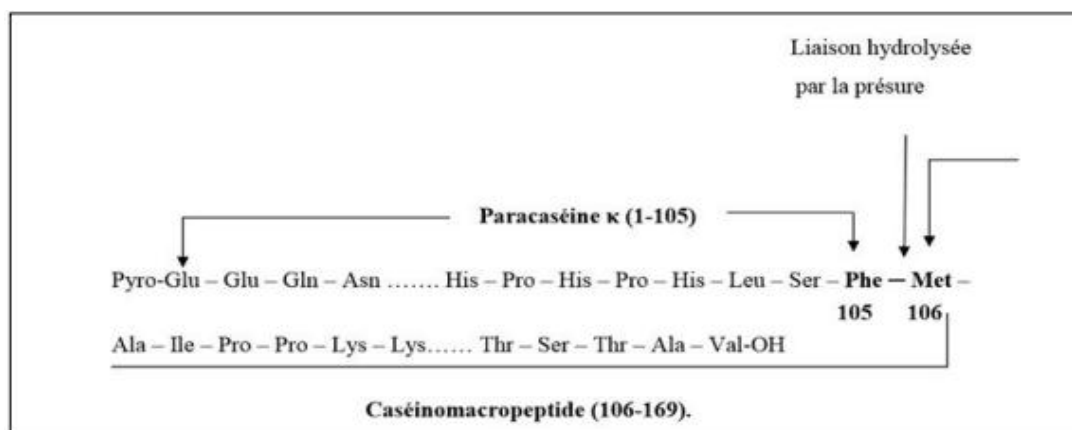


Figure 04 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure (Fox *et al.*, 1994).

1.2.5.2. Phase secondaire

Cette étape débute lorsque 85 % de la caséine-κ subit une hydrolyse. On l'appelle la phase d'agglomération, d'agrégation ou encore la phase de coagulation proprement dite (Lucey, 2002). Pendant cette phase, l'action enzymatique provoque la libération du macropeptide de la caséine-κ, ce qui diminue les répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées et la diminution de leur diamètre hydrodynamique ce qui conduit à une perte de stabilité (Lucey, 2002). En présence d'ions de calcium libres (Ca^{++}), les micelles déstabilisées tendent à s'agglomérer. Initialement, elles forment des chaînes linéaires qui se regroupent progressivement pour former des amas, donnant ainsi naissance au gel protéique qui se distingue clairement du lactosérum (Lucey, 2002).

1.2.5.3. Phase tertiaire

Pendant cette étape, les agrégats de micelles subissent une réorganisation significative en raison de la formation de liaisons phosphocalciques et potentiellement de ponts disulfures entre les para-caséines (Vignola, 2002).

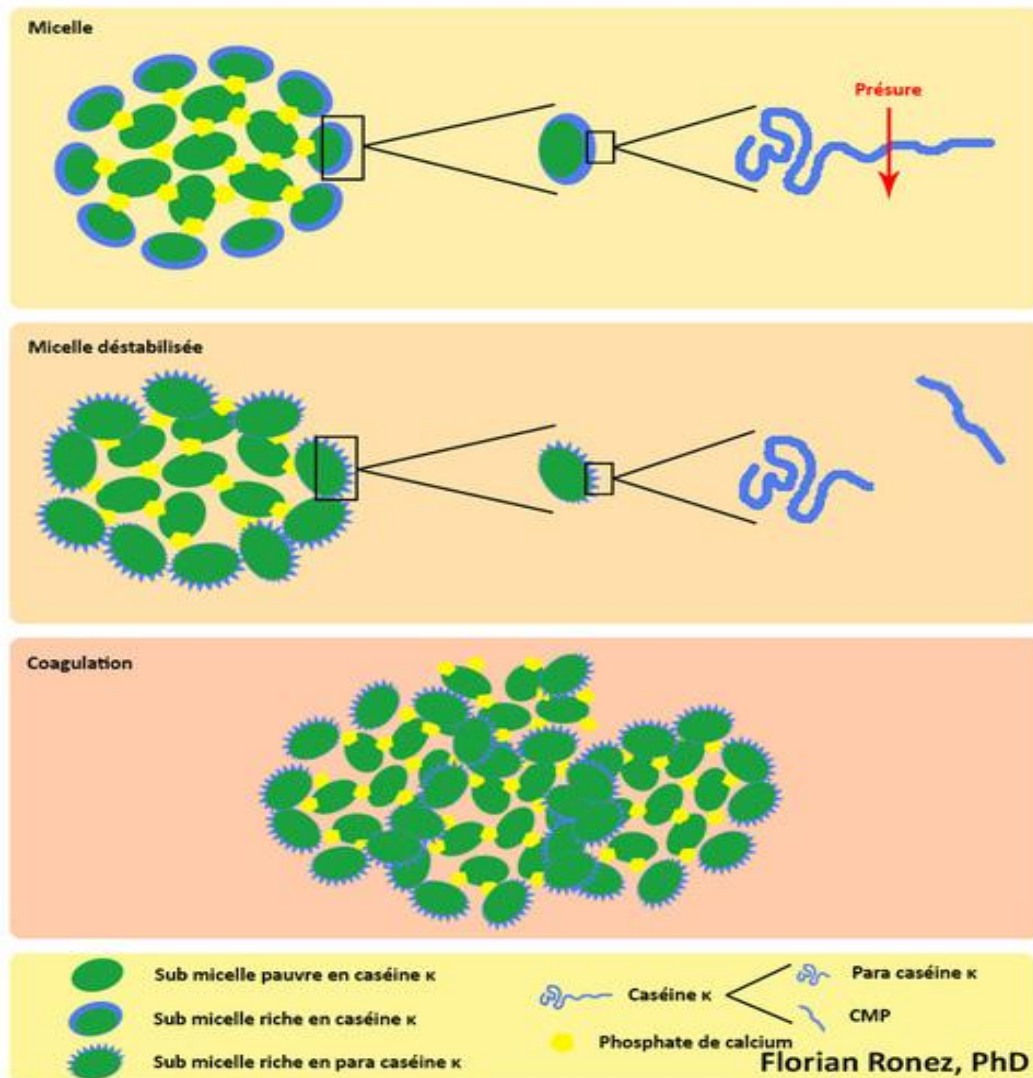


Figure 05 : Formation d'un caillé présure par action de la présure sur les caséines du lait (Florian, 2012).

1.2.6. Facteurs de la coagulation

De nombreux paramètres peuvent affecter la coagulation du lait et les propriétés physiques des coagulums. Ces paramètres sont principalement associés à la quantité d'enzyme, à la température, au pH, à la présence de calcium, à la concentration de caséines et à la taille des micelles (Mahaut *et al.*, 2000 ; Dalgleish, 2006).

