

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

**Par : KHELOUFI Maroua &
MEDDAH Mira**

Thème :

**Contribution a l'étude de l'aptitude coagulant de certaines plantes
utilisées traditionnellement dans la coagulation du lait dans la
région de Ghardaïa**

Soutenu publiquement, le **03/10/2020**, devant le jury composé de :

Mme DAFRI A.	MCB à Univ. Ghardaïa	Présidente
M^{lle} DJEMOUAI N.	MAA à Univ. Ghardaïa	Promotrice
M^{lle} TELLI A.	MCB à Univ. Kasdi Merbah Ourgla	Co-promotrice
Mr MAHAMED I A. E.	MAA à Univ. Ghardaïa	Examineur

Année universitaire : 2019-2020

Dédicaces

A mes parents :

Abd l'Hafid et Fatiha

Qui ont beaucoup donné et contribué de sorte à m'inculquer la meilleure éducation qui soit. Merci pour vos sacrifices, dévouement et surtout de m'avoir fait autant de confiance.

Que Dieu vous bénisse, vous protège et vous garde le plus longtemps avec nous.

A mes sœurs :

Faiza et Sabah

Sincères affections. Que Dieu vous accorde sa grâce et vous guide dans le droit chemin.

A mes frères :

Fouad, Sifou et Nabil

Pour l'amour qui nous unit. Ce travail est également le fruit de vos soutiens. Ce sera gravé en moi éternellement.

Aux petits enfants de ma famille :

Menna, Adem, Tasnim, Abd El'Rouf, Iyad et Abd El 'Rahman

L'innocence qui a accompagné ma carrière universitaire de leur prière sincère.

Que Dieu vous garde, vous protège et que votre chemin soit plein succès. A tous mes amies et amis et plus particulièrement celles et ceux que j'ai connus de notre promotion de 2015. Sans oublier mes très chères amies : M^{lle}. NAILI Imane pour tout l'aide et le soutien qu'elle m'apporté et M^{lle}. BOUKHLIFA Lyna Koufailya qui ma setenus des mon 1^{er} pas à l'université. Que Dieu vous bénisse et de rester toujours à mes côtés.

À ma binôme MEDDAH Mira.

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

KHELOUFI MAROUA



Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut.....

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,

Le respect, la reconnaissance...

Ainsi, c'est tout simplement que

Je dédie ce mémoire :

À la source de la tendresse, ma mère pour sa gentillesse sa douceur, pour son affection, son amour ses sacrifices et ses encouragements.

À mon très cher père, pour sa confiance, ses encouragements et son soutien dans toute ma carrière d'étude dès le premier pas jusqu'à ce jour-là et qui m'a appris que la patience est le Secret du succès.

À mes sœurs : Amina et sa fille Melak, Khadîdja, Ahlam et mon frère Abdelhakim que Dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.

À toute ma famille et A ma grand-mère, mon grand-père, et mes tantes

À mes amis ; Sara, Farida, Hafsa, Hamida, Ahlam, iman et Bouchra.

À ma binôme KHELOUFI Maroua

À toutes qui me connaît.

MEDDAH MIRA 

Remerciements

Avant tout, Nous remercions Allah, le tout puissant de nous donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à Melle DJEMOUAI Nadjette, Maître Assistant B, au Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, elle était comme une *sœur* qui a mis toute sa compétence à notre disposition, Elle été à notre disposition depuis le début de mémoire, et au cours de chaque étape de ce mémoire, elle était *d'un grand* soutien pour nous, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à *l'élaboration de ce travail*, Merci.

Nos sincères remerciements vont également à Dr. TELLI Alia Maître de Conférences B, au Département de Biologie, Faculté des Sciences, *de la Nature et de la Vie* à l'Université de Kasdi Merbah, Ouargla, pour avoir *accepté d'encadrer* ce mémoire. Son aide et sa disponibilité ont été des atouts précieux.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Mme DAFRI Ahlem, Maître de conférences B, du Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, pour avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.

Aussi, nous exprimons nos sincères remerciements à M. MAHAMED I Alla Eddine, Maître assistant classe « A », du Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, pour avoir *accepté d'examiner* ce travail.

Un grand merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, particulièrement nous collègues de la promotion de Master Biochimie appliquée (2020).

Résumé

Le fromage *Kemariya* occupe une place socio-économique très importante établie dans l'environnement rural et périurbain. Il est coagulé par de la présure végétale ou animale, considéré comme l'un des fromages traditionnels les plus populaires de la région de Ghardaïa. Ce travail consiste à documenter les plantes utilisées traditionnellement dans la coagulation du lait dans la région de Ghardaïa (Algérie), en particulier les deux plantes : *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*. Cette étude consiste aussi à extraire et à identifier quelques métabolites primaires et secondaires des extraits obtenus dans les parties récoltées des deux plantes étudiées à partir des deux régions ; Dahayet Bendhahoua et Zelfana (Ghardaïa). En plus, les extraits sont évalués pour leurs stabilités et les conditions optimales de la coagulation du lait sont étudiées. Enfin une analyse physico-chimique et de la qualité hygiénique des laits de vache et de chèvre crus utilisés dans la préparation de *Kemariya* et la *Kemariya* préparée ont été étudiées. Une enquête ethnobotanique auprès de la population locale de Ghardaïa a montré que les fleurs de *C. cardunculus* et les graines de *F. glutinosa* ce sont les deux parties plus utilisées dans la coagulation du lait dans la région de Ghardaïa. Les analyses quantitatives des polyphénols totaux et protéines révèlent la présence de quantités moyennement importante. L'étude de stabilité des extraits montre que la nécessité de trouver un moyen de conservation meilleur que la conservation par réfrigération à +4°C. L'étude de la détermination des conditions optimales de la coagulation du lait pour la recherche du pH optimal, montre que l'extrait des fleurs de *C. cardunculus* est plus actif à pH 5,5. Pour la recherche de la température et la concentration en CaCl₂ optimale, les meilleurs résultats sont obtenus à 40°C et à 0,03M pour tous les extraits préparés des deux plantes testées. Les analyses physico-chimiques montrent que le lait de vache et de chèvre sont caractérisé par un pH normal et stable. La teneur en matière sèche du lait de vache (14%) est élevée que celle du lait de chèvre (12,5%), le taux en cendres du lait de chèvre est légèrement élevé (0,59%) en comparaison avec celui de lait de vache (0,4%), la densité du lait bovin est plus élevée que le lait caprin (1030 et 1027, respectivement), et le lait de vache à la valeur la plus élevée de l'acidité titrable (24 °D) en comparaison avec le lait de chèvre (17 °D). La *Kemariya* est caractérisée par un pH légèrement acide alors que, sa qualité microbiologique était généralement acceptable et conforme aux normes fixées par l'état algérien avec une absence totale des staphylocoques à coagulase +, cependant, une contamination par des *E. coli* a été enregistrée, mais avec une faible charge. Pour les analyses microbiologiques du lait cru, le lait de vache comporte un nombre très élevé de germes aérobies et des coliformes thermotolérants qui ont dépassé largement les normes J.O.R.A N°39. A l'opposé, le lait de chèvre a été conforme aux normes avec une absence totale de staphylocoques à coagulase (+) dans tous les échantillons de laits analysés (bovin et caprin).

Mots clés : *Kemariya*, Ghardaïa, *Cynara cardunculus*, *Fagonia glutinosa*, enquête ethnobotanique, analyses physico-chimiques, qualité hygiénique.

يحتل جبن الكمارية مكاناً اجتماعياً واقتصادياً مهماً للغاية في بيئة الريفية وشبه حضرية وهو يحضر بواسطة مخثر نباتي او الحيواني، ويعتبر من اشهر الاجبان التقليدية في منطقة غرداية. يسعى هذا العمل إلى توثيق النباتات المستخدمة تقليدياً في تخثر الحليب في منطقة غرداية (الجزائر) ، ولا سيما نبتتان: *Cynara cardunculus* و *Fagonia glutinosa*. تضمنت هذه الدراسة أيضا استخلاص وتحديد بعض المستقلبات الأولية والثانوية من المستخلصات التي تم الحصول عليها من الأجزاء المقطوفة من النبتتين المدروستين من المنطقتي: ضاية بن ضحوة وزلفانة (غرداية). بالإضافة إلى ذلك ، يتم تقييم ثبات المستخلصات ودراسة الظروف المثلى لتخثر الحليب. أخيراً ، تمت دراسة التحليل الفيزيائي والكيميائي والصحي لحليب البقر والماعز الخام المستخدم في تحضير كمارية و الكمارية المحضرة.

كما ظهرت الدراسة اثنوباتية لسكان المحليين في غرداية أن أزهار *C. cardunculus* و بذور *F. glutinosa* هما الجزءان الأكثر استخداماً في تخثر الحليب في منطقة غرداية. تكشف التحليلات الكمية للبوليفينول والبروتينات عن وجود كميات بشكل معتدل. أظهرت كذلك دراسة الثبات للمستخلصات أن الحاجة إلى إيجاد طريقة أفضل للحفظ من التبريد عند (+4) درجة مئوية. كما أظهرت دراسة تحديد الظروف المثلى لتخثر الحليب للبحث عن درجة الحموضة المثلى ، أن مستخلص أزهار *C. cardunculus* يكون أكثر نشاطاً عند درجة الحموضة (5.5). للبحث عن درجة الحرارة المثلى وتركيز $CaCl_2$ ، يتم الحصول على أفضل النتائج عند $40^{\circ}C$ وعند 0.03M لجميع المستخلصات المحضرة من النبتتين المختبرتين. أظهر التحليلات الفيزيائية والكيميائية أن حليب البقر والماعز يتميز بدرجة حموضة طبيعية ومستقرة. محتوى المادة الجافة في حليب الأبقار (14٪) أعلى من محتوى حليب الماعز (12.5٪) ، محتوى الرماد في حليب الماعز مرتفع قليلاً (0.59٪) مقارنة بمحتوى حليب البقر (0.4٪) ، كثافة حليب البقر أعلى من حليب الماعز (1030 و 1027 على التوالي) ، وحليب البقر له أعلى قيمة للحموضة القابلة للمعايرة ($24^{\circ}D$) مقارنة بحليب الماعز ($17^{\circ}D$). تتميز كمارية بدرجة حموضة طفيفة في حين أن جودتها الميكروبيولوجية كانت مقبولة بشكل عام وتتوافق مع المعايير التي وضعتها الدولة الجزائرية حيث لوحظ غياب تام للمكورات العنقودية ، لكن مع وجود تلوث بسيط بالاشريكية القولونية. بالنسبة للتحليلات الميكروبيولوجية للحليب الخام ، يحتوي حليب البقر على عدد كبير جداً من الجراثيم الهوائية والقولونيات المقاومة للحرارة والتي تجاوزت إلى حد كبير معايير J.O.R.A N ° 39. في المقابل، فإن حليب الماعز يتوافق مع المعايير مع غياب تام للمكورات العنقودية في جميع عينات الحليب التي تم تحليلها (الأبقار والماعز)

الكلمات المفتاحية: الكمارية ، غرداية ، *Cynara cardunculus* ، *Fagonia glutinosa*، دراسة اثنوباتية ، التحليل الفيزيائي الكيميائي، جودة ميكروبيولوجية.

Abstract

Kemariya cheese occupies a very important socio-economic place established in the rural and peri-urban environment. It is coagulated with vegetable or animal rennet, considered as one of the most popular traditional cheeses from the Ghardaïa region. This work consists of documenting the plants traditionally used in the coagulation of milk in the region of Ghardaïa (Algeria), in particular the two plants: *Cynara cardunculus* and *Fagonia glutinosa*. This study also consists of extracting and identifying some primary and secondary metabolites from the extracts obtained in the parts harvested from the two plants studied from the two regions; Dahayet Bendhahoua and Zelfana (Ghardaïa). In addition, the extracts are evaluated for their stability and the optimum conditions for milk coagulation are studied. Finally, a physico-chemical and hygienic analysis of the raw cow's and goat's milk used in the preparation of *Kemariya* and the prepared *Kemariya* were studied. An ethnobotanical survey among the local population of Ghardaïa showed that the flowers of *C. cardunculus* and the seeds of *F. glutinosa* are the two parts most used in the coagulation of milk in the region of Ghardaïa. The quantitative analyzes of the total polyphenols and proteins revealed the presence of moderately large quantities. The stability study of the extracts shows that the need to find a better way of preservation than refrigeration at +4°C. The study of the determination of the optimal conditions for coagulation of milk to search for the optimal pH, shows that the extract of the flowers of *C. cardunculus* is more active at pH 5,5. For the search for the optimum temperature and CaCl₂ concentration, the best results are obtained at 40 °C and at 0,03M for all the extracts prepared from the two plants tested. Physico-chemical analyses show that cow's and goat's milk are characterized by a normal and stable pH. The dry matter content of cow's milk (14%) is high than that of goat's milk (12,5%), the ash content of goat's milk is slightly high (0,59%) in comparison with that of cow's milk (0,4%), the density of bovine milk is higher than goat's milk (1030 and 1027, respectively), and cow's milk has the highest value of titratable acidity (24°D) in comparison with goat's milk (17 °D). *Kemariya* is characterized by a slightly acidic pH whereas, its microbiological quality was generally acceptable and complies with the standards set by the Algerian state with a total absence of *coagulase* (+) *staphylococci*, however, contamination by *E. coli* was recorded, but with a small load. For microbiological analysis of raw milk, cow's milk contained a very high number of aerobic germs and thermotolerant coliforms which have largely exceeded the J.O.R.A.N °39 standards. In contrast, goat's milk was in line with the standards with a total absence of *coagulase* (+) *staphylococci* in all the analyzed milk samples (bovine and goat).

Key word: *Kemariya*, Ghardaïa, *Cynara cardunculus*, *Fagonia glutinosa*, ethnobotanical survey, physico-chemical analysis, microbiological quality.

Liste des figures

Figure 1. Différents modèles structuraux des micelles. A. Modèle coeur- enveloppe B. Modèle à submicelles, C. Modèle à double liaison, D. Modèle à structure ouverte	6
Figure 2. Phases de la coagulation enzymatique du lait	11
Figure 3. Diagramme de la transformation du lait en fromage	13
Figure 4. Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine	17
Figure 5. Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine	17
Figure 6. Mécanisme réactionnel des protéases acides	18
Figure 7. Mécanisme réactionnel des métalloprotéases	18
Figure 8. Diagramme de fabrication de la Kemariya	22
Figure 9. Carte de l'Algérie montrant la zone étudiée (wilaya de Ghardaïa) .Dahayet Bendhahoua en rouge, Zelfana en bleu, El Guerrara en jaune, El Atteuf en violet, Sebseb en vert, Berriane en noir, Ghardaïa (centre-ville) en orange et Metlili en rose	25
Figure 10. Photographies d'une population de <i>Cynara cardunculus</i> (a) un plant de <i>Cynara cardunculus</i> (b), fleur fraîche (c) et fleur sèche (d)	27
Figure 11. Photographies de <i>Fagonia glutinosa</i> dans son milieu naturel (a), sa fleur (b) et ses grains (c)	28
Figure 12. Schéma des protocoles de la décoction et de la macération de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i>	29
Figure 13. Répartition de la population questionnée selon leur connaissance en plantes traditionnellement utilisées dans la coagulation du lait	39
Figure 14. Fromage préféré par la population questionnée	40
Figure 15. Répartition de la population selon le sexe	40
Figure 16. Utilisation des plantes dans la coagulation du lait selon le sexe	41
Figure 17. Répartition de la population questionnée selon l'âge	42
Figure 18. Répartition de la population utilisant les plantes dans la coagulation du lait selon l'âge	42
Figure 19. Fréquence de citation des plantes utilisées dans la coagulation du lait dans la région de Ghardaïa	43
Figure 20. Périodes de récolte de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i>	44
Figure 21. Parties utilisées de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i> dans la coagulation du lait	44
Figure 22. Utilisation de <i>Cynara cardunculus</i> (a) et <i>Fagonia glutinosa</i> (b) dans la coagulation du lait selon l'état de la partie utilisée	45
Figure 23. Utilisation de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i> dans la coagulation du lait selon la dose	46
Figure 24. Types du lait utilisés dans la fabrication de Kemariya	46
Figure 25. Durée de conservation du Kemariya préparée	47
Figure 26. Rendement d'extraction de différents extraits aqueux des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	48
Figure 27. pH des différents extraits aqueux des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	49
Figure 28. Conductivité des différents extraits aqueux des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	50

Figure 29. Teneur en protéines des différents extraits aqueux des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	52
Figure 30. Teneur en polyphénols totaux des différents extraits aqueux des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	53
Figure 31. Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la macération des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i>	54
Figure 32. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la macération des Fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	55
Figure 33. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la décoction des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	55
Figure 34. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la macération des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i>	56
Figure 35. Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de la macération des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i> .	56
Figure 36. Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de la décoction des Fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	57
Figure 37. Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de la macération des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i>	57
Figure 38. Stabilité de la décoction des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i> .	58
Figure 39. Stabilité de la macération des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i> .	58
Figure 40. Stabilité de la macération des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> .	58
Figure 41. pH du lait de vache et du lait de chèvre	60
Figure 42. Valeurs du pH du Kemariya	60
Figure 43. Teneur en matière sèche du lait bovin et du lait caprin	61
Figure 44. Valeurs de matière sèche du Kemariya	62
Figure 45. Teneur en cendres totales du lait bovin et du lait caprin	63
Figure 46. Taux de cendres du Kemariya	63
Figure 47. Valeurs de la densité du lait de vache et de chèvre	64
Figure 48. Résultats de l'acidité titrable du lait de vache et de chèvre	64
Figure 49. Valeurs de l'acidité titrable du Kemariya	65
Figure 50. Test présomptif dans le bouillon LST à simple et à double concentration.	67
Figure 51. Test de conformation de la présence d' <i>E. coli</i> montrant la présence de l'indole traduit par l'anneau rouge	67

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition moyenne en g.L ⁻¹ du lait de différentes espèces animales	3
Tableau 2. Teneurs en éléments minéraux en g.kg ⁻¹ de lait de vache	4
Tableau 3. Teneur en différentes protéines du lait de vache	5
Tableau 4. Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.	12
Tableau 5. Différents types de fromages traditionnels en Algérie	14
Tableau 6. Caractéristiques de quelques enzymes à activité coagulante isolées à partir de plantes	21
Tableau 7. Quelques sources d'extraits de plantes utilisés comme coagulant en fromagerie	23
Tableau 8. Classification de <i>Cynara cardunculus</i>	26
Tableau 9. Systématique de <i>Fagonia glutinosa</i>	28
Tableau 10. Calendrier de la récolte des différentes espèces	28
Tableau 11. Différentes réactions de criblage photochimique	30
Tableau 12. Résultats du criblage phytochimique des différents extraits de fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	51
Tableau 13. Résultats des analyses microbiologiques du lait de vache et de chèvre (UFC/ml)	66
Tableau 14. Tableau récapitulatif montrant les résultats du dénombrement par la méthode du NPP pour 3 tubes, obtenus à la recherche d' <i>E. coli</i>	68

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré celsius

Ph : Potentiel Hydrogènes

°D : Degré dornic

L : Litre

ml: Millitre

Mg: milligramm

µg : Microgramme

Ms : Millisiemens

Min:Minutes

S : Seconde

EAG : Equivalent d'acide gallique

ANOVA : Analyse de la variance

J.O.R.A : Journal Officiel de la République Algérienne

UFC : Unité forment de colonies

m : Nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante

M : Nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable

E : Echerichia

CaCl₂: Chlorure de calcium

Table de matières

<i>Dedicace</i>	<i>I</i>
<i>Resume</i>	<i>II</i>
<i>Abstract</i>	<i>III</i>
<i>ملخص</i>	<i>IV</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>V</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>VI</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>VII</i>
<i>Sommaire</i>	<i>VIII</i>
Introduction	01
Partie bibliographique	
Chapitre I. Aperçu général sur le lait, sa transformation en fromage et les enzymes coagulantes	03
1. Lait cru	03
1.1. Définition	03
1.2. Composition	03
1.3. Caractéristiques du lait cru	03
1.3.1. Lait de chèvre	03
1.3.2. Lait de vache	03
1.3.2.1. Lactose	04
1.3.2.2. Minéraux	04
1.3.2.3. Matière grasse	04
1.3.2.4. Matières azotées	04
1.3.2.4.1. Azote non protéique	04
1.3.2.4.2. Caséines bovines	05
1.4. Importance du lait en nutrition	06
1.5. Caractéristiques microbiologiques du lait	07
1.5.1. Contamination initiale	07
1.5.2. Microflore lactique du lait	07
1.5.3. Sources de contamination	07
1.6. Conservation du lait	07
1.6.1. Conservation par le froid	07
1.6.1.1. Réfrigération	08
1.6.1.2. Congélation	08
1.6.2. Conservation par chaleur	08
1.6.2.1. Stérilisation	08
1.6.2.2. Pasteurisation	08
2. Coagulation du lait	09
2.1. Coagulation par l'action des enzymes	09
2.2. Coagulation par acidification	09
2.3. Coagulation mixte	09
3. Facteurs influençant la coagulation du lait	09
3.1. Effet de la température	09
3.2. Effet du pH du lait	09
3.3. Effet de la teneur en ions calcium (CaCl₂)	10
3.4. Effet de la concentration en enzyme	10
4. Enzymes coagulantes le lait	10

4.1. Présure	10
4.1.1. Composants de la présure	10
4.1.1.1. Chymosine	10
4.1.1.2. Pepsine	10
4.1.2. Mode d'action de la présure	11
4.1.3. Obtention de la présure commerciale	11
4.1.4. Limites d'utilisation de la présure	12
4.1.5. Etat de la recherche sur les succédanés de présure	12
5. Transformation du lait	13
5.1. Fromage	13
5.2. Fromages traditionnels connus en Algérie	14
5.3. <i>Kemariya</i> un fromage traditionnel dans la région de Ghardaïa	14
5.3.1. Définition de <i>Kemariya</i>	14
5.3.2. Caractéristiques de <i>Kemariya</i>	14
5.3.3. Place de <i>Kemaria</i> dans la filière du lait	15
5.3.4. Consommation du <i>Kemariya</i>	15
Chapitre II. Perspectives de la coagulation végétale	16
1. Historique	16
2. Coagulants végétaux	16
2.1. Protéases végétales à sérine	16
2.2. Protéases végétales à cystéine	16
2.3. Protéases végétales acides	17
2.4. Métalloprotéases végétales	17
3. Protéases d'origine végétale	18
3.1. Papaine	19
3.2. Ficine	19
3.3. Bromélaïne	19
3.4. Cucumisine	19
3.5. Cardosines	19
3.6. Cynarases	19
4. Applications des protéases végétales	20
4.1. Dans l'industrie laitière	20
5. Caractéristiques des protéases d'origine végétale	20
6. Méthodes d'extraction des protéases	20
7. Exemples des présures végétales utilisées en industrie laitière	22
7.1. Espèces végétales utilisées traditionnellement dans la fabrication du fromage (<i>kemariya</i>) dans la région de Ghardaïa	22
7.2. Méthode de fabrication de <i>Kemariya</i>	22
7.2.1. Présure animale	22
7.2.2. Présure végétale	22
Matériel et méthodes	24
2.1. Présentation de la zone d'étude	24
2.2. Enquête ethnobotanique	24
3. Matériel biologique	24
3.1. Lait de chèvre et de vache	24
3.2. Poudre de lait écrémé type « Low Heat »	25
3.3. Présure commerciale	25
3.4. Caillettes de chèvre	25

4. Matériel végétal	26
4.1. Choix des plantes	26
4.2. Origine, systématique, description botanique et utilisation de <i>Cynara cardunculus</i>	26
4.3. Origine, systématique, description botanique et utilisation de <i>Fagonia glutinosa</i>	27
4.4. Récolte du matériel végétal	28
4.5. Echantillonnage	28
5. Appareillage	29
6. Méthodes de travail	29
6.1. Préparations des extraits	29
6.2. Détermination du rendement d'extraction	29
6.3. Détermination du pH des extraits	30
6.4. Détermination de la conductivité des extraits	29
6.5. Criblage phytochimique des extraits	30
6.6. Quantification des métabolites	31
6.6.1. Dosage des protéines	31
6.6.2. Dosage des polyphénols totaux	32
6.6.3. Dosage des tanins condensés ou proanthocyanidines	32
6.7. Coagulation du lait de chèvre et lait de vache par les différents types d'extraits	32
6.7.1. Recherche du pH optimal	32
6.7.2. Recherche de la température optimale	32
6.7.3. Recherche de la concentration optimale en CaCl ₂	33
6.7.4. Optimisation du temps de floculation	33
6.8. Etude de stabilité des différents extraits	33
6.9. Essai de fabrication de fromage <i>Kemariya</i> par les différents extraits des plantes	33
6.10. Analyse sensorielle	33
6.11. Analyses physico-chimiques du lait de vache/chèvre cru et de fromage	34
6.11.1. Evaluation des principales caractéristiques	34
6.11.1.1. Mesure de Ph	34
6.11.1.2. Matière sèche totale	34
6.11.1.3. Teneurs en cendres	34
6.11.1.4. Densité du lait cru	34
6.11.1.5. Mesure de l'acidité titrable	35
6.11.1.5.1. Pour lait cru	35
6.11.1.5.2. Pour le fromage	35
6.11.1.5.3. Expression des résultats	35
6.11.1.6. Teneur en matière grasse	35
6.11.1.6.1. Pour le lait cru	35
6.11.1.6.2. Pour le fromage	36
6.12. Analyses de la qualité hygiénique pour le lait cru et le fromage	37
6.12.1. Recherche des germes aérobies dans le lait cru	37
6.12.2. Recherche de staphylocoques à coagulase + pour le lait cru et le fromage	37
6.12.3. Recherche de coliformes thermotolérants dans le lait cru	37
6.12.4. Recherche d' <i>Escherichia coli</i> dans le fromage	37

6.12.4.1. Préparation de la solution mère.....	38
6.12.4.2. Ensemencement et incubation.....	38
6.13. Analyses statistiques.....	38
Résultats et discussion	39
3.1. Etude ethnobotanique.....	39
3.1.1. Connaissance des plantes utilisées traditionnellement pour la coagulation du lait.....	39
3.1.2. Type de fromage préféré.....	39
3.1.3. Répartition de la population questionnée selon le sexe.....	40
3.1.4. Utilisation des plantes pour la coagulation du lait et la fabrication de <i>Kemariya</i> selon le sexe.....	41
3.1.5. Répartition des informateurs selon l'âge.....	41
3.1.6. Utilisation des plantes pour coaguler le lait selon l'âge.....	42
3.1.7. Plantes utilisées traditionnellement pour la fabrication de <i>Kemariya</i>	43
3.1.8. Utilisation de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i> dans la coagulation du lait selon la période de récolte.....	43
3.1.9. Utilisation de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i> dans la coagulation du lait selon la partie utilisée.....	44
3.1.10. Utilisation de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i> dans la coagulation du lait selon l'état de la partie utilisée.....	45
3.1.11. Utilisation de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i> dans la coagulation du lait selon la dose.....	45
3.1.12. Mode de préparation de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i>	46
3.1.13. Type de lait utilisé pour la fabrication de <i>Kemariya</i> par <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i>	46
3.1.14. Durée de conservation de <i>Kemariya</i>	47
3.1.15. Toxicité de <i>Cynara cardunculus</i> et <i>Fagonia glutinosa</i>	47
3.2. Etude phytochimique.....	48
3.2.1. Rendement d'extraction.....	48
3.2.2. Conductivité et pH.....	49
3.2.3. Criblage phytochimique.....	50
3.2.4. Quantification de certains métabolites.....	52
3.2.4.1. Métabolites primaires (teneur en protéines).....	52
3.2.4.2. Métabolites secondaires (teneur en polyphénols totaux).....	53
3.3. Coagulation du lait.....	54
3.3.1. Détermination des conditions optimales de la coagulation du lait.....	54
3.3.1.1 Recherche du pH optimal.....	54
3.3.1.2. Recherche de la température optimale.....	55
3.3.1.3. Recherche de la concentration optimale en CaCl ₂	56
3.4. Stabilité des extraits des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> et des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	58
3.5. Analyses physico-chimiques des laits de vache et lait de chèvre crus et du <i>Kemariya</i>	59
3.5.1. pH du lait cru.....	59
3.5.2. pH du <i>Kemariya</i>	60
3.5.3. Taux de matière sèche du lait cru.....	61
3.5.4. Taux de matière sèche de <i>Kemariya</i>	61
3.5.5. Teneur en cendres totales du lait cru.....	62

3.5.6. Teneur en cendres totales de <i>Kemariya</i>	63
3.5.7. Densité du lait cru	64
3.5.8. Acidité titrable du lait cru	64
3.5.9. Acidité titrable de <i>Kemariya</i>	65
3.6. Analyses de la qualité hygiénique pour le lait cru et <i>Kemariya</i>	65
3.6.1. Analyses microbiologiques du lait cru	66
3.6.2. Analyses microbiologiques du <i>Kemariya</i>	66
3.6.2.1. Recherche et dénombrement d'<i>Escherichia coli</i>	66
3.6.2.2. Recherche de Staphylocoques à coagulase +	68
Conclusion et perspectives	69
Références bibliographiques	71
Annexes

INTRODUCTION

En Algérie, comme dans les pays de l'Afrique du nord et du monde entier, le lait occupe une place prépondérante et fondamentale dans la ration alimentaire. Le lait est un aliment noble caractérisé par sa composition équilibrée en différents nutriments de base (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines (A₁, B₁, B₂ et B₁₂) et en éléments minéraux (calcium, phosphore et magnésium). De ce fait, il est considéré comme un élément essentiel pour tous les groupes de consommateurs et particulièrement les enfants, les femmes enceintes et les personnes âgées (Souza et al., 2011).

Dans les villages les plus reculés et qui pratiquent l'élevage, les éleveurs produisent du lait en abondance pendant les périodes de haute lactation. Le manque de moyens de conservation, ils se trouvent parfois obligés de jeter l'excès de lait. Étant donné que celui-ci est une denrée rapidement périssable, l'essentiel de la production doit être transformé. La méthode de conservation la plus simple est de le transformer en fromage. Ce dernier à travers sa richesse en protéines de bonne qualité, en calcium et en vitamines, constitue un aliment de haute qualité nutritionnelle (Abakar, 2012).

Parmi les produits laitiers couramment consommés en Algérie, on trouve le fromage. Au moins dix types de fromages traditionnels de différentes régions du pays sont actuellement recensés avec les plus connus sont « *Djben* » et « *Klila* » (Hamama, 2017). En plus, on trouve *Kemariya* un fromage traditionnel très populaire dans les régions de Sud algérien, notamment dans la wilaya de Ghardaïa (Choubaila et al., 2019).

La première étape de la transformation du lait en fromage nécessite traditionnellement et industriellement l'emploi d'un agent coagulant, appelé présure. Elle est extraite à partir de la caillette de veau non sevré. D'après Alais (1984), il faut en moyenne deux caillettes de veau pour produire 1 litre de présure, et selon Bauer et al. (2010), il faut environ 2 litres de présure pour produire une tonne de fromage, autrement dit : « il faut sacrifier 4 jeunes veaux pour produire une tonne de fromage ».

La quantité de présure animale et particulièrement celle de veau disponible est devenue insuffisante du fait de l'augmentation de la production mondiale de fromage, ainsi le besoin de coagulants de remplacement s'est fait sentir dès le début des années 1960 (Talentikite-Kellil, 2015). Ces problèmes sont aggravés, dans les pays musulmans pour des raisons religieuses, dues aux rituelles de l'abattage et l'interdiction de certains agents coagulants tel que la pepsine porcine. Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches sont entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement. De nombreux substituts d'origine variable (animale, végétale ou microbienne) ont été proposés (Talentikite-Kellil, 2015).

La coagulation du lait peut venir de pratiques que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux (Froc, 2001). Il existe, dans divers pays, des plantes susceptibles de fournir des enzymes ayant la propriété de coaguler le lait. De nombreux travaux ont signalé l'emploi d'enzymes végétales et certains extraits coagulants à partir de plantes tropicales (Génin, 1968).

Le développement d'une production fromagère nationale basée sur des enzymes coagulantes extraites à partir des sources locales, constitue le début du chemin de l'indépendance par la réduction des coûts d'importation.

Dans ce contexte, notre étude s'intéresse à rechercher les plantes (présure végétale) locales utilisées traditionnellement dans la région de Ghardaïa par l'obtention d'extraits végétales à effet coagulant pour la fabrication du fromage *Kemariya*. Pour cela, nous avons réalisé cette étude qui comporte trois parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique qui résume les informations liées à l'étude du lait, du fromage et de la coagulation du lait. Dans la deuxième partie, nous avons adopté une démarche expérimentale qui porte sur:

- Réaliser une enquête ethnobotanique sur les plantes utilisées pour la fabrication de *Kemariya* dans la région de Ghardaïa et choisir et sélectionner les deux espèces les plus utilisées ;
- Extraire les principes actifs dans les mêmes conditions que les préparations traditionnelles (décoction et macération) ;
- Quantifier certains métabolites primaire et secondaire ;
- Rechercher les facteurs influençant la coagulation du lait ;
 - Analyser Les qualités physico-chimique et hygiénique (microbiologique) du lait et de *Kemariya* ;
- Analyser la qualité organoleptique (sensorielle) de *Kemariya*.

La troisième partie est consacrée aux résultats, à leur discussion et enfin une conclusion.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Partie bibliographique

Chapitre I. Aperçu général sur le lait, sa transformation en fromage et les enzymes coagulantes

1. Lait cru

1.1. Définition

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (Amiot et al., 2002).

1.2. Composition

De très nombreux facteurs peuvent intervenir sur la composition du lait dont l'espèce, la race, le stade de lactation, la saison, l'état sanitaire et l'alimentation de l'animal (Mahaut et al., 2000). Le Tableau 1 présente la composition moyenne du lait de quelques espèces animales.

