



**UNIVERSITÉ D'ÉTAT D'HAÏTI**

**(U.E.H)**

**FACULTÉ D'AGRONOMIE ET DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE**

**(F.A.M.V)**

**DÉPARTEMENT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DES ALIMENTS**

**(D.S.T.A)**

*« Intérêts des coagulants végétaux dans la fabrication fromagère »*

Mémoire présenté par: Patrick JEAN GILLES  
Pour l'obtention du titre d'Ingénieur-Agronome  
Option: Sciences et Technologie des Aliments

Encadreur : Jean-Christophe Vuilleumard, Ph.D.

**Avril 2015**

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements et toute ma gratitude au GRAND ARCHITECTE DE L'UNIVERS pour m'avoir donné le courage, la force, la détermination et la persévérance pour cheminer sur la voie de l'éducation. Qu'il en soit toujours ainsi†††

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance. Je tiens tout d'abord à remercier mon encadreur, le Dr Jean-Christophe VUILLEMARD, pour avoir accepté de m'encadrer dans la rédaction de ce mémoire, pour sa disponibilité et ses conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Ma profonde gratitude va également au Vice-Doyen à la Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, monsieur Pierre-Mathieu CHAREST, pour son support inconditionnel durant tout mon séjour à l'Université Laval.

Je voudrais également remercier le gouvernement du Canada, qui, via le « Programme des Futurs Leaders dans les Amériques (PLFA)» a financé ce travail à l'Université Laval.

Je désire aussi remercier mes professeurs de la FAMV, le personnel du Département des Sciences et Technologie des Aliments, en particulier le Directeur du département, monsieur Corantin HAROLD. Mes sincères remerciements à tous mes collègues haïtiens pour leurs encouragements et pour l'ambiance agréable tout au long de ce stage.

Je n'aurais pas pu arriver jusque-là sans l'appui de mes parents, de mes frères et sœurs. Merci de m'avoir toujours supporté et encouragé.

À mon grand frère Michel Jean Gilles qui m'a montré la voie, qui a cru en moi et m'a soutenu dans mes efforts.

## Résumé

L'affinage du fromage est l'une des étapes les plus importantes en fromagerie. C'est aussi un processus lent et coûteux. Trouver une méthode permettant de réduire le temps de maturation permettrait de diminuer considérablement les coûts de production. Grâce à leur activité protéolytique élevée, les coagulants végétaux accélèrent l'affinage. Néanmoins, ils occasionnent des défauts de texture, de saveurs et diminuent le rendement fromager. Des études ont montré que l'extrait de chardon (*Cynara cardunculus*) pouvait accélérer la maturation sans provoquer tous les défauts associés aux enzymes végétales. Mélangée à la présure, l'enzyme du chardon (cyprosine) pourrait réduire le temps d'affinage sans affecter les caractéristiques (rendement, texture, saveur) du fromage. Dans ce travail, l'effet d'un mélange de présure et de cyprosine dans la fabrication de fromages de lait de chèvre dur et mi-dur, sera étudié. Dix (10) lots de laits seront transformés en fromages ferme et semi-ferme. Ces lots seront coagulés, avec un mélange de cyprosine et de présure suivant des rapports de 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60 et 50 : 50 pour les deux types de fromages. Pour chaque lot un (1) fromage témoin sera produit avec 100% de présure. La composition chimique des fromages et deux (2) tests (triangulaire et profil sensoriel) seront réalisés en vue de déterminer les différences entre les fromages.

## Table des matières

Résumé.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	vii
Liste des annexes.....	vii
I. Introduction.....	7
II. État des connaissances.....	3
2.1. Les enzymes coagulantes dans la fabrication du fromage.....	3
2.1.1. Les protéases animales.....	3
2.1.2. Les présures recombinantes.....	4
2.1.3. Les enzymes microbiennes.....	5
2.1.4. Les enzymes végétales.....	5
2.2. Propriétés protéolytiques des extraits végétaux.....	6
2.3. Aspects techno-fonctionnels des extraits végétaux.....	10
2.4. Le processus de maturation.....	13
2.4.1 Les agents de maturation.....	14
2.5. Avancées et perspectives d'utilisation des coagulants végétaux en fromagerie. .	15
III. Hypothèse et objectifs.....	16
3.1. Hypothèse.....	16
3.2. Objectifs.....	17
IV. Méthodologie.....	17
4.1. Fabrication des fromages.....	17
4.2. Analyses physico-chimiques.....	17
4.3. Évaluation sensorielle.....	20

4.4. Analyse statistique.....	20
V. Conclusion .....	21
VI. Bibliographie.....	22
Annexes .....	27

## Liste des tableaux

Tableau 1: Liste non exhaustive des <i>sources d'enzymes végétalee</i> pour la fabrication fromagère. 6	6
Tableau 2: Composition chimique des laits de bovin, d'ovin et de caprin .....	11
Tableau 3: Composition minérale (g/100 g de cendre) du lait de chèvre et du lait de vache .....	12

## Liste des figures

Figure 1: Variation du rendement fromager en fonction du type de lait et d'enzyme .....	13
Figure 2: Variation de la fermeté du fromage en fonction du type de lait et d'enzyme .....	13
Figure 3: Diagramme de fabrication du Batzos fait de lait de chèvre entier et pasteurisé .....	18
Figure 4: Étapes de la fabrication du fromage fermier “persillé des Aravis” .....	19
Figure 5: Étapes pour la réalisation d'un profil sensoriel conventionnel .....	20

## Liste des annexes

Annexe 1: Fraction protéique (g/100 g de protéine) du lait de chèvre et de vache .....	27
Annexe 2: Acides gras (AG) composant les triglycérides du lait de chèvre .....	28
Annexe 3 : Composition en acide gras (g/100 g d'acide gras total) du lait de chèvre et du lait de vache .....	29

## I. Introduction

Les protéases sont les enzymes commerciales les plus utilisées en raison de leurs multiples applications dans divers domaines (Sawant et Nagendran, 2014). À elle seule, la vente

de protéases représente plus de 60% de la vente des enzymes (Corzo et al., 2012). Ces enzymes jouent un rôle incontestable dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire, et dans la biotechnologie industrielle. De fait, l'industrie alimentaire est la plus grande utilisatrice de protéases (Sawant et Nagendran, 2014). Dans cette industrie, l'une des applications les plus importantes est l'utilisation de la présure dans la fabrication de fromages.

La fabrication de fromage comporte plusieurs étapes dont l'une des plus fondamentales est la coagulation du lait. Cette coagulation est traditionnellement obtenue par action sur le lait, de la présure, qui est une enzyme extraite industriellement des caillettes de veaux non sevrés (Abakar, 2012). Jusque vers les années 1950, la présure était l'enzyme dont l'utilisation était dominante dans la fabrication fromagère. Des pénuries mondiales ont suivi en raison du fait que sa production soit tributaire du marché de la viande (Adoui, 2007). Actuellement, la production de présure traditionnelle (ou animale) ne couvre que 20 à 30% de la demande de coagulant (Jacob et al., 2011).

La carence en présure sur le marché mondial a conduit à une augmentation de son prix. Parallèlement, la production de fromage a progressivement augmenté au cours des années (Shah et al., 2014). Cette situation a conduit à la recherche d'autres préparations enzymatiques alternatives d'origines diverses, pouvant coaguler le lait de façon analogue à la présure (García et al., 2012). Dans le cadre des recherches réalisées en vue de trouver des substituts à la présure, des protéases microbiennes mais surtout des protéases produites par des microorganismes génétiquement modifiés ont donné des résultats satisfaisants (Jacob et al., 2011; Mahajan et Chaudhari, 2014). Néanmoins, ces dernières années, une attention croissante a été dirigée vers des extraits naturels d'origine végétale comme alternative (Mahajan et Chaudhari, 2014; Shah et al., 2014). Ces protéases retiennent l'attention, non seulement en raison de leur activité protéolytique, mais également parce qu'elles sont généralement actives dans une large gamme de températures et de pH (Feijoo-Siota et Villa, 2011).

De nombreux coagulants végétaux sont utilisés depuis des siècles pour la fabrication fromagère. Ces enzymes coagulantes ont été identifiées chez presque toutes les espèces de plantes. Elles sont utilisées sous forme d'extraits végétaux bruts ou d'enzymes purifiées (Grozdanovic et al., 2013; Shah et al., 2014). Cependant, leur activité protéolytique élevée,



entraîne des modifications des propriétés organoleptiques des fromages traditionnels et occasionne une baisse du rendement (Grozdanovic et al., 2013).