- **Concentration en enzyme :** Il existe une corrélation positive entre la concentration en enzyme et le degré d'hydrolyse de la caséine κ (étape enzymatique), de même qu'avec l'agrégation des micelles (étape physique). En conséquence, plus la quantité d'enzyme coagulante ajoutée au lait est importante, plus le temps nécessaire à la coagulation sera réduit (Boughellout, 2007)

- **Température** : La température optimale pour la coagulation se situe entre 35°C et 45°C. C'est à cette plage que l'enzyme coagulante, la chymosine est la plus active permettant une formation rapide et efficace du caillé (Boughellout, 2007).
- **pH** : Lors du passage d'un pH de 6,7 à 5,6, la vitesse de coagulation augmente. Cela est dû à une accélération de l'hydrolyse, ce qui entraîne une augmentation du raffermissement du gel. La fermeté est particulièrement marquée entre les pH 6,6 et 6,0, en raison d'une plus grande disponibilité de calcium ionisé. En dessous d'un pH de 6,0, la caséine commence à se déminéraliser, et la désintégration de la structure micellaire intensifie jusqu'à devenir complète à un pH de 5,2 (Boughellout, 2007).
- **Teneur en calcium** : La formation du gel pendant la coagulation du lait par la présure, est fortement influencée par la quantité et le type de calcium présent. L'ajout de CaCl_2 augmente les concentrations de calcium ionisé et de calcium colloïdal, ce qui entraîne une réduction du temps de coagulation et une augmentation de la fermeté du gel (Kellil, 2015).
- **Teneur en caséines** : La vitesse de l'hydrolyse enzymatique dépend directement de la concentration en protéines. Par conséquent, l'augmentation de la teneur en caséines entraîne une accélération de la vitesse d'agrégation et une augmentation de la fermeté des gels (Kellil, 2015).
- **Dimension des micelles** : La taille des micelles est proportionnelle au temps de coagulation. Les micelles de petit diamètre qui contiennent une forte teneur en caséine κ subissent une hydrolyse plus rapide (Kellil, 2015).

1.2.7. Evaluation de la coagulation

- **Temps de coagulation** : Le temps de coagulation représente la période écoulée entre l'ajout de l'enzyme coagulante et le début du tranchage du gel (Ramet, 1997).
- **Temps de prise** : Le temps de prise, ou durée de prise, désigne l'intervalle entre l'emprésurage et le début de la floculation marquant ainsi le début de la gélification apparente du lait (Luquet et Boudier, 1981 ; Mahaut *et al.*, 2000).
- **Activité coagulante** : L'activité coagulante exprimée en unités présure (UP) représente la quantité de l'enzyme contenue dans 1 centimètre cube capable de coaguler 10 centimètres cubes de substrat standard en 100 secondes à 30°C (Alais, 1984).

- **Force coagulante** : La force coagulante est l'aptitude d'un agent coagulant à coaguler le lait (Walstra, 2006). Les méthodes anciennes et les plus répandues ont été proposées par Soxhlet et Berridge. L'unité Soxhlet représente le nombre d'unités de poids ou de volume de lait pouvant être coagulées par une unité de poids ou de volume de la préparation coagulante en 40 minutes à 35°C (Alais, 1984 ; Ramet, 1997).

1.3. Les protéases coagulantes du lait

Les protéases coagulantes sont indispensables à la fabrication du fromage. Ces agents de coagulation comprennent des préparations d'enzymes protéolytiques provenant de diverses sources : animales, microbiennes, végétales, et récemment génétiquement modifiées (Jacob *et al.*, 2011 ; Shah *et al.*, 2014).

Le marché mondial des coagulants est couvert par quatre principaux fabricants industriels à savoir Chr.Hansen (Danemark), D.S.M. (Pays-Bas), Dupont (États-Unis) avec sa filiale française Danisco, et C.S.K. (Pays-Bas). Chr.Hansen est particulièrement reconnu pour ses innovations dans les cultures bactériennes et les enzymes utilisées dans la production de fromage. D.S.M. offre une large gamme de coagulants et est un acteur clé dans les ingrédients nutritionnels. Dupont, avec sa filiale Danisco, se spécialise dans les solutions pour les industries alimentaires, notamment en fournissant des enzymes coagulantes efficaces. C.S.K. est réputé pour ses produits de haute qualité destinés aux fabricants de produits laitiers artisanaux et industriels. En France, la fabrication de présures animales est assurée par les Laboratoires Abia, qui fournissent des solutions adaptées aux besoins spécifiques des producteurs laitiers locaux.

Selon Faostat (2018), la production des coagulants atteint aujourd'hui 22 millions de tonnes avec une progression annuelle de 2%.

Obtenir des données précises et officielles est difficile. Cependant, en compilant différentes sources économiques et publications, il est estimé que les coagulants Chymosine produits par fermentation (FPC) à partir de chymosine recombinée sont actuellement les plus utilisés (FAOSTAT, 2018) (figure 06). Ce type de coagulant répond aux demandes industrielles, principalement sur le continent américain, en Europe et en Europe centrale. Le reste du marché est partagé de manière équivalente entre les coagulants d'origine animale et microbienne. La part des coagulants d'origine végétale reste extrêmement limitée avec une présence notable en Amérique du Sud, en Espagne et en Grèce.

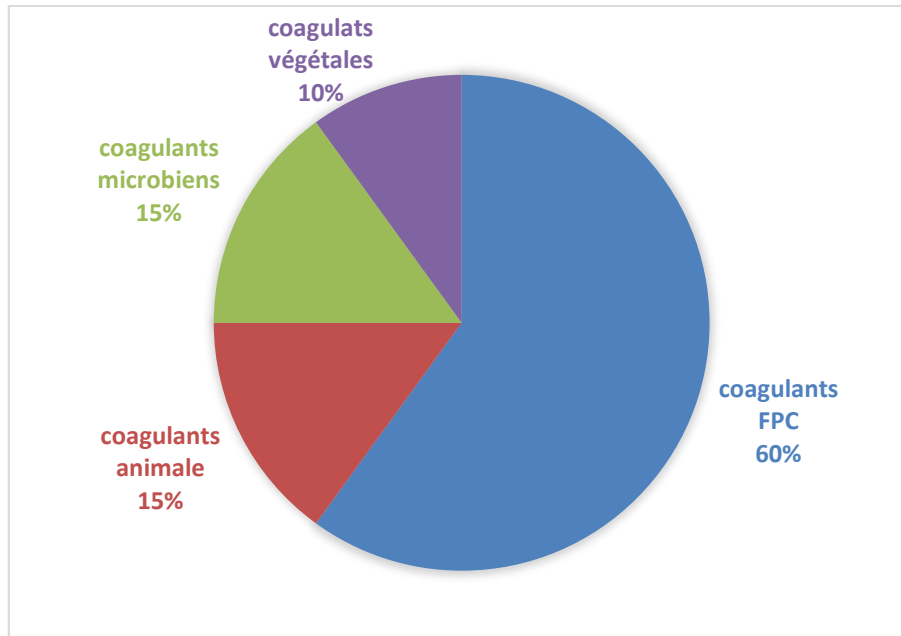


Figure 06 : Production mondiale des enzymes coagulantes (FAOSTAT, 2018).