Tableau 1. Composition moyenne en g.L⁻¹ du lait de différentes espèces animales (Fox et McSweeney, 1998 ; Vignola, 2002).

Type de lait	Protéines totales (mg/100g)	Caséines (mg/100g)	Lactose (mg/100g)	Matières grasses (mg/100g)	Minéraux totaux (mg/100g)	Calcium (mg/100g)
Vache	32	28	40-60	39	9	122
Chèvre	28	23	44-47	33,8	5-8	134
Brebis	55	45	47	71,9	9	193

1.3. Caractéristiques du lait cru

1.3.1. Lait de chèvre

Le lait de chèvre a une composition et des caractères physicochimiques particuliers qui les différencient nettement du lait de vache (Lenoir et al., 1997). Le lait de chèvre est caractérisé par des proportions relatives de caséines différentes de celles du lait de vache (Richardson et al., 1974 ; Boulanger, 1976) et des teneurs en Ca⁺² assez élevées (Remeuf et al., 1989). Le lait de chèvre se distingue en transformation fromagère par un temps de floculation relativement court, une vitesse de raffermissement du gel élevée et une fermeté maximale du gel faible (Steinsholt, 1973; Blattner et Gallmann, 1980).

1.3.2. Lait de vache

Le lait de vache est un milieu multiphasique : une phase aqueuse continue contenant essentiellement le lactose et des minéraux et des éléments dispersés de nature lipidique (globules gras) et de nature protéique (micelles de caséines et protéines solubles) (Abi Azar, 2007).

1.3.2.1. Lactose

Le lactose est le constituant majeur de la matière sèche du lait de vache (Veisseyre, 1975), il joue un rôle important, lie notamment à sa fermentescibilité qui intervient lors de l'élaboration de divers produits laitiers (Mahaut et al., 2000).

1.3.2.2. Minéraux

Le lait de vache apporte de nombreux minéraux. Les plus importants sont représentés dans le Tableau 2 (Mahaut et al., 2000).

Tableau 2. Teneurs en éléments minéraux en g.kg^{-1} de lait de vache (Mahaut et al., 2000).

Minéraux	Concentration (g.kg^{-1})
Calcium	1,25
Potassium	1,5
Chlore	1,2
Phosphore	0,95
Sodium	0,5
Magnésium	0,13

Les minéraux sont pour une partie à l'état dissous et pour une autre à l'état colloïdal associé aux caséines au sein des micelles. La fraction saline colloïdale représente 65% du calcium, 50% du phosphore inorganique, 60% du magnésium et 8% du citrate. Entre formes solubles et colloïdales, il existe un équilibre qui dépend de plusieurs facteurs comme la température et le pH (Scott, 1981). Le lait de vache apporte également des oligoéléments à l'état de traces: zinc ($3,5 \text{ mg.L}^{-1}$), iode ($20 \text{ à } 100 \mu\text{g.L}^{-1}$) et cuivre ($20 \text{ à } 50 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Mahaut et al., 2000).

1.3.2.3. Matière grasse

La matière grasse du lait de vache est principalement sous forme globulaire à l'état d'émulsion (Mahaut et al., 2000). Le diamètre des gouttelettes varie de $0,1 \text{ à } 22 \mu\text{m}$ (Scott, 1981). L'enveloppe globulaire possède, à $\text{pH}=6,7$ une charge électrique négative à l'origine de la répulsion des globules (Mathieu, 1998). Les triglycérides (esters d'acides gras et de glycérol) représentent plus de 97% des lipides à côté d'une faible part de diglycérides, de phospholipides et de substances insaponifiables (Abi Azar, 2007).

1.3.2.4. Matières azotées

Le lait de vache contient environ $5,3 \text{ g}$ d'azote par kg dont 95% sous forme de protéines, soit approximativement $32 - 34 \text{ g.kg}^{-1}$ (Tableau 3) (Abi Azar, 2007).

1.3.2.4.1. Azote non protéique

L'Azote Non Protéique (ANP) correspond à toutes les molécules renfermant de l'azote, autres que les protéines (Ribadeau-Dumas, 1981). Selon Alais (1984), ce sont des substances de bas poids moléculaire. Elles ne précipitent pas dans les conditions de précipitation des protéines du lait: acidification, élévation de température ou addition de présure. Elles sont peu abondantes $1,5 \text{ à } 16 \text{ g.L}^{-1}$ dans le lait de vache (Veisseyre, 1975). L'urée constitue la majeure partie de l'ANP: $33 \text{ à } 79\%$ (Ribadeau-Dumas, 1981).

Tableau 3. Teneur en différentes protéines du lait de vache (Walstra et Jenness, 1984).

	Concentration (g. kg ⁻¹)	Pourcentage des protéines totales (%)
Protéines totales	33,0	100,0
Caséines totales	26,0	79,5
Protéines solubles	6,3	19,3
Protéines de la membrane du globule gras	0,4	1,2
Caséine α_1	10,0	30,6
Caséine α_2	2,6	8,0
Caséine β	9,3	28,4
Caséine γ	0,8	2,4
Caséine κ	3,3	10,1
α -lactalbumine	1,2	3,7
β -lactoglobuline	3,2	10,1
Sérum albumine bovine (BSA)	0,4	1,2
Immunoglobulines	0,7	2,1
Divers (incluant les protéoses peptones)	0,8	2,4

1.3.2.4.2. Caséines bovines

Les caséines représentent 79,5% des protéines totales du lait et se composent de quatre protéines majeures, les caséines α_1 , α_2 , β , et κ . Il existe plusieurs variantes génétiques pour les caséines et leur fréquence est plus ou moins importante selon les espèces (Grosclaude, 1988). Grosclaude (1988) a montré que la présence de ses variantes n'est pas sans incidence sur les aptitudes fromagères du lait.

La détermination de la taille des micelles a fait l'objet de nombreuses études. La méthode la plus employée a été la microscopie électronique (Schmidt, 1980). Elle permet d'observer une distribution très large de la taille des micelles dont le diamètre varie de 20 à 600 nm. Selon Schmidt (1980), la micelle serait formée de sous-unités « submicelles » d'un diamètre de 15 à 30 nm.

La structure et les propriétés de la micelle de caséine ont été largement étudiées en raison de son rôle déterminant dans les propriétés physico-chimiques du lait et des produits laitiers. De nombreux modèles ont été proposés au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur les caractéristiques physico-chimiques des micelles de caséine. On distingue quatre-principaux modèles (Figure 1):

- Le modèle cœur enveloppe (Fig. 1A) ;
- Le modèle à double liaison (Fig. 1B) ;
- Le modèle à sous-unités ou modèle à submicelles (Fig. 1C) ;
- Le modèle à structure ouverte (Fig. 1D).

L'augmentation de la teneur en caséines κ s'accompagne de la baisse de la taille des micelles et suggère une localisation de cette caséine à la surface des micelles (Dalglish et al., 1989 ; Lovisi et al., 2003). Cette caséine serait un facteur limitant de la croissance des micelles, les micelles les plus petites étant les plus riches en caséines κ (Schmidt, 1982 ; Lovisi et al., 2003).

Selon Dalglish et al. (1989), la répartition des caséines s'effectuerait de la façon suivante : la surface des micelles serait composée de 39 à 47% de caséines κ , de 0 à 10 % de

caséines β et de 47 % de caséines α et l'intérieur serait constitué majoritairement des caséines α et β avec des proportions d'environ 47% chacune et seulement de 1% de caséines κ . Les minéraux contenus dans les micelles de caséines sont qualifiés de colloïdaux. Ils sont constitués de calcium, de phosphore, de magnésium. Le phosphore est présent sous forme de phosphate dont une partie est liée aux caséines par estérification des fonctions hydroxyles des résidus d'acides aminés sérine et thréonine (Walstra et Jenness, 1984).

L'agrégation entre les submicelles est favorisée par la présence de sites phosphoséryles qui ont une affinité pour le calcium (Schmidt, 1980). Le calcium soluble est en équilibre avec celui de la micelle et cet équilibre dépend de divers facteurs parmi lesquels la température, le pH, la force ionique, les teneurs en phosphate et citrate solubles (Mahaut et al., 2000).

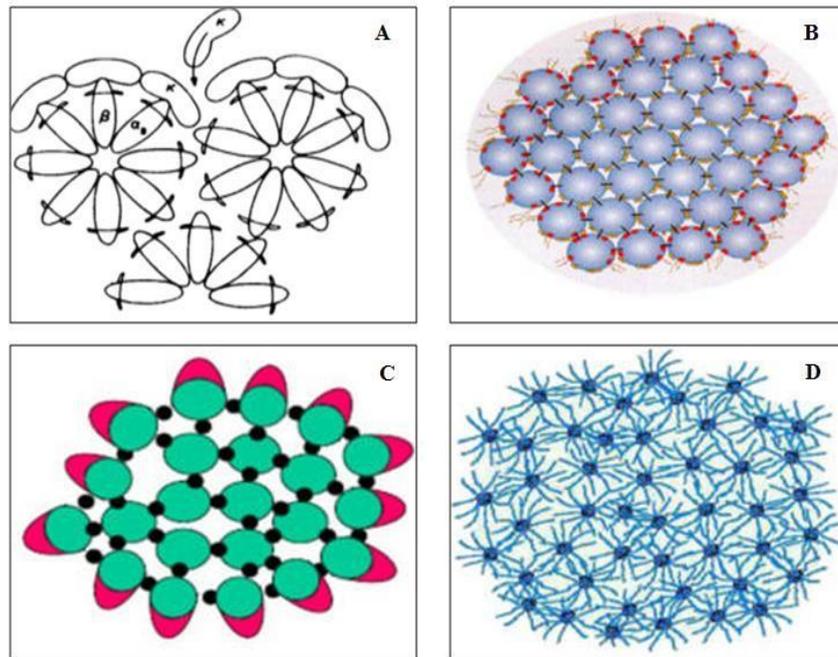


Figure 1. Différents modèles structuraux des micelles. A. Modèle cœur-enveloppe (Waugh et al., 1970), B. Modèle à submicelles (Schmidt, 1982), C. Modèle à double liaison (Horne et al., 2002), D. Modèle à structure ouverte (Holt, 1992).

L'élévation de la température et du pH ainsi que l'augmentation des teneurs en calcium ionique accroissent les taux de calcium et de phosphate dans la micelle et par suite ses dimensions, alors que l'effet inverse est obtenu par l'abaissement de la température, l'acidification ou l'addition de chlorure de sodium, de citrate ou d'un autre agent chélatant (Mahaut et al., 2000). La stabilité des micelles peut s'expliquer par des répulsions électrostatiques qui s'opposent à leur agrégation, par la forte proportion d'eau des micelles (3,7 g par gramme de protéine) dont une partie est immobilisée à la surface ainsi que par la répulsion stérique due au chevelu des micelles (Mahaut et al., 2000).

1.4. Importance du lait en nutrition

Le lait est un aliment de forte densité nutritionnelle, en regard de son contenu en énergie métabolisable il présente une forte concentration en nutriments. Il contient des protéines riches en résidus d'acides aminés essentiels et des minéraux d'intérêt nutritionnel (calcium et phosphore) sous forme organique et minérale facilement assimilable par l'organisme, mais il présente une carence en fer et acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) (Mana et Drif, 2017).

1.5. Caractéristiques microbiologiques du lait

Le lait contient peu de microorganismes (moins de 10^3 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain. Il s'agit essentiellement des microcoques mais aussi des streptocoques lactiques (*Lactococcus* et *Lactobacillus*) qui sont des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées "lacténines" mais leur action est de très courte durée (1 h environ) (Guiraud, 1998). D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade. Ils sont généralement dangereux au point de vue sanitaire (Guiraud, 1998).

1.5.1. Contamination initiale

Les microorganismes interviennent par leur nombre. En effet lorsque le nombre de germe est élevé, la phase de latence est courte et l'espèce prédominante s'impose par la loi du plus grand nombre (Akollor, 1997).

1.5.2. Microflore lactique du lait

La microflore lactique fait partie de la flore normale du lait et se caractérise par son aptitude à fermenter le lactose avec production d'acide lactique et donc, abaissement du pH. Les ferments lactiques laitiers constituent un groupe diversifié de bactéries qui ont néanmoins un certain nombre de caractéristiques communes : elles sont à Gram positif, catalase négative, anaérobies facultatives ou micro-aérophiles et hétérotrophes (Alais, 1984 ; Claude et Champagne, 1998). Parmi les bactéries lactiques ayant comme habitat le lait, nous avons les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Aerococcus* (Luquet et Corrieu, 2005).

1.5.3. Sources de contamination

Le lait est généralement contaminé par une grande variété de microorganismes d'origines diverse. Cette contamination peut provenir de l'animal (intérieur ou extérieur de la mamelle), de l'environnement (sol, atmosphère, eau...) du matériel servant à la collecte du lait (machines à traire, filtre, récipients divers) et aussi de l'homme (Guiraud, 1998).

Certains microorganismes constituent un danger pour le consommateur du lait cru ou de produits fabriqués avec du lait cru. D'autres sont seulement des agents d'altération de ces produits ; ils dégradent les composants du lait en donnant des produits de métabolisme indésirables (Richard, 1990).

1.6. Conservation du lait

1.6.1. Conservation par le froid

Un lait réfrigéré à basse température présente quelques caractéristiques qui le distinguent du lait frais :

- Accroissement de la stabilité du lait par ralentissement des réactions biochimiques ;
- Modification de la nature des espèces microbiennes qui se développent (sélection des psychotropes et psychrophiles aux dépens de la flore mésophile) ce qui peut entraîner l'apparition d'altérations particulières aux basses températures. L'action bactéricide du froid est discrète ou nulle (Belhalili et al., 2014).

On distingue fondamentalement deux techniques :

1.6.1.1. Réfrigération

Selon Rozier (1982), c'est un procédé de conservation à court terme faisant appel à des températures situées au-dessus du point cryoscopique de la phase aqueuse de denrées alimentaires généralement voisines de 0 °C.

1.6.1.2. Congélation

La congélation est une technique de conservation des aliments qui maintient la température à la cour de la denrée jusqu' à -18 °C. Ce procédé provoque la cristallisation en glace de l'eau contenue dans les aliments. On assiste alors à une diminution importante de l'eau disponible, soit à une baisse de l'activité de l'eau (A_w), ce qui ralentit ou stoppe l'activité microbienne et enzymatique (Darinmoub, 2009). Selon le même auteur, la congélation permet donc la conservation des aliments à plus long terme que la réfrigération (Darinmoub, 2009).

1.6.2. Conservation par chaleur

La stabilisation des aliments par la chaleur est un moyen largement répandu dans le secteur alimentaire et répond à plusieurs objectifs :

- Elle vise à détruire partiellement ou totalement les flores d'altération (*Micrococcus*, *Bacillus*, flore lactique, etc.) et les flores pathogènes (*Salmonella* et *Staphylococcus*) pour améliorer la qualité hygiénique des produits ;
- Elle permet d'inactiver certaines enzymes (lipoxygénase et polyphénoloxydas) des produits au cours de leurs stockages.

On distingue fondamentalement deux catégories de traitement : la pasteurisation et la stérilisation (Jeantet et al., 2006).

1.6.2.1. Stérilisation

Le lait subit un traitement thermique de type stérilisation dont l'objectif est de détruire tous les micro-organismes. C'est un lait de moyenne bonne qualité organoleptique et nutritionnelle que le lait pasteurisé. Leur durée de conservation est limitée par l'évolution physicochimique plus ou moins lente du produit susceptible d'altérer sa stabilité (Jeantet et al., 2006).

1.6.2.2. Pasteurisation

C'est un traitement thermique modéré et suffisant permettant la destruction des microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. Il permet d'une part, d'assurer la salubrité du produit et d'autre part, d'améliorer sa conservation. La conception des lignes de traitement du lait pasteurisé du commerce varie beaucoup d'un pays à l'autre, et même d'une laiterie à l'autre, en fonction de la législation et de la réglementation locale. La rapidité de ce traitement (quelques secondes) permet de conserver la qualité organoleptique et nutritionnelle du lait (Belhalili, 2014).

2. Coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape importante dans la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé (Farkye, 2004). Elle correspond à une déstabilisation des micelles de caséine qui flocculent puis se soudent pour former un gel emprisonnant des éléments solubles du lait. Elle peut être provoquée par l'action d'une enzyme, par acidification, ou par l'action combinée des deux (St-Gelais et al., 2002).

2.1. Coagulation par l'action des enzymes

La coagulation du lait consiste à transformer le lait à l'état de gel par action d'enzymes protéolytique d'origine animale (présure et pepsine) végétales (bromélie et ficine) ou microbiennes (enzymes de certaines moisissures ou bactéries) (FAO, 1995 ; Mahaut, 2003). La coagulation du lait par voie enzymatique comprend trois étapes :

- Phase primaire ou enzymatique ;
- Phase secondaire ou d'agrégation des micelles déstabilisées ;
- Phase tertiaire ou phase de réticulation (Jeantet, 2007).

2.2. Coagulation par acidification

L'abaissement de pH du lait a pour effet de neutraliser progressivement les charges électro-négatives des caséines. Cette dernière provoque une réduction du potentiel de surface ayant pour conséquence la diminution du pouvoir, séquestrant des caséines et l'augmentation de la solubilité des sels calciques dans l'eau. Les micelles, ainsi dépourvues de leurs éléments stabilisation (phosphate de calcium), se désagrègent en leurs sous-unités : les submicelles (Brule et Lenoir, 1990).

2.3. Coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée selon le phénomène d'acidification qui consiste à précipiter les caséines isoélectriques ($pH_i = 4,6$) par acidification à l'aide de ferments lactique qui transforment le lactose en acide lactique et l'addition de l'enzyme coagulante. En pratique cette méthode est utilisée pour la fabrication de fromage frais (petit suisse et demi-sel) et les fromages à pâte molle (camembert et brie) (Mahaut, 2003).

3. Facteurs influençant la coagulation du lait

3.1. Effet de la température

L'agrégation des micelles dépend de la température et n'a pas lieu à des basses températures (Mouranche et Costes, 1984). L'activité enzymatique est influencée par la température. La présure montre une activité maximale entre 30 et 42 °C et est inhibée à des températures supérieures à 55 °C (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

3.2. Effet du pH du lait

Le pH joue un rôle très important sur le temps de coagulation. En passant de pH 6,7 à 5,6, la vitesse de coagulation se multiplie par 30 ce qui résulte de l'élévation de la vitesse d'hydrolyse nécessaire pour l'agrégation. À pH supérieur à 7, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée (Lenoir et al., 2006).

3.3. Effet de la teneur en ions calcium (CaCl₂)

D'après Roupas (2001), l'ajout de CaCl₂ est très important dans la fabrication fromagère impliquant la diminution de temps de coagulation et la fermentation d'un gel est plus élevée (Mahaut et al., 2000). L'ajout de CaCl₂ en technologie fromagère stimule la coagulation, le raffermissement du caillé et permet de réduire les pertes dans le lactosérum, tout en diminuant le pH et réduisant la charge de la micelle (Roupas, 2001).

3.4. Effet de la concentration en enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme utilisée (Mahaut et al., 2005).

4. Enzymes coagulantes le lait

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Dans le monde, l'enzyme protéolytique la plus utilisée pour permettre cette transformation, notamment en fromagerie (en dehors des fromages frais) est la présure (Boudjenah-Haroun, 2012).

4.1. Présure

La présure est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait (Alais, 1984 ; Wigley, 1996). Elle est extraite de caillettes de jeunes veaux non sevrés et a une composition où prédomine la chymosine (80%) mais contenant aussi de la pepsine (20%) (Boudjenah-Haroun, 2012).

4.1.1. Composants de la présure

4.1.1.1. Chymosine

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale (Ramet, 1999). C'est une holoprotéine, de poids moléculaire voisin de 30kDa (Scriban, 1999). Elle est stable entre pH 5 et 6 ; son activité est optimale à pH voisin de 5 ; elle est inactivée à pH 7,5 et est dénaturée à pH 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40 °C. L'inactivation thermique a lieu dès 50 °C et elle est totale à 61 °C (Lenoir et al., 1985 ; Scriban, 1999).

4.1.1.2. Pepsine

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage (Ramet, 1997). Elle est de poids moléculaire 35kDa (Alais, 1984) à l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. D'après Broome et Hickey (1990), 20% de l'activité coagulante est assurée par la pepsine dans la fabrication fromagère (Cheddar et Emmental). La pepsine est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat.

C'est une enzyme thermosensible en solution après 55 °C. Elle est dénaturée à des températures à 70 °C (Graiday, 1978). Ses propriétés enzymatiques la font classer parmi les endopeptidases, qui sont à l'origine de la coagulation du lait (Veisseyre, 1975).

4.1.2. Mode d'action de la présure

La chymosine hydrolyse la liaison Phe105-Met106 de la caséine κ et possède une activité protéolytique générale faible pendant l'affinage du fromage.

La coagulation comporte trois phases :

- L'hydrolyse enzymatique de la caséine κ ;
- L'aggrégation des micelles déstabilisées ;
- La réticulation et la formation du gel.

La phase I ou hydrolyse enzymatique concerne l'hydrolyse de la caséine κ , au niveau de la liaison peptidique phénylalanine(105) et méthionine (106), qui conduit à la formation de paracaséine κ (1-105), et de Caséinomacropéptide CMP (106-169). La libération du CMP se traduit par une réduction du potentiel de surface des micelles et en conséquence, une diminution des répulsions électrostatiques qui à l'état initial contribue à la stabilité du système colloïdal. Cette phase est indépendante des ions de Ca^{2+} et elle se produit à des températures variées (De 0 à 50 °C) (Eck et Gillis, 1997).

La phase II ou dite d'agglomération prend place lorsque 80% environ de la caséine κ sont hydrolysés. La vitesse d'aggrégation s'accroît rapidement avec l'état d'avancement de la réaction enzymatique (Eck et Gillis, 1997).

Dans la phase III ou de protéolyse générale, les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations : des liaisons de nature variée s'établissent entre les micelles (électrostatiques, hydrophobes et salines) pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum et la matière grasse. Dans le gel ainsi formé, la caséine est présente sous une forme fortement minéralisée et ce degré de minéralisation élevé confère au gel présure des caractères différents de ceux du gel lactique. Le gel présure est souple, très cohésif, imperméable et contractile (Figure 2) (Scriban, 1999).

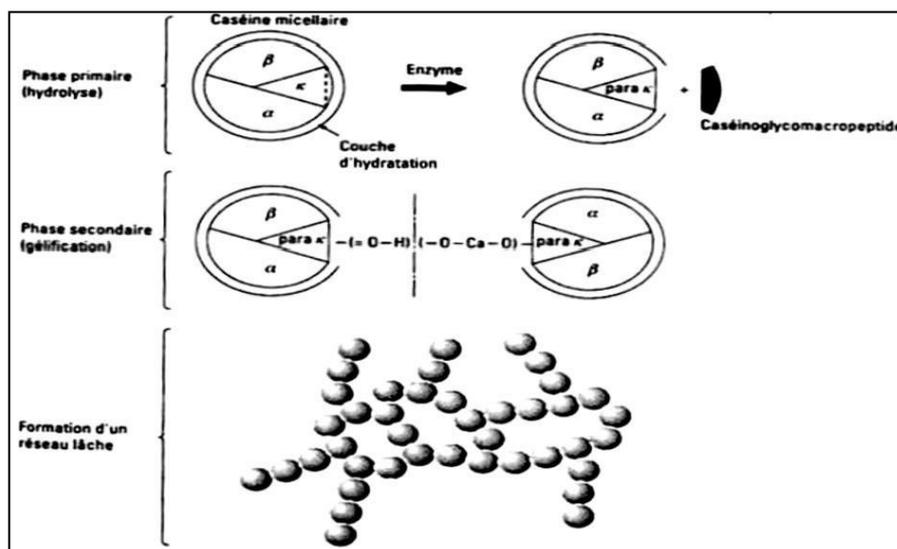


Figure 2. Phases de la coagulation enzymatique du lait (Mietton et al., 1994).

4.1.3. Obtention de la présure commerciale

Industriellement, la présure est extraite par macération de morceaux de caillettes sèches de veaux non sevrés, dans une saumure à 10% NaCl contenant des additifs nécessaires à la préparation (telle que le phosphate disodique), à la conservation (les plus utilisés étant les

antiseptiques et les antifongiques) et à la coloration (caramel). Le jus brut est ensuite purifié par diverses méthodes physico-chimiques. Selon Goursaud (1999), il faut de 1 à 2 caillettes de 60 g pour obtenir 1L d'extrait commercial au 10000e. Ce dernier, après ajustement avec de la saumure, contient alors 10 à 16% de NaCl. Il est de couleur jaune d'or. Le mélange contient les deux enzymes : la chymosine et la pepsine bovine (Goursaud, 1999).

4.1.4. Limites d'utilisation de la présure

L'essor de l'industrie des fromages, demande de plus en plus de présure, les restrictions sur l'abattage des jeunes ruminants et le refus des présures par les pays musulmans, au vu du rituel non Halal de l'abattage, ont causé une pénurie mondiale de présures. A cet effet, la recherche d'autres agents coagulants, s'est accentuée pour aboutir à des produits donnant les mêmes fromages que ceux obtenus à la présure de veaux à un prix de revient inférieur (Benani, 2017).

L'Algérie, dépendante de l'étranger pour ces présures, connaît des essais de travaux, tels que ceux de Transformation et Elaboration des Produits Agroalimentaires (TEPA), sur la pepsine du pro-ventricule du poulet et ceux, sur les agents coagulants d'origine végétale (Adoui, 2007 ; Benyahia Krid et al., 2010).

4.1.5. Etat de la recherche sur les succédanés de présure

Cette situation de pénurie prévaut a été clairement définie et officiellement étudiée par la F.A.O. en avril 1986 sous la forme d'une consultation sur la pénurie mondiale de présure dans la fabrication fromagère. Ce rapport a fait une large place à l'étude de substituts de présure d'origine animale (pepsine), microbienne, fongique et végétale (Tableau 4) (Nouani et al., 2009).

Tableau 4. Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Mietton et al., 1994).

	Origine	Enzymes
Animaux	Ruminants • Veaux • Chevaux • Agneaux • Bovins adultes monogastriques • Porc Oiseaux • Poulets	Chymosine + pepsine Chymosine + pepsine Chymosine + pepsine Chymosine + pepsine Pepsine Pepsine
Végétaux	• Figuier (suc) • Ananas (tige) • Chardon, artichaut • Gaillet	Ficine Broméline Cardosines Cyprosine
Moisissures	• <i>Endothiaparasitica</i> • <i>Mucorpusillus</i> • <i>Mucormiehei</i> • <i>Aspergillus niger</i>	Protéase Protéase Protéase Chymosine "génétique"
Levures	• <i>Kluyvermyceslactis</i>	Chymosine "génétique"
Bactéries	• <i>Escherichia coli</i> • <i>Bacillus subtilis</i>	Chymosine "génétique" Subtiline "génétique"

5. Transformation du lait

Non seulement le lait se consomme à l'état cru, il peut également subir différentes biotransformations qui contribuent à élargir considérablement ses qualités sensorielles et nutritionnelles. L'un des dérivés de ces transformations est le fromage, de l'ancien Français «fromage» (du latin *formaticus*, c'est-à-dire fait dans une forme) (Vignola et al., 2002).

5.1. Fromage

Le fromage, selon la norme (Codex STAN 283-1978), est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséines ne dépasse pas celui du lait. On l'obtient par coagulation complète ou partielle du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation ; ou alors par emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des produits provenant du lait, de façon à obtenir un produit fini ayant des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques correspondant à la définition précédente (Eck et Gillis, 1997).

Les principales étapes dans la fabrication de fromage :

- **Coagulation:** modification physico- chimique entraînant la formation d'un gel sous l'action d'acide lactique et/ou enzymes ;
- **Egouttage:** séparation d'une partie de lactosérum conduit à l'obtention du caillé ;
- **Affinage:** transformation biochimique du caillé sous l'action des enzymes (Figure 3).

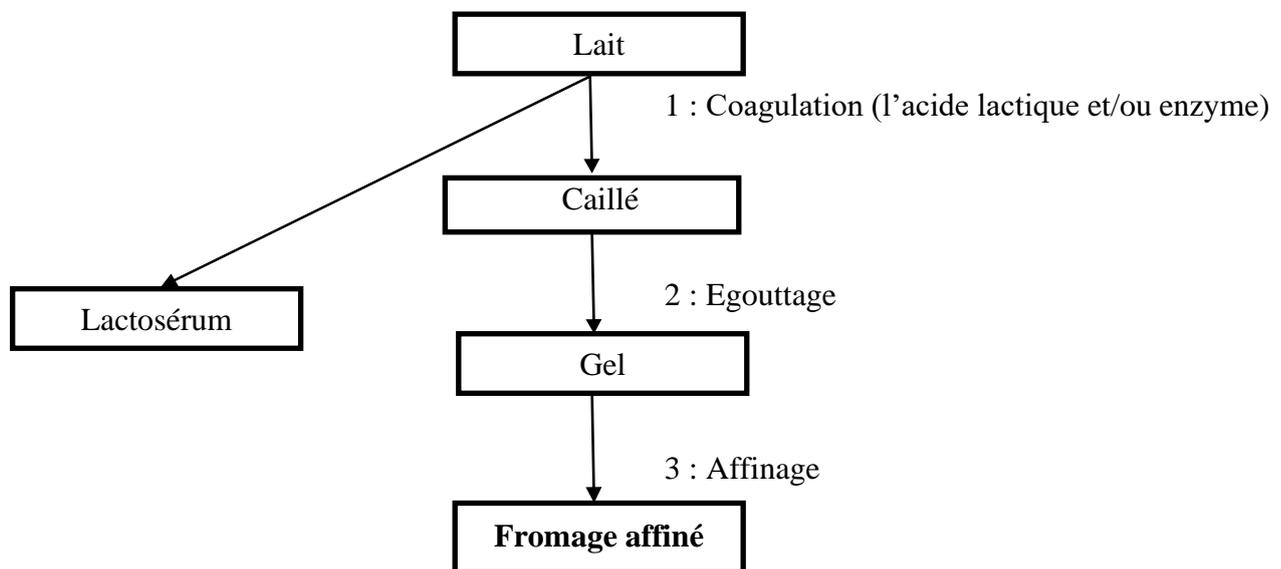


Figure 3. Diagramme de la transformation du lait en fromage (Jeantet et al., 2008).

5.2. Fromages traditionnels connus en Algérie

En Algérie, les fromages ont une longue histoire et sont traditionnellement fabriqués par des processus anciens à partir du lait de vache, de chèvre, de brebis ou de mélanges. Plus de 10 fromages traditionnels sont produits dans tout le territoire algérien. Les fromages les plus célèbres sont montrés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Différents types de fromages traditionnels en Algérie.

Nom	Définition et préparation	Référence
Bouhezza	Ce fromage est répandu dans le territoire de l'Aurès (zone Chaouia). Il est fabriqué à partir de lait de chèvre, de vache ou de brebis baratté et écrémé (Lben).	Touati (1990) ; Hallal (2001)
Jben	Jben est un fromage traditionnel frais obtenu par coagulation enzymatique (présure extrait à partir de la caillette de veau).	Abdelaziz et Ait Kaci (1992)
Klila	Klila est préparée à partir du Lben chauffé sur feu doux pendant 12 minutes environ pour favoriser la séparation du caillé et du lactosérum et accélérer le processus d'égouttage.	Touati (1990)
Aoules	Aoules est fabriqué à partir du lait de chèvre qui est extrêmement aigre. Il peut être consommé en mélange avec les dates.	Abdelaziz et Ait Kaci (1992)
Méchouna	Ce fromage est fabriqué à partir du lait cru qui est chauffé jusqu'à ébullition. Ensuite, on ajoute de lait fermenté « Lben » ou « Rayeb » et du sel. En utilisant une gaze, le mélange est laissé égoutter. Il est consommé frais ou avec la galette.	Lemouchi (2008)
Madghissa	Ce fromage est connu dans la zone du Chaouia coté Est du pays. Il est préparé avec la Klila fraîche après salage et incorporation du lait frais.	Aissaoui (2003)

5.3. *Kemariya* un fromage traditionnel dans la région de Ghardaïa

5.3.1. Définition de *Kemariya*

Kemariya est un type de fromage traditionnel à base de lait de chèvre, la *Kemariya* ou *Takkmerit* (Berbère), est fabriqué par les femmes selon des procédés traditionnels dans les régions du Sud Algérien notamment dans Ghardaïa et Naâma, qui a une place très importante dans la société de la région M'Zab et d'une valeur de consommation très remarquable pour les autochtones de la Wilaya de Ghardaïa (Harrouz et Oulad Hadj, 2007).

5.3.2. Caractéristiques de *Kemariya*

Kemariya est caractérisée par sa couleur blanche et sa bonne saveur (ce dernier est acquis 24 h après sa fabrication). Elle doit être conservée au réfrigérateur pour éviter toute altération. Les altérations de *kemariya* sont principalement l'apparition d'un goût acide après quelques jours de fabrication, amère ou acide et amère en même temps. Le goût acide est dû à la longue conservation (Harrouz et Oulad hadj, 2007).

5.3.3. Place de *Kemaria* dans la filière du lait

Du fait de la forte demande en ce produit, il est de plus en plus produit par des laiteries selon des processus semi-industriel pour être commercialisé aussi bien sur les marchés traditionnels qu'au niveau de certaines grandes surfaces du nord du pays. 80% du lait produit par chaque éleveur est dirigés vers les unités de transformation qui existe dans la région de Ghardaïa. Les éleveurs établissent des contrats avec les unités de transformation, le reste de la quantité est

destiné à l'autoconsommation, et dans des cas exceptionnels (fêtes) l'éleveur garde une quantité pour la transformer en fromage traditionnel (*Kemariya*). Ce dernier est très répandu et demandé par les gens dans cette région. Il existe quelques éleveurs qui préfèrent vendre leurs produits eux-mêmes, soit de manière directe ou bien après sa transformation (Harrouz et Oulad hadj, 2007).