Cette activité protéolytique élevée peut être mise à profit dans le processus d'affinage des fromages. En effet, une étude réalisée pour comparer l'extrait de chardon (*Cynara cardunculus*) à la présure dans la fabrication du Camembert a montré que la vitesse de maturation a été plus élevée pour le Camembert fabriqué avec l'extrait de chardon. Un résultat similaire a été obtenu dans la production de fromage de type cheddar, coagulé avec de faibles proportions de chardon mélangé à la présure (O'Mahony et al., 2003). Plus récemment, Galán et al. (2012) ont montré que le fromage fabriqué avec le mélange de chardon et de présure a atteint les caractéristiques sensorielles et biochimiques plus rapidement que le fromage obtenu par coagulation avec la chymosine seule. De plus, le léger goût amer dû à l'activité protéolytique du chardon est réduit lorsqu'il est mélangé à la présure.

Un grand nombre de travaux ont été réalisés autour de l'effet du chardon sur la protéolyse du fromage à base de lait de chèvre. Néanmoins, peu d'informations sont disponibles sur l'effet d'un mélange de présure et de chardon sur les caractéristiques sensorielles et de protéolyse de ces fromages. Ainsi, ce présent travail se propose d'étudier l'effet de l'association d'une enzyme végétale et d'une enzyme animale sur le temps de maturation et sur les propriétés organoleptiques des fromages, dans le but de permettre une appréciation de l'intérêt des coagulants végétaux comme suppléments aux enzymes animales.

## **II. État des connaissances**

### **2.1. Les enzymes coagulantes dans la fabrication du fromage**

Les enzymes coagulantes sont une nécessité absolue pour la production de fromages affinés. Ces coagulants sont des préparations d'enzymes protéolytiques (Jacob et al., 2011; Shah et al., 2014) et sont de différentes sources : animale, microbienne, végétale et, depuis peu, issues de modifications génétiques.

#### **2.1.1. Les protéases animales**

Plusieurs protéases animales sont utilisées pour la fabrication de fromages. Toutefois, la présure (mélange de chymosine et de pepsine) est de très loin la plus employée et est considérée

comme étant la meilleure enzyme de coagulation du lait (Abi-Azar, 2007). Le principal coagulant de la présure est la chymosine qui représente 80 % de l'enzyme contre 20 % pour la pepsine (Abakar, 2012).

Dans le processus de la coagulation du lait, la chymosine a une double action. Une action coagulante par hydrolyse de la caséine  $\kappa$  et une protéolyse générale sur toutes les protéines au cours de l'affinage du fromage (Abi Azar, 2007; Adoui, 2007). L'enzyme hydrolyse la liaison Phe<sup>105</sup> et Met<sup>106</sup> de la  $\kappa$ -caséine, entraînant la déstabilisation des micelles de caséines et leur coagulation. L'hydrolyse des caséines par la présure fournit des substrats pour la formation de saveurs pendant la maturation du fromage. Bien que la protéolyse soit essentielle pour la fabrication de fromages affinés, un bon coagulant doit posséder un bon rapport d'activité de coagulation sur l'activité protéolytique générale (Yegin et Dekker, 2013).

#### 2.1.2. Les présures recombinantes

Les présures provenant d'animaux comme le chameau, la chèvre, l'agneau, et le buffle ont été étudiées et caractérisées afin de remplacer la présure bovine. Toutefois, elles ne sont pratiquement pas utilisées au niveau industriel, car ces enzymes présentent des propriétés enzymatiques moins intéressantes en comparaison de celles de la présure bovine (Almeida et al., 2015; Yegin et Dekker, 2013).

En réponse à la croissance de la production fromagère et pour surmonter les problèmes de disponibilité de la présure animale, la « Food and Drug Administration » a approuvé, dans les années 1990, l'utilisation de chymosine dérivée de microorganismes génétiquement modifiés comme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* qui sont utilisés comme hôtes pour l'expression des enzymes recombinantes (Jacob et al., 2011).

Les présures recombinantes représentent actuellement 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).

### 2.1.3. Les enzymes microbiennes

Un travail important a été réalisé dans la sélection de microorganismes pouvant produire des enzymes coagulantes. De nombreuses protéases microbiennes agissent de la même manière que la chymosine. Toutefois, ces enzymes montrent une activité protéolytique plus élevée pendant la fabrication du fromage. L'enzyme de *Rhizomucor miehei* est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production fromagère et est disponible à différents degrés de thermo-stabilité et de pureté (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 générale. La thermolabilité est un critère important, en particulier pour les protéases ayant une activité protéolytique générale élevée (Yegin et Dekker, 2013).

### 2.1.4. Les enzymes végétales

De nombreuses préparations coagulantes végétales 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 chardon est probablement la présure végétale ayant connu le plus de succès à ce jour. Il est employé depuis de nombreuses années dans la fabrication de fromages traditionnels (Lamas et al., 2001; Prados et al., 2007). Des études ont montré qu'il est possible d'extraire et de purifier deux protéases aspartiques, à savoir les cardosines A et B, à partir des fleurs de chardon. Ces protéases possèdent des spécificités similaires, respectivement, à celles de la chymosine et de la pepsine (García et al., 2012; Lamas et al., 2001). Elles clivent la liaison peptide Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> de la  $\kappa$ -caséine bovine et ovine, tandis que la  $\kappa$ -caséine caprine est de préférence clivée au niveau de la liaison Lys<sup>116</sup>-Thr<sup>117</sup>. Les deux enzymes peuvent également hydrolyser à la fois l' $\alpha$  et la  $\beta$ -caséine pour produire des fromages ayant un arôme typique, une texture de beurre doux, et une saveur légèrement piquante (Llorente et al., 2014).

## 2.2. Propriétés protéolytiques des extraits végétaux

Dans le but d'identifier des enzymes qui agissent de manière similaire à la présure, de nombreuses plantes ont fait l'objet d'études afin d'évaluer leurs propriétés protéolytiques et coagulantes (Tableau 1). Les propriétés de plantes comme *Actinidia deliciosa* (Piero et al. 2011; Grozdanovic et al. 2013), *Ficus spp*, *Carica papaya*, *Calotropis procera* et *Cynara cardunculus L.* (Low et al., 2006; Adetunji et Salawu, 2008), *Onopordum acanthium L.* (Brutti et Al. 2012), *Cynara cardunculus L.* et *Cynara scolymus L.* (García et al. 2014) ont été étudiées.

Pour évaluer la valeur réelle des enzymes végétales étudiées, certains auteurs ont effectué des études pour comparer leur activité coagulante et protéolytique à la chymosine et à d'autres enzymes végétales qui ont déjà été étudiées. Piero et al. (2011) ont montré que l'actinidine purifiée, extraite d'*Actinidia deliciosa* (kiwi), a une activité coagulante et que celle-ci est liée à la concentration de l'enzyme. Ces auteurs affirment que leur procédure de purification a permis la production d'une préparation enzymatique ayant une activité spécifique élevée et un rapport d'activité coagulante sur la protéolyse générale similaire à celle rapportée pour la chymosine. Piero et al (2011), quant à eux, ont démontré que ce n'est pas l'extrait de kiwi qui contenait la plus forte concentration d'enzyme protéolytique active (pH 9,0) qui avait le plus haut niveau d'activité de coagulation. Des essais sur du lait commercial contenant 0,5 % de matières grasses ont montré que l'extrait préparé à pH 5,0 a eu une activité coagulante 18% plus élevée que la même quantité d'actinidine purifiée. Leur étude a également montré que le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique de l'extrait préparé à pH 5,0 est inférieur à celui de la chymosine, cependant, le coagulum obtenu était comparable à celui obtenu avec la chymosine. Mazorra-Manzano et al. (2013a) sont arrivés à la même conclusion dans leur étude sur l'activité protéolytique de trois extraits végétaux. Selon ces auteurs, il n'y a pas de différence significative en termes de rendement entre l'extrait d'*Actinidia deliciosa* et la chymosine (17,8 % et 20,2% ont respectivement été obtenus pour les deux enzymes). Quant aux autres enzymes, les extraits de *Zingiber officinale* et de *Cucumis melo* ont donné des résultats nettement inférieurs.

Tableau 1: Liste non exhaustive des sources d'enzymes végétales pour la fabrication fromagère.