FPC : Chymosine produite par fermentation.

1.3.1. Classification des protéases

Les protéases sont classées par la Commission des enzymes (E.C.) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) en sept groupes (tableau III) (Singh *et al.*, 2016).

Tableau III : Principales classes d'enzymes dans le système E.C (Singh *et al.*, 2016).

E.C (classe)	Classification
E.C. 1	Oxydoréductases
E.C. 2	Transférases
E.C. 3	Hydrolases
E.C. 4	Lyases
E.C. 5	Isomérases
E.C. 6	Ligases
E.C. 7	Translocases

Toutefois, les protéases sont également classées en fonction de leur structure, leur origine, leur mécanisme d'action et leur site actif. Selon le site actif, les protéases sont principalement divisées en protéases à aspartique, à sérine et à cystéine.

1.3.2. Les principales sources de protéases coagulantes du lait

- **Les protéases animales**

De nombreuses protéases animales sont utilisées dans la fabrication du fromage. Cependant, la présure est d'origine animale extraite de la caillette (le quatrième estomac) de jeunes ruminants non sevrés (un mélange de chymosine 80 % et de pepsine 20%), est la plus couramment employée et elle est considérée comme la meilleure enzyme pour la coagulation du lait (Abi-Azar, 2007 ; Abakar, 2012).

Lors du processus de coagulation du lait, la chymosine exerce une double action, elle hydrolyse la caséine- κ pour provoquer la coagulation, d'une part, et effectue une protéolyse générale sur l'ensemble des protéines pendant l'affinage du fromage (Abi Azar, 2007 ; Adoui, 2007). D'autre part, bien que la protéolyse soit essentielle pour la fabrication de fromages affinés, un bon coagulant doit posséder un bon rapport d'activité de coagulation sur l'activité protéolytique générale (Yegin et Dekker, 2013).

Les présures issues d'animaux tels que le chameau, la chèvre, l'agneau et le buffle ont été étudiées et caractérisées comme alternatives à la présure bovine. Cependant, elles sont rarement utilisées à l'échelle industrielle en raison de leurs propriétés enzymatiques moins performantes par rapport à celles de la présure bovine (Yegin et Dekker, 2013 ; Almeida *et al.*, 2015). Face à l'augmentation de la production fromagère et aux problèmes de disponibilité de la présure animale, l'agence gouvernementale américaine relevant du département de la Santé et des Services sociaux "Food and Drug Administration" a approuvé dans les années 1990 l'utilisation de chymosine dérivée de microorganismes génétiquement modifiés tels que *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* et *Saccharomyces cerevisiae* qui sont utilisés comme hôtes pour l'expression des enzymes recombinantes (Jacob *et al.*, 2011).

Les présures recombinantes représentent 70 à 80% du marché mondial de la présure (Johnson, 2006 ; Jacob, 2011). Différentes études ont prouvé que la chymosine recombinante et la chymosine de veau standard se comportent de la même façon dans toutes les conditions étudiées. Aucune différence entre les fromages n'a été observée du point de vue sensoriel et

chimique (Yegin et Dekker, 2013). Bien que les présures recombinantes aient fait leurs preuves comme substituts à la présure bovine, une attention de plus en plus grande est portée aux enzymes naturelles extraites de plantes (Chazarra, 2007).

- **Les protéases microbiennes**

De nombreuses protéases microbiennes agissent de la même manière que la chymosine. Toutefois, ces enzymes montrent une activité protéolytique plus élevée pendant la fabrication du fromage. L'enzyme de *Rhizomucor miehei* est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production fromagère et il est disponible à différents degrés de thermo-stabilité et de pureté (Jacob *et al.*, 2011).

Actuellement, la recherche sur les présures microbiennes est toujours dirigée vers la découverte d'enzymes qui sont plus thermolabiles et ayant un meilleur rapport de coagulation sur l'activité protéolytique. La thermolabilité est un critère important, en particulier pour les protéases ayant une activité protéolytique élevée (Yegin et Dekker, 2013).

- **Les protéases végétales**

De nombreuses préparations coagulantes d'origine végétale sont connues. Elles sont obtenues par macération de divers organes de plantes supérieures (Adoui, 2007). Malgré le nombre élevé de coagulants végétaux leur application en industrie est très limitée. Toutefois, des études ont révélé que certaines enzymes végétales sont prometteuses.

L'extrait de cardon est probablement la présure végétale la plus réussie à ce jour. Il est utilisé depuis de nombreuses années dans la fabrication de fromages traditionnels comme le Jben (Lamas *et al.*, 2001 ; Prados *et al.*, 2007). Des recherches ont démontré qu'il est possible d'extraire et de purifier deux protéases aspartiques, appelées cardosines A et B, à partir des fleurs de cardon.

Ces protéases présentent des spécificités similaires à celles de la chymosine et de la pepsine (Lamas *et al.*, 2001 ; García *et al.*, 2012). Elles clivent la liaison peptide Phe105-Met106 de la κ -caséine bovine et ovine, tandis que la κ -caséine caprine est de préférence clivée au niveau de la liaison Lys116 - Thr117. Les deux enzymes peuvent également hydrolyser à la fois l' α et la β -caséine pour produire des fromages ayant un arôme typique, une texture de beurre doux, et une saveur légèrement piquante (Llorente *et al.*, 2014). Les protéases végétales peuvent d'être produit à partir de sources naturelles par macération de divers organes végétaux, tels que les fleurs, les graines, les racines et les feuilles (Shah *et al.*,

2013) ou in vitro. En fonction de l'espèce végétales ainsi que de la partie de la plante explorée, différents types d'enzymes coagulantes sont découverts (Amira *et al.*, 2017).