5.3.4. Consommation de *kemariya*

La plupart des consommateurs apprécient la *kemariya* comme fromage frais. Depuis de nombreuses générations cette tradition s'est enrichie au fil des ans, par les progrès de la technologie, et les consommateurs s'attachent de plus en plus à ce produit de terroir qui connaît une forte demande. La *kemariya* est consommée durant toute l'année. Elle est utilisée à des fins festives et souvent servie avec du thé, notamment religieuses comme le Mouloud, le mois de Ramadhan et les mariages (Benderouiche, 2009).

Chapitre II. Perspectives de la coagulation végétale

1. Historique

Dans beaucoup de pays, les extraits de plantes sont utilisés depuis des siècles pour coaguler le lait et fabriquer du fromage. Cette pratique permet de concentrer et conserver les constituants majeurs du lait que sont les protéines, les minéraux et la matière grasse. Les coagulants végétaux constituent une alternative à la présure bovine et présentent l'avantage d'être accessibles et faciles d'utilisation même à l'échelle artisanale (Rayanatou, 2017).

Les premiers travaux qui se sont intéressés à l'activité coagulante des extraits de plante et leur utilisation dans la fabrication des fromages sont ceux de Christen et Virasora (1935). Ils se sont intéressés à l'activité coagulante du chardon (*Cynara cardunculus*) et à l'extraction de l'enzyme à l'origine de cette activité. Dès lors, de nombreuses recherches ont été menées sur l'aptitude à la coagulation du lait d'un grand nombre d'espèces végétales, à l'extraction des enzymes coagulantes responsables de cette activité, et à la caractérisation des produits (fromages) obtenus (Rayanatou, 2017).

2. Coagulants végétaux

Les enzymes coagulantes d'origine végétale sont des protéases (Deymie, 1981). Les enzymes sont classées par la commission des enzymes (C.E.) de l'International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) en six classes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases). Les protéases appartiennent à la sous-classe 4 des hydrolases (code E.C : 3.4.X.X). Les protéases peuvent être classées également selon les acides aminés du site actif, ce qui permet de les regrouper en protéases à sérine (EC 3.4.21.X), les protéases à cystéine (EC 3.4.22.X), protéases à aspartate (EC 3.4.23.X), métalloprotéases (EC 3.4.24.X), etc. Cette dernière classification traduit les mécanismes catalytiques différents de chaque groupe (Benkahoul, 2016)

2.1. Protéases végétales à sérine

Les protéases à sérine ont en commun le mécanisme de coupure, basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine. Les membres de ce groupe présentent un site actif déterminé par trois résidus comprenant en plus de la sérine, une aspartate et une histidine formant ainsi une triade pour que le groupement OH de la sérine soit très fortement polarisé. Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire se forme, puis, le produit d'hydrolyse est libéré (Kraut, 1977) (Figure 4).

2.2. Protéases végétales à cystéine

Les protéases à thiol ou cystéylprotéases sont des protéases dans lesquelles le nucléophile est le soufre de la cystéine (Barrett et Rawlings, 2001). Le premier pas du mécanisme catalytique est la déprotonisation du groupement thiol réalisée par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (souvent une histidine). Le deuxième pas consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupe carbonyle du substrat. Dans cette étape, un fragment du substrat est libéré. L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme déprotonisée et un intermédiaire thioester lie l'extrémité carboxy terminale du substrat à la cystéine. La liaison thioester est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (Storer et Ménard, 1994) (Figure 5).

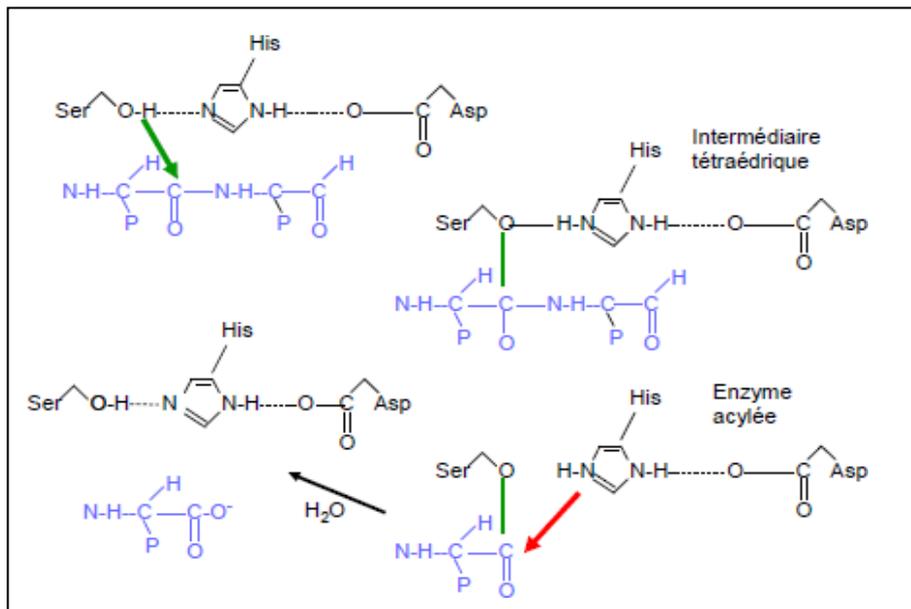


Figure 4. Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine (Kraut, 1977).

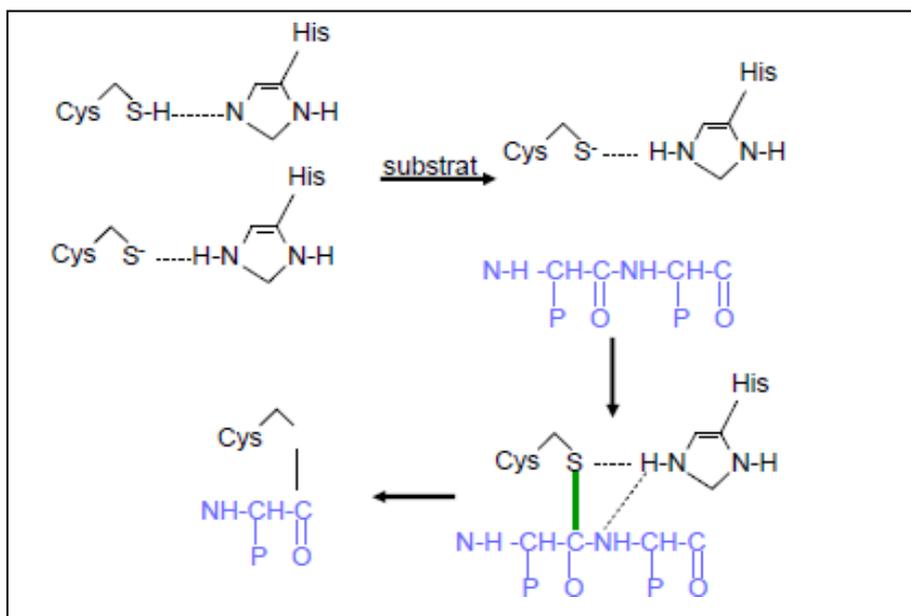


Figure 5. Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine (Storer et Ménard, 1994).

2.3. Protéases végétales acides

Les protéases acides possèdent deux acides aspartiques dans leur site actif. Elles agissent selon un mécanisme général acide-base où un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle (carbone avec double liaison à une molécule d'oxygène) du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (Suguna et al., 1987) (Figure 6).

2.4. Métalloprotéases végétales

Les métalloprotéases (MP) sont le plus grand groupe des protéases. La majorité de ces enzymes contient un ion Zn^{++} dans leur structure qui active une molécule d'eau. L'ion est

maintenu en place par trois acides aminés (histidine, glutamine, asparagine ou lysine) (Rawlings et Barrett, 1995). L'atome de zinc participe à la catalyse en polarisant fortement la liaison carbonyle appartenant à la liaison peptidique coupée. Le carbone du carbonyle devient alors beaucoup plus électrophile, permettant une attaque par l'eau pour donner un intermédiaire instable bi anionique qui se coupe en libérant ainsi un acide aminé terminal ou un peptide. Leur spécificité est assez large, quoique dirigée vers les liaisons voisines d'un acide aminé hydrophobe (Collin et Delecourt, 1988) (Figure 7).

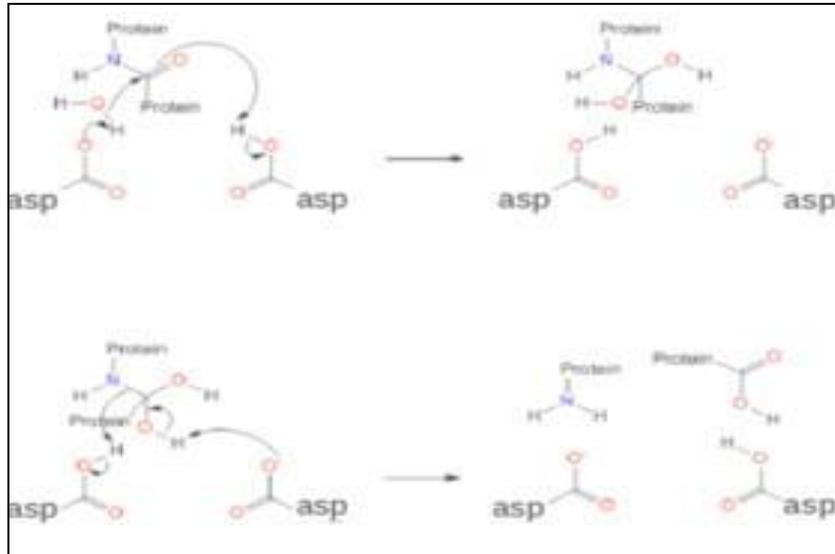


Figure 6. Mécanisme réactionnel des protéases acides (Chabriere, 2010).

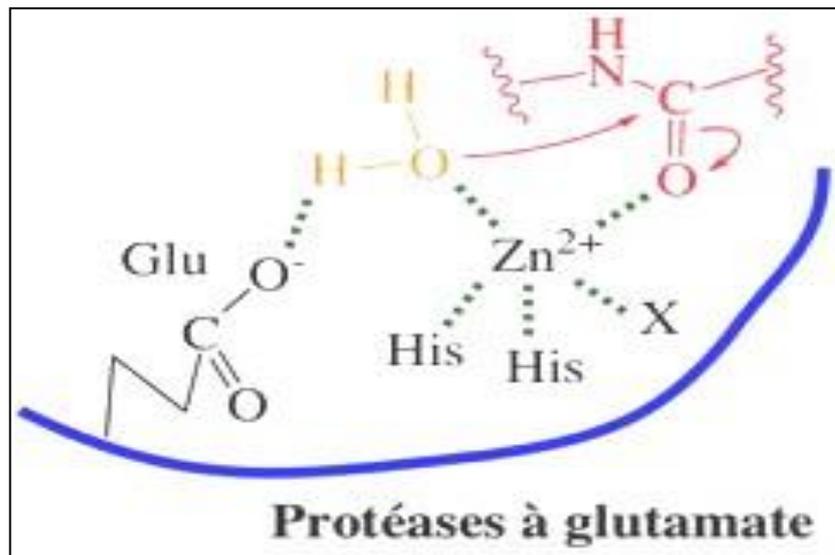


Figure 7. Mécanisme réactionnel des métalloprotéases (Jaspard, 2013).

3. Protéases d'origine végétale

Les protéases végétales les plus connues sont extraites du papayer (*Caricapapaya*), figuier (*Ficus glabrata*), ananas (*Ananas comosus*), sarcocarpe de melon (*Cucumusmelo*). Elles sont appliquées essentiellement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (la papaïne, la ficine, la bromélaïne et cucumisine). D'autres protéases extraites de chardons (*Cynara scolymus*, *Cynara cardunculus* et *Silybum marianum*) permettent la fabrication de fromages traditionnels ; c'est le cas des cardosines et des cynarases (Benkahoul, 2016).

3.1. Papaine

La papaine est une cystéylprotéases (CP) extraite de latex des fruits d'une plante appelée *Carica papaya*. Le papayer est largement cultivé dans les régions équatoriales et tropicales. Cette protéase est souvent utilisée comme modèle dans les études de structure pour d'autres CP. Elle est utilisée dans le domaine médical (Otsuki et al., 2010) ainsi que le domaine alimentaire (Sullivan et Calkins, 2010).

3.2. Ficine

La ficine est une cystéylprotéase extraite de la figue, elle est semblable à la papaine dans la séquence d'acides aminés des résidus du site actif (Devaraj et al., 2008). Cette protéase végétale est isolée à partir du latex séché de *Ficus glabrata*. Elle est également présente dans d'autres espèces de *Ficus*, comme *Ficus carica*. Une figue verte pesant entre 10 et 15 g contient environ 100 à 150 mg de protéases (Uhlig, 1998).

3.3. Bromélaïne

La Bromélaïne fait partie des CP. Elle est découverte dès 1876. La présence de cette enzyme protéolytique dans d'ananas (*Ananas comosus*) confère à ce dernier des qualités diététiques remarquables. Les bromélaïnes sont extraites aussi bien des fruits que des tiges d'ananas, elles ressemblent à la papaine et à la ficine ; elles existent sous plusieurs formes, la fraction majeure se trouve dans les fruits et se nomme "bromélaïne de fruits" (EC.3.4.22.33) de 23KDa. Les autres fractions sont, la " bromélaïne de tige " ou ananas (EC. 3.4.22.32) de 23,8 KDa, l'ananaïne (EC 3.4.22.31) et la comosaïne (Napper et al., 1994).

3.4. Cucumisine

La cucumisine est une sérylprotéase de sarcocarpe de melon (*Cucumis melo*), elle s'accumule dans le jus. Elle a été la première protéase végétale, de type subtilisine à être caractérisée. La séquence d'acides aminés Gly-Thr-Ser-Met autour du résidu serine est identique à celle de la subtilisine, une sérylprotéase (SP) microbienne. Elle possède une activité kératinolétique (Yoshida-Yamamoto et al., 2010).

3.5. Cardosines

Les cardosines sont des protéases à aspartate, elles sont utilisées dans la fabrication du fromage particulièrement dans les pays méditerranéens. La cardosine A, la plus abondante des cardosines, s'accumule dans les vacuoles de stockage de protéine de l'épiderme des papilles stigmatiques et dans les vacuoles des cellules épidermiques dans le stylet (Veríssimo et al., 1996 ; Ramalho-Santos et al., 1997). La cardosine B s'accumule dans la paroi cellulaire et dans la matrice extracellulaire du tissu de transmission (Vieira et al., 2001). Plus récemment, des cardosines nommés E, F, G et H similaires à la cardosine A, ont été isolées, purifiées et caractérisées à partir de pistils de *C. scolymus* (Sarmiento et al., 2009).

3.6. Cynarases

Les cynarases sont également des aspartylprotéases (AP). Elles existent sous trois formes ; 1, 2, et 3 chez *Cynara cardunculus* (Heimgartner et al., 1990) et A, B et C chez *Cynara scolymus* (Llorente et al., 1997). La protéase la plus étudiée est la cynarase A. Elle est utilisée comme agent coagulant du lait (Sidrach et al., 2005).

4. Applications des protéases végétales

Les protéases végétales intéressent de plus en plus les chercheurs et les industriels. La mesure de l'activité hydrolytique sur les substrats synthétiques est un moyen simple de connaître la spécificité de clivage de ces enzymes, ceci fournit des informations importantes pour les applications dans la biotechnologie (Silva et Malcata, 2005). Ils sont utilisées dans différents domaines notamment dans l'industrie laitière, l'industrie alimentaire, le domaine de la santé, la chimie organique, les détergents (Benkahoul, 2016).

4.1. Dans l'industrie laitière

Durant longtemps l'homme a utilisé les extraits végétaux dans la coagulation du lait en remplaçant ainsi la présure animale. Cependant l'utilisation des extraits végétaux dans l'industrie fromagère est limitée à cause de leur grande activité protéolytique (Lo Piero et al., 2002). La fabrication du fromage avec les coagulants de nature végétale est localisée dans les pays du bassin méditerranéen aussi bien dans le nord de l'Afrique que dans les pays situés dans le sud de l'Europe. L'Espagne et le Portugal produisent une grande variété de fromages traditionnels en utilisant des espèces végétales qui donnent une satisfaction du produit final, parmi ces espèces on retrouve : *C. cardunculus*, *C. humilis* et *C. colymus* (Roseiro et al., 2003). Les fromages sont fabriqués à partir de laits de caprins ou d'ovins en utilisant des extraits de fleurs séchés. Le produit issu est doux et crémeux et très apprécié mais parfois légèrement amer quand il est très affiné (Galan et al., 2008). Les Espagnols ont le brevet pour la production d'extraits en poudre séchée de fleurs appartenant au genre *Cynara* (Cáceres Arriba et Fernández, 2000).

Les espèces appartenant au genre *Cynara* contiennent le plus souvent plusieurs formes d'enzymes ce qui complique la purification et la caractérisation des protéases pour la recherche fondamentale. Pour cette raison, plusieurs aspartylprotéases (AP) de *Cynara* sp. ont été clonées et exprimées avec succès dans des systèmes d'expression bactériens et eucaryotes comme cela a été le cas pour la cyprosine B (cynarase 3) exprimée par la levure (Soares et al., 2000) qui fut la première protéase de coagulation d'origine végétale produite par fermentation (Sampaio et al., 2008). L'enzyme recombinante présente une protéolyse similaire à celle obtenue avec des enzymes naturelles présentes dans l'extrait brut à partir de *C. cardunculus* (Fernández-Salguero et al., 2003).

5. Caractéristiques des protéases d'origine végétale

Le Tableau 6 présente quelques caractéristiques des plantes dont les extraits sont utilisés comme coagulants en fromagerie.

6. Méthodes d'extraction des protéases

L'extraction des protéases permet la libération du contenu cellulaire. Une des approches qui a été développée est celle du broyage mécanique, essentiellement dérivé des mortiers et des pilons utilisés en chimie ou en pharmacie. Cependant, cette technique est utilisée pour certaines applications spécifiques où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée. Le broyage par le biais d'un mortier en présence de l'azote liquide est un exemple de techniques simple d'utilisation. Cette méthode d'extraction n'est pas coûteuse et permet de conserver l'activité des enzymes. Etant donné la disponibilité du matériel et des produits utilisés dans le protocole ainsi que sa simplicité et sa fiabilité. Cette technique est utilisée particulièrement pour l'extraction des protéases végétales, c'est le cas des protéases de *C. scolymus*, *C. cardunculus*, *Centaurea calcitrapa* et *Sylibum marianum* (Lorente et al., 2004 ; Silva et Malcata, 2005; Vairo Cavalli et al., 2005 ; Salvador et al., 2006).

Tableau 6. Caractéristiques de quelques enzymes à activité coagulante isolées à partir de plantes.

Plante	Enzyme	Classe	Masses moléculaires (KDa)	pH optimal	Température optimale (°C)	Référence
<i>Cucumis melo</i>	Cucumisine	Protéase à sérine	50	7,1	70	Kaneda et Tominaga (1975)
<i>Streblus asper</i>	Strebline	Protéase à sérine	64	9	65	Tripathi et al. (2011)
<i>Zinziber officinalis</i>	Zingibaine	Protéase à cystéine	36	5,5	60	Hashim et al. (2011)
<i>Euphorbia milii</i>	Miliine	Protéase à sérine	-	9	35	Moro et al. (2013)
<i>Euphorbia nivulia</i>	Nivuliine II	Protéase à cystéine	43	6,3	50	Badgujar et Mahajan (2014)
<i>Opuntia ficus indica</i>	-	Protéase à cystéine	23	5,2	70	Teixeira et al. (2000)
<i>Calotropis procera</i>	Proceraine	Protéase à cystéine	28,8	7-9	55-60	Dubey et Jagannadham (2003)
	Proceraine B	Protéase à cystéine	25,7	6,5-8,5	40-60	Singh et al. (2010)
	Proteinase II	Protéase à cystéine	25	8	50	Aworh et al. (1994)
	Proteinase I	Protéase à cystéine	30	7	50	
<i>Cynara cardunculus</i>	Cardosine A	Protéase acide	31+15	5,1	70	Verissimo et al. (1996)
	Cardosine B	Protéase acide	34+14	5,1	70	
<i>Cynara scolymus</i>	Cardonsine	Protéase acide	30+15	5	37-45	Llorente et al. (2004)
<i>Solanum dubium</i>	Dubiumine	Protéase à sérine	66	11	70	Ahmed et al. (2014)
<i>Carica papaya</i>	Papaine	Protéase à cystéine	23	5-9	50	Monti et al. (2000)
<i>Ficus carica</i>	Ficine	Protéase à cystéine	23	7	-	Devaraj et al. (2008)
<i>Ficus religiosa</i>	Religosine	Protéase à cystéine	43	8-8,5	50	Kumari et al. (2010)
	ReligosineB	Protéase à sérine	63	8-8,5	-	Kumar et al. (2012)
	Reliosine C	Protéase à sérine	80	6-8	45-50	Shah et al. (2012)

7. Exemples des présures végétales utilisées en industrie laitière

Le Tableau 7 présente quelques plantes dont les extraits sont utilisés en industrie laitière.

7.1. Espèces végétales utilisées traditionnellement dans la fabrication du fromage (*kemariya*) dans la région de Ghardaïa

Kemariya ou *Takkemarit* (en Berbère) est un fromage produit dans la région du Sud algérien notamment dans les wilayas de Ghardaïa et Nâama. C'est un fromage traditionnel à base de lait cru de chèvre, de vache et de chamelle (Harrouz et Oulad Hadj, 2007).

7.2. Méthode de fabrication de *kemariya*

Les deux méthodes utilisées pour la fabrication de *kemariya* sont l'ajoute de présure animale et l'ajoute de présure végétale.

7.2.1. Présure animale

Le lait cru de vache est utilisé pour la fabrication industrielle tandis que le lait de chèvre est utilisé pour la fabrication domestique de *kemariya*, avec l'ajout de sel (2 g/l) suivi d'un chauffage modéré à 37 °C. La coagulation se fait par des enzymes issues de caillette de chevreaux, ensuite le coagulum subit un égouttage dans des tissus pendant 30 min à 24h (Benderouich, 2009).

7.2.2. Présure végétale

Kemaria peut être obtenu à partir du lait de chamelle mélangé avec du lait de vache ou de lait de chèvre en utilisant une présure végétale sous forme d'un extrait d'artichaut disponible dans le commerce, à raison de 20 g pour 20 L du lait pendant 30 min jusqu'à sa coagulation. 20 min après, le mélange va subir la séparation de liquide qui reste. La dernière étape consiste à poser le coagulum dans des moules (Benderouich, 2009). Le digramme suivant explicite la méthode traditionnelle de fabrication de la kemaria.

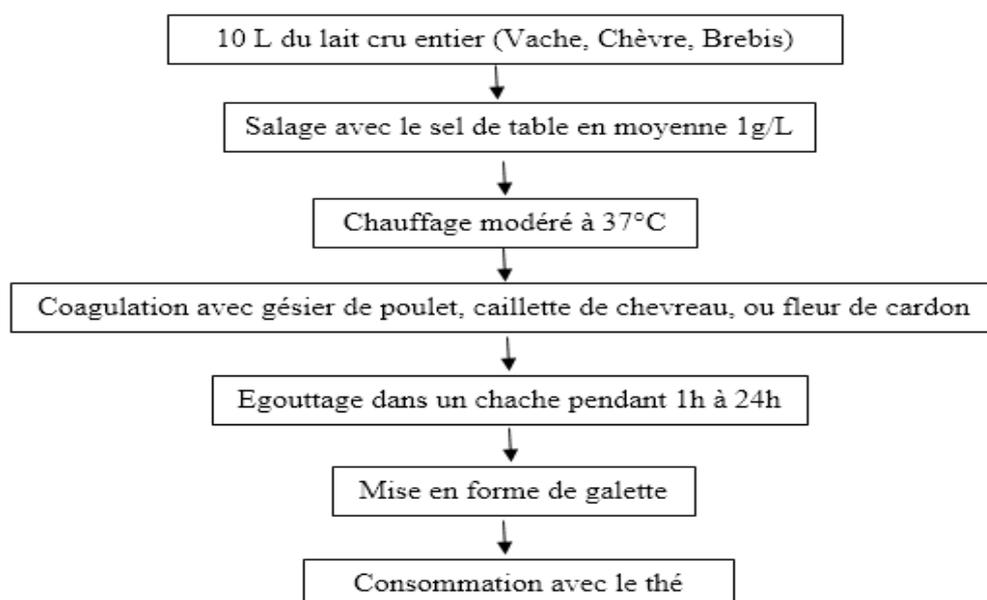


Figure 8. Diagramme de fabrication de la kemaria.

Tableau 7. Quelques sources d'extraits de plantes utilisés comme coagulant en fromagerie.

Plantes	Famille	Parties utilisées	Type de lait utilisé	Fromage	Zone de production	Références
<i>Solanum dubium</i>	Solanaceae	Feuilles Fruits	Lait de vache	Gybna Beyda	Sudan	Sana et al. (2011)
<i>Cynara cardunculus</i>	Asteraceae	Fleurs	Lait de brebis	Rorta Del Casar Serra da Estrella	Spain Portugal	Sousa et Malcata (2002) Silva et Malkata (1998)
<i>Cynara scolymus</i>	Asteraceae	Fleurs	Lait de bufflesse	Tallaga Cheese Jeben	Egypt Algeria	El Kholly (2015) Nouani et al. (2009)
<i>Zinziber officinalis</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Lait de bufflesse Lait de vache	Jiangzhinai Jiangzhuangnai Peshawarichees	Japan	Huang et al. (2010) Hashim et al. (2011)
<i>Calotropis procera</i>	Asclepiadaceae	Feuilles Latex Fleurs Tiges	Lait de vache	Warankashi Woagashi Wagassirou Waragashi	Nigeria Benin Togo Ghana	Aworh et Nakai (1988) Aworh et Muller (1987) Adetunji et al. (2008)
<i>Ficus carica</i>	Moraceae	Latex	Lait de chèvre	Cacioricotta	Italy	Faccia et al. (2012)
<i>Streblus asper</i>	Moraceae	Latex	Lait de vache	Dadih	Malaysia	Yazid et al. (1999)
<i>Withania coagulans</i>	Solanaceae	Fruits Fleurs	Lait de bufflesse	Paneer	Indian Iran	Sudesh et al. (2012) Pezeshki et al. (2011)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé en collaboration avec trois laboratoires, il s'agit de : Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, Laboratoire de Contrôle de Qualité et Suppression des Fraudes d'El Atteuf et Laboratoire de Contrôle de Qualité de l'Institut National Spécialisé en Formation Professionnelle (INSFP) Mohamed Cherif Mesaâdia de Ghardaïa.

2.1. Présentation de la zone d'étude

Cette étude a été menée dans la région de Ghardaïa, située à 600 Km au sud d'Alger. Ses coordonnées géographiques sont 3° 40' de longitude Est et 32° 29' de latitude Nord et son altitude est de 530 m. La wilaya de Ghardaïa s'étend sur une superficie de 86105 Km², pour une population de 4,17 habitants par Km². La wilaya de Ghardaïa est limitée au Nord par les wilayas de Laghouat et Djelfa à l'Est par la wilaya de Ouargla, à l'Ouest par les wilayas d'El-Bayadh et d'Adrar et au Sud par la wilaya de Tamanrasset (Figure 9) (Daddi Bouhouné, 1997).

La wilaya de Ghardaïa a un climat désertique avec un hiver froid et un été chaud. La température est très différente entre le jour et la nuit, l'été et l'hiver. La période chaude commence au mois de mai jusqu'au mois de septembre. La température moyenne enregistrée au mois de juillet est de 36,3°C, et la température maximale de cette période est 46°C. Pour la période hivernale, la température moyenne enregistrée au mois de janvier ne dépasse pas 12,2°C, et la température minimale de cette même période est 2,5°C (Toutain, 1979). A Ghardaïa, les précipitations sont très faibles et irrégulières, elles varient entre 13 et 68 mm sur une durée moyenne de quinze jours/an (Ramade, 1984).

2.2. Enquête ethnobotanique

L'objectif principal de cette étude est d'inventorier les plantes utilisées traditionnellement pour fabriquer le fromage connu par *Kemariya* dans la région de Ghardaïa. Pour cela, une enquête ethnobotanique a été réalisée auprès de la population de Ghardaïa en utilisant un questionnaire semi-structuré administré lors d'entretiens en face-à-face avec 100 individus de deux groupes ethniques (Arab et Mozabites), parmi eux 10 sont des herboristes. Cette enquête est faite en huit zones de la région de Ghardaïa (Dahayet Bendhahoua, Zelfana, El Guerrara, El Atteuf, Sebseb, Berriane, Ghardaïa centre-ville et Metlili) durant la période allant d'octobre 2019 au février 2020.

3. Matériel biologique

3.1. Lait de chèvre et de vache

Le lait de chèvre ainsi que le lait de vache ont été procurés des éleveurs à Ghardaïa. Le lait de chèvre a été fourni par un éleveur dans la région de Dahayet Bendhahoua et le lait de vache a été fourni par un éleveur dans la région de Zelfana. Après la réception du lait, il a été placé dans un réfrigérateur avant d'effectuer les tests ultérieurs pour la coagulation du lait.

3.2. Poudre de lait écrémé type « Low Heat »

Cette poudre de lait nous a été fournie gracieusement par la Laiterie d'Alouani (wilaya de Ghardaïa).

3.3. Présure commerciale

La présure utilisée dans cette étude a été apportée par un vendeur dans la région d'El Atteuf (wilaya de Ghardaïa).

3.4. Caillettes de chèvre

Les caillettes proviennent de chèvre, préparées selon la méthode traditionnelle dans la région de Ghardaïa. Après l'abattage au niveau de l'abattoir communal de Ghardaïa, le dernier tiers du troisième compartiment de leurs estomacs est prélevé. Les caillettes sont alors lavées à l'eau de robinet, dégraissées, séchées, mises dans un morceau de tissu puis conservés à une température ambiante.

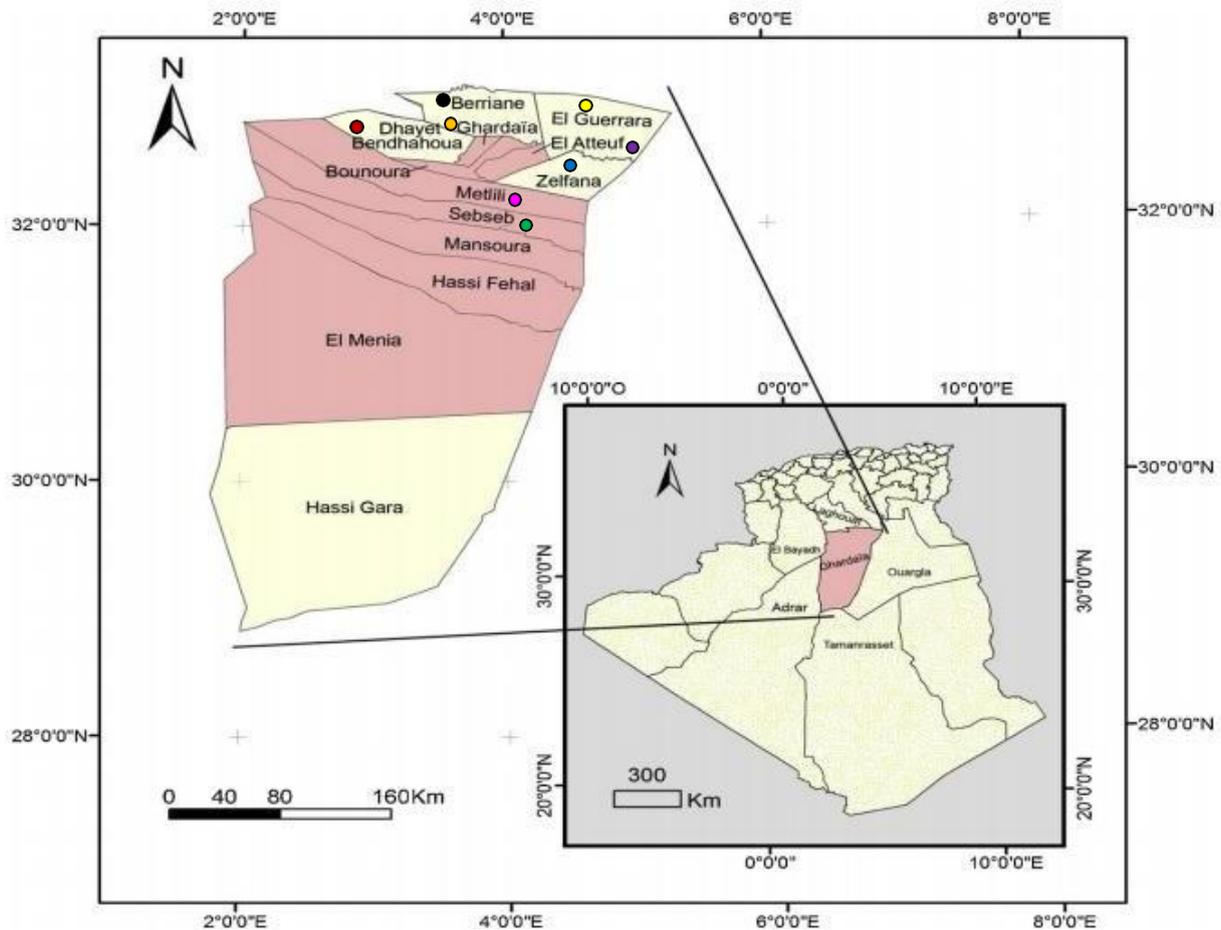


Figure 9. Carte de l'Algérie montrant la zone étudiée (wilaya de Ghardaïa) (Benfodil et al., 2020, avec modification). Dahayet Bendhahoua en rouge, Zelfana en bleu, El Guerrara en jaune, El Atteuf en violet, Sebseb en vert, Berriane en noir, Ghardaïa (centre-ville) en orange et Metlili en rose.