---

**Plantes étudiées**

**Références**

---

---

	Puglisi et al. (2014)
<i>Actinidia deliciosa</i>	Piero et al. (2011)
	Grozdanovic et al. (2013)
	Mazorra-Manzano et al. (2013a)
<i>Albizia lebbek</i>	Egito et al. (2007)
<i>Ananas comosus</i>	Solorza-Feria et al. (2011)
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Beka et al. (2014)
<i>Bromelia hieronymi</i>	Bruno et al. (2010)
<i>Calotropis gigantea</i>	Anusha et al. (2014)
<i>Carica papaya</i>	Low et al. (2006)
	Solorza-Feria et al. (2011)
<i>Citrus aurantium L. flower.</i>	Mazorra-Manzano et al. (2013b)
<i>Cucumis melo</i>	Mazorra-Manzano et al. (2013a)
<i>Cynara cardunculus</i>	Low et al. (2006)
<i>Cynara scolymus</i>	Chazarra et al. (2007)
<i>Euphorbia nerifolia</i>	
<i>Euphorbia nivulia</i>	Mahajan et Chaudhari (2014)
<i>Euphorbia tirucalli</i>	
<i>Ficus religiosa</i>	Low et al. (2006)
	Kumari et Al. (2012)
<i>Helianthus annuus</i>	Egito et al. (2007)
<i>Moringa oleifera</i>	Pontual et al. (2012)

---

Tableau 1 : Liste non exhaustive des *sources d'enzymes végétales pour la fabrication fromagère* (suite)

<b>Plantes étudiées</b>	<b>Références</b>
<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	Mahajan et Chaudhari (2014)
<i>Solanum dubium</i>	Ahmed et al. (2009)
<i>Solanum elaeagnifolium var. Cavanilles</i>	Néstor et al. (2012)
<i>Streblus asper</i>	Tripathi et al. (2011)
<i>Withania coagulans</i>	Nawaz et al. (2011)
	Beigomi et al. (2014)
<i>Zingiber officinale</i>	Mazorra-Manzano et al. (2013a)

L'activité protéolytique des enzymes du chardon, du ficus (*Ficus spp*) et de la papaye (*Carica papaya*) a été comparée sur du lait écrémé régulier et du lait écrémé ultra filtré (Low et al., 2006). Bien qu'il soit légèrement plus protéolytique que la présure, seul l'extrait de chardon a donné des résultats proches de cette dernière. Tandis que pour la ficine, c'est surtout avec du lait ayant une concentration en protéines d'au moins quatre fois celle du lait régulier qu'elle se révèle prometteuse. Quant à la papaïne, elle a été jugée trop protéolytique dans les deux types de lait et donnait des rendements de coagulation variables. Solorza-Feria et al. (2011) ont démontré que la papaïne hydrolyse moins bien la caséine que la broméline (extraite de *Ananas comosus*), qui, à son tour, donne des résultats nettement plus faibles que la chymosine.

Compte tenu du succès de certaines enzymes dans la fabrication de fromages traditionnels dans diverses régions du monde, des essais de fabrication d'autres fromages ont été réalisés ces dernières décennies. Ainsi, Faccia et al. (2012) ont comparé le profil protéolytique de la cacioricotta de type artisanal, un fromage fait de lait de chèvre coagulé par un extrait de *Ficus carica sylvestris*, à la cacioricotta industrielle coagulée par la présure. Même avec un chauffage intense du lait, la forte activité protéolytique de l'extrait de *Ficus carica sylvestris* a conduit à la formation de grande quantité de peptides, contrairement à la présure.

L'extrait de *Withania coagulans* a été utilisé pour préparer le fromage Cottage au lait de buffle et comparé avec celui coagulé par la présure. Le type de coagulant n'a eu aucun effet significatif sur les propriétés organoleptiques, l'acidité, la quantité de protéines et de cendres des deux fromages. Néanmoins, le fromage coagulé par l'extrait de *Withania coagulans* avait une teneur en humidité plus élevée qui traduit une plus grande activité protéolytique de cette enzyme (Khan et Masud, 2013). Ces résultats concordent parfaitement avec ceux de Nawaz et al. (2011) avec le fromage de type Mozzarella.

L'influence de l'extrait de *Zingiber officinale* sur les propriétés physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du fromage Peshawari fabriqué à partir de lait de vache, a été évaluée et comparée à celle de la présure. Seules les teneurs en azote soluble et en humidité ont présenté des différences significatives. Le fromage coagulé par l'enzyme du *Zingiber officinale* a présenté des niveaux d'humidité inférieurs et d'azote soluble plus élevés par rapport à celui coagulé par la présure. Aucune amertume n'a été notée dans le fromage fait avec l'extrait du *Zingiber officinale* (Hashim et al., 2011).

Des études réalisées sur les extraits de *Cynara cardunculus L.* et de *Cynara humilis L.* ont montré, en accord avec leur contenu enzymatique similaire, que presque toutes les propriétés rhéologiques étaient similaires pour les deux coagulants. Comparés à la chymosine, ces derniers se sont révélés légèrement plus protéolytiques, conduisant à la formation d'un gel moins ferme (Esteves et al., 2002; Vioque et al., 2000). Utilisé pour la fabrication de fromages de type Gouda à partir de lait de vache, l'extrait de *Cynara scolymus L.* a affiché un rendement similaire à celui obtenu avec la présure. Toutefois, les fromages obtenus devaient être mis en saumure pendant une période plus longue pour empêcher une sur-protéolyse et éviter le développement d'amertume (Llorente et al., 2014).

Différentes quantités d'extrait de *Cynara cardunculus L.* ont été comparées à la présure dans la fabrication de fromages de lait de brebis. Sur une période de six mois de maturation, aucune différence significative n'a été observée entre les coagulants pour la majorité des paramètres chimiques étudiés. Cependant, l'azote soluble était significativement plus élevé dans les fromages fabriqués avec les coagulants végétaux (Galán et al., 2008; Prados et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus pour la fabrication de fromages de lait de chèvre (Pino et al., 2009; Tejada et al., 2008).

Plusieurs auteurs ont passé en revue les différentes recherches effectuées sur les coagulants extraits de plantes. Sousa et Malcata (2002) ont examiné le rôle de l'extrait de *Cynara cardunculus* in vitro et pendant la maturation de plusieurs types de fromages. Roseiro et al. (2003) ont étudié l'utilisation d'extraits de plantes en particulier l'espèce *Cynara spp.* Les récentes avancées sur les différents types de coagulants (animaux, présures recombinantes, microbiens, végétaux) ont été examinées par Jacob et al. (2011). Dans ce travail, l'auteur fait ressortir l'impact des enzymes sur la protéolyse, le rendement fromager et la qualité du fromage. Yegin et Dekker (2013) ont passé en revue les progrès dans le domaine des protéases aspartiques d'origine diverses avec un accent particulier sur les structures, les fonctions et le mécanisme catalytique de ces protéases. Plus récemment, l'utilisation des protéases végétales comme coagulants a été étudiée (Shah et al., 2014). Cette étude a mis l'accent sur les différents types de protéases végétales, leurs sources et leurs propriétés fonctionnelles.

De façon générale, les résultats ont montré que les coagulants végétaux ont une activité protéolytique très élevée. Cette activité protéolytique se manifeste par une diminution du rendement fromager, des défauts de texture et de goût. Toutefois, certaines enzymes végétales, comme celle du *Withania coagulans*, ont donné des résultats plutôt satisfaisants en fromagerie. Mais l'enzyme végétale ayant donné les meilleurs résultats est l'extrait de chardon qui est employé avec succès depuis de nombreuses années au Portugal et dans les régions limitrophes de l'Espagne pour la fabrication de fromages traditionnels (Shah et al., 2014).

### 2.3.Aspects techno-fonctionnels des extraits végétaux

Les fromages préparés avec des coagulants végétaux ont une texture douce caractéristique et une saveur légèrement amère. L'utilisation d'enzymes végétales pour la production de fromage a parfois conduit à des produits de faible qualité, en particulier en termes de texture et de saveur (Roseiro et al., 2003; Yegin et Dekker, 2013). Toutefois, ces enzymes sont largement utilisées pour la production de fromages durs et mi-durs de lait de caprins ou d'ovins (Shah et al., 2014). Ce succès des enzymes végétales dans la production de fromages au lait de brebis suggère que les caractéristiques différentes des caséines des laits ovins et caprins par rapport au lait bovin (annexe 1) limitent la production de peptides amers lors de la protéolyse (Roseiro et al., 2003).



La teneur en caséines du lait a une influence significative sur les propriétés rhéologiques du gel, sur sa vitesse de formation et sa fermeté maximale (Park et Al., 2007). Le tableau ci-dessous (tableau 2) présente la teneur en protéines, en lipides et en solides des laits bovins, caprins et ovins (voir annexe 1 pour les fractions protéiques des laits bovins et caprins).

Les micelles des laits d’ovin et de caprin sont différentes de celles du lait de vache en termes de diamètre moyen et d’hydratation. Elles diffèrent également par leur niveau de minéralisation (tableau 3), les micelles de caséines du lait de caprins contenant plus de calcium et de phosphore inorganique (Park et al., 2007). En raison des similarités dans les structures primaires des laits d’ovin et de caprin, des schémas de gel similaires ont été observés dans les fromages fabriqués avec ces deux types de laits (Temizkan et Al., 2014).