PARTIE II

II. Artichaut et coagulation du lait

L'artichaut est une plante de la famille des Astéracées, originaire du bassin méditerranéen. On le trouve dans diverses régions de l'Algérie où sa culture nécessite un climat tempéré et des sols bien drainés riches en matière organique. La plantation s'effectue généralement au printemps, à partir de rejets ou de graines. Les artichauts requièrent un arrosage régulier et une bonne exposition au soleil. La récolte intervient environ 7 à 8 mois après la plantation, lorsque les bourgeons floraux sont encore fermés et bien formés (Bérard *et al.*, 2006). En termes de distribution, les artichauts sont principalement cultivés en Europe du Sud, en Californie, ainsi que dans certaines régions d'Afrique du Nord telles que le Maroc, l'Algérie et la Tunisie (Médail *et al.*, 1999). Ils sont ensuite distribués sur les marchés locaux et internationaux. L'artichaut est apprécié non seulement pour ses qualités gustatives, mais également pour ses bienfaits nutritionnels et médicinaux, contribuant ainsi à une demande constante sur les marchés mondiaux (Ryder, 2002).

Outre leur valeur nutritive importante, les fleurs d'artichaut contiennent des protéases aux propriétés catalytiques similaires à celles de la chymosine, capables de coaguler le lait (Petropoulos *et al.*, 2019). Récemment, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris afin d'identifier ces enzymes comme des succédanés potentiels de la présure, extraits de ces plantes. Dans ce contexte, cette partie vise à fournir un aperçu sur l'activité coagulante de l'extrait aqueux des fleurs de deux espèces d'artichaut *Cynara cardunculus L.* et *Cynara scolymus L.* sur la coagulation du lait, en s'appuyant sur des données bibliographiques d'études antérieures.

2.1. Artichaut sauvage (*Cynara cardunculus*)

2.1.1. Description du cardon

Le cardon possède un rhizome vivace, mais chaque rosette a une croissance bisannuelle. Cela signifie que les feuilles de rosettes se développent pendant une année avant de fleurir l'été suivant laissant ainsi leur développement naturel. Le cardon devient large de 1 mètre et fleurit à près de 2 mètres de hauteur, produisant une plante impressionnante et ornementale. Les feuilles fortement divisées, légèrement épineuses, sont d'un gris vert avec un revers tomenteux, et bien sûr au pétiole charnu qui est appelé cardes. Les fleurs sont regroupées en capitule énorme d'une couleur violet vif (JeanNoelPlagères, 2014).

Le cardon est une plante herbacée cultivée pour ses tiges épaisses, consommées comme légume. Son nom scientifique est *Cynara cardunculus L.*, appartenant à la famille des

astéracées.



Figure 07 : Aspect morphologique du cardon (Zell, 2011).

2.2. Artichaut cultivé (*Cynara scolymus* L)

2.2.1. Description de l'artichaut

L'artichaut (*Cynara scolymus* L) est une plante herbacée vivace, non présente à l'état sauvage, mais cultivée à partir du *Cynara cardunculus*, originaire du bassin méditerranéen. Sa partie souterraine est un gros rhizome doté d'un puissant système racinaire. La tige, dressée, cannelée et ramifiée, mesure de 1 à 1,50 m. La première année, une rosette de grandes feuilles larges, vert grisâtre, profondément découpées, à nervures saillantes et non épineuses, apparaît, avec une face inférieure blanchâtre et tomenteuse. La tige, qui apparaît généralement la deuxième année, porte dans sa partie supérieure des feuilles presque entières, plus petites et sessiles, pouvant atteindre près de 1 m de long. Les fleurs, bleu-violet et tubulées, se regroupent en gros capitules solitaires verts ou violacés. Ces fleurs hermaphrodites apparaissent généralement la deuxième année. Les gros capitules terminaux, dépassant souvent 10 cm de diamètre, sont constitués d'un réceptacle charnu hérissé de soies et entouré d'un involucre de bractées ovales, charnues à la base et pointues au sommet (figure 08) (Goetz et Le jeune, 2007).



Figure 08 : Aspect morphologique de l'artichaut (Franck, 2016).

2.3. Les différents domaines d'utilisations d'artichauts (Artichaut sauvage et Artichaut cultivé)

Les artichauts peuvent être utilisés dans divers domaines en raison de leur polyvalence et de leurs propriétés bénéfiques. Voici quelques domaines d'utilisation des artichauts :

a. Alimentation : Les artichauts sont largement consommés comme légume et sont appréciés pour leur goût unique et leur texture tendre. Ils peuvent être cuits, grillés, farcis, marinés ou ajoutés à des salades (Raccuia *et al.*, 2015).

b. Médecine traditionnelle : Les extraits d'artichaut sont utilisés en phytothérapie pour leurs propriétés médicinales, notamment pour soutenir la santé hépatique, favoriser la digestion et réduire le taux de cholestérol (Williamson *et al.*, 2011).

c. Cosmétique : L'extrait d'artichaut est parfois utilisé dans les produits de soin de la peau en raison de ses propriétés antioxydantes et hydratantes (Raja *et al.*, 2016).

d. Industrie pharmaceutique : Certains composés présents dans l'artichaut comme la cynarine sont étudiés pour leur potentiel dans le traitement de diverses maladies, notamment les troubles hépatiques et digestifs. Ces propriétés peuvent être exploitées dans le développement de médicaments et de compléments alimentaires (Holtmann *et al.*, 2003).

e. Industrie textile : Les fibres de l'artichaut peuvent être utilisées pour produire des textiles durables et respectueux de l'environnement (Raccuia *et al.*, 2015).

2.4. Comparaison de la capacité coagulante des deux espèces d'artichaut (*Cynara cardunculus* et *Cynara scolymus*)

Selon les données bibliographiques, il a été démontré que l'artichaut est une source d'enzymes. Ces enzymes peuvent être extraites à partir des différentes parties de la plante telles que les racines, les jeunes feuilles, les feuilles adultes, ainsi que des fleurs d'artichaut immature ou à différents stades de maturité (Llorente *et al.*, 2004 ; Miraj *et al.*, 2016).

2.4.1. Extraction des enzymes des fleurs de cardon et d'artichaut

Conformément aux articles analysés, la macération aqueuse est la méthode d'extraction recommandée pour obtenir des enzymes coagulantes à partir des fleurs d'artichaut. Dans ce travail, on présente les travaux de Nouani et ses collaborateurs qui ont travaillé sur les plantes de cardon et d'artichaut locales (Algérie) afin d'évaluer leur effet coagulant de leur extrait enzymatique sur le lait de vache.

L'extraction enzymatique aqueuse à partir des fleurs de cardon et d'artichauts selon la méthode décrite par Nouani *et al.* (2009) comporte deux étapes. La première étape est consacrée à la préparation du matériel végétal. Les fleurs d'artichaut sont d'abord lyophilisées, ensuite broyées avec soin pour obtenir une fine poudre. Cette poudre représente la forme idéale pour l'extraction, car elle augmente la surface de contact avec le solvant, facilitant ainsi le transfert des molécules d'intérêt.