4. Matériel végétal

4.1. Choix des plantes

Dans cette étude, le choix des espèces végétales est effectué selon leur fréquence de citation en se basant sur les résultats de l'enquête ethnobotanique. Ainsi, les espèces choisies sont : *Cynara cardunculus* (Asteraceae) et *Fagonia glutinosa* (Zygophyllaceae).

4.2. Origine, systématique, description botanique et utilisation de *Cynara cardunculus*

Communément appelée cardon, carde ou chardon ; est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Astéracées, cultivée comme plante potagère consommée comme légume. Elle est très voisine de l'artichaut, qui fut parfois classée dans une espèce différente (*Cynara scolymus*). Bien que son origine soit réellement inconnue, le cardon (un des plus anciens légumes) est généralement censé être originaire du bassin Méditerranéen (Koubaa et Damak, 2003).

Le nom du genre cardon a été adopté par Linné, il vient du mot Grec « *kynara* », il est attribué à diverses plantes épineuses. Le Tableau 8 représente la classification du cardon.

Tableau 8. Classification de *Cynara cardunculus* (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/details/species/id/b037533b1ec41b54012e2830523cdddd>).

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Cynara</i>
Espèce	<i>Cynara cardunculus</i>

Le cardon se développe en rosette, puis émet une tige principale épaisse et rameuse qui peut atteindre de 1,50 à 2 m de haut portant à ses extrémités des capitules terminales. Les feuilles sont alternes, très grandes et longues, aux bords dentés et épineux, profondément divisées en lobes aigus, de couleur verte argentée ou grise-verte. Grandes inflorescences sphériques solitaires ou en corymbes, ses fleurs, bleu violacé, sont solitaires, dépassant souvent 6 cm de diamètre, elles sont réunies en capitules qui apparaissent à partir de la deuxième année, qui sont également comestibles. Le cardon présente un système racinaire pivotant très profond, qui lui confère une bonne résistance à la sécheresse et à des froids non sévères. Les graines sont des akènes oblongs surmontés d'une aigrette plumeuse qui se séparent facilement. Dans le commerce des graines, il existe deux variétés de cardon : l'une inerme et l'autre épineuse, seule la variété à épines est cultivée pour son goût typique de cardon (Djerroumi et Nacef, 2004).

Toutes les études réalisées sur le cardon ont porté sur l'identification de ses métabolites secondaires et éventuellement tester leurs utilisations biopharmaceutiques comme les activités antioxydante, antimicrobienne et antivirale (Paris et Moyse, 1971 ; Koubaa et Damak, 2003 ; Valentão et Fernandes, 2002).

Les fleurs du cardon sont riches en protéases telles que les cardosines A et B, dans la péninsule ibérique et depuis longtemps les extraits aqueux des fleurs sont utilisés pour la fabrication du fromage (Silva et Malcata, 2005 ; Fernandez et al., 2006). Les fleurs sèches sont macérées dans une petite quantité d'eau salée puis le filtrat est ajouté au lait (Macedo, Xavier Malcata et Oliveira, 1993).

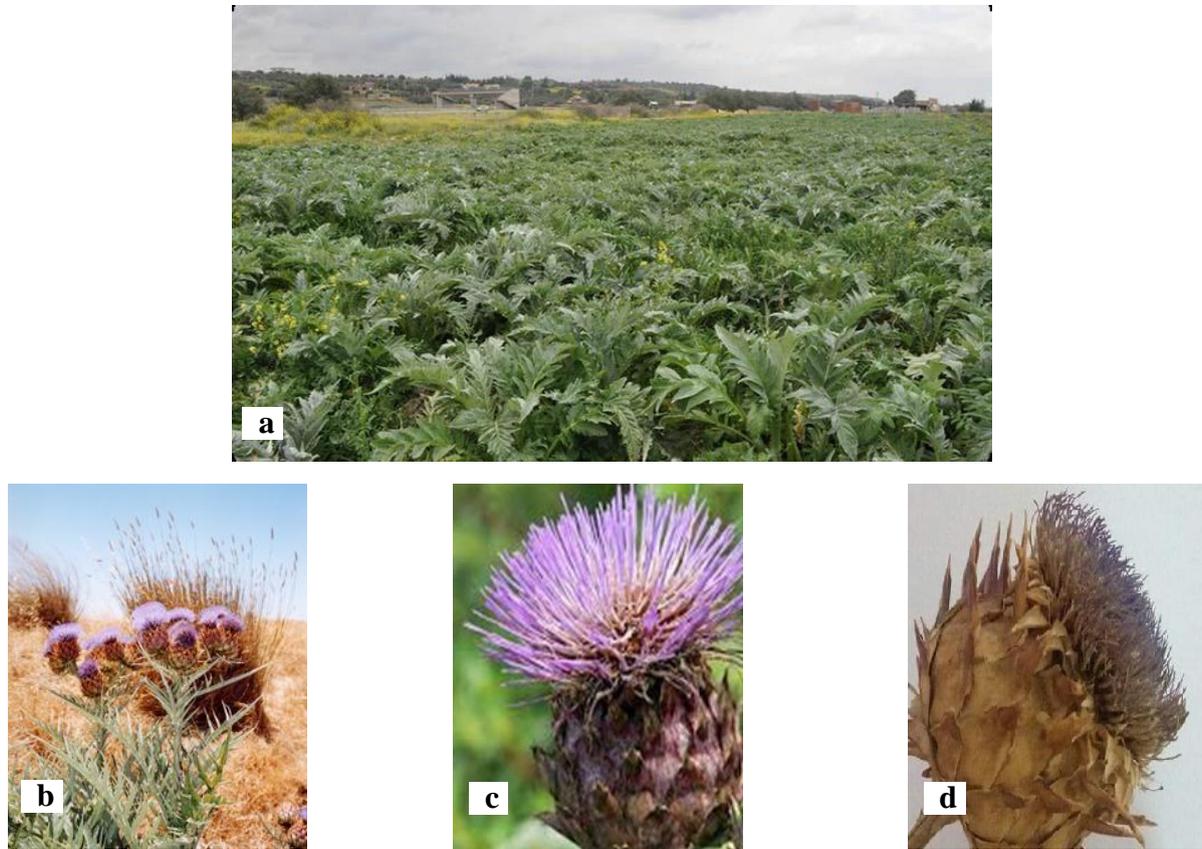


Figure 10. Photographies d'une population de *Cynara cardunculus* (a) un plant de *Cynara cardunculus* (b), fleur fraîche (c) et fleur sèche (d) (cda)

4.3. Origine, systématique, description botanique et utilisation de *Fagonia glutinosa*

Fagonia est un genre connu des régions arides chaudes de tous les continents sauf l'Australie. Le Nord d'Afrique peut être considéré comme le centre de distribution du genre dans le monde ancien. Oliver (1868) a enregistré sa présence dans différentes localités en Algérie, Tunisie, Palestine, Syrie, Arabie petraea, Mésopotomie et Perse.

Ozenda et Quezel (1956) ont étudié la famille des Zygophyllaceae du Sahara Nord-africain et classé les différentes espèces de *Fagonia* dont *Fagonia glutinosa*. C'est une plante vivace, prostrée, pubescente, vert pâle avec de longs entre-nœuds, généralement recouverte de sable adhérent. Feuilles trifoliées, la centrale est deux fois plus grande que les latéraux. Épines courtes, aussi longues que des pétioles. Capsule de 5 mm de large, 5 mm de long recouvert de poils et portée sur courte pédoncules réflexes velus, à calice persistant. Fleurs petites, de couleur rose violacé, s'ouvrant en étoile et donnant par la suite de petites capsules. Leur habitat principal est sur les sols sableux et sablo rocailleux. La *Fagonia* est très commune dans tout le Sahara et son période de floraison est en avril-mai. Les membres de la famille Zygophyllaceae sont distribués dans les zones arides du monde et sont traditionnellement utilisés contre diverses agressions de santé allant de lésions de la peau au cancer (Mohammad

et al., 2019). Les feuilles sont utiles contre les maladies de la peau, les problèmes de bouche pour les bébés, faiblesse corporelle, fracture et spasme musculaire (Teklehaymanot, 2017).

Le tableau suivant représente la classification de *Fagonia glutinosa*.

Tableau 9. Systématique de *Fagonia glutinosa* (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/details/species/id/c5fcafc2575e114896180c15da5dfe0d>).

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Zygophyllales
Famille	Zygophyllaceae
Genre	Fagonia
Espèce	<i>Fagonia glutinosa</i> Del.



Figure 11. Photographies de *Fagonia glutinosa* dans son milieu naturel (a), sa fleur (b) et ses grains (c) (cda)

4.4. Récolte du matériel végétal

La récolte de deux espèces choisies est effectuée selon le calendrier présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10. Calendrier de la récolte des différentes espèces.

Espèce	Lieu de récolte	Partie récoltée	Période de récolte
<i>Cynara cardunculus</i>	Dahayet Bendhahoua (Ghardaïa)	Fleurs	15 juillet 2019
<i>Fagonia glutinosa</i>	Zelfana (Ghardaïa)	Graines	27 septembre 2019

4.5. Echantillonnage

La récolte des graines de *Fagonia glutinosa* a été réalisée à Oued Zelfana et pour le *Cynara cardunculus*, les fleurs ont été récoltées d'une ferme d'un paysan située à Dahayet Bendhahoua dans la région de Ghardaïa.

5. Appareillage

Les différents appareillages utilisés pour la réalisation des différentes expérimentations sont présentés dans l'Annexe 1.

6. Méthodes de travail

6.1. Préparations des extraits

Les extraits destinés aux essais ont été préparés selon les méthodes traditionnelles de préparation (décoction et macération).

Pour la décoction, 5g de matériel végétal est ajouté à 100 ml d'eau distillée, puis ce mélange est porté à ébullition pendant 5 min. Après un repos de 5 min, le mélange est filtré sur filtre Wattman n°1.

Pour la macération, une quantité de 5g de matériel végétal est mélangée avec un 100 ml de l'eau distillée pendant 24 h à température ambiante et à l'obscurité, puis le mélange est filtré sur filtre Wattman n°1.

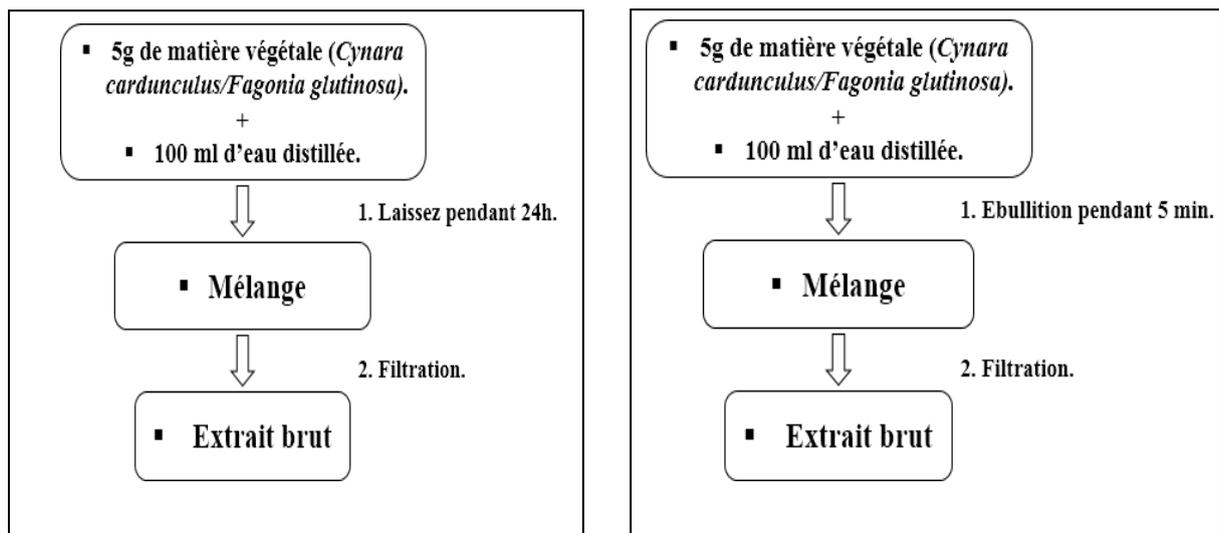


Figure 12. Schéma des protocoles de la décoction et de la macération de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*.

6.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des différents extraits de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$R \% = (PEB/PMV) \times 100 \text{ (Houba et Himeur, 2013)}$$

Avec :

R : Rendement, **PSE** : Poids Sec de l'extrait (g) après séchage et **PMV** : Poids de Matière Végétale (g).

6.3. Détermination du pH des extraits

Le pH des 4 extraits obtenus a été déterminé à l'aide du pH-mètre.

6.4. Détermination de la conductivité des extraits

La conductivité des 4 extraits obtenus a été mesurée à l'aide du conductimètre.

6.5. Criblage phytochimique des extraits

Des analyses phytochimiques ont été effectuées afin de mettre en évidence certains métabolites (primaires et secondaires) dans les différents extraits des plantes en utilisant des méthodes standard comme décrites ci-dessous tableau.

Tableau 11. Différentes réactions de criblage photochimique.

Test	Principe	Référence
Protéines	La mise en évidence des protéines est réalisée en utilisant la ninhydrine. L'apparition de la couleur violette correspond à la présence des acides aminés et des protéines.	Yadav et Agarwala (2011)
Sucres réducteurs	La présence des sucres réducteurs a été réalisée en utilisant la liqueur de Fehling. Le précipité rouge brique formé indique la présence des sucres réducteurs.	Yadav et Agarwala (2011)
Phénols et tanins	Pour mettre en évidence des phénols et des tanins, l'extrait est mélangé avec 2 ml d'une solution de FeCl ₃ (2%). Une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique la présence des phénols et des tanins.	Yadav et Agarwala (2011)
Différenciation Tanins : (cathéchiqes/ galliqes)	Pour mettre en évidence des tanins (cathéchiqes/ galliqes), le réactif de Stiasny est utilisé. La solution est chauffée à reflux au bain marie pendant 15 à 30 min et l'apparition d'un précipité de couleur rose clair montre la présence des tanins catéchiqes.	Mibindzou Mouellet (2004)
Flavonoïdes : anthocyanes	A 2 ml d'extrait on ajoute 2 ml d'HCl (2N) puis 2 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH ₄ OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes.	Ribereau-Gayon, (1968)
Flavonoïdes : réaction à la cyanidine)	5 ml d'éthanol chlorhydrique sont ajoutés à l'extrait, ensuite quelques copeaux de magnésium ainsi qu'1 ml d'alcool iso-amylque sont rajoutés. L'apparition d'une coloration sur la couche surnageant d'alcool iso-amylque indique la présence des flavonoïdes libres : - Une coloration rose-orangée indique la présence des flavones flavones. - Une coloration rose-violacée indique la présence des flavanones. - Une coloration rouge indique la présence des	Mibindzou Mouellet (2004)

	flavonols et des flavanonols. On effectue la réaction de la cyanidine sans ajouter des copeaux de magnésium et on chauffe pendant 10 min au bain-marie. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brune-rouge.	
Saponines	L'extrait est mélangé avec 5 ml de l'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est agité vigoureusement. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides.	Yadav et Agarwala (2011)
Coumarines	Les coumarines sont révélées à partir de 2 ml de l'infusé à 5% placé dans un tube dans lequel sont ajoutés 3 ml de NaOH (10%). Après agitation de la solution, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines.	Diallo (2000)
Quinones libres	Les quinones libres sont révélées à partir de 5 ml d'extrait plus quelques gouttes de NaOH (1%) développent une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet, révèle la présence des quinones libres.	Dohou (2004)
Stéroïdes	La présence des stéroïdes est effectuées par l'introduire de 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml d'H ₂ SO ₄ concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive.	Harborne (1998)
Terpénoïdes	Test de Libermann-Burchard, à 5 ml d'extrait on ajoute 2 ml d'anhydride acétique et 1 ml d'H ₂ SO ₄ . L'apparition d'une couleur mauve ou violette indique un test positif.	Mamadou (2012)
Alcaloïdes	Les alcaloïdes sont mis en évidence par les tests de Mayer et de Wagner. L'extrait est mélangé avec 2 ml d'HCl (1%) et chauffé doucement. Les réactifs de Mayer et de Wagner ont été ensuite additionnés à ce mélange. La turbidité du précipité résultant est considérée comme une évidence de la présence des alcaloïdes.	Chaouch (2001)

6.6. Quantification des métabolites

Pour la quantification des différents métabolites primaires (protéines) et secondaires (dosage des polyphénols totaux et des tanins condensés ou proanthocyanidines), nous avons utilisé le spectrophotomètre UV-Visible.

6.6.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (1976) en utilisant le bleu de Coomassie (G-250). Ce dernier réagit avec les acides aminés basiques (notamment l'arginine) et aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. L'absorbance de cette couleur est mesurée à 595 nm par le spectrophotomètre UV-Visible (Marque). Un étalonnage est préparé en utilisant l'albumine de

sérum de bœuf (BSA, bovine serum albumine) (50- 250 µg/ml). Les résultats sont exprimés en mg de protéines/g de poids sec de matériel végétal (Telli, 2017).

6.6.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le dosage de ces composés a été effectué selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965) : Un volume de 0,25 ml de l'extrait végétal a été mélangé avec 1,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée). Après agitation puis incubation de 5 min, 1 ml de solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7,5 %) a été ajouté. Le mélange a été laissé au repos à l'obscurité et à température ambiante pendant 90 min avec agitation intermittente. L'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 765 nm contre un blanc.

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits bruts a été exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MVS). Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme étalon.

6.6.3. Dosage des tanins condensés ou proanthocyanidines

La détermination de la teneur en tanins condensés ou les proanthocyanidines est effectuée selon la méthode de Sun et al. (1998). Cette méthode se base sur la réaction entre les tanins condensés avec la vanilline en milieu acide (HCl). A 0,2 ml de l'extrait, 1 ml de la solution fraîchement préparée de la vanilline 1% (p/v) en acide acétique glacial et HCl (98:2, v/v) est ajoutée. Après incubation à 30°C pendant 20 min, l'absorbance est mesurée à 510 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. L'étalonnage est réalisé avec de la catéchine (de 0 à 1 mg/ml) et le taux des tanins condensés est calculé en mg équivalent de catéchine EC/g de poids sec de matériel végétal (Telli, 2017).

6.7. Coagulation du lait de chèvre et lait de vache par les différents types d'extraits

6.7.1. Recherche du pH optimal

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique de ces préparations et par conséquent sur le temps de floculation du lait (Ramet, 1997). Dans le but de rechercher les meilleures conditions d'activités des différents extraits, nous avons examiné l'effet des valeurs suivantes de pH : 5,5 ; 6 et 6,5 par l'addition d'hydroxyde de sodium ou l'acide lactique, sur l'activité produite. Le mélange préparé est constitué de 500 µl d'extrait et 5 ml de lait pour les trois types de lait utilisés (lait de vache, lait de chèvre et Low Heat lait).

Pour cela, le lait et des extraits sont mises dans les mêmes conditions, de température ambiante et en absence du CaCl₂.

6.7.2. Recherche de la température optimale

Pour déterminer la température optimale de l'activité des différents extraits, l'activité coagulante est étudiée à trois valeurs de température 30, 35 et 40°C. Pour chaque valeur de température, un mélange est préparé pour chaque extrait et chaque type du lait renfermant 500 µl de l'extrait et 5 ml de lait. Les autres paramètres sont fixés : pH est celui de lait, et la

concentration de CaCl₂ est égale à 0 M. Le temps de floculation est alors mesuré pour chaque valeur de température et pour chaque extrait.

6.7.3. Recherche de la concentration optimale en CaCl₂

Afin de déterminer la concentration optimale de CaCl₂ qui permettra d'obtenir le meilleur temps de floculation pour chaque extrait, nous avons réalisé des essais. Pour cela le lait de vache et chèvre sont dans les mêmes conditions de pH et de température mais se distinguent par la valeur de la concentration adoptée et la nature de l'extrait. Les différentes concentrations choisies sont 0M ; 0,01M ; 0,02M et 0,03M.

6.7.4. Optimisation du temps de floculation

L'objectif est d'essayer de faire comparer les temps de floculation obtenus dans les essais précédents avec des essais similaires mais en utilisant la présure commerciale et les caillettes de chèvre comme agent de coagulation.

6.8. Etude de stabilité des différents extraits

Dans le but de suivre la stabilité des extraits coagulants, un mode de conservation a été testé à savoir la réfrigération (à +4°C). L'évolution des activités coagulantes est vérifiée après un mois de conservation.

6.9. Essai de fabrication de fromage *Kemariya* par les différents extraits des plantes

Le procédé de fabrication utilisé est selon la méthode traditionnelle de fabrication de *Kemariya* dans la région de Ghardaïa. La seule différence est l'ajout de l'extrait des plantes et non pas la plante directement. Pour les fromages frais à partir du lait de vache et le lait de chèvre avec quelques modifications de paramètres d'emprésurage tels que la température.

Le lait qui a servi à la fabrication du fromage est un lait cru. Le lait est réparti dans des bédiers de 1000 ml, à une température de 37°C- 40°C (température optimale de l'extrait coagulant). On ajoute 10 ml de cet extrait dans chaque bédier et on laisse coaguler. Dès la séparation des deux phases du lait (lactosérum et caillé) on verse le mélange sur un tissu filtrant pour faciliter l'égouttage. Le dispositif est mis dans le réfrigérateur durant une nuit. Le lactosérum qui s'égoutte est recueilli en totalité (Boudjenah-Haroun, 2012). Le poids du lait et du caillé est noté pour servir au calcul du rendement selon l'équation suivante :

Le rendement = le poids du caillé/ le poids du lait x 100 (Boudjenah-Haroun, 2012)

6.10. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle repose sur la dégustation des fromages et sur l'analyse des réponses données par les dégustateurs. La séance de dégustation s'est déroulée dans une salle par un panel de 30 dégustateurs.

Les dégustateurs choisis sont de différents âges, non-fumeurs et sous aucune médication, car ces facteurs influencent sur l'appréciation sensorielle des dégustateurs.

Les dégustateurs ont goûté du fromage de chèvre et de vache frais, préparé par les deux espèces végétales étudiées. Ils sont présentés dans une assiette propre accompagnés des tranches de pomme pour le nettoyage de la bouche entre chaque dégustation.

6.11. Analyses physico-chimiques du lait de vache/chèvre cru et de fromage

6.11.1. Evaluation des principales caractéristiques

Afin d'avoir une idée sur la qualité des laits collectés par des fournisseurs privés, plusieurs paramètres physico-chimiques ont été évalués.

6.11.1.1. Mesure de pH

La mesure de pH est précédée par une étape d'étalonnage qui consiste en un ajustement du cadre de lecture du pH à l'aide d'une solution de pH connue (solution de pH étalon). La mesure du pH du lait cru, est effectuée à la température de +20°C (Boudjenah-Haroun Saliha, 2012).

La valeur est lue directement sur le pH-mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser. Pour le fromage, le pH est mesuré selon la méthode rapportée par Owusu-Kwarteng et al. (2012). Un échantillon de 10 grammes du fromage a été homogénéisé dans 90 ml d'eau distillée.

6.11.1.2. Matière sèche totale

La matière sèche totale est le produit résultant de la dessiccation du lait ou du fromage. Sa mesure est obtenue par évaporation de l'eau à l'étuve réglée à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 h (AFNOR, 1985). La méthode consiste à mettre 5 ml du lait et pour le fromage 5 g dans une capsule d'étuvage qui est placée dans l'étuve. Les capsules sont ensuite transférées dans un dessiccateur pendant quelques min, le temps qu'elles refroidissent et atteignent la température ambiante, puis elles sont pesées.

Le résultat est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{P2/P1*100}$$

La matière sèche exprimée en %, Avec : **P1** : Poids de l'échantillon humide et **P2** : Poids de l'échantillon après dessiccation.

6.11.1.3. Teneurs en cendres

La teneur en cendres est déterminée par incinération au four à moufle à une température de 550°C pendant 4 à 6 h (AOAC, 1990). La méthode consiste à mettre 10 ml du lait, ou 10 g de fromage respectivement. Ces échantillons sont mis dans des cupules puis dans le four électrique réglé. Puis les capsules sont placées dans le dessiccateur et laissées refroidir pendant quelques min. Enfin, les cupules contenant les cendres sont pesées. Ce taux est déterminé selon la formule suivante :

$$\mathbf{Matière\ minérale\ \% = Poids\ des\ cendres/poids\ d'échantillon \times 100}$$

6.11.1.4. Densité du lait cru

La densité du lait cru déterminée à l'aide d'un lactodensimètre gradué, dans une éprouvette de 250 ml remplie de l'échantillon à analyser, la lecture donne directement la valeur de la densité (AFNOR, 1986).

6.11.1.5. Mesure de l'acidité titrable

6.11.1.5.1. Pour le lait cru

La mesure de l'acidité titrable du lait cru est réalisée selon la méthode normalisée d'AFNOR (1980), qui consiste en la mesure du volume de la solution de NaOH (0,1 N) nécessaire à la titration de l'acidité du lait, en présence de phénophtaléine comme indicateur.

6.11.1.5.2. Pour le fromage

L'acidité titrable est mesurée en prenant 10 g de fromage finement broyé et les solubiliser dans un volume d'eau distillée chauffée à 40°C dans une fiole jaugée de 105 ml. Ensuite, le mélange est agité vigoureusement puis filtré. Un volume de 25 ml du filtrat représentant 2.5g de fromage est titré par une solution de NaOH à 0,1 N en présence de phénophtaléine alcoolique. Le résultat est exprimé en pourcentage d'acide lactique dans 100g de fromage (AOAC, 1980).

6.11.1.5.3. Expression des résultats

La valeur de l'acidité du lait cru ou du fromage est obtenue par la formule suivante :

$$A=10 (V/V') (g/l)$$

Avec, **A** : Quantité d'acide lactique en (g/l), **V** : Volume de la solution de NaOH utilisé (ml) et **V'** : Volume de l'échantillon (ml).

Pour obtenir l'acidité titrable en degrés Dornic (°D), la valeur de A est multipliée par 10.

6.11.1.6. Teneur en matière grasse

6.11.1.6.1. Pour le lait cru

Les teneurs en matières grasses du lait sont déterminées par la méthode acido-butyrométrique de Gerber. Cette méthode repose sur la lecture directe sur un butyromètre de la quantité de matière grasse contenue dans 11 ml d'échantillon après dissolution des protéines par de l'acide sulfurique (d =1,820) et séparation de la matière grasse par centrifugation en présence d'alcool amylique (AFNOR, 1985).

- **Principe de la méthode acido-butyrométrique de Gerber**

Il est nécessaire de détruire l'état globulaire de la matière grasse pour pouvoir la séparer. Cette destruction est assurée par l'acide sulfurique concentré d =1,820. L'addition de ce dernier entraîne également la dissolution totale de la caséine ce qui favorise une bonne séparation entre la phase grasse et non grasse du lait, la séparation est accentuée par l'utilisation de l'alcool iso-amylique. La détermination de la matière grasse est réalisée dans un appareil étalonné, appelé butyromètre. Un butyromètre est constitué d'un corps surmonté à une extrémité d'un col et à l'autre d'une tige graduée où s'accumule la matière grasse. Chaque graduation représente 0.1% matière grasse, soit 1g par litre (AFNOR, 1985).

- **Mode opératoire**

A l'aide d'une burette automatique, introduire dans le butyromètre 10 ml d'acide sulfurique ($d = 1,820$) en évitant d'en humecter le col. A l'aide d'une pipette spécialement graduée (à un trait), prélever 11 ml de lait homogène ; les introduire dans le butyromètre en plaçant la pointe de la pipette, inclinée à 45° , en contact avec la base du col du butyromètre et en laissant le lait couler très lentement au début afin d'éviter un mélange prématuré de lait avec l'acide, ce qui rendrait la lecture finale difficile. Ajouter ensuite 1 ml d'alcool isoamylique à l'aide d'une burette automatique et boucher le butyromètre avec un bouchon. Envelopper le butyromètre d'un chiffon et agiter en maintenant le bouchon avec le pouce jusqu'à dissolution complète du coagulum. Rendre le mélange homogène par retournements successifs en vidant l'ampoule terminale à chaque retournement. Du fait du mélange acide-lait, le contenu de l'appareil se trouve porté à environ $80-85^\circ\text{C}$. Cette température favorise la séparation de la phase grasse du nom gras en introduisant immédiatement le butyromètre dans la centrifugeuse. Après une centrifugation pendant 5 à 7 min à 1000-1200 tours/min, il faut effectuer rapidement la lecture sur le butyromètre en ajustant soigneusement le bouchon du col à 0 pour avoir la valeur exacte de la matière grasse (AFNOR, 1985).

- **Expression des résultats**

La teneur en matière grasse est exprimée en g/l est obtenue par la lecture de la graduation sur le butyromètre. Maintenir le bouchon vers le bas et ajuster devant le repère le plus proche, puis lire rapidement.

$$\text{MG (g/l)} = (\text{B}-\text{A}) \times 100 \text{ (AFNOR, 1985)}$$

Avec : **A** : la valeur correspondant au niveau inférieur de la colonne grasse et **B** : la valeur correspondant au niveau supérieur de la colonne grasse.

6.11.1.6.2. Pour le fromage

Les teneurs en matières grasses du fromage sont déterminées par la méthode acido-butyrométrique de Van Gulik (AFNOR, 1993).

- **Principe de la méthode acido-butyrométrique de Van Gulik**

Après la dissolution des protéines de fromage par addition d'acide sulfurique (65%), séparation de la matière grasse par centrifugation dans le butyromètre, la séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité de l'alcool amylique (AFNOR, 1993).

- **Mode opératoire**

Peser $3\text{g} \pm 0.005\text{g}$ de fromage dans un système de pesage adapté à un bouchon approprié, fermer le col au moyen du bouchon, ajouté l'acide sulfurique (65%) par l'autre extrémité qui reste ouverte, jusqu'à ce que l'acide atteigne une hauteur d'environ de $2/3$ de la chambre de butyromètre et que le système de pesage soit complètement entouré d'acide sulfurique. Placer le butyromètre, le col en bas pendant 5 min dans un bain d'eau à $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Le retirer du bain d'eau et l'agiter énergiquement pendant 10 secondes, répéter les opérations de chauffage et l'agitation jusqu'à dissolution complète de fromage. Retirer le butyromètre du bain d'eau, et après avoir soigneusement agité. Ajouter 1ml de d'alcool amylique, agiter à nouveau immédiatement pendant 3 secondes. Ajouter de l'acide sulfurique par l'ouverture

étroite jusqu'à ce que le niveau atteint le trait repère 35% de l'échelle, fermer immédiatement avec un petit bouchon, le retourner et enfin retourner le butyromètre. Agiter énergiquement pendant 10 secondes dès que la matière grasse est montée dans la chambre du butyromètre. Placer le butyromètre, le col en bas pendant 5 min dans un bain d'eau à $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Retirer le butyromètre du bain, centrifuger pendant 10 min et ajuster le bouchon du col de façon à amener la colonne de matière grasse dans la partie graduée.

- **Expression des résultats**

L'obtention de la teneur en matière grasse en grammes pour 100 g de fromage se fait par lecture directe sur l'échelle de butyromètre.

6.12. Analyses de la qualité hygiénique pour le lait cru et le fromage

6.12.1. Recherche des germes aérobies dans le lait cru

Dans des conditions aseptiques, les dilutions décimales ont été réalisées à partir de la solution mère jusqu'à la dilution 10^{-5} . La technique consiste à prélever, à l'aide d'une pipette graduée stérile, 1 ml de la solution mère puis à l'incorporer à 9 ml de l'eau physiologique stérile. Les dilutions obtenues ont étéensemencées sur les milieux de culture spécifiques aux germes recherchés et incubées à 30°C pendant 48 h (JORA, 2004).

6.12.2. Recherche de staphylocoques à coagulase + pour le lait cru et le fromage

La recherche des staphylocoques à coagulase + a été réalisée selon les recommandations de la réglementation algérienne décrites dans l'Arrêté du 23 novembre 2014 publié dans le journal officiel de la république algérienne n°68. Les staphylocoques ont été dénombrés sur la gélose de Baird Parker additionnée à l'émulsion de jaune d'œuf et au tellurite de potassium. En introduisant 0,1 ml de la suspension mère (dilution 10^{-1}) à la surface du milieu de culture suivie d'un étalement et incubée à 37°C pendant 48 h. Les colonies caractéristiques après 48 h sont noires, brillantes et convexes et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque. La confirmation sera effectuée par les tests : catalase, ADNase (ou coagulase) et coloration de Gram.

6.12.3. Recherche de coliformes thermotolérants dans le lait cru

Dans des conditions aseptiques, les dilutions décimales ont été réalisées à partir de la solution mère jusqu'à la dilution 10^{-2} . Les dilutions obtenues ont étéensemencées sur les milieux de culture spécifiques aux germes recherchés et incubée à 44°C pendant 48 h (JORA, 2004).

6.12.4. Recherche d'*Escherichia coli* dans le fromage

La recherche et le démembrement d'*E. coli* présumé a été réalisée selon la technique du nombre le plus probable (NPP) tout cela; ont suivant la réglementation Algérienne décrite dans l'Arrêté du 13 juin 2017 publié dans le JORA N° 64 du 7 novembre 2017 et ISO 7251:2005.

6.12.4.1. Préparation de la solution mère

Introduire et diluer aseptiquement 10 g de l'échantillon du fromage à pâte molle a analysé dans un sachet Stomacher, contenant au préalable 90 ml d'Eau Peptonée Tamponnée (EPT).