Tableau 2: Composition chimique des laits de bovin, d’ovin et de caprin

<b>Paramètres</b>	<b>Types de lait</b>		
	<b>Bovin</b>	<b>Ovin</b>	<b>Caprin</b>
<b>Matière sèche totale (%)</b>	10,98	17,10	11,83
<b>Protéine (%)</b>	3,17	6,27	4,00
<b>Lipide (%)</b>	3,58	7,33	3,90

Adapté de Temizkan et al. (2014)

Si toutes les enzymes protéolytiques coagulent le lait, les rendements obtenus en fromagerie avec ces dernières varient grandement en fonction du lait utilisé et de l’enzyme elle-même. En effet, Arlene (2014) a étudié l’effet du type d’enzyme et du type de lait sur le rendement du fromage. Les résultats ont montré que pour une même enzyme le rendement varie en fonction du lait, compte tenu du fait que la teneur en , varie selon le lait (figure 1, annexe 1). Pour un même lait, plus le pouvoir coagulant de l’enzyme est élevé, plus le rendement est élevé. De même, la texture du fromage obtenu pour un même lait dépend de l’enzyme utilisée (figure 2). Moins l’enzyme est protéolytique, plus la texture du fromage sera ferme. La différence de texture des fromages est également due à la teneur en calcium du lait. En effet, plus la teneur en calcium est basse, moins le réseau de caséines sera dense et moins ferme sera la texture du fromage.

Tableau 3: Composition minérale (g/100 g de cendres) du lait de chèvre et du lait de vache

	Lait de chèvre	Lait de vache
<b>Ca</b>	21.14	17.47
<b>P</b>	15.86	13.39
<b>Mg</b>	1.72	1.44
<b>Fe</b>	0.02	0.02
<b>Cu</b>	0.006	0.002
<b>Zn</b>	0.07	0.07

Adapté de Ceballos et al. (2009)

Pour une enzyme comme l'extrait de chardon qui possède des caractéristiques similaires à la présure, comme décrit précédemment, les résultats en termes de rendement fromager sur un même type de lait devraient être semblables. En effet, comme l'ont montré les études réalisées sur ce sujet, il n'y a pas de différence significative entre les rendements obtenus avec les deux enzymes. Néanmoins, l'activité protéolytique de l'extrait de chardon a conduit à la production de fromages ayant une texture douce et crémeuse, différente de celle des fromages obtenus avec la présure (Jacob et al., 2011).

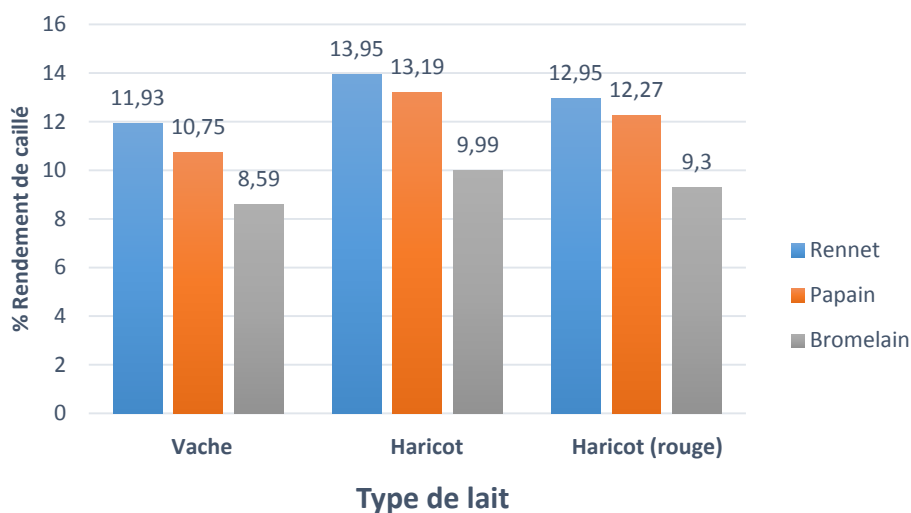


Figure 1: *Variation du rendement fromager en fonction du type de lait et de l'enzyme*

Adaptée de Arlene (2014).

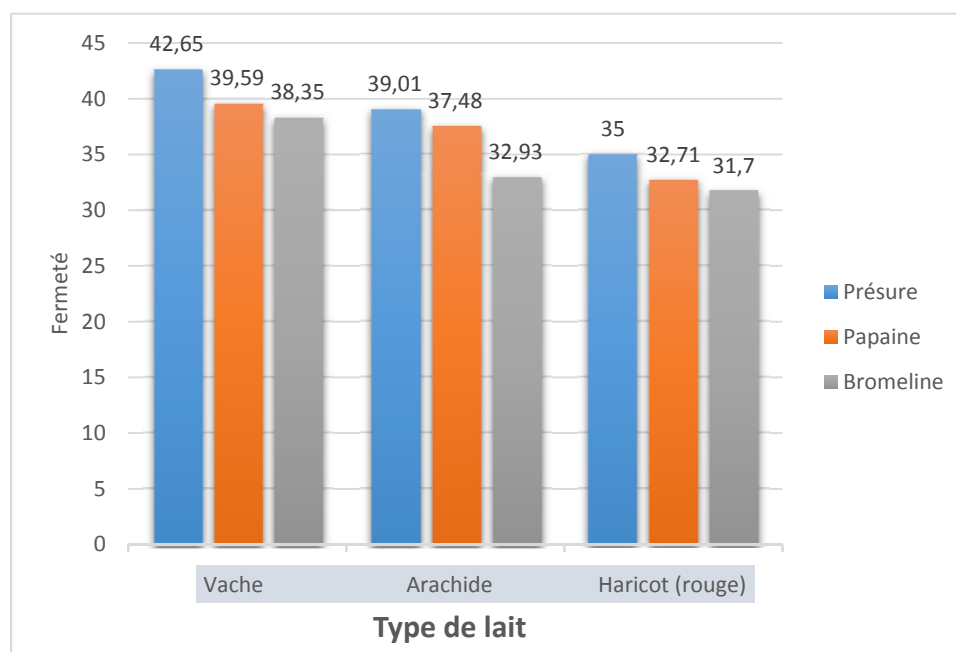


Figure 2: *Variation de la fermeté du fromage en fonction du type de lait et de l'enzyme*

Adaptée de Arlene (2014)

#### 2.4. Le processus de maturation

Le processus de maturation est une étape impliquant la digestion enzymatique des composants du coagulum. Il implique plusieurs processus biochimiques comprenant la protéolyse, la lipolyse et la glycolyse (Guizani et al., 2006). En cours d'affinage, les composants du caillé (caséine, matière grasse, lactose, etc.) sont transformés par l'action des enzymes natives du lait ou produites par synthèse microbienne au cours de la maturation. Ces transformations biochimiques confèrent de nouvelles caractéristiques au caillé. Simultanément, la saveur et l'arôme se développent dans le fromage (Choisy et al., 2000).

La protéolyse est le principal et le plus complexe événement biochimique survenant pendant le processus de maturation. Elle contribue à la maturation du fromage grâce à la formation de peptides et d'acides aminés, et modifie la texture du fromage par la dégradation du

réseau protéique (Guizani et al., 2006). Les étapes générales de la réaction peuvent être résumées ainsi :

- ✓ Une hydrolyse initiale des caséines macro-peptides par le coagulant résiduel et par la plasmine du lait;
- ✓ La dégradation des macro-peptides en petits et moyens peptides par les ferments et les peptidases;
- ✓ L'hydrolyse des moyens et petits peptides par les peptidases des ferments pour donner des dipeptides, des tripeptides et des acides aminés libres. (Farkye, 2004)

Dans le développement de la saveur du fromage, la lipolyse joue un rôle considérable. En effet, la plupart des acides gras libres générés à partir de la lipolyse sont des composés aromatiques mais aussi des précurseurs d'autres composés volatils comme des aldéhydes, des esters, des lactones et des alcools secondaires (Guizani et al., 2006). Les composés volatils contribuent à la fois au goût, à la consistance et à l'arôme des produits. Dans les fromages de chèvre, par exemple, les acides caproïque, caprylique et caprique leur donnent leur goût caractéristique (annexes 2 et 3).

#### 2.4.1 Les agents de maturation

Plusieurs approches pour accélérer l'affinage du fromage ont été décrites, parmi lesquelles: l'élévation de la température de maturation; le traitement à haute pression; le développement de cultures d'affinage; l'utilisation d'enzymes exogènes. (Farkye, 2004; Kilcawley et al., 2012) En général, ces approches visent l'accélération de la protéolyse. Cependant, même si cela est relativement facile à réaliser, il est très difficile de contrôler la protéolyse (Kilcawley et al., 2012).