La deuxième étape du processus correspond à l'extraction proprement dite, 10 grammes de cette poudre de fleurs sèches sont immergés dans 100 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium à une concentration de 0,1 M et à un pH de 5. Cette solution tampon est additionnée de 0,2% d'acide borique. La macération est effectuée pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité.

Afin de maximiser la libération des enzymes, une série de cycles de congélation et de décongélation est effectuée. Les échantillons sont d'abord congelés pendant 48 heures, puis

décongelés. Ce traitement par congélation/décongélation aide à briser les parois cellulaires, facilitant ainsi la libération des enzymes dans la solution tampon.

Après cette étape, le mélange est filtré pour éliminer les débris solides, obtenant ainsi un extrait brut. Ce filtrat, contenant les enzymes extraites, est ensuite conservé au congélateur à une température de -22°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

2.4.2. Activité protéolytique et activité coagulante des extraits enzymatiques des fleurs de cardon et d'artichaut

Les extraits enzymatiques bruts des fleurs ont fait objet d'évaluation de leur activité protéolytique et activité coagulante. Concernant l'activité protéolytique, elle est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, tandis que l'activité coagulante est déterminée, en mesurant le temps de coagulation.

La détermination de l'activité protéolytique s'effectue en suivant la méthode développée par Aicha (2003), telle que référencée dans le travail de Zikiou et Zidoune (2019). Pour ce faire, un gradient de concentration de l'extrait enzymatique brut est préparé à 25%, 50%, 75% et 100%.

La réaction enzymatique constitue la première étape essentielle de ce processus. Le mélange réactionnel est composé de 1 ml de l'extrait enzymatique, 1,5 ml de tampon citrate de sodium à 0,05 M ajusté à un pH de 5,5, et 2,5 ml de solution de caséine à 2,5%. Cette dernière est obtenue à partir de lait de vache cru et est dissoute dans une solution de citrate de sodium à 0,02 M.

L'ensemble est ensuite incubé dans un bain-marie maintenu à 40°C . Après une heure d'incubation, 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 4% sont ajoutés, induisant la précipitation des protéines non hydrolysées suivi d'une centrifugation de 3000 rpm pendant 5 minutes.

La deuxième étape étant le dosage colorimétrique, après centrifugation les composés azotés non protéiques qui se trouvent dans la phase soluble sont dosés selon la méthode d'Anson (1939) qui consiste à mélanger 0,5 ml de surnageant avec 2,5 ml de Na_2CO_3 à 2% préparé dans NaOH 0,1 N. Après agitation et repos de 10 minutes, on ajoute 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au $\frac{1}{2}$ suivi d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est lue contre le blanc réactionnel à 750 nm avec spectrophotomètre.

Quant à l'activité coagulante elle est déterminée selon la méthode usuelle décrite par Arima *et al.* (1970), qui est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de la coagulation du lait écrémé.

Un volume de 2,5 mL du substrat (lait écrémé) pré-incubé pendant 15 min à 35°C, a été additionné de 0,25mL d'extrait enzymatique.

2.4.3. Détermination de l'activité protéolytique et du temps de coagulation (activité coagulante)

Les résultats de l'étude de Nouani *et al.* (2009) montrent une différence significative dans l'activité protéolytique entre les extraits enzymatiques des fleurs de *Cynara cardunculus* (artichaut sauvage) et *Cynara scolymus* (artichaut cultivé) à différentes concentrations. À une concentration de 100%, l'activité protéolytique de *Cynara cardunculus* est de 90 µg tyr/ml, tandis que celle de *Cynara scolymus* est de 80 µg tyr/ml. À 75%, ces valeurs sont respectivement de 75 µg tyr/ml et 45 µg tyr/ml. Pour une concentration de 50%, *Cynara cardunculus* affiche une activité de 50 µg tyr/ml contre 10 µg tyr/ml pour *Cynara scolymus*. À 25%, seule *Cynara cardunculus* manifeste une activité de 10 µg tyr/ml, *Cynara scolymus* étant inactive. Ces données montrent clairement que l'artichaut sauvage (*Cynara cardunculus*) présente une activité protéolytique supérieure à l'artichaut cultivé (*Cynara scolymus*) à toutes les concentrations testées.

De même, Roseiro *et al.* (2003) et Claverie-Martín et Vega-Hernández (2007) ont rapporté que l'activité protéolytique des extraits floraux de l'espèce *Cynara cardunculus* était plus élevée que celle de l'espèce *Cynara scolymus*.

Pour ce qui concerne l'activité coagulante, l'analyse du temps de floculation des deux extraits aux différentes concentrations (tableau V) montre que l'extrait de fleurs de *Cynara cardunculus* a floculé le lait en 5 minutes aux concentrations de 100% et 75%, par contre, le lait a été floculé uniquement à la concentration de 100% pour l'extrait de fleurs de *Cynara scolymus*. Après 10 min, on constate une floculation du lait aux deux autres concentrations pour les deux extraits.

Selon les données bibliographiques analysés, il semble que l'extrait aqueux des fleurs de *Cynara cardunculus* présente une meilleure activité coagulante comparativement à celui de *Cynara scolymus* (Benali *et al.*, 2022 ; Jiménez *et al.*, 2022 ; Zeng *et al.*, 2022).

Partie II: Artichaut et coagulation du lait

Tableau V : Temps de la coagulation selon les concentrations de l'extrait (Nouani *et al.*, 2009).

	Concentration	5 min	10 min	15 min	25 min	40 min	1 h
Sauvage (<i>Cynara Cardunculus</i>)	100%	±	+	+	+	+	+
	75%	±	+	+	+	+	+
	50%	-	±	+	+	+	+
	25%	-	±	±	+	+	+
Cultivé (<i>Cynara Scolymus</i>)	100%	±	+	+	+	+	+
	75%	-	+	+	+	+	+
	50%	-	±	+	+	+	+
	25%	-	±	+	+	+	+

Légende : ± première apparition des flocons lors de la coagulation ; + coagulation totale ; - Absence de coagulation.

Des recherches approfondies ont été menées pour caractériser et identifier la composition des extraits bruts des fleurs de ces plantes. Selon les données disponibles dans la littérature scientifique, il est suggéré que la capacité coagulante remarquable de l'extrait de fleurs de (*Cynara Cardunculus*) pourrait être principalement attribuée à la cardosine, qui est une protéase aspartique. Parmi les protéases cardosines, les plus répandues sont Cardosine A et Cardosine B. Ces enzymes spécifiques sont connues pour leur capacité à hydrolyser la caséine-k précisément au niveau du domaine Phe105-Met106 (Mohamed, 2021 ; Nicosia *et al.*, 2022).