6.12.4.2. Ensemencement et incubation

Le bouillon le Lauryl Sulfate Tryptose (LST) simple et double concentration est utilisé comme test présomptif pour le dénombrement d'*E. coli* présumés, selon la méthode de NPP en deux étapes (présomption et confirmation). En effet, le test de présomption consiste à prendre une série de 9 tubes contenant le milieu (LST), 3 tubes contenant 9 ml de LST double concentration, 6 tubes contenant 10 ml de (LST) simple concentration. A partir des dilutions décimales, un volume de 10 ml est mis dans chacun des trois tubes premiers, 1ml est mis dans les 3 tubes de LST simple concentration et 0,1 ml dans les 3 tubes qui restent. L'incubation est à 37°C pendant une durée de 24 à 48 h. De ce fait, les tubes présentant un trouble microbien et de gaz dégagé à l'intérieur de la cloche sont considérés comme positifs. Ils feront systématiquement l'objet d'un test de confirmation. Pour ce dernier, les tubes positifs sur le milieu LST simple et double concentration sont repiqués dans 1 ml sur bouillon EC et tubes de l'eau peptonée exempte d'indole. L'incubation à 44°C se fait pendant 24 h. En cas où le résultat est positif dans bouillon EC et une production d'indole dans l'eau peptonée à partir d'un acide aminé le tryptophane, par adjonction du réactif de Kovacs (l'apparition d'un anneau rouge), la présence d'*E. coli* est constatée.

6.13. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type de trois répliques analytiques. L'analyse de la variance à un seul et deux facteurs (ANOVA) est utilisée pour comparer les valeurs des moyennes obtenues avec les différents extraits en utilisant XLSTAT 2016.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Résultats et discussion

3.1. Etude ethnobotanique

Les études ethnobotaniques constituent un pas essentiel et important non seulement dans la conservation du savoir-faire traditionnel et la préservation de la diversité biologique, mais aussi un point de départ pour la recherche des nouvelles méthodes concernant la coagulation du lait (Siewet al., 2014; Houéhanouet al., 2016; Ladoh-Yemedaet al., 2016). L'enquête menée auprès de 100 personnes interrogées de la wilaya de Ghardaïa par rapport aux données collectées nous permet d'obtenir les résultats suivants :

3.1.1. Connaissance des plantes utilisées traditionnellement pour la coagulation du lait

Dans une population composée de 100 personnes locales de la région de Ghardaïa, 68% des gens ont le savoir-faire et l'habitude d'utiliser les plantes dans la coagulation du lait et la préparation du fromage traditionnel «*Kemariya*», alors que 32% de la population questionnée ne les connaît pas (Figure 13).

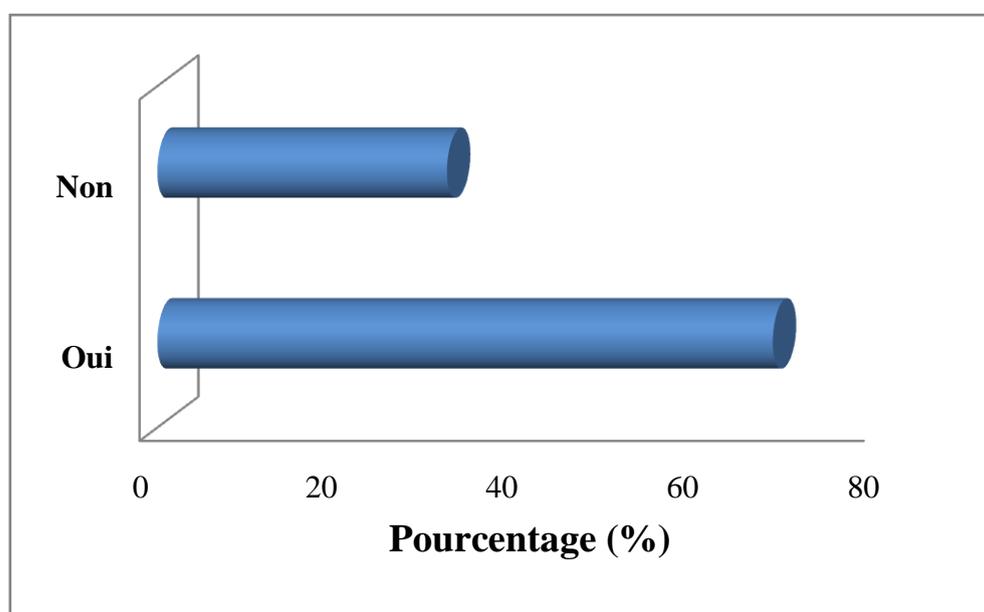


Figure 13. Répartition de la population questionnée selon leur connaissance en plantes traditionnellement utilisées dans la coagulation du lait.

3.1.2. Type de fromage préféré

En ce qui concerne le type du fromage préféré, nous constatons que la majorité de la population questionnée préfère le fromage traditionnel et seulement 18% des personnes ont préféré le fromage moderne (Figure 14).

Le choix du fromage par la population locale est lié le plus souvent à l'enclavement des zones rurales, l'inexistence ou la rareté des infrastructures commerciales, le coût élevé des fromages ainsi que la modestie des revenus de ces populations (Leksir et al., 2019).

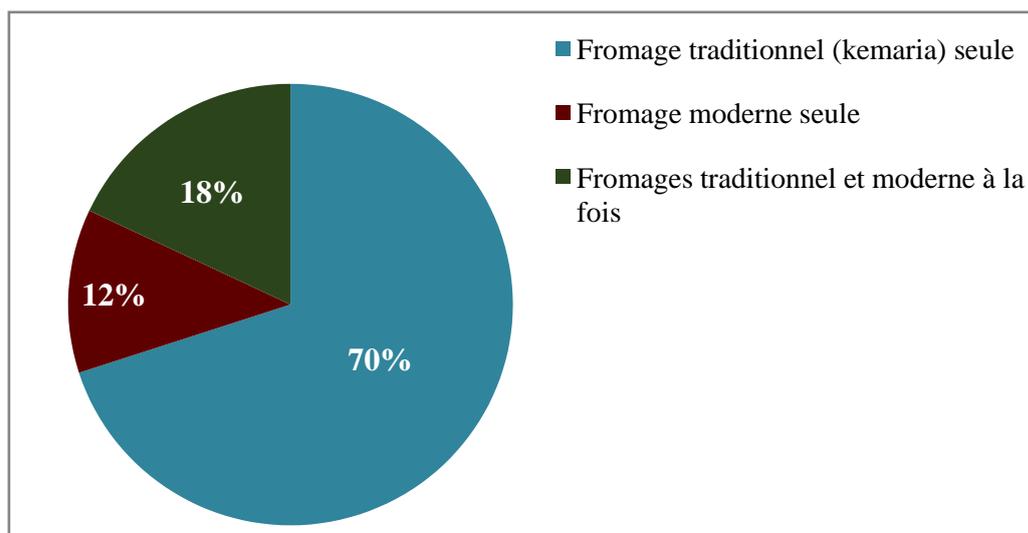


Figure 14. Pourcentage de fromage préféré par la population questionnée

3.1.3. Répartition de la population questionnée selon le sexe

Plus de la moitié de la population questionnée sont des femmes avec un taux de 60%, alors que les hommes représentent 40% seulement (Figure 15).

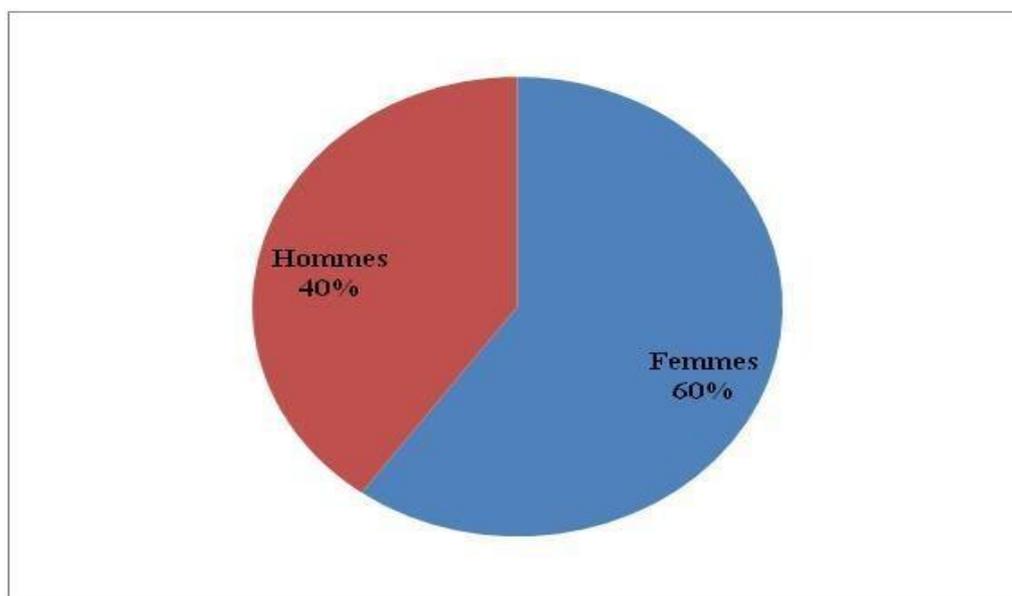


Figure 15. Répartition de la population selon le sexe.

3.1.4. Utilisation des plantes pour la coagulation du lait et la fabrication de *Kemariya* selon le sexe

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation des plantes coagulantes du lait dans la région de Ghardaïa pour la fabrication de *Kemariya* par les femmes est plus importante que par les hommes, avec 56% et 44%, respectivement (Figure 16).

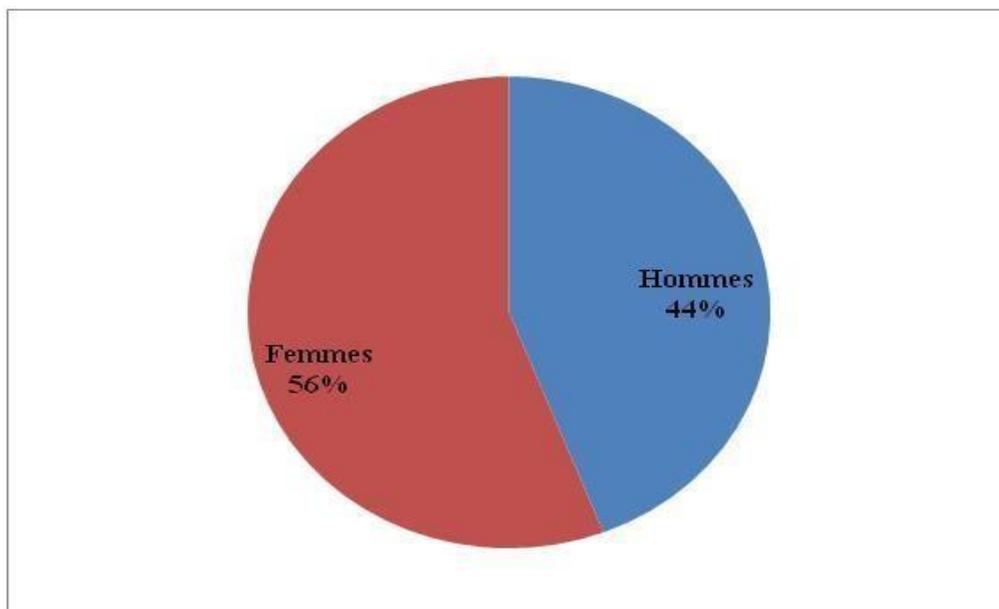


Figure 16. Utilisation des plantes pour la coagulation du lait selon le sexe.

Bien qu'il y ait une différence légère concernant l'utilisation des plantes coagulantes en fonction de sexe, les femmes et les hommes se chargent équitablement de la collecte des plantes utilisées dans la coagulation du lait, avec la participation de l'homme surtout dans les zones réputées dangereuses. Les femmes s'occupent majoritairement du séchage, de stockage et de la préparation artisanale de *Kemariya*. En effet, les femmes sont d'une part les plus détentrices du savoir dans la fabrication traditionnelle du fromage par leur responsabilité en tant que mères, qui donnent les repas riches en nutriments en particulier pour leurs enfants (Leksir et al., 2019).

3.1.5. Répartition des informateurs selon l'âge

La population questionnée de 100 personnes est groupée selon leur âge en cinq classes. Selon les résultats présentés dans la Figure 17, il apparaît que plus de 64% de la population questionnée est âgée (40 ans et plus) et les jeunes ne représentent que 36%.

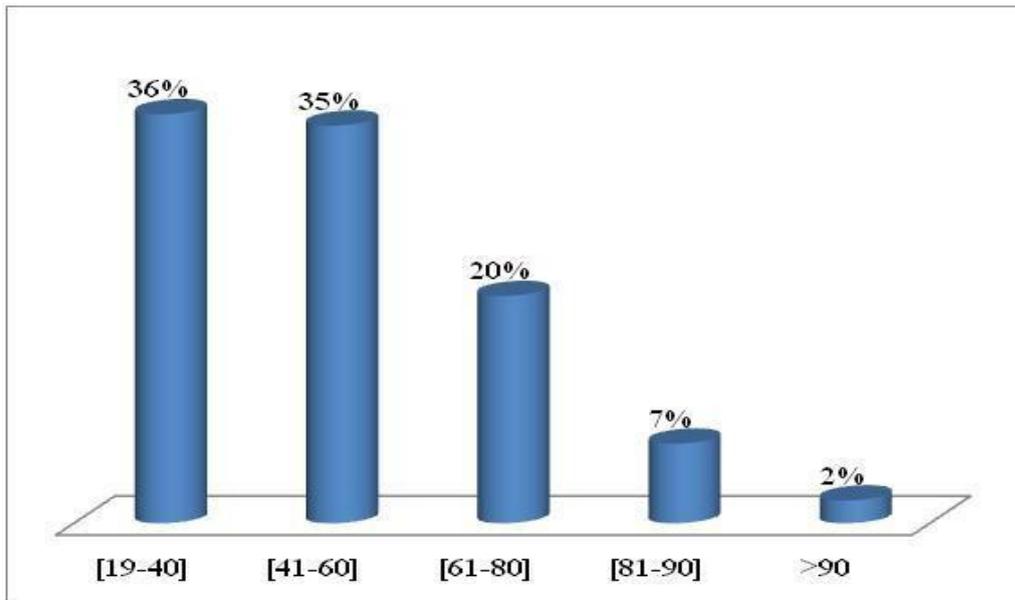


Figure 17. Répartition de la population questionnée selon l'âge.

3.1.6. Utilisation des plantes pour coaguler le lait selon l'âge

La population étudiée se compose de 100 personnes avec des âges allant de 19 à 102 ans et en moyenne d'âge d'environ 51 ans. L'utilisation des plantes pour la préparation de *Kemariya* dans la wilaya de Ghardaïa est répandue chez toutes les tranches d'âge avec une prédominance chez les personnes âgées de [41 à 60] ans avec une proportion de 35,3%. Les tranches d'âge de [19 à 40] ans, [61 à 80] ans et [81 à 90] ans, viennent ensuite avec des proportions de 29,4% ; 22,1% et 10,3%, respectivement. Enfin, les personnes de plus de 90 ans représentent une proportion de 2,9% (Figure 18).

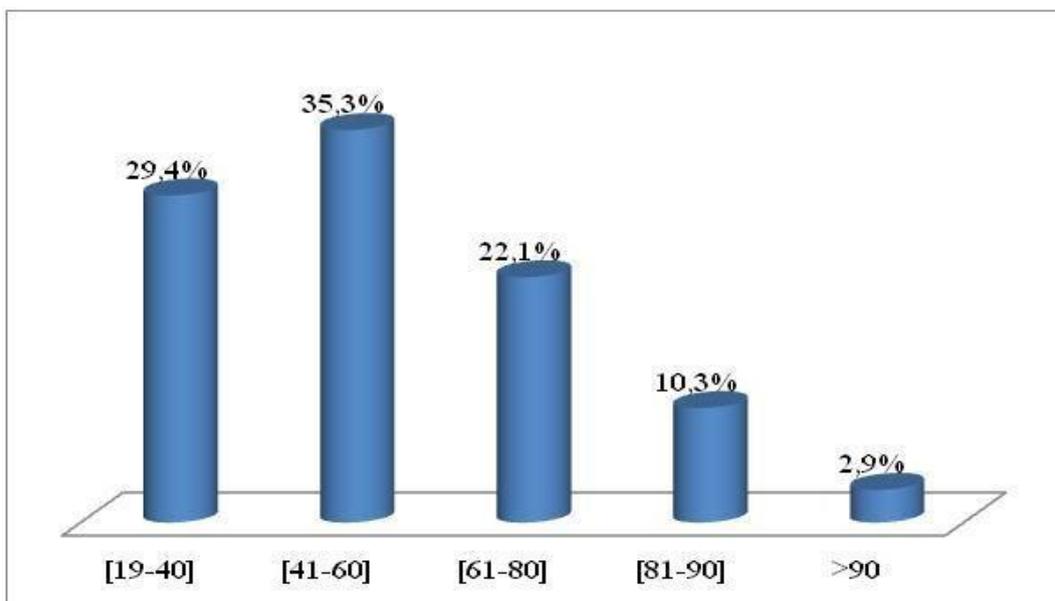


Figure 18. Répartition de la population utilisant les plantes dans la coagulation du lait selon l'âge.

Les résultats obtenus confirment que les personnes âgées connaissent et utilisent les plantes pour la fabrication de fromage traditionnelle. On note aussi un manque de connaissances par la population jeune. En effet, les personnes âgées sont censées fournir et transmettre leur savoir-faire vers les nouvelles générations du fait qu'elles détiennent une bonne partie du savoir ancestral (Lakouété et al., 2009).

3.1.7. Plantes utilisées traditionnellement pour la fabrication de *Kemariya*

Au niveau de la zone d'étude, 68% de la population enquêtée utilise les plantes comme une présure végétale pour la préparation de fromage artisanale *Kemariya*.

En globale, neuf plantes sont utilisées dans la fabrication traditionnelle de fromage, qui sont *Fagonia glutinosa*, *Cynara cardunculus*, *Ficus carica*, *Silybum marianum*, *Pituranthos chloranthus*, *Artemisia campestris*, *Rhantherium adpressum*, *Emex spinosa* et *Teucrium polium*. Les espèces les plus citées sont *Fagonia glutinosa* (39,7%) et *Cynara cardunculus* représentant (33,8%) (Figure 19).

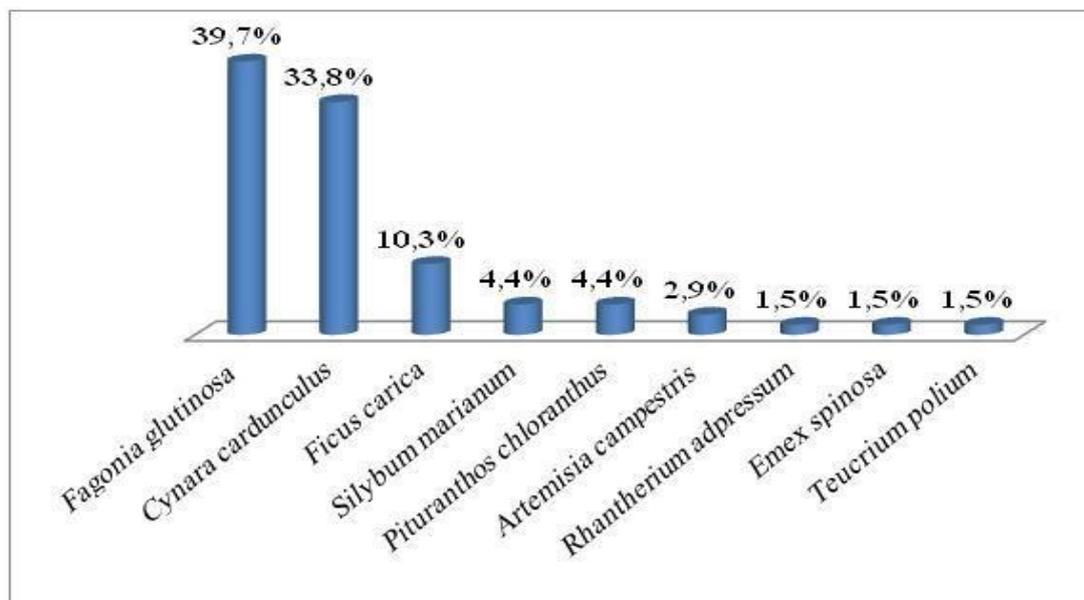


Figure 19. Fréquence de citation des plantes utilisées dans la coagulation du lait dans la région de Ghardaïa.

3.1.8. Utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon la période de récolte

La récolte des plantes dépend des parties qui seront utilisées pour préparer le fromage. Cependant, la teneur en constituant biologiquement actif varie selon le stade de développement de ces plantes (OMSG, 2003).

La Figure 20 illustre la fréquence des différentes périodes de récolte de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* par la population locale de la wilaya de Ghardaïa. La récolte de *Cynara cardunculus* se fait généralement au printemps (48%), mais peut avoir lieu en automne (35%) et en été (17%). Pour la récolte de *Fagonia glutinosa*, elle se fait généralement

au printemps et l'automne avec des proportions de 59% et 37%, respectivement, et peut avoir lieu tout au long de l'année (4%).

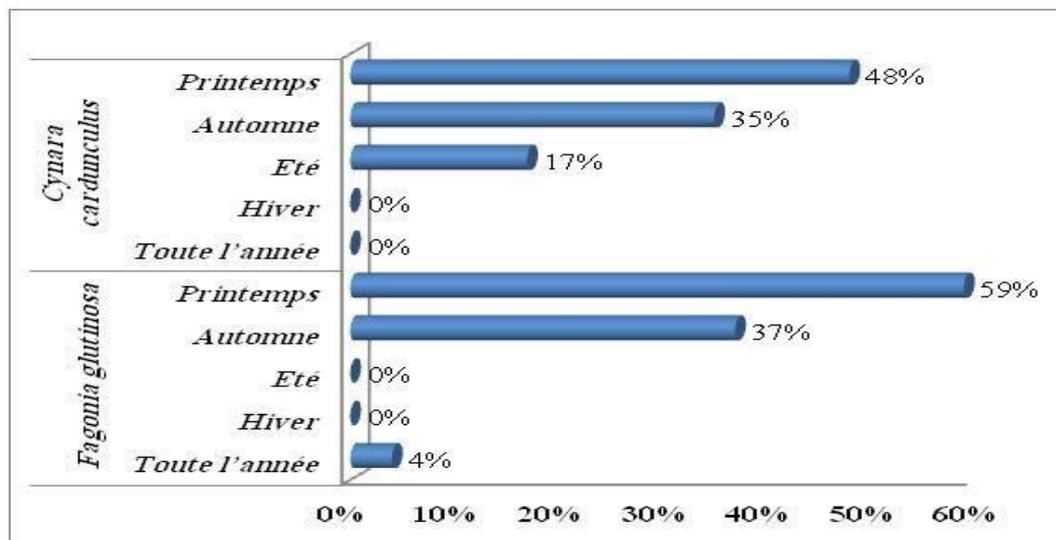


Figure 20. Périodes de récolte de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*.

D'après Chevallier (2001), la récolte des parties cibles se fait quand ils sont en pleine maturité car elles contiennent une teneur très élevée en composant actif. Ainsi les feuilles sont récoltées au printemps ou en été et l'écorce est généralement prélevée au printemps ou en automne.

3.1.9. Utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon la partie utilisée

Les résultats obtenus ont révélé que la partie la plus utilisée pour *Cynara cardunculus* est seulement les fleurs (100% des réponses), alors que les graines (44,4%) suivi par les feuilles (33,3%) sont les parties les plus utilisées pour *Fagonia glutinosa* (Figure 21).

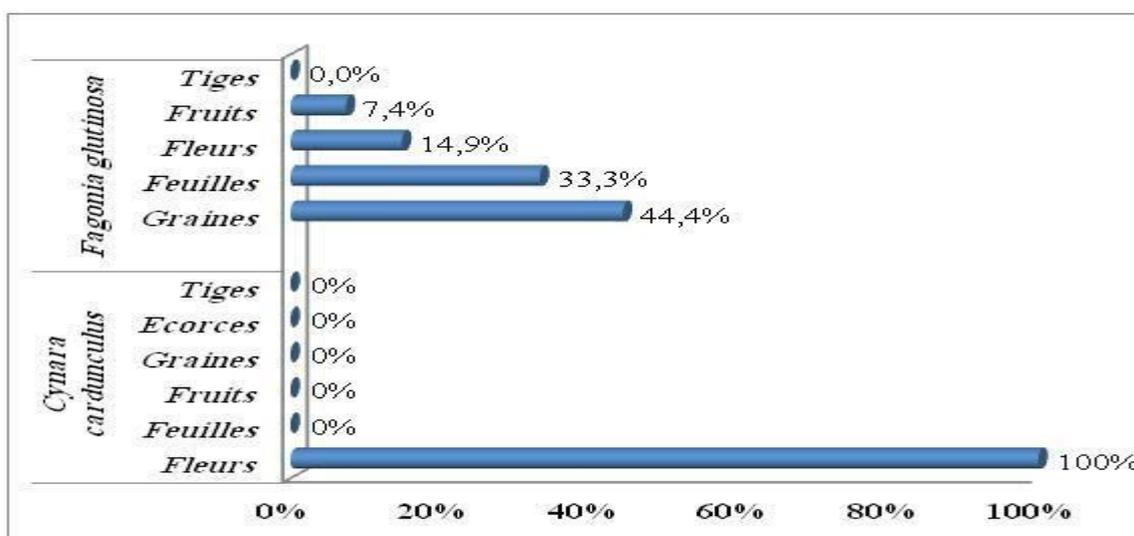


Figure 21. Parties utilisées de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait.

3.1.10. Utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon l'état de la partie utilisée

L'utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon l'état de la partie utilisée est présentée dans la Figure 22. Les résultats obtenus montrent que les deux plantes sont utilisables soit à l'état frais soit à l'état sec. Un nombre important (60,8%) des personnes questionnées utilise *Cynara cardunculus* à l'état frais ou à l'état sec selon la disponibilité, tandis que le reste de la population préfère son utilisation à l'état frais (39,1%). En ce qui concerne *Fagonia glutinosa*, 52% de la population l'utilise à l'état sec et à l'état frais (Figure 22).

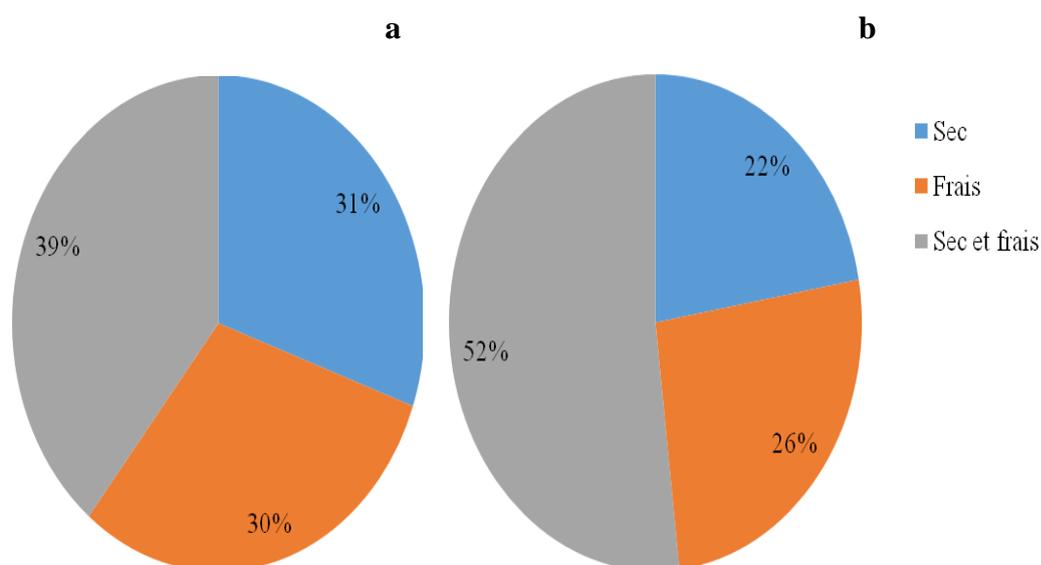


Figure 22. Utilisation de *Cynara cardunculus* (a) et *Fagonia glutinosa* (b) dans la Coagulation du lait selon l'état de la partie utilisée.

Le séchage naturel est un mode de conservation efficace en évitant la contamination de la plante cible, il permet d'augmenter sa durée de vie et de diminuer son poids afin de faciliter son transport (Bourkhiss et al., 2009).

3.1.11. Utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon la dose

L'utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon la dose est représentée dans la Figure 23. Des taux de 65% et 52% de la population étudiée utilise le *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* respectivement avec des doses non précises, alors que 35% seulement de cette population utilise *Cynara cardunculus* avec des doses bien précises et 48 % de la population utilise des doses précises pour *Fagonia glutinosa* (Figure 23).

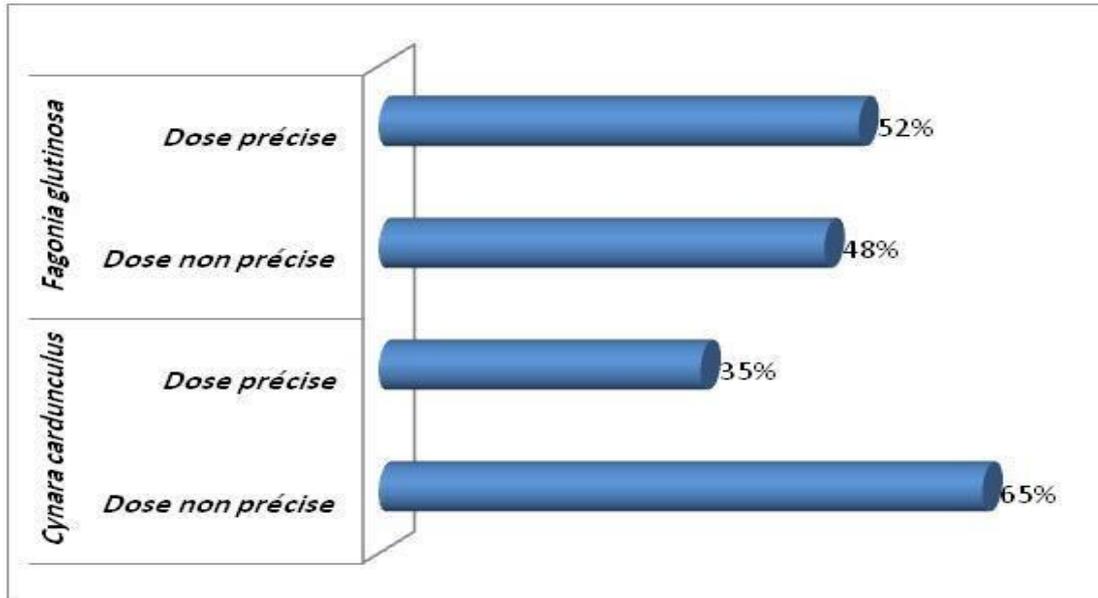


Figure 23. Utilisation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* dans la coagulation du lait selon la dose.

3.1.12. Mode de préparation de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*

Les résultats de cette étude montrent que la totalité (100%) de la population prépare *Kemariyapar* l'utilisation des plantes *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* directement dans le lait et sans les hachés. La préparation de *Kemariya* est effectuée par l'ajout de ces deux espèces végétales sans combinaison d'autres ingrédients (100%).

3.1.13. Type de lait utilisé pour la fabrication de *Kemariyapar* *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*

La Figure 24 montre les proportions du type de lait utilisé pour la préparation de *Kemariyachez* la population locale de la wilaya de Ghardaïa.

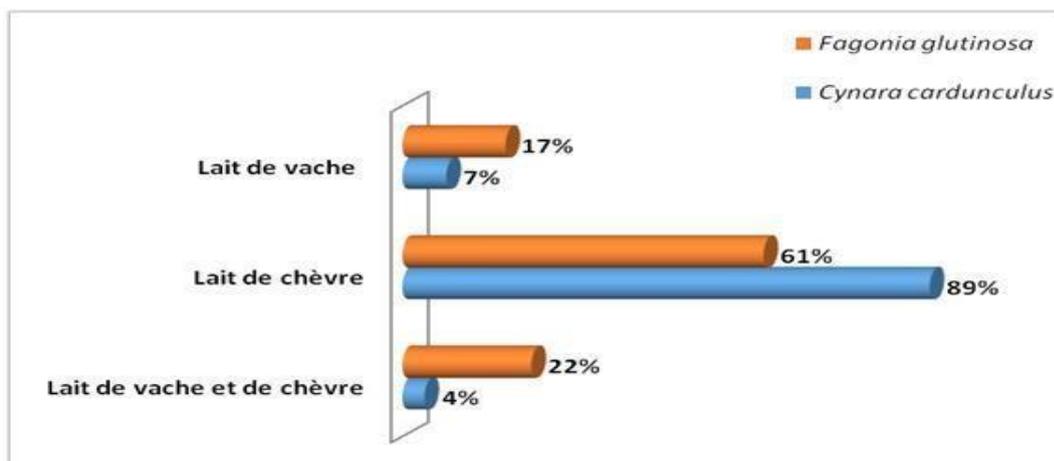


Figure 24. Types du lait utilisés dans la fabrication de *Kemariya*.

Le lait de chèvre est le plus utilisé dans la préparation de *Kemariya* par *Cynara cardunculus* (81% de la population questionnée) ou *Fagonia glutinosa* (61% de la population questionnée). A l’opposé, le lait de vache est moins utilisé par la population locale dans la fabrication de *Kemariya* (Figure 24).

3.1.14. Durée de conservation de *Kemariya*

La Figure 25 représente les différentes durées de conservation de *Kemariya* préparé par de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* chez la population locale de la wilaya de Ghardaïa.

Ces résultats montrent que la durée de conservation *Kemariya* préparé par *Fagonia glutinosa* ne dépasse pas un jour (100 % de la population), tandis que la durée de conservation de *Kemariya* préparée par *Cynara cardunculus* est moins d’un jour avec une proportion de 74%, suivi une durée d’une semaine au maximum et plus d’un jour avec une proportion de 22% et 4% respectivement (Figure 25).