Dans l'affinage, les enzymes qui constituent les agents de maturation peuvent provenir de trois sources différentes: les enzymes naturelles du lait, les enzymes coagulantes et les enzymes de micro-organismes qui colonisent le fromage (Choisy et al., 2000).

- ✓ Les enzymes du lait

Le lait natif contient un nombre élevé d'enzymes parmi lesquelles, deux sont de première importance: la lipase et la plasmine. La plasmine est une enzyme thermostable (la pasteurisation du lait à 72<sup>0</sup>C pendant 15 secondes réduit son activité de l'ordre de 10%). Une partie de la

plasmine est associée aux micelles de caséines, et est donc incorporée dans le coagulum pendant la fabrication du fromage. Son action pendant la maturation est importante et est principalement marquée dans les fromages nécessitant une maturation lente (Choisy et al., 2000).

La principale lipase du lait est la lipoprotéine lipase. Cette enzyme thermolabile est dénaturée par un chauffage à 78<sup>0</sup>C pendant 10 secondes. Son activité est donc plus importante dans les fromages au lait cru, puisque l'enzyme est inactivée par la pasteurisation (McSweeney, 2004).

#### ✓ Les enzymes coagulantes

Les enzymes coagulantes ont une double activité dont l'une est spécifique à la  $\kappa$ -caséine. La deuxième activité, la protéolyse générale qui vise la dégradation des protéines pendant la maturation est due à la présure résiduelle non évacuée avec le petit-lait et prise au piège dans le caillé (Choisy et al., 2000). Le coagulant résiduel constitue une source importante d'enzymes protéolytiques dans les fromages. Jusqu'à 30 % du coagulant ajouté au lait peut être présent et actif dans le caillé, dépendamment de facteurs tels que le type d'enzyme, la température de cuisson et le pH à l'égouttage (McSweeney, 2004)

#### ✓ Les enzymes microbiennes

La protéolyse et la lipolyse jouent un rôle important, mais d'autres réactions, en particulier la dégradation des acides aminés, sont essentielles pour la production de constituants d'arôme et l'obtention de la saveur finale du produit. Au cours de la maturation, l'intervention des micro-organismes se produit par l'action de leurs enzymes exo-cellulaires et intracellulaires. Ces enzymes appartiennent à différentes catégories: les enzymes protéolytiques, les lipases, les systèmes enzymatiques actifs sur les acides aminés, les systèmes actifs sur les acides gras, etc. Ces enzymes contribuent, non seulement à l'hydrolyse des moyens et petits peptides, mais également à la formation de saveurs par la dégradation des acides aminés (Choisy et al., 2000; Farkye, 2004)

### 2.5. Avancées et perspectives d'utilisation des coagulants végétaux en fromagerie.

La maturation du fromage est un processus lent et relativement coûteux. En raison du coût élevé de ce processus, le développement d'un procédé efficace permettant de réduire le temps d'affinage, permettrait de réaliser des économies substantielles pour l'industrie fromagère.

L'accélération de la maturation peut être obtenue en augmentant l'activité de la présure dans le caillé. Cependant, une étude a montré qu'une augmentation de la quantité de présure n'accélère pas la maturation mais provoque plutôt de l'amertume (Fox cité par Beermann et Hartung, 2012). Ces auteurs ont suggéré de mélanger la présure avec un autre enzyme (extrait de *Cryphonectria parasitica*) pour accélérer la maturation du fromage.

Comme vu précédemment, les approches pour accélérer l'affinage du fromage passent par l'accélération de la protéolyse qui est l'un des principaux événements biochimiques du processus d'affinage (Faccia et al., 2012). Compte tenu de leur activité protéolytique élevée, les enzymes végétales coagulent très rapidement le lait, néanmoins, cette protéolyse est également source de défauts de goût, de texture et de diminution de rendement.

Bien qu'ayant une protéolytique générale plus élevée, les enzymes extraites des fleurs de chardons sont caractérisées par une activité coagulante semblable à la chymosine. Comme cela a été démontré antérieurement, aucune différence substantielle entre les compositions des fromages de lait de chèvre coagulés avec l'enzyme du chardon ou la chymosine, n'a été observée (Pino et al., 2009; Tejada et al., 2008). De même, aucune différence significative n'a été observée pour le fromage de lait de brebis (Galán et al., 2008; Prados et al., 2007). Cependant, l'activité protéolytique du chardon a favorisé un développement plus rapide des caractéristiques sensorielles et a permis de réduire de près de moitié le temps d'affinage (Galán et al., 2008). Selon Tejada et al. (2008), l'extrait de chardon peut être utilisé dans la fabrication de fromage au lait de chèvre pour accélérer la maturation.

### **III. Hypothèse et objectifs**

#### 3.1. Hypothèse

- L'extrait de chardon combiné à la présure diminue de manière significative le temps d'affinage des fromages au lait de chèvre fermes et semi-fermes sans affecter leur texture ni leur saveur.

### 3.2.Objectifs

- ✓ Comparer la composition et les propriétés sensorielles et texturales des fromages coagulés par différents mélanges de présure et d'extrait de chardon au fromage coagulé par la présure.
  
- ✓ Déterminer le ratio enzyme végétale et présure qui permet d'accélérer le temps de maturation sans modifier les propriétés sensorielles des deux (2) types de fromages.

## IV. Méthodologie

### 4.1.Fabrication des fromages

Dix (10) lots de lait entier de chèvre transformés en fromage ferme : (le persillé des Aravis de type fermier) et de fromages semi-fermes (le batzos). Les laits seront coagulés, avec les mêmes mélanges de cyprosine et de présure commerciale suivant des rapports de 20 : 80; 30 : 70; 40 : 60 et 50 : 50. Pour chacune des deux répétitions, un (1) fromage témoin sera produit avec 100% de présure. La préparation de la présure se fera suivant les recommandations du fabricant. L'extrait de chardon sera préparé comme décrit par Sanjuán et al. (2002). Les fromages seront réalisés suivant les diagrammes de fabrication présentés ci-dessous (Figures 3 et 4). Un ferment natif composé de trois souches de *Lactococcus lactis*, préalablement isolé du fromage traditionnel, sera utilisé pour la fabrication du batzos. Des échantillons seront prélevés après 30, 60 et 90 jours de maturation, pour tous les fromages.

### 4.2.Analyses physico-chimiques

La composition des fromages sera déterminée en duplicata sur chaque échantillon après 30, 60 et 90 jours. La teneur en solides totaux (ST) sera déterminée par séchage au four à 100 °C sous vide pendant 5 h (AOAC, 2002). La teneur en humidité (H) sera calculée par différence  $100 - ST = H$ . La méthode Kjeldahl (AOAC, 2005) sera utilisée pour déterminer l'azote total des fromages. Un facteur de correction de 6,38 sera appliqué afin d'exprimer les résultats en protéines. La teneur en chlorure de sodium sera évaluée à l'aide d'un analyseur de chlorure de sodium. La teneur en lipides sera déterminée suivant la méthode 933.05 de l'AOAC (2005). Le

pH, et les caractéristiques rhéologiques des fromages seront déterminés, respectivement, avec un pH-mètre et un texturomètre.