L'extrait de (*Cynara Cardunculus*) est principalement utilisé avec le lait de chèvre et de brebis. Ces types de lait sont préférés en raison de leur composition, qui réagit efficacement avec les enzymes coagulantes du (*Cynara Cardunculus*), produisant ainsi des fromages de haute qualité. Le lait de chèvre, avec une matière grasse de 3,5 à 4,5 % et une teneur en protéines totales de 3,1 à 3,8 %, est apprécié pour sa capacité à former des caillés fins et homogènes grâce à sa composition en protéines plus petites comparativement au lait de vache. Le lait de brebis, quant à lui, contient une matière grasse plus élevée de 6,0 à 7,5 % et des

Partie II: Artichaut et coagulation du lait

protéines totales de 5,5 à 6,0 %. Les cardosines A et B montrent une activité optimale à des températures et des pH qui correspondent bien à ceux utilisés pour fabriquer des fromages traditionnels à partir de lait de brebis et de chèvre (Silva *et al.*, 2003).

D'autre part, l'extrait de fleur d'artichaut (*Cynara scolymus*) présente plusieurs enzymes protéases, cependant, la capacité coagulante de cet extrait est attribuée à la cynarase qui est également une enzyme aspartique (Sidrach *et al.*, 2005 ; Chazarra *et al.*, 2007 ; Ricceri *et al.*, 2016 ; Abdel-Raouf *et al.*, 2017). Cette enzyme est caractérisée par deux fractions essentielles à son activité catalytique qui contiennent des résidus d'acide aspartique au sein de son site catalytique. Elle est particulièrement active dans un environnement pH acide et démontrent une haute spécificité pour les sites de clivage peptidique situés entre des résidus d'acides aminés hydrophobes (Domingos *et al.*, 2000).

Selon Chazarra *et al.* (2007), l'extrait de fleurs de (*Cynara scolymus*) a présenté une activité coagulante qui est fortement dépendante du pH et de la température du lait. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte les conditions environnementales pour optimiser l'efficacité des extraits (*Cynara scolymus*) et de (*Cynara Cardunculus*) dans le processus de coagulation du lait pour la fabrication de fromages.

Les résultats analysés ont révélé des différences dans la formation et l'hydrolyse des peptides dans les fromages fabriqués avec des coagulants végétaux par rapport à la présure traditionnelle. De plus, les études menées dans cette optique ont identifié des fragments peptidiques spécifiques et des sites de clivage dans les protéines caséiques des différents types de lait, soulignant le potentiel des coagulants végétaux dans l'amélioration de la qualité et de la saveur des produits laitiers (Sidrach *et al.*, 2005).

Selon Carles *et al.* (2011), l'utilisation de la protéase d'artichaut (Cynarase) est moins étudiée que celle du cardon (cardosines A et B) pour plusieurs raisons, principalement en raison de sa forte activité protéolytique qui peut dégrader excessivement les protéines du lait, entraînant ainsi une texture trop molle ou pâteuse. Par conséquent, cela peut affecter la structure du caillé, rendant le fromage difficile à manipuler et à mouler. La dégradation excessive des protéines libère également des peptides et des acides aminés pouvant avoir des saveurs amères. Néanmoins, la cynarase présente un potentiel pour coaguler le lait de vache, de chèvre et de brebis. Les études montrent que les enzymes de (*Cynara scolymus*) peuvent être efficaces, bien que la variabilité des résultats constitue un défi (Carles *et al.*, 2011).

Gonzalez *et al.* (2015) soulignent que les enzymes de (*Cynara scolymus*), bien que présentant une forte activité protéolytique, peuvent être optimisées par des ajustements précis des conditions de coagulation, telles que la température et le pH. Leur recherche démontre que, sous des conditions contrôlées, la protéase (*Cynara scolymus*) peut produire des fromages avec des profils de texture et de saveur comparables à ceux obtenus avec (*Cynara Cardunculus*). Ils notent également que la variabilité des résultats observée dans d'autres études pourrait être due à des différences dans les techniques de production et les conditions expérimentales.

2.5. Caractéristiques des fromages issus de la coagulation par ces protéases végétales

Les fromages issus de la coagulation par les protéases végétales présentent des caractéristiques distinctes qui varient selon le type de l'enzyme utilisée et le processus de fabrication. La texture de ces fromages est souvent plus tendre et un peu plus friable comparée à celle des fromages coagulés avec de la présure animale, et peut même être granuleuse en fonction de l'enzyme végétale spécifique employée (Yadav *et al.*, 2015). Le goût est également différent, souvent décrit comme plus végétal, herbacé ou amer, en raison de la présence de composés spécifiques aux plantes (Blecker *et al.*, 2018). L'apparence est généralement similaire à celle des fromages à la présure animale, bien que la couleur puisse être légèrement plus pâle ou plus jaune, et la forme moins régulière (Ramírez *et al.*, 2012). Ces fromages tendent à avoir une durée de conservation plus longue, attribuée généralement aux composés antimicrobiens présents dans certaines plantes (Ramírez *et al.*, 2012). Quant à l'arôme, elle peut être plus floral, fruité ou épicé, également en raison des composés spécifiques aux plantes utilisées (Jacob *et al.*, 2011).

Les fromages fabriqués avec de la protéase de (*Cynara Cardunculus*) sont réputés pour leur pâte crémeuse et leur saveur légèrement amère. Cette texture unique est due à l'activité enzymatique spécifique des enzymes présents dans l'extrait de (*Cynara Cardunculus*). Des fromages comme la Torta del Casar et le Serra da Estrela sont particulièrement appréciés en Espagne et au Portugal pour leurs caractéristiques organoleptiques distinctes (Silva *et al.*, 2003).

Partie II: Artichaut et coagulation du lait

Selon Carles *et al.* (2011), les fromages produits avec de la protéase de (*Cynara scolymus*) présentent des propriétés sensorielles intéressantes. La recherche indique que cette enzyme peut produire des fromages aux textures et saveurs variées, bien que le rendement en fromage puisse varier en fonction des conditions de coagulation (Carles *et al.*, 2011).

Il ressort des résultats analysés que les protéases de fleurs de cardon et d'artichaut représentent une alternative prometteuse à la présure animale dans la fabrication de fromage, avec des avantages éthiques et potentiels pour l'innovation dans l'industrie alimentaire.

Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour surmonter les défis techniques et économiques associés à leur utilisation à grande échelle.