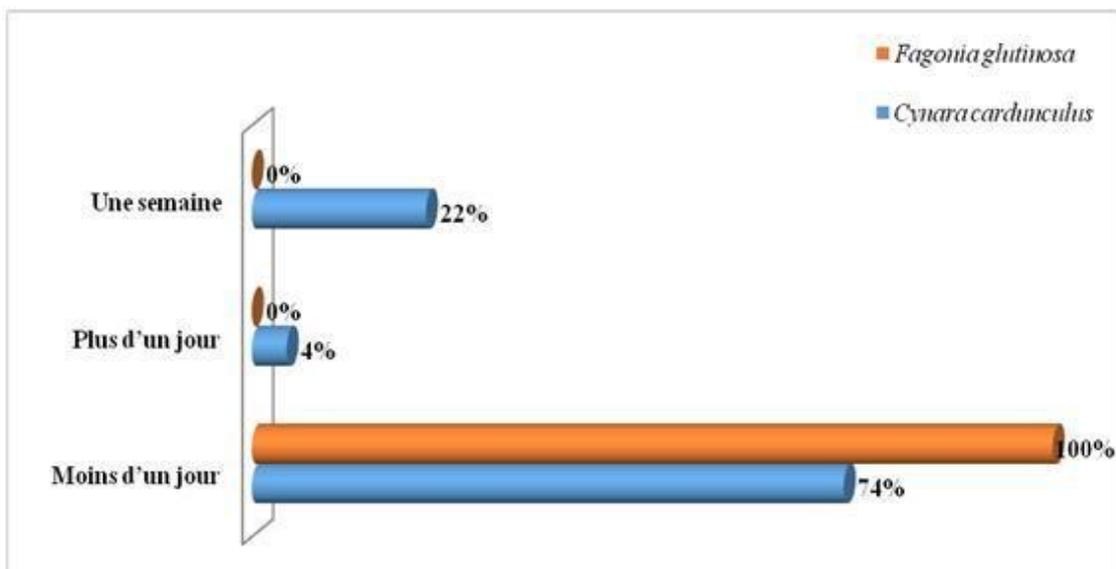


Figure 25. Durée de conservation du *Kemariya* préparée.

3.1.15. Toxicité de *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*

Les résultats de l’enquête ethnobotanique montrent que 100% de la population questionnées de la région de Ghardaïa ont mentionné que ces deux espèces ne sont pas toxiques.

Les résultats de l’étude ethnobotanique montrent la richesse et la diversité de la connaissance de l’utilisation des plantes dans la coagulation du lait dans la région de Ghardaïa. Certaines espèces sont caractérisées par un fort consensus d’utilisation dans la préparation artisanale d’un fromage traditionnel appelé *Kemariya*. Deux de ces espèces nommé *Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa* ont été analysés la suite de cette étude.

3.2. Etude phytochimique

3.2.1. Rendement d'extraction

L'extraction des principes actifs des deux espèces choisies dans cette étude est effectuée par décoction et macération. Le rendement d'extraction est calculé et les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 26.

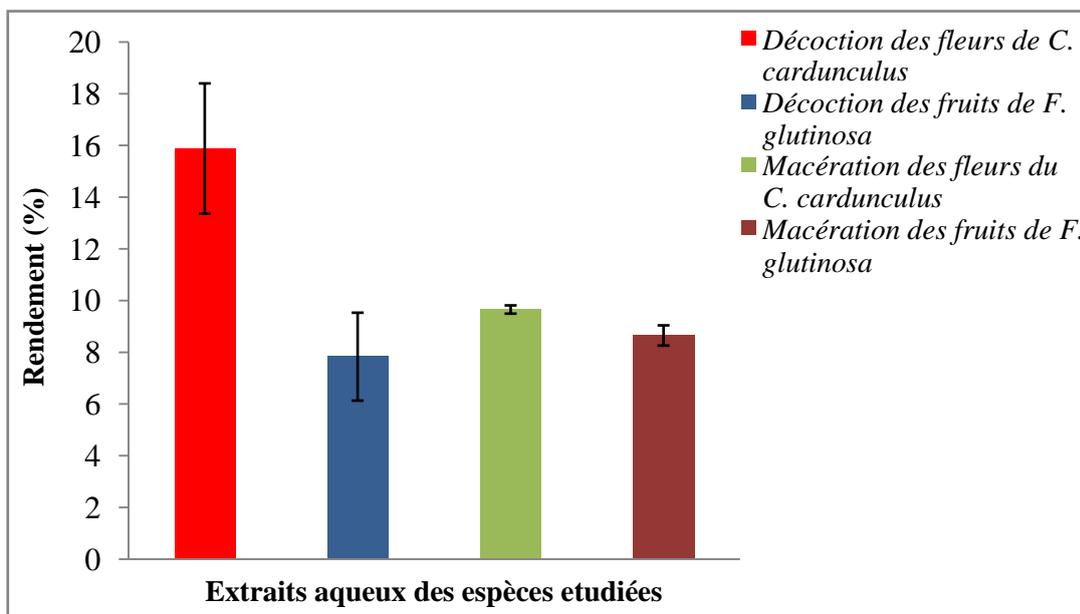


Figure 26. Rendement d'extraction de différents extraits aqueux des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*.

La Figure 26 montre des variations remarquables des rendements d'extraction en fonction de la méthode de préparation utilisée et en fonction de l'espèce végétale. Il ressort de cette figure que le rendement d'extraction le plus élevé est celui de la décoction des fleurs de *Cynara cardunculus* qui est de l'ordre de $15,89 \pm 2,52\%$, suivis par celui de la décoction de *Fagonia glutinosa*, alors que le rendement le plus faible est enregistré pour la macération des fruits de *Fagonia glutinosa* de $7,84 \pm 1,70\%$. L'analyse statistique effectuée montre qu'il y a des différences significatives entre les différents extraits en fonction de l'espèce végétale et en fonction de mode de préparation ($P < 0,048$; $\alpha < 0,05$).

L'extraction à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs en comparaison avec ceux obtenus à température ambiante ($15,89 \pm 2,52\%$ et $8,66 \pm 0,39\%$), l'élévation de la température favorise l'intensification de la solubilité et le coefficient de diffusion des molécules extraites (Jerez et al., 2006 ; Al-Farsi et al., 2007 ; Silva et al., 2007).

Le rendement de macération plus élevé que la décoction alors, le traitement thermique prolongé, comme dans le cas de la décoction, conduirait à la déperdition de certains composés thermosensibles (Chemat et Lucchesi, 2005). Il semble que les principes actifs des plantes aient tendance à être extraits avec de l'eau plus que les autres solvants (Majhenic et al., 2007). L'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) est une solution brunâtre et se caractérise par un extrait sec total égal à $6,14 \text{ g}/100\text{g}$ ces paramètres sont proches à ceux des extraits des

fleurs du genre *Cynara* rapportés par Roseiro et al. (2003), pH= 5,8, extrait sec égal à 5% (Zikiou, 2017).

D'une manière générale, les teneurs en extrait sec varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant. En plus de ces aspects quantitatifs, quel que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité des extraits, autrement dit de la bio activité de ces principes actifs (Dridi et Segeuni, 2015).

3.2.2. Conductivité et pH

Le pH et la conductivité des 4 extraits obtenus ont été déterminés à l'aide du pH-mètre et du conductivimètre respectivement. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 27 et 28

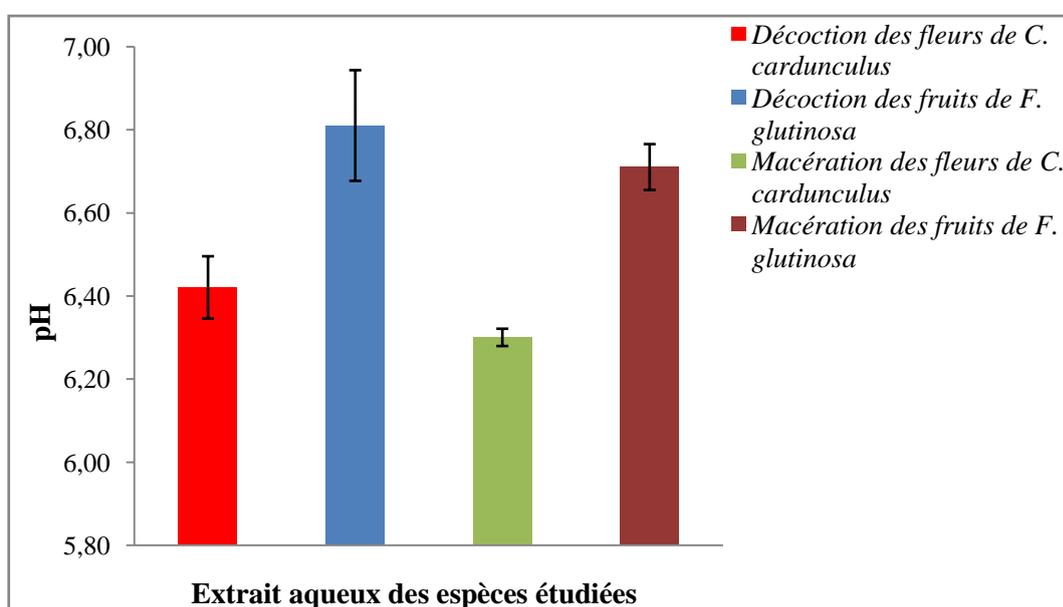


Figure 27. pH des différents extraits aqueux des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*.

Il ressort des résultats présentés dans la Figure 27 que les valeurs pH les plus élevées sont obtenues avec les extraits des fruits de *Fagonia glutinosa*, qui sont $6,81 \pm 0,13$ pour la macération et $6,70 \pm 0,055$ pour la décoction. Les extraits des fleurs de *Cynara cardunculus* ont des valeurs du pH inférieures à celles enregistrées pour les extraits des fruits de *Fagonia glutinosa* (Figure 27). Statistiquement, les différences enregistrées sont significatives en fonction de l'espèce végétale et en fonction de la méthode d'extraction ($P < 0,042$; $\alpha < 0,05$). La Figure 28 illustre les résultats obtenus pour la mesure de la conductivité des différents extraits aqueux des espèces étudiées.

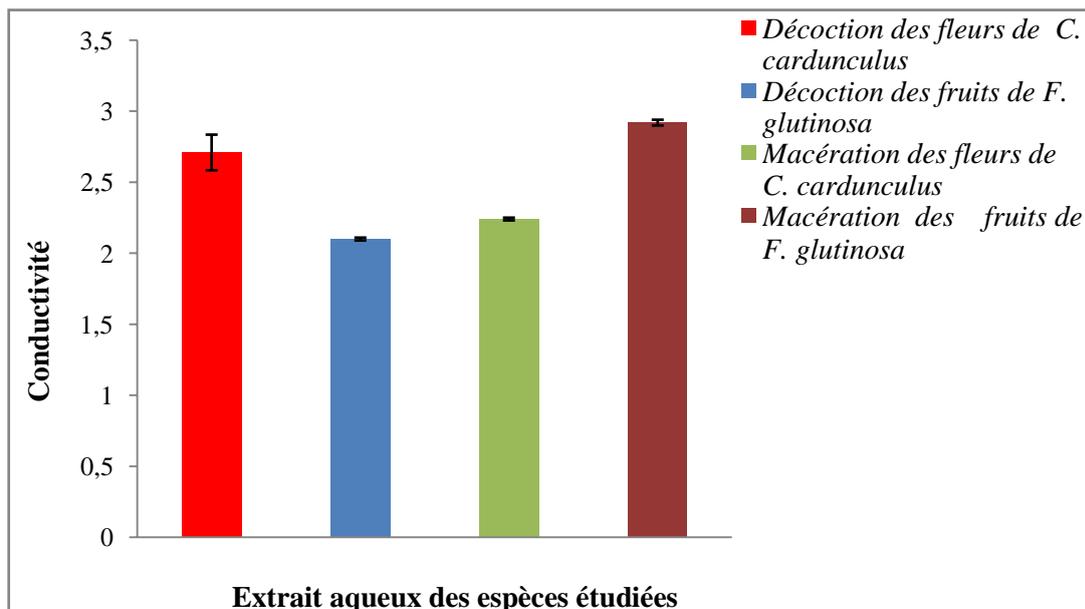


Figure 28. Conductivité des différents extraits aqueux des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*.

Il ressort des résultats présentés dans la Figure 28 que les valeurs de conductivité à (17°C) le plus élevé est celui de la macération des fruits de *Fagonia glutinosa* qui est de l'ordre de $2,92 \pm 0,02$ (ms), suivi par celui de la décoction des fleurs de *Cynara cardunculus* $2,71 \pm 0,12$ (ms) et la macération de fleurs de *Cynara cardunculus* $2,24 \pm 0,01$ (ms), alors que la conductivité le plus faible est enregistrée pour la décoction des fruits de *Fagonia glutinosa* de $2,10 \pm 0,01$ (ms).

Les analyses statistiques réalisées montrent qu'il y a des différences significatives entre les deux espèces et entre les modes d'extraction ($P < 0,029$; $\alpha < 0,05$).

3.2.3. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique réalisé sur les différents extraits des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa* a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites et les résultats obtenus sont illustrés dans le Tableau 12.

Il ressort de ces résultats qu'il y a des diversités des composés qui sont présents dans les différents extraits. La richesse des extraits dépend de l'espèce choisie et de la méthode de préparation. En effet, la décoction des fleurs de *C. cardunculus* est caractérisée par la présence d'un nombre important des métabolites (les tanins, les Saponosides, les terpénoïdes, les coumarines, les composés réducteurs, protéines). Les extraits obtenus par macération pour les deux espèces sont les plus pauvres avec la présence de quatre métabolites (Tableau 12).

Tableau 12. Résultats du criblage phytochimique des différents extraits de fleurs de *Cynaracardunculus* et des fruits de *Fagoniaglutinosa*.

Composé recherché	Macération des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i>	Macération des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>	Décoction des fleurs de <i>Cynara cardunculus</i>	Décoction des fruits de <i>Fagonia glutinosa</i>
Tanins hydrolysable	-	+	+	+
Tanins catéchiques	+	-	+	-
Flavonoïdes	-	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-	-
Stéroïdes	-	-	-	-
Terpénoïdes 1^{er} test	-	-	-	-
Terpènes 2^{ème} test	+	-	+	-
Saponosides	-	+	+	+
Coumarines	-	-	+	-
Quinones libres	-	+	-	+
Composées réducteurs	+	-	+	-
Protéines	+	+	+	+

+ : présence ; - absence

Il ressort de ces résultats qu'il y a des diversités des composés qui sont présents dans les différents extraits. La richesse des extraits dépend de l'espèce choisie et de la méthode de préparation. En effet, la décoction des fleurs de *C. cardunculus* est caractérisée par la présence d'un nombre important des métabolites (les tanins, les saponosides, les terpénoïdes, les coumarines, les composée réducteur, protéines) Les extrits obtenus par macération pour les deux espèces sont les plus pauvres avec la présence de quatre métabolites (tableau 12).

Selon Iserin (2001), les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999). Selon (Hanen et al., 2008). Tanins condensés en extrait méthanolique de *Cynara cardunculus* étaient présents dans toutes les parties étudiées en particulier dans les fleurs.

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken et al., 2007).

Selon les auteurs Melek et al. (1996) ; Shaker et al. (1999) ; Khalik et al. (2000) et Melek et al. (2000), confirme la présence des saponines dans les parties aériennes du genre de *Fagonia* (*Fagonia lutinosa*, *Fagonia mollis*, *Fagonia indica* et *Fagonia cretica*).

La variation de la composition chimique des plantes peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la situation géographique, l'organe prélevé, la période, le moment de récolte et les conditions de stockage (Kone et al., 2009).

3.2.4. Quantification de certains métabolites

3.2.4.1. Métabolites primaires (teneur en protéines)

La teneur en protéines est déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (1976). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 29.

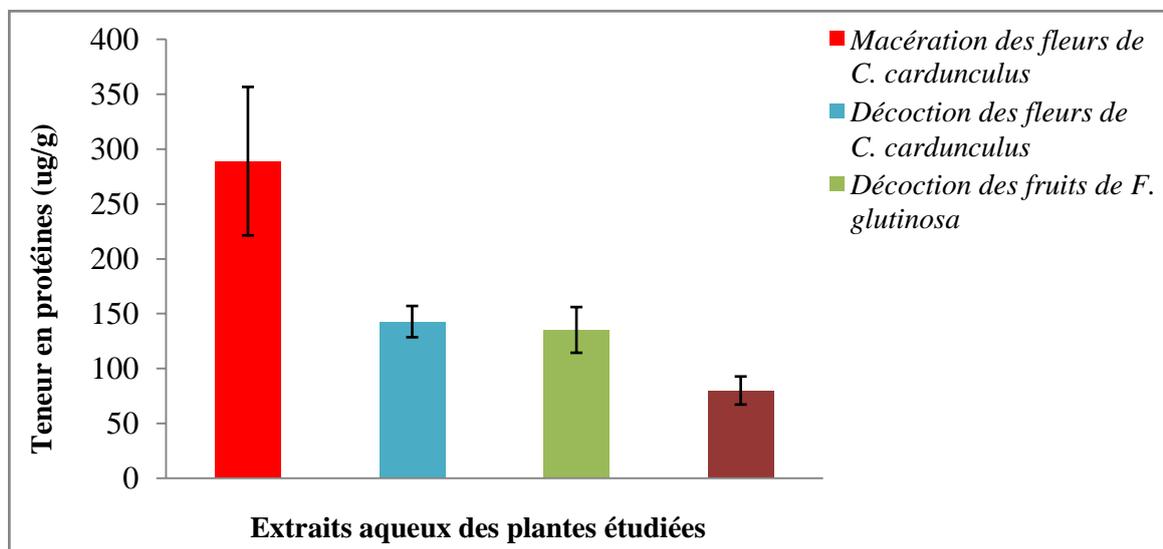


Figure 29. Teneur en protéines des différents extraits aqueuse des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*.

Cette figure montre que l'extrait des fleurs de *Cynara cardunculus* en particulier celui obtenu par la macération est le plus riche en protéines en comparaison avec les autres extraits avec une concentration égale à $289,82 \pm 67,72 \mu\text{g/g}$. Par contre, la macération des fruits de *Fagonia glutinosa* a la teneur en protéines la plus faible ne dépassant pas $79,75 \pm 12,80 \mu\text{g/g}$ (Figure 29). Les analyses statistiques réalisées ont montré que les différences ne sont pas significatives entre les différents extraits et aussi entre les espèces ($P < 0,283$; $\alpha < 0,05$).

Les différences notées entre les différentes préparations peuvent être expliquées par le fait que la température élevée fait dénaturer les protéines et l'exposition des groupements hydrophobes à la surface ce qui conduit à l'agrégation et à la précipitation de ces molécules en comparaison avec la température ambiante (Cheng et al., 2016).

Pour *Fagonia glutinosa* le taux des protéines dans l'extrait obtenu par décoctions est plus élevé que celui de la macération. Ceci peut être expliqué par le fait que les protéines sont thermostables ou la température élevée permet l'extraction des molécules qui peuvent réagir avec le bleu de Coomassie. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (1976) en utilisant le bleu de Coomassie (G-250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les acides aminés basiques (notamment l'arginine) et aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) des protéines pour former un complexe de couleur bleue (Telli, 2017). Selon Zikiou, (2017), l'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) est une solution brunâtre et se caractérise par une teneur en protéines de 26 mg/ml.

3.2.4.2. Métabolites secondaires (teneur en polyphénols totaux)

La quantité des polyphénols totaux des différentes préparations a été évaluée et les résultats sont présentés dans la Figure 30.

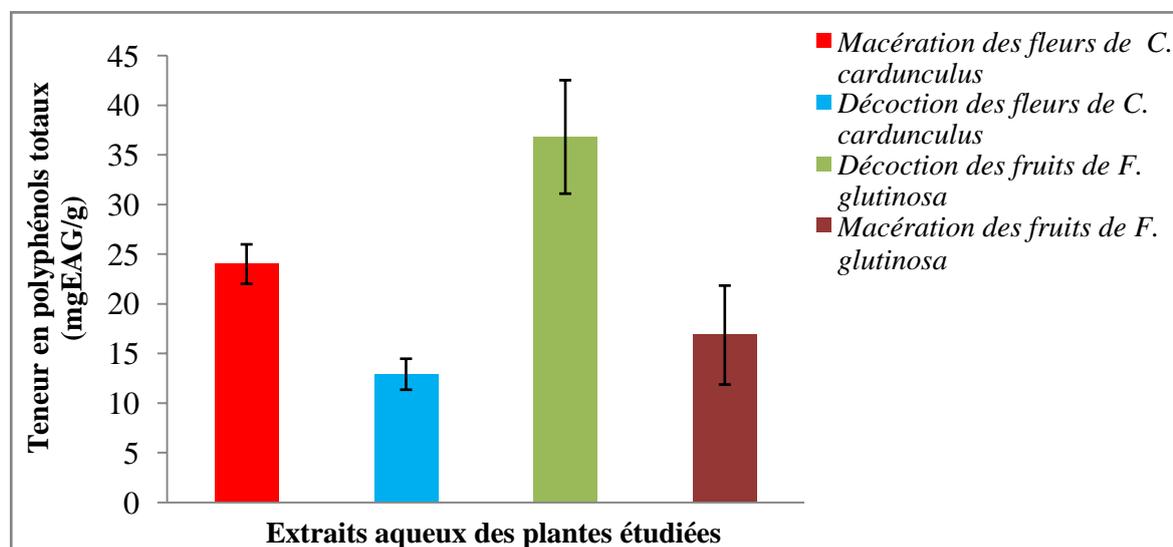


Figure 30. Teneur en polyphénols totaux des différents extraits aqueux des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*.

D'après ces résultats, nous constatons que les teneurs en polyphénols totaux les plus élevées sont enregistrées pour les extraits des fruits de *Fagonia glutinosa*, qui sont $36,81 \pm 5,71$ mg EAG/g pour la décoction et $16,87 \pm 4,98$ mg EAG/g pour la macération en comparaison avec celles des extraits des fleurs de *Cynara cardunculus* (Figure 30). La comparaison entre les différentes préparations montre que les différences enregistrées entre les deux espèces et les modes d'extraction sont significatives ($P < 0,042$; $\alpha < 0,05$).

Les différences notées entre les différentes préparations peuvent être expliquées par fait que le type d'extractions (macération et décoction). Les conditions d'extraction et les solvants utilisés ont des effets remarquables sur le taux des composés phénoliques extraits (Bammou et al., 2015), qui entraînent des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Benzaoui et Houari, 2016).

Aussi, la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également peut réagir encore avec les acides aminés aromatiques des protéines (surtout avec le tryptophane), les glucides réducteurs comme le glucose et le fructose et la vitamine C (problèmes d'interférences), donnant un taux phénolique apparent élevé (Vuorela, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006 ; Gomez- Caravaca et al., 2006; Tawaha et al., 2007).

Hanen et al. (2008) ont montré que tous les organes de *Cynara cardunculus* sont riches en composés phénoliques (entre 7,5 et 15 mg EAG/g PS) avec des taux comparables aux résultats obtenus dans notre étude. En ce qui concerne les extraits aqueux de *Fagonia glutinosa*, il apparaît que nos résultats sont mieux en comparaison avec ceux obtenus pour les

extraits méthanoliques de trois espèces de *Fagonia* obtenus par Rama et al. (2019). Aussi, Alali et al. (2007) ont obtenus des teneurs faibles en polyphénols totaux pour les extraits aqueux et méthanoliques de *Fagonia glutinosa* (14,2 mg EAG/g et 7,9 mg EAG/g respectivement). La quantité des polyphénols dans les plantes dépend de nombreux facteurs intrinsèque (génétique) et extrinsèque (environnemental, récolte, séchage et stockage) (Bammou et al., 2015).

3.3. Coagulation du lait

3.3.1. Détermination des conditions optimales de la coagulation du lait

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action des extraits des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur son activité coagulante.

3.3.1.1. Recherche du pH optimal

Le pH optimal est déterminé par la mesure du temps de l'apparition des premiers flocons des extraits coagulants en 3 valeurs de pH 5,5 ; 6 et 6,5

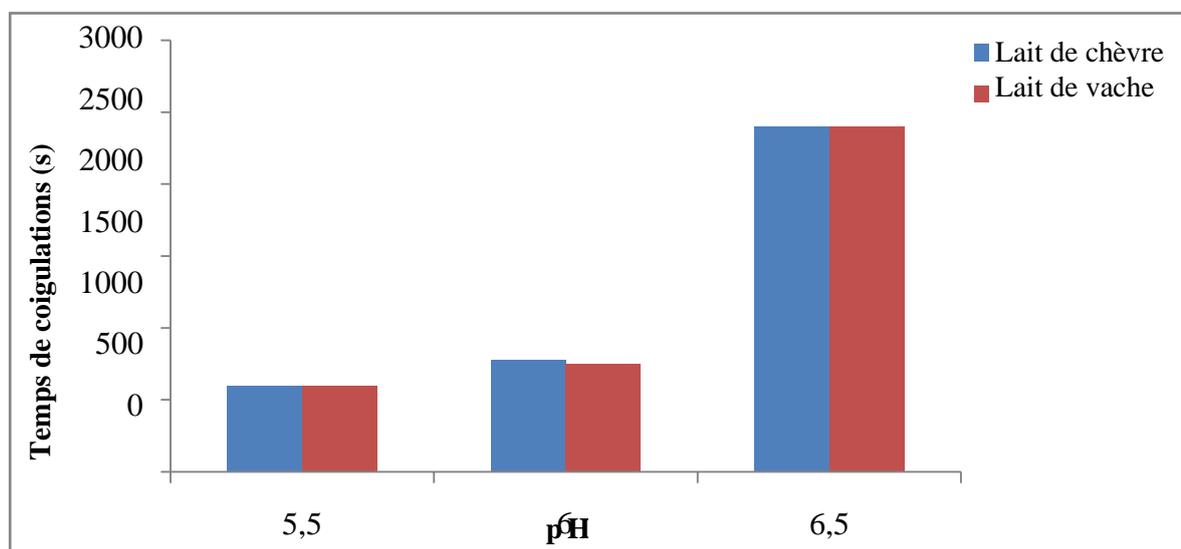


Figure 31. Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus*.

Les résultats illustrés dans la figure ci-dessus indiquent une diminution de l'activité coagulante de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus* au fur et à mesure que le pH du lait de vache et de chèvre augmente. Alors que, pour l'extrait des fleurs de cardon l'activité coagulations augment a pH 5.5 avec une diminution de temps, jusqu'à ph 6,5 la coagulation diminue c'est à dire le pH optimal de l'extrait de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus* 5,5.

Selon Ammouche (1985), l'activité de l'extrait d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) même genre de *Cynara cardunculus* baisse à pH optimum égal 5,6.

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

3.3.1.2. Recherche de la température optimale

La température optimale est déterminée par la mesure du temps de coagulation des extraits coagulants des espèces étudiées en 3 valeurs de température (30, 35 et 40 °C) en utilisant le lait de chèvre et le lait de vache.

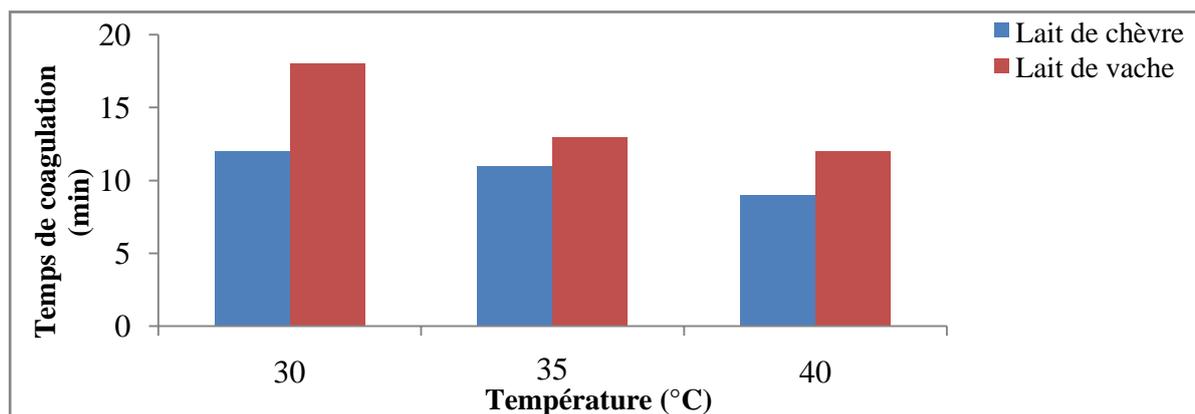


Figure 32. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la macération des Fruits de *Fagonia glutinosa*

Les résultats illustrés par la figure 32 indiquent l'augmentation de l'activité coagulante de la macération des fruits *Fagonia glutinosa* avec l'augmentation de température de lait de chèvre et le lait de vache.

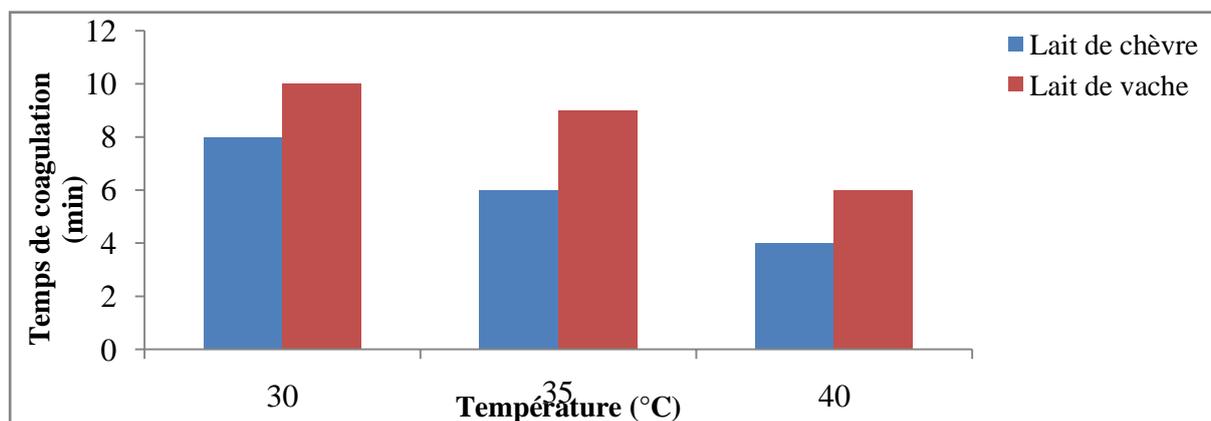


Figure 33. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la décoction des fruits de *Fagonia glutinosa*.

Les résultats illustrés par la Figure33 indiquent l'augmentation de l'activité coagulante de la décoction des fruits de *Fagonia glutinosa* à mesure que la température du lait de vache et de chèvre augmente.

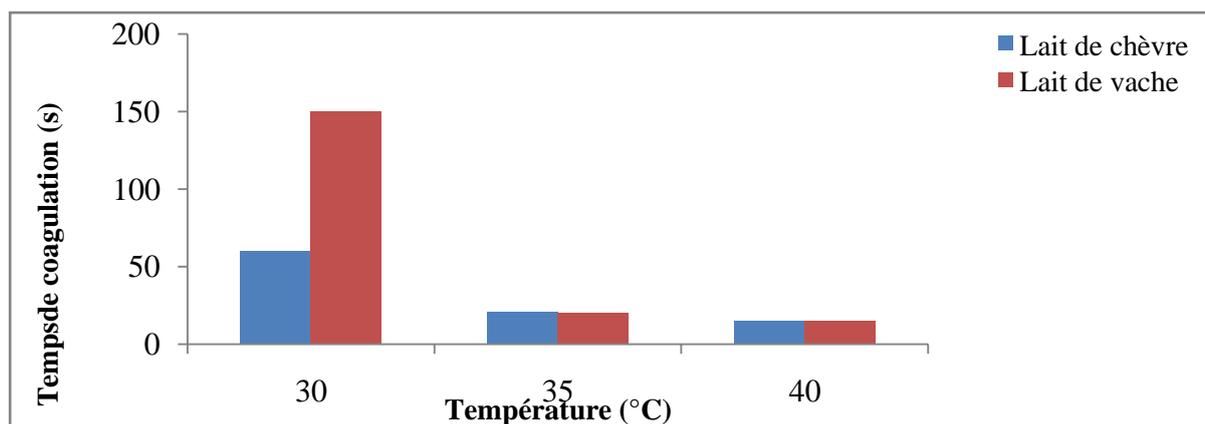


Figure 34. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus*

Les résultats illustrés par la Figure 34 indiquent l'augmentation de l'activité coagulante la macération des fleurs de *Cynara cardunculus* au fur et à mesure la température que du lait de vache et de chèvre augmente.

Nous constatons un comportement différent des trois préparations extraites en fonction de la température appliquée. Les meilleurs résultats sont obtenus à 40 °C pour tous les extraits des espèces testées (*Cynara cardunculus* et *Fagonia glutinosa*). Selon Zikiou(2017), la température optimale de l'activité coagulante de l'extrait aqueux brutdes fleurs l'optimum de cardon (*Cynara cardunculus*L) est égal à 60°C.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs, qui ont précisé que les protéases d'origine végétales sont très thermostables, et elles ont généralement une température optimum d'activité beaucoup plus élevée que celle des protéases d'origine animale (Ammouche, 1985 ; Roseiro et al., 2003 ; Sidrach et al., 2005 ; Chazarra et al., 2007 ; Claverie et Hernandez, 2007).

3.3.1.3. Recherche de la concentration optimale en CaCl₂

L'addition du chlorure de calcium au lait, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et accroître la fermeté de coagulum obtenu (Eck et al., 1997).