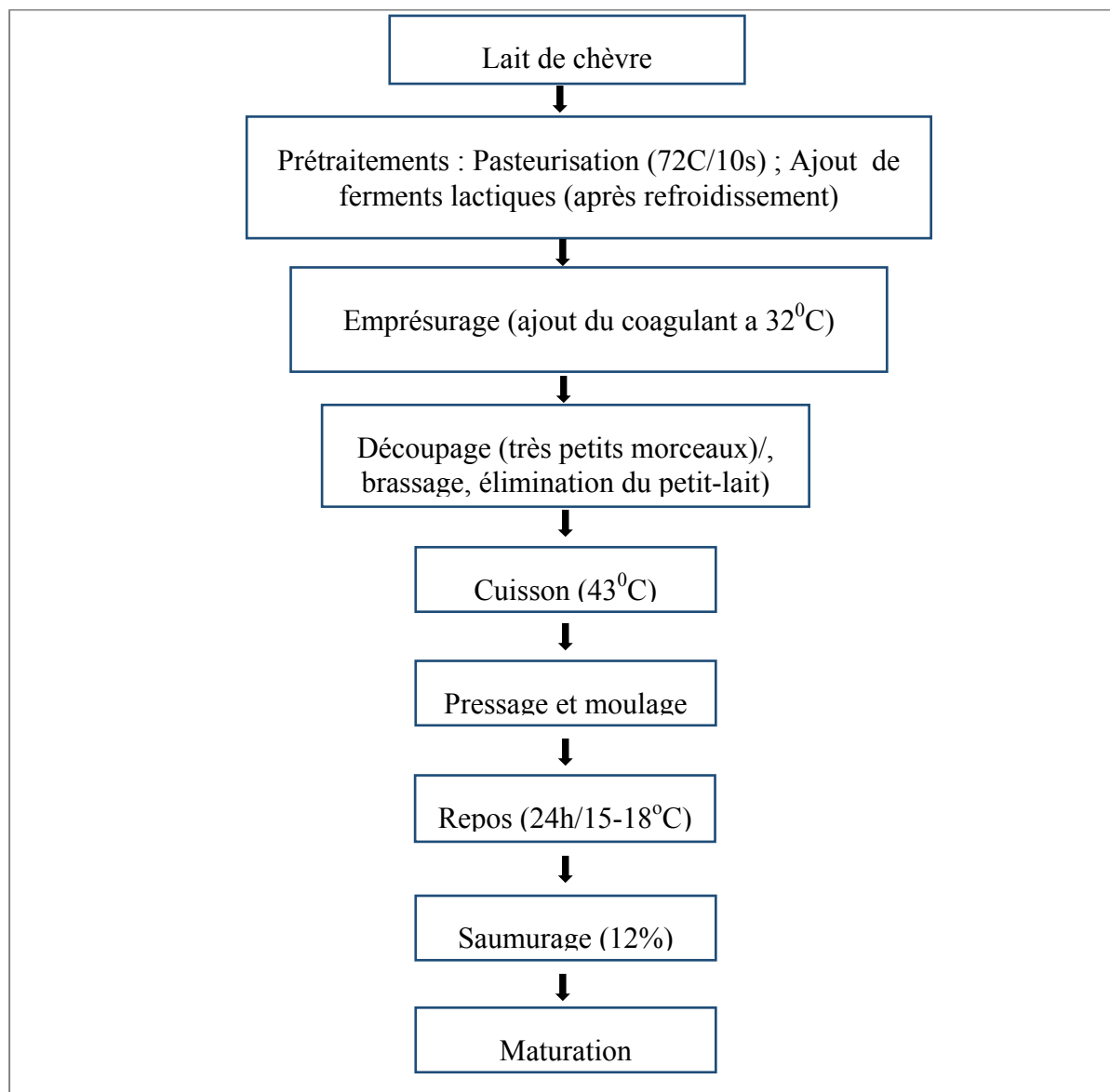


Figure 3: *Diagramme de fabrication du Batzos fait de lait de chèvre entier et pasteurisé*

Adapté de Psoni et al. (2006) et Anifantakis (2008)

Le rendement fromager, en pourcentage, sera calculé au début de la maturation par la formule :



$$\text{Rendement fromager} = \frac{\text{Quantité fromage produit}}{\text{Quantité de lait utilisée}}$$

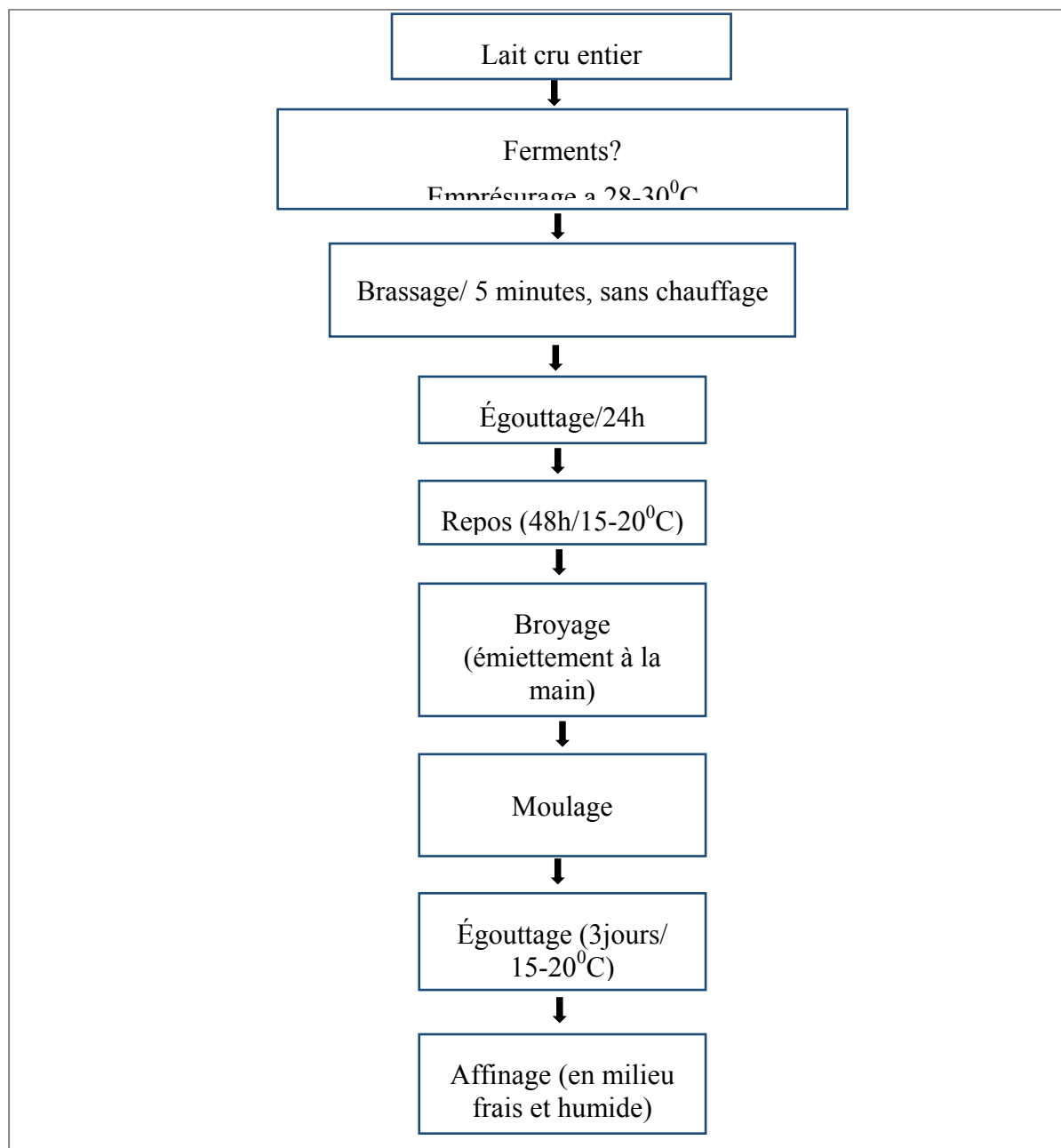


Figure 4: *Étapes de la fabrication du fromage “persillé des Aravis” fermier*

Adapté de Zeller (2005)

### 4.3.Évaluation sensorielle

L'évaluation sensorielle des fromages sera réalisée après 60 et 90 jours de maturation. Deux (2) tests (triangulaire et profil sensoriel) seront réalisés en vue de déterminer s'il existe des différences entre les fromages coagulés par le mélange d'enzyme et le fromage témoin. La préparation du jury se fera tel que décrit à la figure 5.