CONCLUSION

Conclusion

Depuis longtemps, les besoins protéiques dans l'alimentation ont déterminé une forte demande de produits fromagers (Rotonel et Equi, 1972). Les protéases végétales suscitent aujourd'hui un intérêt croissant dans l'industrie fromagère en raison de leur facilité d'accès, de leurs procédés de purification simples et de leur potentiel pour une plus grande acceptation par les végétariens (Ben Amira *et al.*, 2017). Leur utilisation représente une avenue prometteuse pour garantir la durabilité de l'industrie alimentaire, notamment dans la fabrication du fromage et la création d'hydrolysats de protéines laitières pour des applications spéciales (Mohamed, 2021).

Dans ce contexte nous avons mené une recherche bibliographique modeste dans le but de contribuer à l'exploration de l'utilisation des protéases extraites de plantes, particulièrement de l'artichaut sauvage et cultivé.

Selon les données bibliographiques analysés, il apparaît que les extraits aqueux issu de ces plantes présentent un effet coagulant, cependant la meilleure coagulation est enregistrée avec l'espèce *Cynara Cardunculus*, et qui peut avoir un effet coagulant sur différents types du lait. D'après les travaux de caractérisation de ces extraits, l'activité des deux extraits est attribuée aux protéases cardosine (A et B) pour *Cynara Cardunculus* et cynarase pour *Cynara Scolymus*, respectivement.

Cependant, les coagulants d'origine végétale ne sont généralement pas très appropriés pour la fabrication de fromage en raison du faible rendement, de la saveur désagréable et de la texture douce des fromages affinés, suite à leur activité protéolytique excessive par rapport à leur activité de coagulation du lait, ce qui peut poser des défis technologiques dans la fabrication fromagère (Estève *et al.*, 2001).

Bien que, l'utilisation des protéases végétales présente des avantages potentiels dans l'industrie fromagère, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour optimiser leur utilisation et surmonter les défis technologiques associés à leur forte activité protéolytique.

Ce travail bibliographique met en lumière l'utilisation des enzymes d'origine végétale dans le domaine agro-alimentaire, notamment en industrie fromagère, en guise de perspective, on souhaite :

- Réaliser des travaux expérimentaux sur les plantes étudiées et d'autres espèces en particulier nos plantes locales.

- Réaliser des tests de coagulation sur plusieurs types du lait (vache, chèvre, brebis, chamelle).
- Etudier les paramètres influençant l'activité de l'enzyme afin d'améliorer la qualité et le rendement fromager.
- Améliorer les procédés de séparation et de purification des enzymes extraites des plantes.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- **Abdel-Raouf H., A.H., El-Neshwy A.A., Rabie A.M. & Khalifa S.A. (2017).** Évaluation d'un substitut de présure à partir d'extraits de fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) : Étude des facteurs affectant l'activité de la coagulation du lait. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 44(6A), 2203-2219.
- **Abi-Azar R. (2007).** Complication des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier : propriétés technologiques des coagulums obtenus. Thèse de Doctorat, Ecole doctorale ABIES, AgroParisTech, France. 196 p.
- **Adoui F. (2007).** Extraction d'enzyme coagulante du lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine, Constantine, Algérie. 64 p.
- **Alais C. (1984).** Science du lait : Principes des techniques laitières (4ème éd.). Paris : SEPAIC.
- **Almeida C. M. & Simões I. (2018).** Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4675-4686.
- **Andria M. (2017).** Qualités nutritionnelle et organoleptique du fromage frais optimisé au sein de la société FOOD & BEVERAGE Madagascar, Mémoire Master, 75p.
- **Arima K., Yu J. & Iwasaki S. (1970).** Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In Perlmann, G., Lorand, L. (eds.) *Methods in Enzymology*. (pp. 446-459). New York: Academic Press.
- **Bendimerad N. (2013).** Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type « Jben ». Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. Algérie.
- **Blecker F., Danthine S., Tammam, J. D. & Guerin S. (2018).** Impact des protéases végétales sur les caractéristiques des fromages. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9805-9816.
- **Boughellout H. (2007).** Coagulation du lait par la pepsine de poulet. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine. P 13.

- **Carles S., Aubourg S., Chataigne G. & Sire O. (2011).** Coagulation of milk by extracts of *Cynara scolymus* : Investigating the enzymatic properties. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 242-248.
- **Carole L.V. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. *Fondation et technologie laitier du Québec*. P 29-407.
- **Chamba J.F. (2008).** Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères, bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In : bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G et Luquet F.M). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. P787–821.
- **Chazarra S., Sidrach L. & López-Molina D. (2007).** Characterization of the Milk-Clotting Properties of Extracts from Artichoke (*Cynara scolymus*, L.) Flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393–1400.
- **Codex STAN 283-1978.** Norme générale pour le fromage.
- **Dillon J. C. & Berthier A.M. (2006).** Le fromage dans l'alimentation ; In : « Le Fromage » ed. Eck. Technique et Documentation, 3ème Ed., Lavoisier, Paris. P 26-633.
- **Domingos A., Cardoso P. C., Xue Z. T., Clemente A., Brodelius P. E. & Pais M. S. (2000).** Purification, cloning, and autoprolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 6824-6831.
- **Eck A. & Ghilis J. (2006).** Le fromage. TEC et DOC, 3ème édition, p 891.
- **Eck A. & Gillis J.C. (1997).** Le fromage. 3ème édition, Lavoisier, Paris, France, 874 p.
- **Efebvre-Cases E., Gastaldi E., Vidal V., Marchesseau S., Lagaude A., Cuqj L & Tarodo de la Fuente B. (1998).** Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 932-938.
- **Fao/Oms. (2000).** Codex Alimentarius : Lait et produit laitiers, 2eme édition- Rome : FAO ; OMS,136p.
- **FAO—FAOSTAT.** Artichoke Production Statistics Division.
- **Fox P. F., Singh T. K., & McSweeney P. L. H. (1994).** Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese: Chemistry, physics and microstructure*, 1, 1-32.
- **Franck P. (2016).** L'artichaut : aspects morphologiques et culturels. Éditions Horticoles, Paris.
- **Fredot E. (2006).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier : 25, p 397.