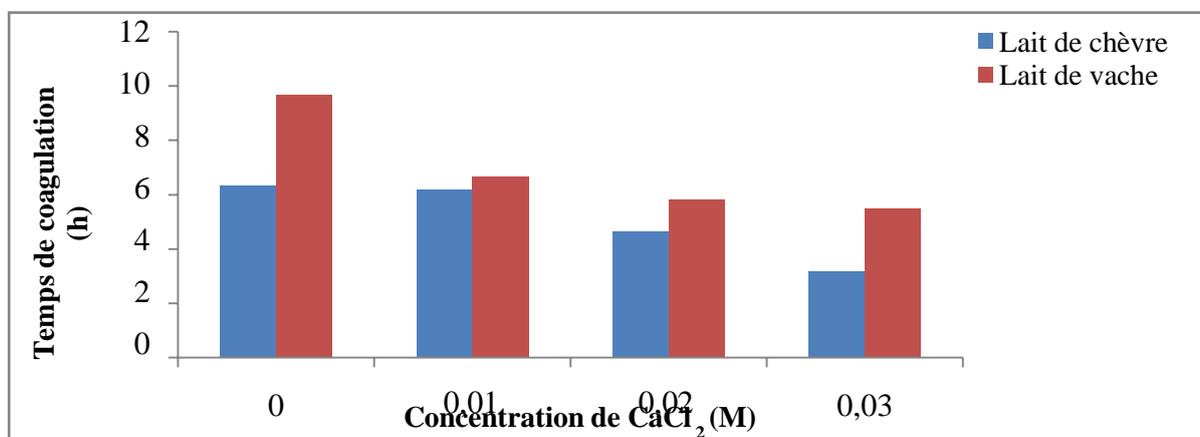


Figure 35. Effet de la concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante de la macération des fruits de *Fagonia glutinosa*.

Les résultats illustrés par la Figure 35 indiquent l'augmentation de l'activité coagulante de la macération des fruits *Fagonia glutinosa* a différentes concentrations de CaCl_2 et lait de vache et de chèvre.

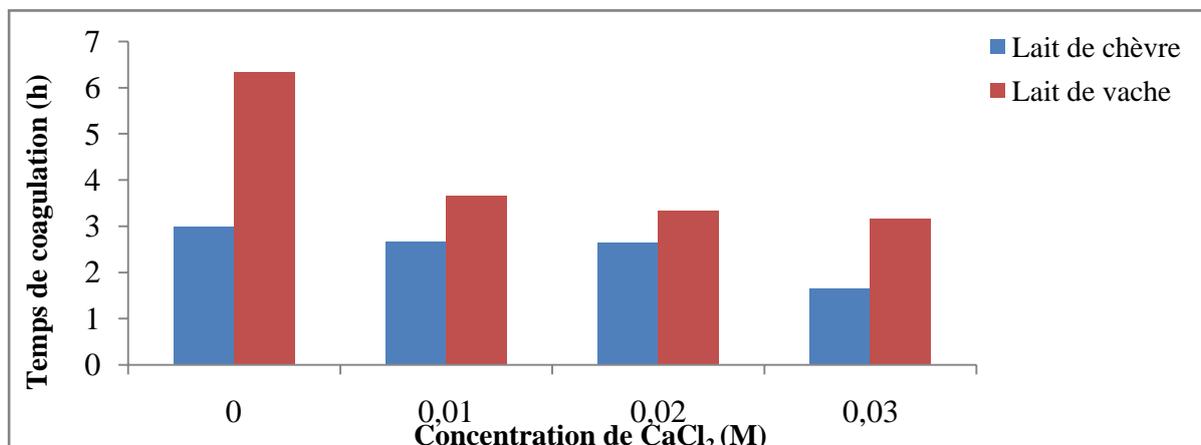


Figure 36. Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de la décoction des Fruits de *Fagonia glutinosa*.

Les résultats illustrés par les figures 36 indique l'augmentation de l'activité coagulante de la décoction des fruits *Fagonia glutinosa* a différentes concentrations de CaCl_2 et lait de vache et de chèvre).

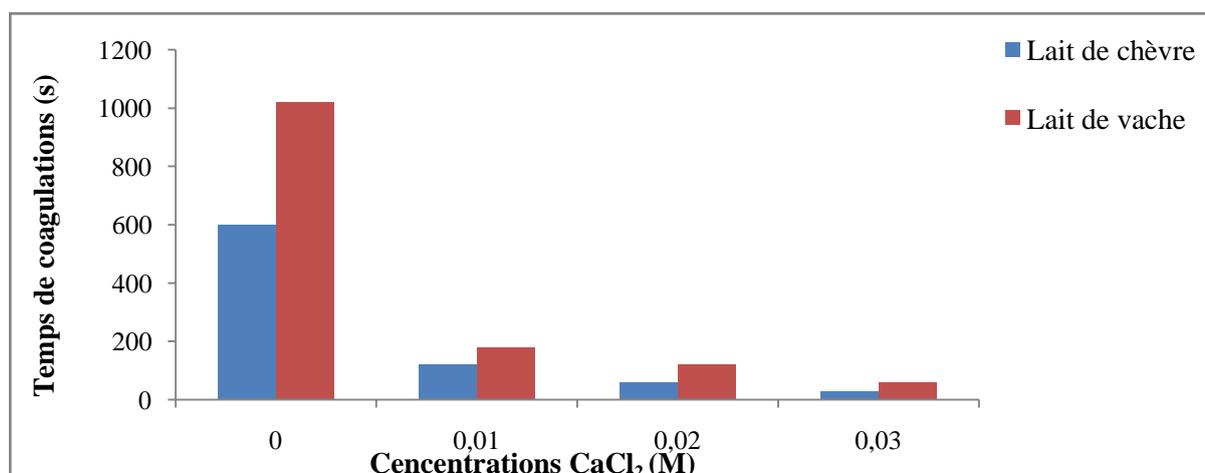


Figure 37. Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus*.

Les résultats illustrés par la Figure 37 indiquent l'augmentation de l'activité coagulante de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus* à différentes concentrations de CaCl_2 avec lait vache et de chèvre.

D'après ces résultats, nous constatons que dans l'intervalle de concentration du lait en CaCl_2 utilisé en fromagerie (0,01 à 0,03M), l'activité coagulante augmente en fonction de la concentration en CaCl_2 avec un optimum à 0,03M pour les trois préparations aqueuses. Ces valeurs sont proches de ceux trouvés par Zikiou (2017) qui a montré que l'activité coagulante augmente en fonction de la concentration en CaCl_2 avec un optimum à 0,02M pour l'extrait de macération des fleurs de *Cynara cardunculus*.

3.4. Stabilité des extraits des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa*

La stabilité des extraits aqueux des fleurs de *Cynara cardunculus* et des fruits de *Fagonia glutinosa* est étudiée et les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 38, 39 et 40.

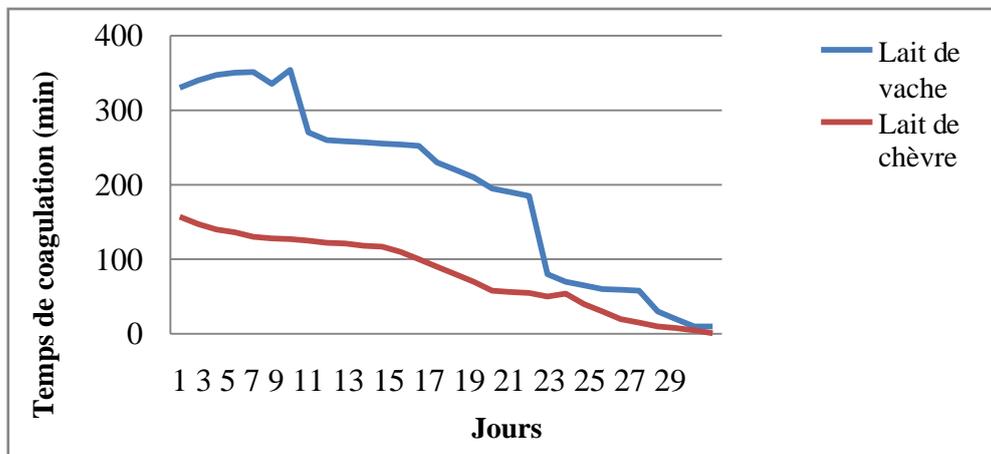


Figure 38. Stabilité de la décoction des fruits de *Fagonia glutinosa*.

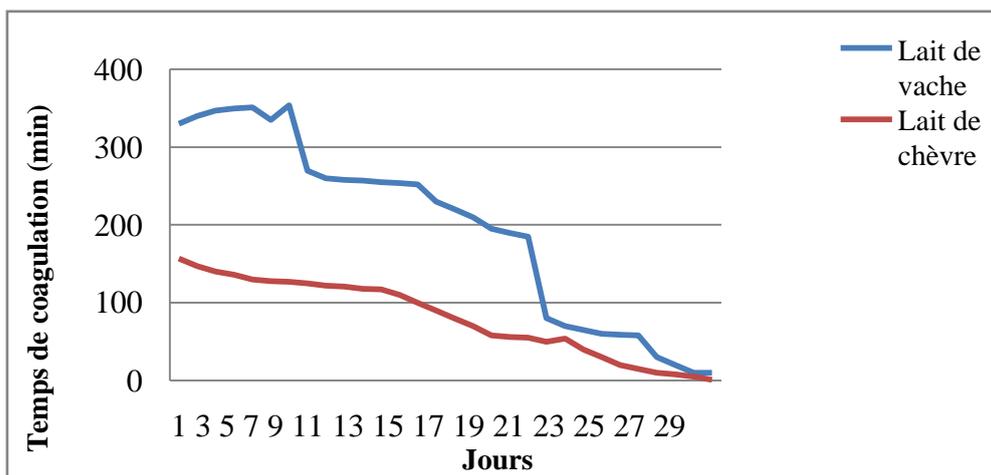


Figure 39. Stabilité de la macération des fruits de *Fagonia glutinosa*.

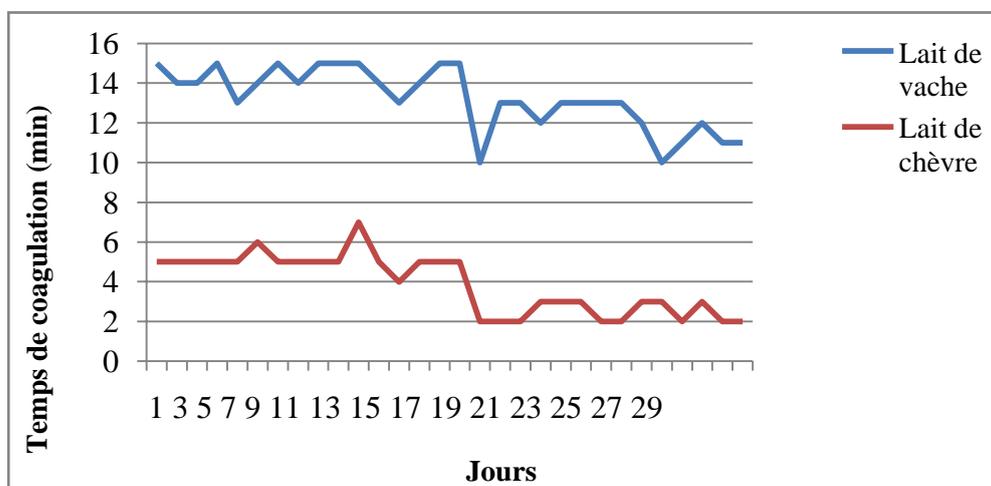


Figure 40. Stabilité de la macération des fleurs de *Cynara cardunculus*.

Il ressort des résultats présentés dans les Figures 38, 39 et 40 que les extraits aqueux ne peuvent pas être conservés pendant une longue durée (30 jours). Selon ces figures, les extraits aqueux obtenus par macération et décoction des espèces étudiées sont plus ou moins stables pendant les premières dizaines de jours. Après ces 10 jours, nous constatons que l'activité coagulante augmente (temps de coagulation diminue) à cause de développement des champignons dans les extraits.

Ces résultats montrent la nécessité de trouver un moyen de conservation meilleur que la conservation par réfrigération à +4°C.

En général, l'extrait aqueux obtenu par décoction doit être utilisé le jour même de la préparation. La macération aqueuse peut être conservée seulement 2 à 4 jours à +4°C (Ammouche, 1985).

Selon Adoui (2007), la conservation de l'activité coagulante de l'extrait clarifié est meilleure à l'état congelé qu'à l'état réfrigéré. L'extrait congelé a conservé 72,3 % de son activité initiale, après 30 jours de conservation, contre 4,3 % seulement pour l'extrait réfrigéré. La perte d'activité de l'extrait réfrigéré est notable durant les deux premières semaines de conservation.

3.5. Analyses physico-chimiques des laits de vache et lait de chèvre crus et du *Kemariya*

La qualité physico-chimique globale, du lait de vache collecté de la région de Zelfana et le lait de chèvre collecté de Dahyet Bendhahoua et du kemariya obtenu après sa fabrication en utilisant les extraits de *C. cardunculus* et *F. glutinosa*, a été évaluée et les résultats sont regroupés dans les figures ci-après.

3.5.1. pH du lait cru

La mesure de pH du lait est faite à l'aide d'un pH mètre est effectuée à la température de +20°C. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 41.

Selon la Figure 41, il apparaît que le pH du lait bovin est supérieur à celui du lait caprin, qui sont de l'ordre de 6,78 et 6,42 ; respectivement. Les valeurs du pH rapportés dans cette étude sont situées dans l'intervalle de 6,6 et 6,8 qui caractérise un lait normal et stable (Vignola, 2002). Selon Gaddour et al. (2014), les valeurs du pH de différents échantillons du lait caprin sont entre 6,68 et 6,77 qui sont supérieures au pH du lait caprin obtenu dans notre étude. Cependant, la valeur du pH du lait bovin (6,76) est comparable à notre résultat (Gaddour et al., 2014).

Le pH ainsi que le goût du lait peuvent dépendre de la nature des fourrages, du facteur génétique, de l'état sanitaire de l'animal et de la disponibilité de l'eau (Gaddour et al., 2014). D'après Labioui (2009), le pH et l'acidité dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions, mais aussi des conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et de son activité métabolique.

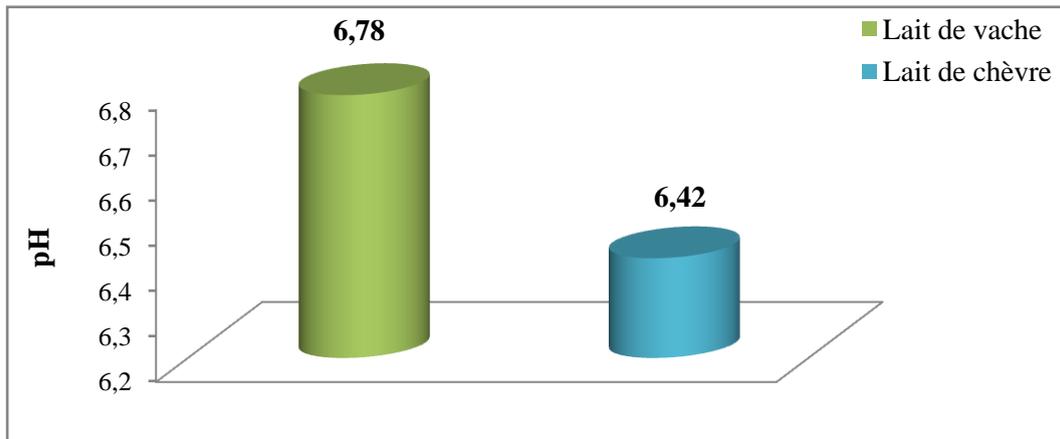


Figure 41. pH du lait de vache et du lait de chèvre.

3.5.2. pH du *Kemariya*

Les valeurs de pH du *Kemariya* fabriquée à partir de laits vaches et de chèvre par l'utilisation des différents extraits aqueux des fleurs de *C. cardunculus* et les fruits de *F. glutinosa* sont représentés dans la Figure 42.

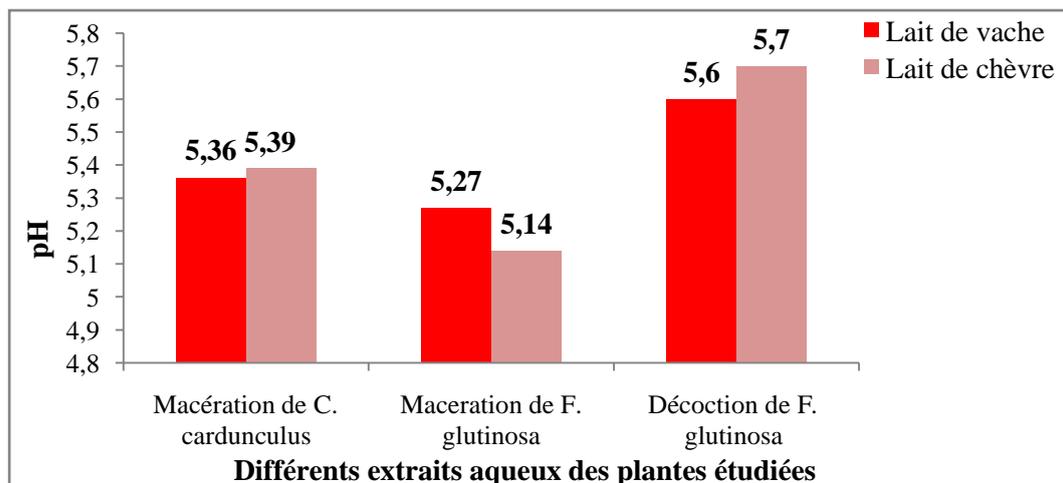


Figure 42. Valeurs du pH du *Kemariya*.

Ces résultats révèlent que les valeurs du pH les plus élevées sont obtenues avec *Kemariya* fabriquée à partir du lait de vache et de chèvre en utilisant la décoction de *F. glutinosa*, qui sont égales à 5,6 pour *Kemariya* obtenu de lait de vache et 5,7 pour celui obtenu de lait de chèvre. Les valeurs de pH les plus faibles sont enregistrées pour *Kemariya* préparé par l'utilisation de la macération de *F. glutinosa* pour le lait de vache (5,27) et le lait de chèvre (5,14). *Kemariya* obtenus par l'ajout de la macération de *C. cardunculus* ont des valeurs de pH intermédiaires entre les deux premiers (Figure 42). Les valeurs obtenues dans le cadre de notre étude sont proches de ceux trouvés par Zikiou (2017). L'utilisation de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon a donné un fromage avec un pH de 4.89.

Selon Benderouich (2009), le pH du *Kemariya* est légèrement acide pour celle produite à partir du lait bovin avec un pH de l'ordre de 5,09 et pour celui du lait caprin est de l'ordre de 5,20.

Les valeurs du pH obtenus de la *Kemariya* est nettement supérieure à celle du fromage traditionnel Bouhezza (pH= 4,0) (Aissaoui Zitoun, 2003). Aussi, il semble que la différence entre les valeurs de pH n'est pas très importante du point de vue propriétés organoleptiques. Cette légère acidité du *Kemariya* peut être expliquée par l'acidité produite lors de la fermentation par les bactéries lactiques (Gelais et al., 2002).

3.5.3. Taux de matière sèche du lait cru

Les taux de la matière sèche ont été déterminées pour les échantillons du lait cru utilisés dans cette étude. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 43.

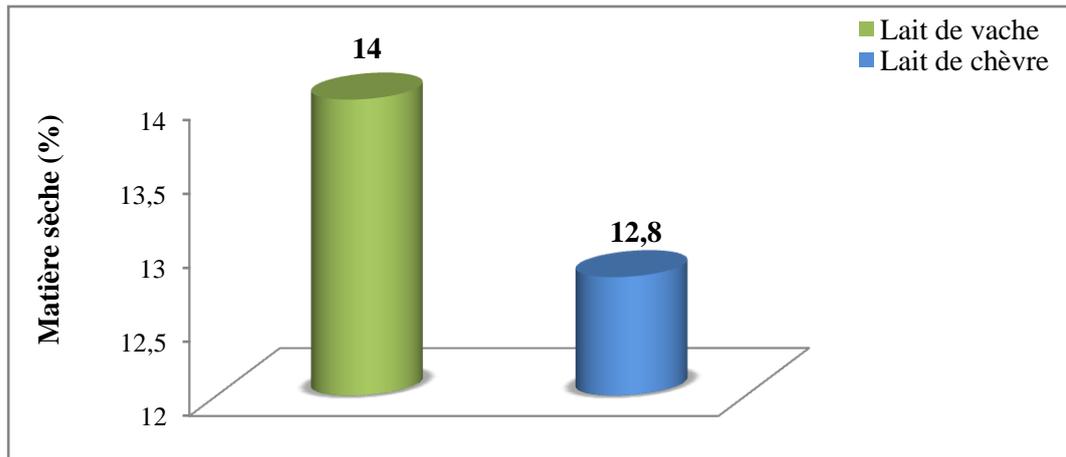


Figure 43. Teneur en matière sèche du lait bovin et du lait caprin.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en matière sèche du lait de vache (14%) est plus élevée que celle du lait de chèvre (12,5%). Le lait de vache est plus riche en matière sèche que le lait de chèvre, ces valeurs sont très proche des valeurs trouvées dans la norme algérienne de J.O.R.A (1993) avec l'intervalle de taux de matière sèche standard de 11 à 12,5 % pour le lait de vache. Pour le lait de chèvre, les teneurs en matière sèche enregistrées dans notre travail sont nettement inférieures à celle évoqué par Alais (1984) qui a été trouvé 13%.

Le taux de matière sèche de lait dépend de l'alimentation. En effet, l'élevage des vaches laitières se base sur une alimentation riche constituée de concentrés et des compléments alimentaires, tandis que l'élevage caprin se base majoritairement sur les fourrages et les résidus des récoltes (Saoucha, 2017). Selon Vignola (2002), les principaux facteurs de variation sont liés soit à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation et état sanitaire... etc.) soit au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat et alimentation). Alais (1984), a signalé que la teneur en extrait sec du lait se diffère selon l'espèce.

3.5.4. Taux de matière sèche du *Kemariya*

Les valeurs de la matière sèche du *Kemariya* fabriquée à partir de laits vache et de chèvre par l'utilisation des différents extraits aqueux des fleurs de *C. cardunculus* et les fruits de *F. glutinosa* sont représentés dans la Figure 44.

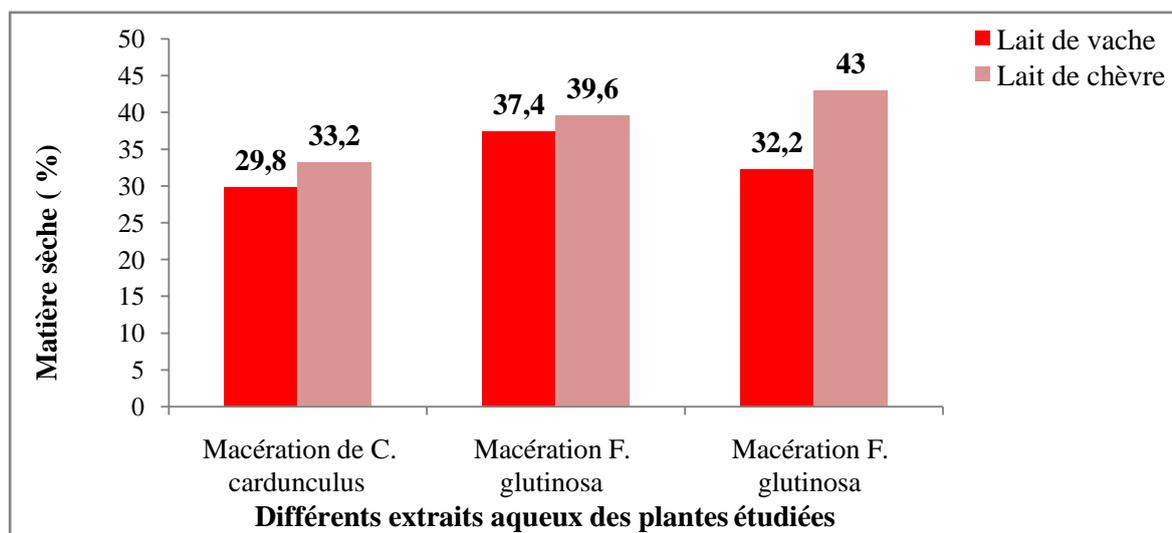


Figure 44. Valeurs de matière sèche du *Kemariya*.

Les résultats obtenus dans la Figure 44 montrent que la teneur en matière sèche la plus importante est enregistrée pour *Kemariya* obtenu du lait caprin en utilisant la décoction de *F. glutinosa* (43%), suivi par celui fabriqué par la macération de *F. glutinosa* pour le lait caprin (39,6), alors que *Kemariya* de lait de vache produit par l'ajout de la macération de *C. cardunculus* a le taux le faible de la matière sèche (29,8%).

Les valeurs de matière sèche obtenue pour *Kemariya* sont caractérisées par des valeurs variables. Cette variabilité dépend du lait utilisé (de vache ou de chèvre) et la composition de la présure végétale utilisée (*C. cardunculus* et *F. glutinosa*). La variabilité de la teneur en matière sèche dépend de plusieurs facteurs : stade de lactation, état sanitaire de l'animal, les conditions climatiques et le système d'alimentation (Pougheon, et al., 2001).

3.5.5. Teneur en cendres totales du lait cru

La teneur en cendre est déterminée par incinération au four à moufle à une température de 550 °C pendant 4 à 6 h. les résultats obtenus sont la figure suivante.

D'après les résultats de la Figure 45, nous constatons que le taux en cendre est plus élevé (0,59%) en comparaison avec celui de lait de vache (0,4). Ces résultats montrent que le lait caprin est plus riche en matière minérale par rapport au lait bovin. La composition minérale est variable selon les espèces, les races, le moment de lactation, les facteurs zootechniques et l'état sanitaire de l'animal (Remeuf, 1994). Les effets zootechniques résultant des effets sanitaires : variation de la concentration cellulaire du lait, de la production laitière du troupeau (Serieys, 2006).

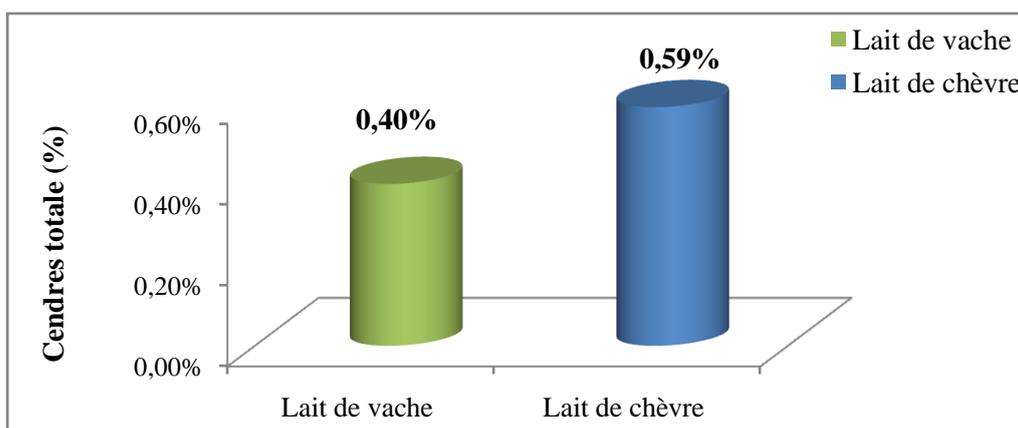


Figure 45. Teneur en cendres totales du lait bovin et du lait caprin.

D'après Yagil (1985), le taux de sels minéraux du lait varie selon l'apport alimentaire, il est plus faible dans le lait d'animaux déshydratés. Le lait de chèvre est légèrement riche en potassium, calcium, magnésium, chlore et fer que le lait vache (Saoucha, 2017).

3.5.6. Teneur en cendres totales du *Kemariya*

Les taux des cendres du *Kemariya* produites ont été déterminés et les résultats sont résumés dans la Figure 46

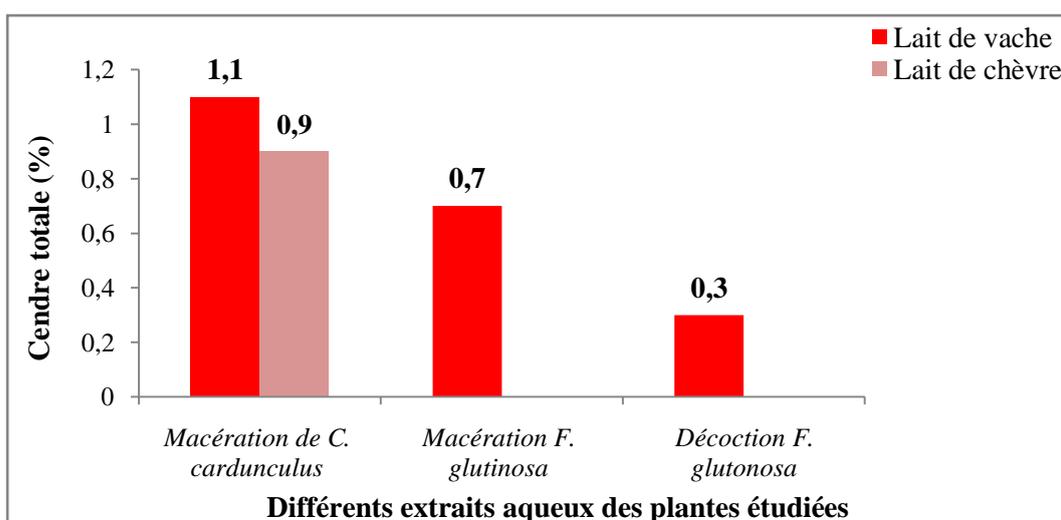


Figure 46. Taux de cendres du *Kemariya*.

Il est à noter que la teneur en cendre allant de 1,1% pour *Kemariya* obtenu du lait de vache en utilisant la macération de *C. cardunculus* à 0,3% pour *Kemariya* du lait de vache en ajoutant la décoction *F. glutinosa* (Figure 46).

Les valeurs de cendres du *Kemariya* obtenus sont supérieures par rapport à celle obtenue par Bouadjaib (2013) qui est de l'ordre de 0,28%, et aussi par rapport à celle de cendre de la Klila (0,35%) par Lahsaoui (2009). L'augmentation du taux des cendres dans *Kemariya* est due au contenu minéral de la présure végétal (*C. cardunculus* et *F. glutinosa*), le type du lait utilisé (le lait de chèvre semble être plus riche en calcium, phosphore, magnésium, potassium et chlore que le lait de vache mais moins riche en Sodium (Belarbi, 2015.)).

3.5.7. Densité du lait cru

La densité du lait cru est déterminée à l'aide d'un lactodensimètre graduée. Les résultats sont présentés dans la Figure 47.

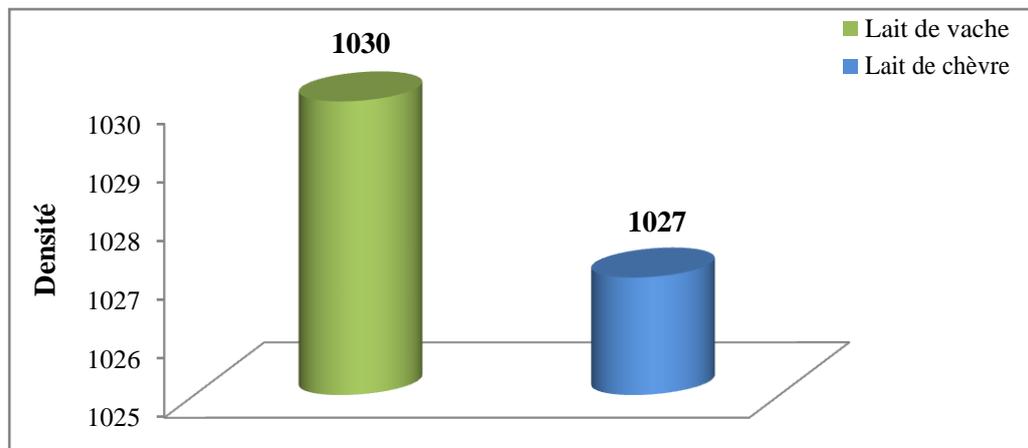


Figure 47. Valeurs de la densité du lait de vache et de chèvre.

Il ressort des résultats de la Figure 37 que les deux types du lait (bovin et caprin), la densité de lait bovin plus élevée que lait caprin est : 1030,1027 respectivement à 20 °C.

La densité moyenne enregistrée dans les échantillons du lait de vache étudiés répond aux normes (1030-1034) citées par J.O.R.A. (1993). Selon Gaddour et al. (2014), les valeurs de la densité sont entre 1028 et 1030 pour les échantillons du lait caprin; et 1028 pour l'échantillon du lait bovin.

La densité des deux laits est proche, cela peut s'expliquer par l'influence de la température et de la teneur en matière solide non grasse, donc de la nature de la nourriture que prennent ces deux animaux (Gaddour et al., 2014). La densité dépend de la teneur en matière sèche, en matière grasse, de l'augmentation de la température et de la disponibilité des aliments (Aggad et al., 2009).

3.5.8. Acidité titrable du lait cru

La mesure de l'acidité titrable du lait cru est réalisée selon la méthode normalisée d'AFNOR (1980). Les résultats sont illustrés dans la Figure 48.

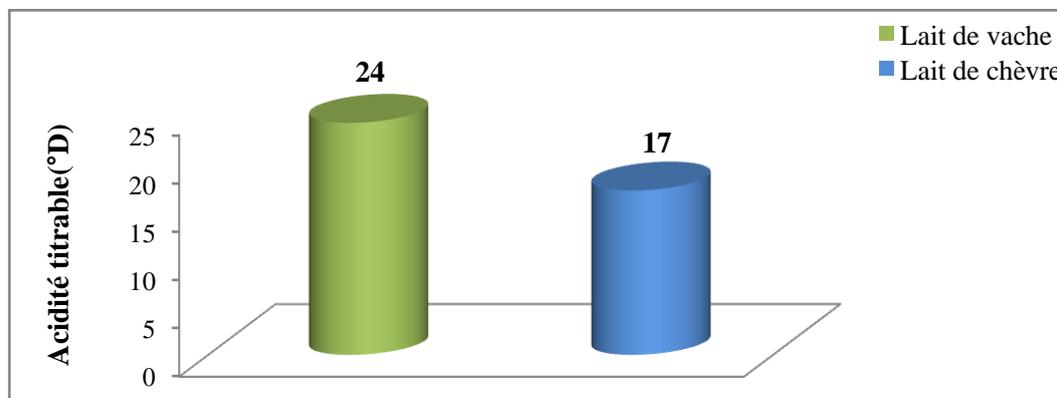


Figure 48. Résultats de l'acidité titrable du lait de vache et de chèvre.