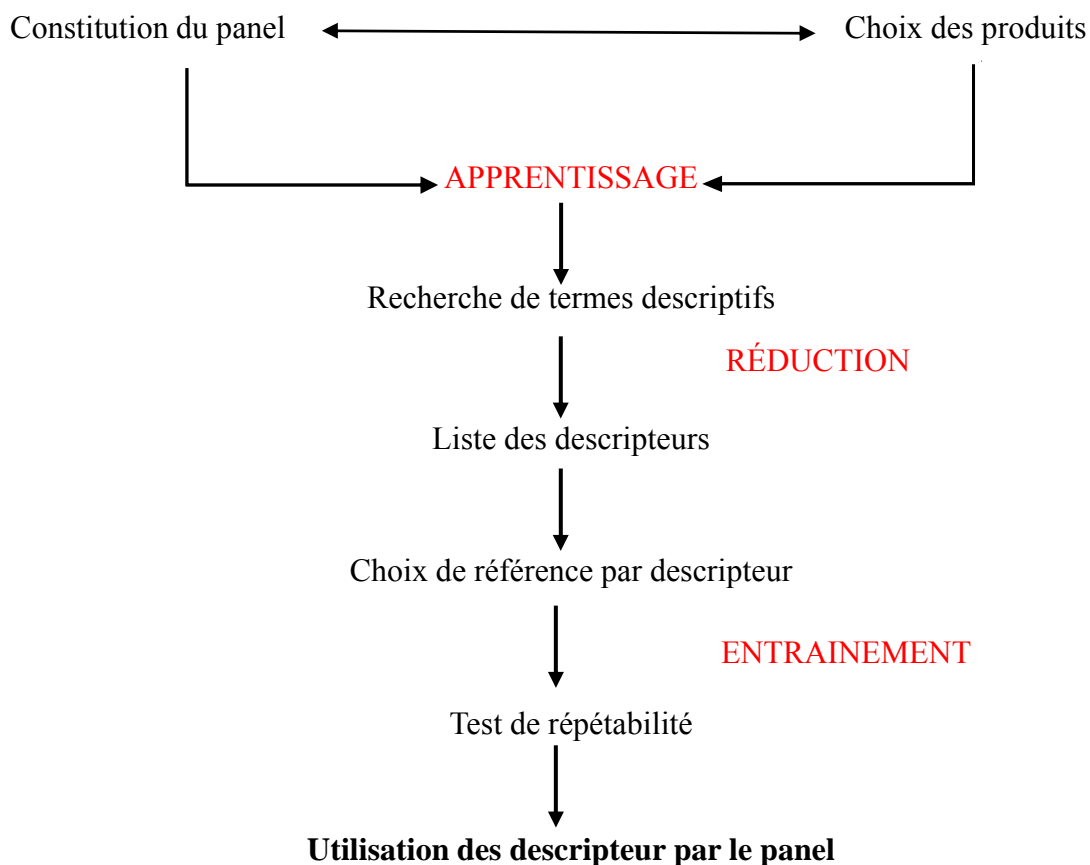


Figure 5: *Étapes de la formation du jury*

Adapté de Deneulin et Pfister (2013)

### 4.4.Analyses statistiques

Les différents paramètres étudiés seront soumis à une analyse statistique avec SAS/STAT, afin d'évaluer les différences significatives.

## V. Conclusion

Les études réalisées sur les coagulants végétaux montrent que ces enzymes ont généralement une protéolyse très élevée par rapport à la présure et provoquent des défauts de texture, de saveur et induisent une diminution du rendement fromager. Toutefois, des travaux réalisés sur l'extrait de chardon (cyprosine) ont montrés que ce dernier possède des propriétés similaires à la présure de veaux. Tout en étant un peu plus protéolytique que cette dernière, la cyprosine conduit à la production de fromages de bonne qualité et donne un bon rendement fromager sans différence significative par rapport aux fromages coagulés avec de la présure. Ceci est encore plus vrai pour les fromages réalisés avec du lait de chèvre, dont la composition diffère de celle du lait de vache.

L'affinage du fromage est l'une des étapes les plus importantes en fromagerie. C'est aussi un processus lent et coûteux. Plusieurs approches pour accélérer l'affinage du fromage ont été étudiées. Ces approches visent l'accélération de la protéolyse qui est le principal et le plus complexe événement biochimique survenant dans le processus d'affinage. Des études ont montré que la cyprosine, grâce à son mode d'action semblable à celui de la présure et son activité protéolytique un peu plus élevée que cette dernière, peut être utilisée dans la fabrication de fromage afin d'accélérer le processus de maturation. Combiné à la présure, ce coagulant pourrait contribuer à diminuer de manière significative le temps d'affinage des fromages sans affecter leur texture ni leur saveur.

## VI. Bibliographie

- Abakar, M. N. M. (2012). Essai de fabrication d'un fromage frais traditionnel sénégalais, à partir du lait de vache, coagulé par la papaine naturelle. Mémoire de maitrise, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, 32p
- Abi Azar, R. (2007). Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier: propriétés technologiques des coagulums obtenus. Thèse de Doctorat, AgroParisTech, Ecole Doctorale Abies, 195p
- Adetunji, V. O., et Salawu, O. T. (2008). West African soft cheese 'wara' processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: a comparative assessment of nutritional values. *African Journal of Biotechnology*, 7, 3360-3362.
- Adoui, F. (2007). Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. (Maitrise Mémoire de maitrise), Université Mentouri, 97p
- Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., et Mori, N. (2009). Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry*, 116(2), 395-400.
- Almeida, C. M., Gomes, D., Faro, C., et Simões, I. (2015). Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-13.
- Anifantakis, E.M. et Moatsou, G. (2008). Feta and other Balkan cheeses, dans *Brined cheeses*. Tamime, A. Y., John Wiley & Sons, 43-71
- Anusha, R., Singh, M. K., et Bindhu, O. (2014). Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *European Food Research and Technology*, 238(6), 997-1006.
- Arlene, A. (2014). (Page consultee le 05/04/2015). The Effects of Milk Types (Cow, Peanut, Red Bean) And Enzyme Types (Rennet, Papain, Bromelain) Towards The Quantity And Quality of Cheddar Cheese [En ligne], url: <https://publikasiilmiah.ums.ac.id/handle/123456789/4979>
- Beermann, C., et Hartung, J. (2012). Current enzymatic milk fermentation procedures. *European Food Research and Technology*, 235(1), 1-12.
- Beigomi, M., Mohammadifar, M. A., Hashemi, M., Senthil, K., et Valizadeh, M. (2014). Biochemical and rheological characterization of a protease from fruits of *Withania coagulans* with a milk-clotting activity. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1805-1813.
- Beka, R. G., Krier, F., Botquin, M., Guiama, V. D., Donn, P., Libouga, D. G., . . . Vercaigne-Marko, D. (2014). Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34(1), 25-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.013>

- Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M., Caffini, N. O., et Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 695-701.
- Brutti CB, Pardo MF, Caffini NO, Natalucci CL (2012) *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT Food Sci Technol* 45:172–179
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., et Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 322-329.
- Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D., et Rodríguez-López, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), 1393-1400.
- Choisy, C., Desmazeaud, Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., 2000. The biochemistry of ripening, dans *Cheesemaking, from science to quality assurance*, Eck, A., Gillis, J.C., TEC & DOC, Paris, 82-143
- Corzo, C. A., Waliszewski, K. N., et Welti-Chanes, J. (2012). Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry*, 133(3), 631-635.
- Deneulin, P. et Pfister R. (2013). (Page consulté le 23/04/2015). Méthodologie en analyse sensorielle. [En ligne] adresse url : <http://www.oenoflair.com/pdf/ArticleObjectif2013.pdf>
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., . . . Gaillard, J. L. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein. *International Dairy Journal*, 17(7), 816-825. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.012>
- Esteves, C. L., Lucey, J. A., et Pires, E. M. (2002). Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *International Dairy Journal*, 12(5), 427-434.
- Faccia, M., Picariello, G., Trani, A., Loizzo, P., Gambacorta, G., Lamacchia, C., et Di Luccia, A. (2012). Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with capriferin (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234(3), 527-533.
- Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91-98.
- Feijoo-Siota, L., et Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess technology*, 4(6), 1066-1088.
- Galán, E., Cabezas, L., et Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25(2), 92-96.
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., et Fernández-Salguero, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93-98.

- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Álvarez, D., et López, M. (2014). A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation. *Dairy science & technology*, 1-12.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I., et López, M. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy science & technology*, 92(6), 691-707.
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., et del Carmen Oliver-Salvador, M. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology advances*, 29(6), 983-996.
- Grozdanovic, M. M., Burazer, L., et Gavrovic-Jankulovic, M. (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, 32(1), 46-52.
- Guizani, N., Al-Attabi, Z., Kasapis, S., et Mahgoub Gaafar, O. (2006). Ripening profile of semi-hard standard goat cheese made from pasteurized milk. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 523-532
- Hashim, M., Dong, M., Iqbal, M., Li, W., et Chen, X. (2011). Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet. *Dairy science & technology*, 91(4), 431-440. doi: 10.1007/s13594-011-0021-x
- Jacob, M., Jaros, D., et Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.
- Johnson, M. E., et Lucey, J. A. (2006). Major technological advances and trends in cheese. *Journal of dairy science*, 89(4), 1174-1178.
- Khan, R. S., et Masud, T. (2013). Comparison of buffalo cottage cheese made from aqueous extract of *Withania coagulans* with commercial calf rennet. *International Journal of Dairy Technology*, 66(3), 396-401.
- Kilcawley, K. N., Nongonierma, A. B., Hannon, J. A., Doolan, I. A., et Wilkinson, M. G. (2012). Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 26(1), 50-57.
- Kumari M, Sharma A, Jagannadham MV (2012) Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chem* 131:1295–1303
- Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcão, V. M., et Malcata, F. X. (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and microbial technology*, 28(7), 642-652.
- Llorente, B. E., Obregón, W. D., Avilés, F. X., Caffini, N. O., et 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.
- Low, Y. H., Agboola, S., Zhao, J., et Lim, M. Y. (2006). Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*, 16(4), 335-343.