- **Froc J. (2001)**. Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. *INRA mensuel*, n°110, 41-42.
- **Garcia V., Rovira S., Teruel R., Boutoial K., Rodriguez J., Roa I. & Lopez M.B. (2012)**. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science and Technology*, 92(6), p 691-707.
- **Goetz P. & Le jeune R. (2007)**. Artichaut (*Cynara scolymus*): Monographie médicalisée. *Phytothérapie*, vol. 5, p 219-222.
- **Gonzalez M., M. I., Hernandez H., J. M., Revilla I. & Vivar Q. (2015)**. Use of vegetable coagulants in cheese manufacture. *Food Chemistry*, 171, p 74-82.
- **Goursaud J. (1985)**. Composition et propriétés physico-chimiques. In : LUQUET F.M., Laites et produits laitiers. 1ère éd. Paris : Technique et documentation Lavoisier. Vol.1, 1-90.
- **Holtmann G., Adam B., Haag S., Collet W., Grünwald E. & Windeck T. (2003)**. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: A six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 18(11-12), 1099-1105.
- **Hsieh F. & Pan P.H. (2012)**. Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(8), 2039-2045.
- **Jacob M. & Jaros D. (2011)**. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.
- **Jiménez-Escrig A., Dragsted L.O., Danesi F. & Mulder T.P. (2022)**. Bioactive Compounds in *Cynara cardunculus L.* and their Health Benefits. *Nutrients*, 14(5), 1012.
- **Kellil S. (2015)**. Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de Doctorat, Université M'hamed Bougara, Boumerdes. 24 p.
- **Khater I. & Ghefar M. (2017)**. Dénombrement et caractérisation de la flore lactique et la flore de contamination du « jben » traditionnel fabriqué par des coagulants de nature végétale. Mémoire de MASTER, UNIV. Abou Beker Belkaid, Tlemcen, 15p.
- **Lij D. & Dagleish D. (2006)**. Mixed coagulation of milk – gel formation and mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4687-4695.

- **Liorente B. E., Brutti C. B. & Caffini N. O. (2004).** Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8182–8198.
- **Liorente B.E., Obregón W.D., Avilés F.X., Caffini N.O. & Vairo-Cavalli S. (2014).** Use of Artichoke (*Cynara scolymus*) Flower Extract as a Substitute for Bovine Rennet in the Manufacture of Gouda-Type Cheese: Characterization of Aspartic Proteases. *Food Chemistry*, 159, 55–63.
- **Lo Piero A.R., Puglisi I. & Petrone G. (2002).** Characterization of lettuce, a serine like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2439- 2443.
- **Louhichi M. (2008).** Effet de l’irradiation sur la texture d’un fromage à pâte molle de type Camembert, Projet de fin d’étude, Tunis, 71p.
- **Lucey J. A. (2002).** Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281-294.
- **Luquet F.M. & Boudier J.F. (1981).** Dictionnaire laitier (2^{ème} édition). Paris : Technique & Documentation - Lavoisier. ISBN 2-85206-092-0. 232 pages.
- **Luquet F.M. (1990) :** Lait et produits laitiers, vache, brebis, chèvre. Transformation et technologie. Edition technique et documentation. Lavoisier (2^{ème} édition. Tome 2). P. 26-633.
- **Mahaut M., Jeantet R., Schuck P. & Brule G. (2000).** Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. Lavoisier, p. 26-40.
- **McSweeney P., Ottogalli G. & Fox P. (2017).** Chapter 31 - Diversity and classification of cheese varieties: An overview. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese* .4th edition, San Diego: Academic Press.
- **Mietton B. (1995).** La typologie des fromages, Symposium organisé par la fondation des Gouverneurs et le centre de recherche et de développement sur les aliments d’agriculture et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.
- **Miraj S. & Kiani S. (2016).** Study of Therapeutic Effects of *Cynara scolymus L.*: A Review. *Pharm. Lett*, 8, 168–173.
- **MUELLER M. S. & MECHLER E. (2005).** Medicinal plants in tropical countries: Traditional use experience facts (Thieme). Stuttgart, Germany.
- **Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal 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. *International Journal of Food Technology*, 7, p 20-25.
- **Plagères J.N. (2014).** Le cardon : une plante ornementale et potagère. Éditions du Jardin, Paris.
 - **Raccuia S., Melilli M., Agosta G., Provenzano M. & Amato R. (2015).** Nutritional and phytochemical characterization of *Cynara cardunculus L.* cultivated in Sicily. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38: 13-20.
 - **Ramet J., Eck A. & Gillis J.C. (1997).** L'égouttage du coagulum in « Le fromage », 3ème édition, Lavoisier Tec. & Doc. 891 p.
 - **Ramírez M. & Cuenca M. (2012).** Comparative study of milk-clotting activity of vegetable rennets. *Food Chemistry*, 133(3), 959-965.
 - **Rao M., Tanksale A., Ghatge M. & Deshpande V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-653.
 - **Ricceri J. & Barbagallo R. (2016).** Role of Protease and Oxidase Activities Involved in Some Technological Aspects of the Globe Artichoke Processing and Storage. *LWT*, 71, 196–201.
 - **Roseiro L., Barbosa M., Ames J. & Wilbey R. (2003).** Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of *Cynara L. for the production of ovine milk cheeses*, 13, 91–97.
 - **Rotonel R. & Equi L. (1972).** Plant Proteases. *Annual Review of Biochemistry*, 41, 261-288.
 - **Ryder E. (2002).** The new production of artichoke (*Cynara scolymus L.*) and cardoon (*Cynara cardunculus L.*). *Horticultural Reviews*, 28, 239-274.
 - **Serhan M. (2008).** Valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation en fromage Darfiyeh et établissement de caractéristiques physico chimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine. Thèse, Lorraine, 199 p.
 - **Shah, M. A., Mir S. A., & Paray M. A. (2014).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5-16

- **Sidrach L., García-Cánovas F., Tudela J. & NeptunoRodríguez-López J. (2005).** Purification of Cynarases from Artichoke (*Cynara scolymus L.*): Enzymatic Properties of Cynarase A. *Phytochemistry*, 66, 41–49.
- **Silva S., Allmere T., Malcata F. & Andren A. (2003).** Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow skim milk. *International Dairy Journal*, 13, 559–564.
- **Singh R., Kumar M., Mittal A. & Mehta P. (2016).** Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.
- **Taleb Bendiab F. (2017).** Contrôle physico-chimique et microbiologique du camembert. Mémoire Master En Nutrition et Santé, Tlemcen, 93p.
- **Toukob A. (2016).** Etude Physicochimique, microbiologique du Jben traditionnel de la région d'ainsefra fabriqué par el HAKA. Mémoire de MASTER, UNIV. Abou BekerBelkaid, Tlemcen, 18p.
- **Veisseyre. (1979).** Technologie du lait constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3ème édition. Edition la maison rustique, Paris.
- **VIGNOLA C. (2002).** Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN : 29-34.
- **Walstra P., Wouters J. & Geurts T. (2006).** *Dairy Science and Technology*, Second Edition. CRC Press.
- **Yadav M. & Sharma A. (2015).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: A review. *Dairy Science Technology*, 95(5), 595-611.
- **Zell H. (2011).** Le cardon : aspects morphologiques et culturels. Éditions Agricoles, Paris.
- **Zeng Z., Zhang H., Wu H. & Liu B. (2022).** Functional Properties of Artichoke (*Cynara scolymus L.*) and Cardoon (*Cynara cardunculus L.*): A Comprehensive Review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 231-244.