- Mahajan, R. T., et Chaudhari, G. M. (2014). Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. *International Journal*, 2(5), 1173-1181.
- Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramirez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., et Vallejo-Cordoba, B. (2013a). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141(3), 1902-1907.
- Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., Ramírez-Suarez, J. C., de Jesús Torres-Llanez, M., González-Córdova, A. F., et Vallejo-Córdova, B. (2013b). Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 325-330.
- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- Nawaz, M. A., Masud, T., et Sammi, S. (2011). Quality evaluation of mozzarella cheese made from buffalo milk by using paneer booti (*Withania coagulans*) and calf rennet. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 218-226.
- Néstor, G. M., Dely Rubí, C. G., et Héctor, J. C. (2012). Exploring the Milk-Clotting Properties of a Plant Coagulant from the Berries of *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles. *Journal of food science*, 77(1), C89-C94.
- O'Mahony, J. A., Sousa, M. J., et Mcsweeney, P. L. (2003). Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, 56(1), 52-58.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., et Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1), 88-113.
- Piero, A. R. L., Puglisi, I., et Petrone, G. (2011). Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233(3), 517-524.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L., et Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food research international*, 42(3), 324-330.
- Pontual, E. V., Carvalho, B. E., Bezerra, R. S., Coelho, L. C., Napoleão, T. H., et Paiva, P. M. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, 135(3), 1848-1854.
- Prados, F., Pino, A., et Fernández-Salguero, J. (2007). Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. *International journal of food science & technology*, 42(5), 556-561.
- Psoni, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006). Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food control*, 17(7), 533-539.
- Puglisi, I., Petrone, G., et Piero, A. R. L. (2014). A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 67-72.

- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., et Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76-85.
- Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M., Gómez, R., et Fernández-Salguero, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, 78(3), 281-289.
- Sawant, R., et Nagendran, S. (2014). Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 3, 568-579.
- Shah, M. A., Mir, S. A., et Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy science & technology*, 94(1), 5-16.
- Solorza-Feria, J., Méndez-Montealvo, G., González-Soto, R., Osorio-Díaz, P., et Jiménez-Pérez, A. (2011). Changes in the apparent viscosity profiles of casein suspensions as affected by plant enzymes. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 414-420.
- Sousa, M. J., et Malcata, F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82(2), 151-170.
- Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J., Martínez-Cacha, A., et Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18(2), 139-146.
- Temizkan, R., Yasar, K., et Hayaloglu, A. A. (2014). Changes during ripening in chemical composition, proteolysis, volatile composition and texture in Kashar cheese made using raw bovine, ovine or caprine milk. *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (12), 2643-2649.
- Tripathi, P., Tomar, R., et Jagannadham, M. V. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125(3), 1005-1012.
- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., et Fernández-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 451-456.
- Yegin, S., et Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy science & technology*, 93(6), 565-594.
- Zeller, B. (2005). Le fromage de chèvre: spécificités technologiques et économiques (Thèse de Doctorat), Université Paul-Sabatier, Toulouse, 78 p



**Annexes**

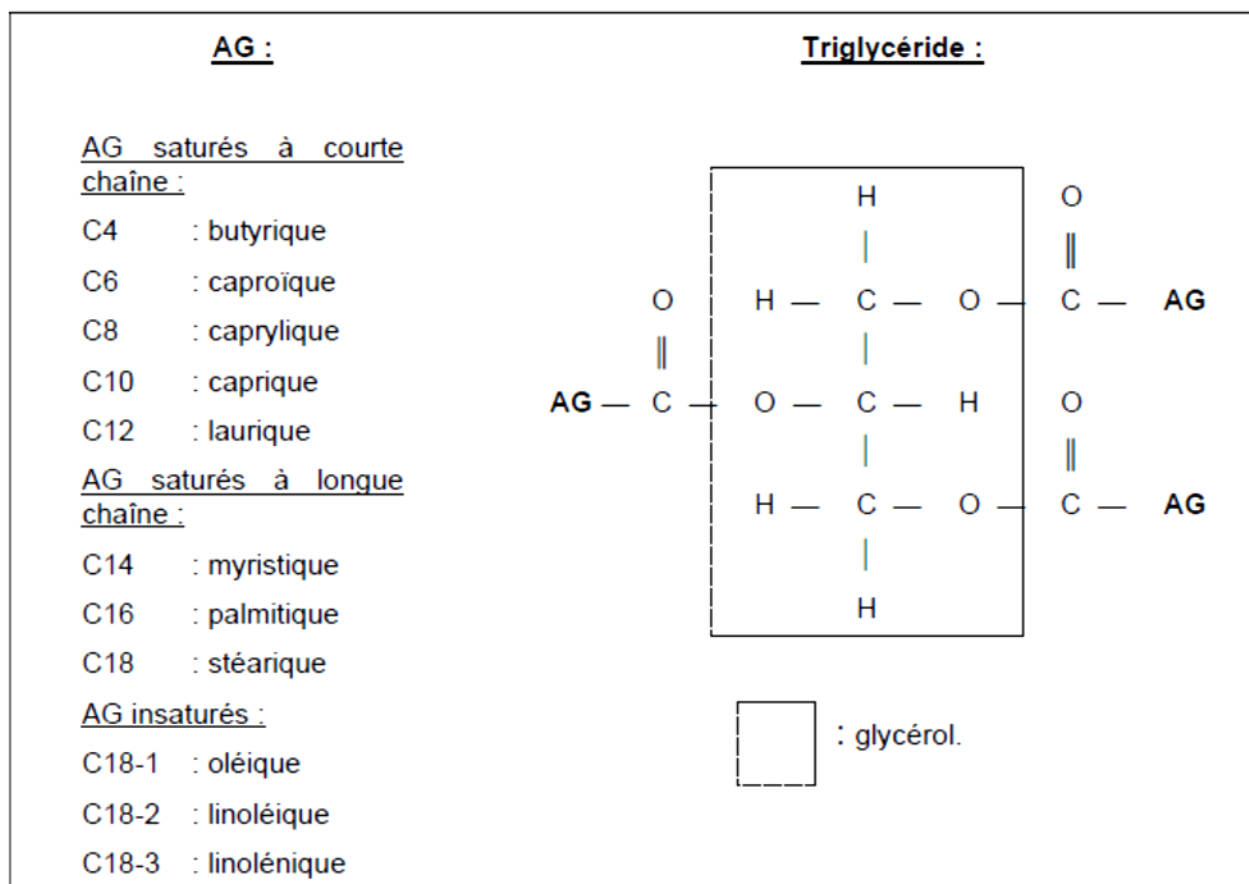
Annexe 1: Fraction protéique (g/100 g de protéine) du lait de chèvre et de vache

Adapté de Ceballos et al. (2009).

	Lait de chèvre	Lait de vache
Caséine (Cn)	82.70	82.65
$\alpha_{S1}$ -Cn	18.92	30.80
$\alpha_{S2}$ -Cn	8.52	7.50
$\beta + \kappa$ -Cn	55.26	44.35
Protéines du petit-lait	17.30	17.35

## Annexe 2: Acides gras (AG) composant les triglycérides du lait de chèvre

Adapté de Zeller (2005).



Annexe 3 : Composition en acide gras (g/100 g d'acide gras total) du lait de chèvre et du lait de vache. Adapté de Ceballos et al. (2009).

	Lait de chèvre	Lait de vache
C4 :0	1.27	3.84
C6 :0	3.28	2.28
C8 :0	3.68	1.69
C10 :0	11.07	3.36
C11 :0	0.14	0.21
C12 :0	4.45	3.83
C14 :0	9.92	11.24
C14 :1	0.14	0.49
C15 :0	0.54	1.03
C15:1	0.06	0.08
C16 :0	25.64	32.24
C16 :1	0.99	1.53
C16:2 n-4	0.03	0.02
C17 :0	0.35	0.18
C17:1	0.08	0.08
C18 :0	9.92	11.06
C18 :1 n-9, <i>trans</i>	0.37	1.63
C18 :1 n-9, <i>cis</i>	23.80	21.72
C18 : 2 n-6	2.72	2.41
CLA n-7, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.36	0.40
CLA n-6, <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.07	0.05

CLA n-7, cis-9, cis-11	0.02	-
CLA n-5, cis-11, trans-13	0.24	-
CLA total	0.68	0.45
C18 :3 n-3	0.53	0.25
C20 :0	0.05	0.11
C20 :1 n-9	0.03	0.03
C20 :2 n-6	0.11	0.04
C20 :3 n-6	-	0.02
C21 :0	0.03	0.01
C22 :0	0.08	0.12
C23 :0	0.01	0.03
C24 :0	0.01	0.02
C24 :1 n-9	0.02	-
C16-14	32.42	23.10