Selon les résultats de la figure 48, le lait de vache a la valeur la plus élevée de l'acidité titrable (24 °D) en comparaison avec le lait de chèvre (17 °D).

Nos résultats d'acidité titrable sont plus élevés que ceux obtenus par Vignola (2002) et Alais (1984). Les valeurs de l'acidité titrable obtenues pour le lait de vache et de chèvre sont plus élevées, alors que le lait frais contient très peu d'acide et pas d'acide lactique provenant de la transformation du lactose par les bactéries lactiques. L'augmentation de l'acidité provient donc d'un développement important de la flore lactique influencé par la température et la durée de conservation de ce produit (Guiraud, 1998 ; Hamla et al., 2018).

3.5.9. Acidité titrable du kemariya

L'acidité titrable du *Kemariya* est déterminée selon la méthode de l'AOAC (1980). Les valeurs de ce paramètre sont présentées dans la Figure 49.

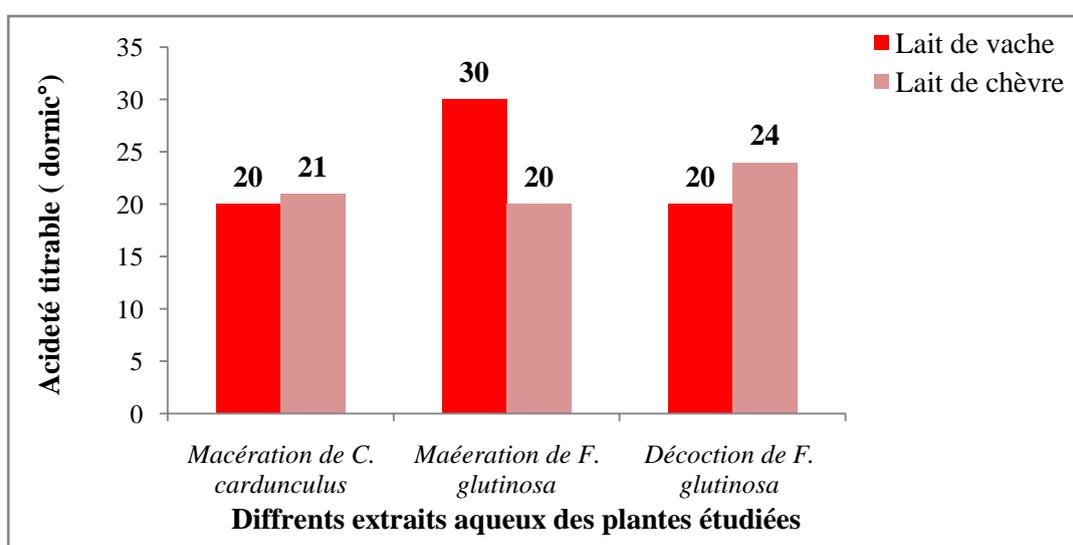


Figure 49. Valeurs de l'acidité titrable du *Kemariya*.

Au vu des résultats de la Figure 49, il apparaît que *Kemariya* de lait de vache fabriquée par la macération de *F. glutinosa* a la valeur d'acidité titrable la plus élevée égale à 30 °D, suivi par celle du *Kemariya* de lait de chèvre préparée par l'ajout de la décoction de *F. glutinosa* (24 °D), alors que les autres préparations du *Kemariya* ont des valeurs d'acidité titrable allant de 20 à 21 °D.

Selon Benderouich (2009), l'acidité de la *Kemariya* produite du lait de vache représente 0,17 g pour 100 g de *Kemariya* et de 0,19 g pour 100 g du *Kemariya* produite du lait de chèvre. L'acidité du fromage augmente significativement lors du séchage, cela peut être traduit par l'activité des bactéries lactique du lait lors de l'opération du séchage solaire où la température d'ensoleillement est favorable aux bactéries lactiques de continuer leur activité au cours du séchage (Lahsaoui, 2009).

3.6. Analyses de la qualité hygiénique pour le lait cru et *Kemariya*

Un contrôle microbiologique suivant les recommandations de la législation algérienne des échantillons a été procédé pour déterminer la conformité du lait et du *Kemariya* aux normes de la qualité hygiénique, les résultats obtenus sont regroupés dans les figures et les tableaux ci-après.

3.6.1. Analyses microbiologiques du lait cru

Les résultats du contrôle microbiologique des laits de vache et de chèvre crus et celui du *Kemariya* sont résumés dans le Tableau 13.

Tableau13. Résultats des analyses microbiologiques du lait de vache et de chèvre (UFC/ml).

Lait et nombre de bactérie	Lait de vache	Lait de chèvre	Nombres-en UFC/g ou L		Norme J.O.R.A.	
			Lait de vache	Lait de chèvre	m	M
Recherchée de bactéries						
Germes aérobies à (30°C) en dilutions (10^{-5})	+	+	$228 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$
Coliformes thermotolérants en dilutions 10^{-2}	+	-	$264 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	10^2	10^3
Staphylocoques à coagulase (+)	Abs	Abs	Abs		Abs	

UFC: Unité Formant Colonie; Abs: absent; J.O.R.A.: Journal Officiel de la République Algérienne.

Il ressort des résultats du Tableau 13 que le lait de vache comporte un nombre très élevé de germes aérobies et des coliformes thermotolérants qui ont dépassés largement les normes J.O.R.A N°39 avec des valeurs de ($3 \cdot 10^6$ UFC/ml) et (10^3 UFC/ml) respectivement. A l'opposé, le lait de chèvre a été conforme aux normes.

Les résultats relatifs à l'analyse bactériologique indiquent une absence totale de staphylocoques à coagulase (+) dans tous les échantillons de laits analysés (bovin et caprin).

Selon J.O.R.A N°39 et la réglementation nationale, la flore totale des germes aérobies et des coliformes thermotolérants dans le lait de vache ont dépassés les normes ce qui signifie une contamination importante de ce dernier. La présence de ces germes dans le lait traduit un non-respect des bonnes pratiques durant la traite et une négligence de l'hygiène des étables, elle peut être aussi liée à une contamination par les déjections de la vache, le sol et l'eau utilisée (Matallah et al., 2017).

L'absence de staphylocoques à coagulase (+) pour tous les échantillons de laits analysés s'explique par une bonne santé relative des laits de vache et de chèvre, notamment l'absence d'infections des mamelles par ces germes (Matallah et al., 2017).

3.6.2. Analyses microbiologique du *Kemariya*

3.6.2.1. Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli*

L'*E. coli* a été énumérée suivant la méthode du nombre le plus probable (NPP) (Figure 50). Le résultat du test présomptif dans le bouillon LST à simple et à double concentration, le résultat positif se traduit par un trouble microbien et de l'air dégagé à l'intérieur de la cloche de Durham.

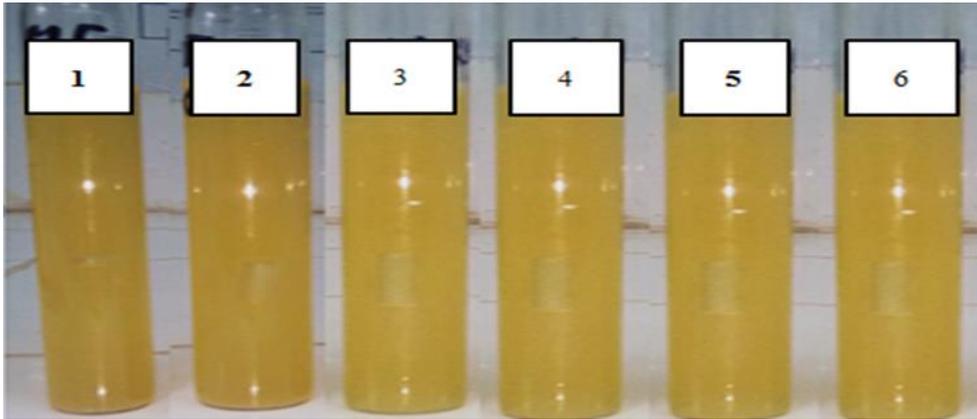


Figure 50. Test présomptif dans le bouillon LST à simple et à double concentration. 1: Macération de *C. cardunculus* L. avec le lait de chèvre, 2: Macération de *C. cardunculus* L. avec le lait de vache, 3: Macération de *F. glutinosa* Delil avec le lait de chèvre, 4: Macération de *F. glutinosa* Delil avec le lait de vache, 5: Décoction de *F. glutinosa* Delil avec le lait de vache et 6: Décoction de *F. glutinosa* Delil avec le lait de vache.

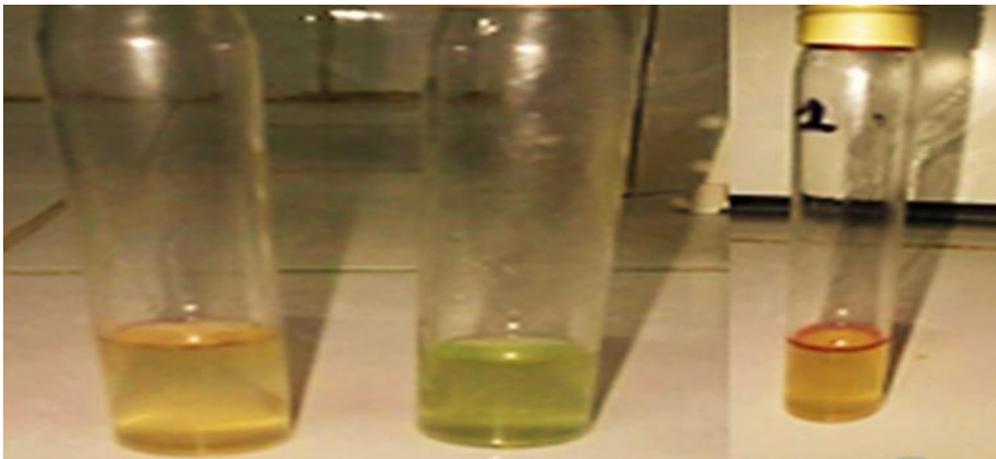


Figure 51. Test de confirmation de la présence d'*E. coli* montrant la présence de l'indole traduit par l'anneau rouge

Selon la Figure 50, tous les tubes sont gaz +. Afin de confirmer la présence d'*E. coli*, qui est caractérisée par sa capacité à dégrader le tryptophane en indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase, la recherche de l'indole produit a été révélée par l'ajout de réactif de Kovacs. La Figure 51 montre l'apparition d'une teinterouge dans des bouillons d'eau peptonée exempte d'indole, indiquant la présence de l'indole et confirme ainsi la présence d'*E. coli*.

Tableau14. Tableau récapitulatif montrant les résultats du dénombrement par la méthode du NPP pour 3 tubes, obtenus à la recherche d'*E. coli*.

Echantillon	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻³	Dilution 10 ⁻⁴	Nombre en UFC/g
Macération de <i>C. cardunculus</i> avec le lait de chèvre	+++ (3)	+++ (3)	+++ (3)	10 ⁵
Macération de <i>C. cardunculus</i> avec le lait de vache	++- (2)	++- (2)	--- (0)	2*10 ³
Macération <i>F. glutinosa</i> avec le lait de chèvre	++- (2)	++- (2)	++- (2)	3*10 ³
Décoction <i>F. glutinosa</i> avec le lait de chèvre	++- (2)	++- (2)	--- (0)	2.1*10 ³
Macération <i>F. glutinosa</i> avec le lait de vache	++- (2)	++- (2)	+- (1)	2.8*10 ³
Décoction <i>F. glutinosa</i> avec le lait de vache	++- (2)	+- (1)	+- (1)	2*10 ³

(+): résultat positif, (-) : résultat négatif.

Les résultats de Tableau 14 indiquent la présence d'*E. coli*, les échantillons du *Kemariya* du lait de chèvre et de vache obtenus par l'utilisation de la macération de *C. cardunculus* ont une charge d'*E. coli* de 10⁵UFC/g et 2*10³UFC/g, respectivement. De même, *Kemariya* produite par l'ajout des extraits aqueux de *F. glutinosa* pour les différents types de laits ont enregistré des nombres variant de 2*10³UFC/g à 3*10³UFC/g (Tableau 14).

Selon les normes J.O.R.A N°39, la charge d'*E. coli* du *Kemariya* à base du lait cru de nos six échantillons sont situés entre la limite de satisfaction de 10⁴ à 10⁵ UFC/g. Ces échantillons sont considérés comme des fromages d'une qualité acceptable par rapport à la présence d'*E. coli*.

3.6.2.2. Recherche de Staphylocoques à coagulase +

Pour les Staphylocoques à coagulase +, nous avons observé son absence dans les six échantillons sur le milieu Baird Parker. La Figure 52 montre que la culture à partir de 0,1 ml de bouillon de macération de *C. cardunculus* avec le lait de vache de l'échantillon ne contient aucune colonie.

Les staphylocoques présumés pathogènes sont totalement absents dans tous les échantillons analysés ce qui est conforme à la réglementation algérienne. Cette absence est revenue à l'hygiène liée au lait cru utilisé due à la traite jusqu'à la fabrication de ce fromage et ça reflète la bonne santé relative des vaches et des chèvres, et notamment l'absence d'infection des mamelles par ces germes (Vignola, 2002).

CONCLUSION

La recherche des plantes à effet coagulant utilisées traditionnellement dans la région de Ghardaïa pour la préparation de *kemariya* nous a conduits à réaliser une enquête ethnobotanique auprès de la population locale de six communes de la wilaya de Ghardaïa (Algérie).

Les résultats de cette étude nous a permis de choisir deux espèces spontanées selon leur fréquence de citation, leur endémisme et le fait qu'elles soient peu ou pas étudiées. Il s'agit de *C. cardunculus* et *F. glutinosa*. Les parties récoltées des deux plantes étudiées à partir des deux régions ; Dahayet Bendhahoua et Zelfana (Ghardaïa) ont fait l'objet de nos investigations. De plus, la récolte de *C. cardunculus* et *F. glutinosa* se fait au printemps pendant la période de floraison (48% et 59% des réponses, respectivement). La partie utilisée pour *C. cardunculus* était les fleurs (100% des réponses), tandis que pour *F. glutinosa* étaient les graines (44,4%) et les feuilles (33,3%). *C. cardunculus* et *F. glutinosa* peuvent être utilisés à l'état frais ou sec. Le lait de chèvre était le lait le plus utilisé par la population locale pour la production de *Kemariya*. Ces résultats soulignent l'importance de l'utilisation de la flore algérienne dans la production fromagère.

L'extraction des principes actifs a été effectuée selon les modes traditionnels de préparation à savoir, la décoction et la macération.

Le criblage phytochimique a mis en évidence la présence des différentes classes chimiques de molécules bioactives tels que les phénols, les tanins, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes, les sucres réducteurs et les protéines. Les différents extraits des deux espèces étudiées ne renferment pas les stéroïdes et les terpénoïdes. Les alcaloïdes et les flavonoïdes ne sont pas détectés dans les différents extraits de fleurs de *C. cardunculus* et des fruits de *F. glutinosa*. Par contre la richesse des différents extraits en protéines est notée. Les sucres totaux ne sont détectés que dans les extraits de *C. cardunculus*.

Les analyses quantitatives du contenu des protéines par la méthode par la méthode colorimétrique de Bradford (1976) révèlent que l'extrait des fleurs de *C. cardunculus* en particulier celui obtenu par la macération est le plus riche en protéines en comparaison avec les autres extraits avec une concentration égale à $289,82 \pm 67,72$ $\mu\text{g/g}$.

Les teneurs des différentes préparations en polyphénols totaux sont très appréciables, plus particulièrement celle de la décoction des fruits de *F. glutinosa* et la macération des fleurs de *C. cardunculus*.

Le suivi de la stabilité des extraits coagulant pendant 30 jours selon le mode de conservation (réfrigération) a montré que l'activité coagulante augmente (temps de coagulation diminue) à cause de développement des champignons dans les extraits. Donc la nécessité de trouver un moyen de conservation meilleur que la conservation par réfrigération à $+4^{\circ}\text{C}$ est signalé.

L'étude de la détermination des conditions optimales de la coagulation du lait pour la recherche du pH optimal, montre que l'extrait des fleurs de *C. cardunculus* est mieux actif à pH 5,5. Et pour la recherche de la température et la concentration en CaCl_2 optimale, les meilleurs résultats sont obtenus à 40°C et à 0,03M pour tous les extraits préparés.

Afin de valoriser et caractériser les deux types de lait utilisés (lait de vache et de chèvre) pour la préparation de fromage traditionnel *Kemariya* et la *Kemariya* préparé, nous avons étudié leurs qualités physico-chimique et hygiénique. À travers les résultats des paramètres de la physico-chimie obtenus il en ressort que la teneur en matière sèche du lait de vache (14%) est élevée que celle du lait de chèvre (12,5%), le taux en cendres du lait de chèvre est légèrement élevé (0,59%) en comparaison avec celui de lait de vache (0,4%), la densité du lait bovin est plus élevée que le lait caprin (1030 et 1027, respectivement), le lait de vache à la valeur la plus élevée de l'acidité titrable (24 °D) en comparaison avec le lait de chèvre (17 °D), et un pH normal et stable pour les deux types de lait par contre la *Kemariya* est caractérisée par un pH légèrement acide.

Pour la qualité hygiénique, elle était généralement acceptable avec absence totale des *Staphylococcus*, néanmoins, la contamination par *E. coli* a été enregistrée chez certains échantillons de *Kemariya*, mais avec une faible portion. Il ressort donc que nos échantillons de *Kemariya* analysés sont de qualité acceptable et conforme aux normes fixées par la législation algérienne.

A cause de la situation pandémique causée par le virus Covid 19, cette étude reste non complète et nécessite d'être complétée et à partir des conclusions nées de cette étude, il est intéressant de poursuivre ce travail par :

- Essayer de poursuivre les travaux sur la plante vu qu'il y a peu de travaux
- Isoler et d'identifier les molécules qui sont responsable de la coagulation du lait ;
- Réaliser des tests sur plusieurs types de lait (brebis, chamelle, etc.) ;
- Etudier les différents facteurs influençant l'extraction de l'agent coagulant à partir des fleurs de cardon afin d'optimiser le diagramme d'extraction ;
- étudier les différentes méthodes de conservation, afin de déterminer le meilleur moyen pour conserver l'extrait floral ;
- Il est intéressant d'essayer d'appliquer l'extrait des fleurs de cardon pour la fabrication d'autres types de fromages pour mettre en évidence son effet sur la qualité du produit ;
- Enfin, pour permettre une utilisation efficace de l'extrait coagulant des fleurs de cardon et des graines de *F. glutinosa* dans l'industrie fromagère, sans avoir des inconvénients, il serait intéressant de trouver un moyen pour promouvoir un meilleur rendement fromager.

Cette étude pourrait contribuer à l'élaboration des présures naturelles, Halal et de préserver le patrimoine culinaire algérien.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abakar M N M., 2012. Essai de fabrication d'un fromage frais traditionnel sénégalais, à partir du lait de vache, coagulé par la papaïne naturelle. Mémoire de Master en Qualité des Aliments de l'homme. Université Cheikh Anta Diop De Dakar. 86p.
2. Abdelaziz S, Ait Kaci F. 1992. Contribution à l'étude physico-chimique et microbiologique d'un fromage traditionnel algérien fabriqué à partir du lait de chèvre le "Djben". Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Institut national agronomique, El Harrach.122p.
3. 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 école doctorale abies.Paris .35p.
4. Adoui F. 2007. Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir du proventricule de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.
5. Aggad H., Mahouz F., Ahmed Ammar Y., Kihal M., 2009. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien, Revue Méd. V, N° 16012, Oran : 591-593p.
6. Aissaoui Zitoun O., 2003. Fabrication et caractéristiques d'un fromage traditionnel algérien Bouhezza. These de magister, INATAA, Constantine, Algérie.138 p.
7. Akollor E. 1997. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des chawarmas vendus dans les Fast-Food de Dakar. Th : méd. Vet, Dakar, n°22. 94p.
8. Alais C. 1984. Science du lait. Principes des techniques laitières. Société d'édition et de promotion agro-alimentaires, industrielles et commerciales, 4^{ème} Edition, 814p.
9. Alali, F.Q., Tawaha ., K,El-Elimat T et al, 2007 . Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: An ICBG project. natural product research.vol. 21, n ° 12. 1121-1131p.
10. Al-Farsi M. A. & Lee C. Y., 2007- Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Journal of Food Chemistry, vol. 108:977-985p.
11. Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., et Simpson, R. 2002. Composition propriété physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In : Science et technologie du lait- Transformation du lait, Press International, Polytechnique, Canada.
12. Ammouche., Ali., Morsli., Amar., Et Bellal., Mohand Mouloud. 1985. Etude Du Pouvoir Coagulant Sur Le Lait De Quelques Plantes Locales. Département de Technologie des Industries Agronomique et Alimentaires. Institut National Agronomique -Alger.63-84P.
13. AFNOR. 1980. Lait et produits laitiers : méthodes d'analyses. Recueil des normes Françaises, 1^{ère} Edition, AFNOR, Paris.
14. AFNOR. 1985. Contrôle de la qualité des produits laitiers –Analyses physiques et chimiques, 3^{ème} édition : 107-321p.
15. AFNOR. 1986. Contrôle de qualité des produits laitiers. Recueil de normes Françaises. Paris.
16. AFNOR. 1993. Contrôle de la qualité des produits alimentaires : lait et produits laitiers : analyses physicochimiques. Paris La Défense: AFNOR, 4^{ème} Ed.
17. AOAC. 1980.Official Methods of Analysis, 13th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
18. AOAC. 1990. Méthodes d'analyse officielles. Association of Official Analytical Chemist, 15 Edition, Washington DC, USA.
19. Aworh O C. & Muller, H. G. 1987. Cheese-making properties of vegetable rennet from sodom apple (*Calotropis procera*). Food Chemistry, 26: 71-79p.
20. Aworh O C., Kasch V., Apampa O O. 1994. Purification and some properties of Sodom apple latex proteinases. Food Chemistry, 50: 359-362p.
21. Aworh O C., Nakai. S. 1988. Extraction of milk clotting enzyme from sodom apple (*Calotropis procera*). Journal of food science, 51: 1569-1570p.
22. Badgujar B S., Mahajan R T. 2014. Nivulian-II a new milk clotting cystein protease of *Euphorbia nivulia*. International Journal of Biological Molecules,70: 391-398p.
23. Bammou M., Sellam K., El Rhaffari L., Bouhlali E.D.T., Daoudi A., Ibiybijen J. &Nassiri L., 2015. Bioactivity of Anvillearadiata Coss &Dur. Collected from the southeast of Morocco. European Scientific Journal, vol. 11, N° 21: 233-243p.

24. Bauer W J., Badoud R., Loliger J. 2010. Sciences et technologies des aliments. *Ed.* Alain Etournaud, 539-562p.
25. Belarbi, Meryem. Etude Comparative Entre La Qualité Microbiologique Du Lait Cru De Vache Et Le Lait De Chèvre. 2015. Thèse De Doctorat. Université Abou Baker Belkaid-Tlemcen .56p.
26. Belhalili A., Barkache N., Ziadi A. 2014. Evaluation de la qualité du lait cru et transformé au cours de la conservation. Mémoire de Master. Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'Univers. Université 08 Mai 1945 Guelma. 77p.
27. Houba Z et Hibour H., 2013. Contribution à l'étude phytochimique et biochimique (In vitro et Vivo) des cônes femelles d'Epheraalata DC. De la région d'Oued Souf, Université Echahid Hamma Lakhdar-Eloued. 110p
28. Benani S T. 2017. Mémoire de master Valorisation et optimisation de l'utilisation d'un coagulant végétal pour la fabrication d'un fromage traditionnel.68p.
29. Benderouich B. 2009. La kémariya: un produit du terroir à valoriser, mémoire d'ingénieure, université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie. 82 p.
30. Benkahoul M. 2016. Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactitestomentosa* et *Onopordumacanthium*. Université des Frères Mentouri Constantine. Thèse Doctorat. 4-12p.
31. Benyahia-krid F A., Attia H., Zidoune M N. 2010. Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *J. of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, 3: 75-86p.
32. Benzaoui F., Houari A. 2016. Contribution à l'étude des activités biologiques de *Brocchiacinerea* (Vis.) et *Matricariapubescens* (Desf.). Mémoire master. Université Ouargla. 56p.
33. Boizot N., Charpentier J.P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le cahier des techniques de l'Inra : 79-82p.
34. Bouadjaib S. 2013. Etue physico-chimique du produit laitier traditionnel du sud algérien « Jben » Recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Université Abou BekrBelkaid Tlemcen. Mémoire de Master. 110p.
35. Boudjenah-Haroun S. 2012. Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri De Tizi ouzou.16p.
36. Boulanger A., 1976. Etude biochimique et génétique des protéines du lait de chèvre (*Capra hircus*). Thèse 39 cycle. Université Paris VII.
37. Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A. et Satrani B. 2009. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinisarticulata*(Vahl) Masters. *Agro. Sol.*, 20 : 45-48p
38. Broome M C. et Hickey MW. 1990. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Australian J. Dairy. Technology.*, 45, 2, 53-59p.
39. Brule A et Lenoir S, 1990. La micelle de caséine et la coagulation du lait In : Le fromage. 3ème Edition, Edition Technique et documentation Lavoisier, Paris. 423p.
40. Cáceres Arriba P., Fernández J I. 2000. Proceso de obtención de extractos en polvo de un coagulante de leche procedente de les flores de cardo *Cynara* sp. Patente Espanhola, 139-550p.
41. Cavin, Alexandre. 1999. Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse dedoctorat. Université de Lausanne, Faculté des sciences. 241p.
42. Chaouch N. 2001. Étude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthisvulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de Ouargla). Mémoire de Magister. Université d'Ouargla, Ouargla (Algérie).
43. Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D., Rodriguez-Lopez J.N., 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, n °12. 1393-1400p.

44. Chemat F., & Lucchesi M. E., 2005. Extractions Assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des extraits aromatiques. *Journal de la Société ouest-africaine de chimie*, 2005, no 20. 77-99p.
45. Cheng H.-J., Zhang L.-M., Duan H.X., Li J. & Dai Y.-J., 2016 Optimization of extraction technology of the alkali-soluble components of barley malt roots and its composition analysis. *Medicine and Biopharmaceutical* Downloaded from www.worldscientific.com
46. Chevallier A. 2001. Encyclopédique des plantes médicinales. Identification, préparation, sains, 2^{ème} Edition, Edition Larousse, Paris. 335p.
47. Christen C., Virasora E. 1935. Présures végétales, extraction et propriétés. *Le Lait*, 15 : 345-363p.
48. Claverie-Martín F., Hernández M. C., 2007. Protéases aspartiques utilisées dans la fabrication du fromage. Dans : *Enzymes industrielles*. Springer, Dordrecht. 207-219p.
49. Collin J C., Delecourt R. 1988. A propos des méthodes d'analyse des enzymes applicables aux préparations enzymatiques industrielles. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 105(6): 448-460p.
50. Daddi Bouhoun M. 1997. Contribution à l'étude de l'évolution de la salinité des sols et des eaux d'une région saharienne : Cas du M'Zab. Thèse Magister, I.N.A. Alger, 180p.
51. Dalgleish D G., Horne D S. & Law A J R. 1989. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, 991: 383-387p.
52. Darinmoub. 2009. Conseils pour le consommateur. Laboratoire de contrôle la qualité et de conformité, Atakor pub. En ligne : <http://www.darinmoub.com/>.
53. Devaraj K B., Kumar P R., Prakash, V. 2008. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23): 11417-11423p.
54. Deymié B., Multon J.L., Simon. D. 1981. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Edition APRIA, Paris. 238-241p.
55. Diallo D. 2000. Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (*Azaceae*), *Diaspora sabyssinica* (*Ebenaceae*), *Entada africana* (*Minosaceae*), *Trichilia emetica* (*Meliaceae*). Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l'université de Lausanne Suisse.
56. Djerromi A., Nacef M. 2004. 100 Plantes médicinales d'Algérie. Edition palais du livre, ISBN : 9961-749-25-1. 55p.
57. Dohou N. 2004. Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de thymeleaelythroïdes, thèse de doctorat, Maroc. 59p.
58. Dridi, N et Segueni, N. 2015. Etude de l'effet antitoxique de l'extrait méthanolique de l'espèce *Cotulacina reavis* à vis le pesticide Chlorpyrifos chez les rats *wistar albinos*. Mémoire Master Académique. Université echahid hamma lakhdar d'el-oued. el-Algérie. 94p.
59. Drif F, Mana H. 2017. Caractérisation physico-chimique et organoleptique de trois laits (Vache, chèvre, brebis) et fabrication du fromage frais. Mémoire de Master. Université M'hamed Bougara Boumerdes. 6p.
60. Dubey V K., Jagannadham M V. 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 62:1057-1071p.
61. Eck A., Gillis J C. 1997. Le fromage de la science à l'assurance qualité. 3^{ème} Edition. Edition Lavoisier, Paris, Ed. Tech. Et Doc. Lavoisier (3e édition), 229- 253p.
62. Eck, A., Gillis J., 1997. Le Fromage: De La Science A L'assurance Qualité. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, Pp : 7-39p.
63. El Kholy A M. 2015. The use of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts for the production of Tallaga cheese. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 4: 34-41p.
64. Faccia M., Picariello G., Trani A., Iozzo P., Gambacorta G., Lamacchia C., Di Luccia A. 2012. Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with capfig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234: 527-533p.

65. FAO 1995. Lait et produit laitiers dans la nutrition humaine, www.fao.org.
66. Farkye N. Y. 2004. Cheese technology. Int. j. Dairy. Tech. 57: 91-98p.
67. Fernandez J., Curt M.D., Aguado P.L. 2006. Industrial application of *Cynara cardunculus* L. for energy and others uses. Industrial crops and products, 24: 222-229p.
68. Fernández-Salguero J., Prados F., Calixto F., Vioque M., Sampaio P. et Tejada, L. 2003. Use of recombinant cyprosin in the manufacture of ewe's milk cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(25): 7426-7430p.
69. Fox P. F. et McSweeney, P. L. H. 1998. Dairy chemistry and biochemistry. 1^{ère} Ed. Cork. Ireland. Françaises, 1^{ère} Ed, AFNOR, Paris. 543p.
70. Froc J. 2001. Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. INRA mensuel n°110, 41-42p.
71. Gaddour A., Najari, S., Abdennebi, M., Arroum, S., et Assadi, M. 2014. Caractérisation physicochimique du lait de chèvre et de vache collectée localement dans les régions arides de la Tunisie. *Options Méditerranéennes, A, no.151-154p.*
72. Galán E., Prados F., Pino A., Tejada L., 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): 93-98p.
73. Gelais-St D., Tirard-C P., Belonger G., Couture R. et Drapeau R., 2002. Chapitre 6 : Fromage. Pp 349 à 412. Science et Technologie du lait, transformation du lait. Coord. Vignola. Edition école polytechnique. 600p.
74. Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. & Fernández-Gutiérrez A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(4) : 1220-1234p.
75. Goursaud J. 1999. Réacteurs traditionnels à enzyme libre : cas de l'industrie laitière. In : Biotechnologie. Coord. Scriban, 5^{ème} Ed. 365-401p.
76. Graiday P. 1978. Détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale. Revue du Technicien du lait, 83 : 5-47p.
77. Grosclaude F. 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relation avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. INRA Prod. Anim. 1 : 5-17p.
78. Guiraud J P. 1998. Microbiologie Alimentaire. Ed Dunod, Paris, 652p.
79. Hallal A. 2001. Fromages traditionnels algérien. Quel avenir. Revue agro ligne. 14 : 43-47p.
80. Hamama A Z. 2017. Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel Algérien Bouhezza. Thèse de doctorat. Université Constantine 1. 154 p.
81. Hamla H et Belgroune K. 2018. Fabrication et suivi des paramètres physico-chimiques et microbiologiques de Jben et Klila fabriqués à partir du lait de vache et de chèvre, mémoire master. 42p.
82. Hanen, Falleh, Riadh, Ksouri, Chaieb, Kamel, Et Al. 2008. Composition phénolique des organes de *cynara cardunculus* L. et leurs activités biologiques. Comptes Rendus Biologies, vol. 331, n° 5. 372-379p.
83. Harborne J.B. 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 3^{ème} Edition. ISBN : 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214p.
84. Harrouz W., Oueldhadj Y. 2007. La filière lait : vers une nouvelle dimension de développement dans la vallée du M'Zab et Metlili. Mémoire Ing, ITAS, Ouargla. 87p.
85. Hashim, M. M, Mingsheng, M., Iqbal, M. F., Xiaohong, C. 2011. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. Phytochemistry, 72: 458-464p.
86. Holt C., 1992. Structure and Stability of bovine casein micelles. Adv. Protein Chem., 43: 63-150p.
87. Horne D S., Parker T G. "and" Dagleish D G. 1989. Casein micelles, polycondensation and fractals. In: Food Colloids. Bee R.D., Richmond P., Mingins J., eds , Special publication n°75, Royal Society of Chemistry, London. 400-405p.
88. Houéhanou D.T., Assogbadjo A.E., Chadare F.J., Zanzo S., Sinsin B. 2016. Approches

- méthodologiques synthétisées des études d'ethnobotanique quantitative en milieu tropical Annales des sciences Agronomiques 20-spécial Projet Undesert-UE : 187-205p.
<https://doi.org/10.1186/s42779-019-0008-4>
89. Iserin, P. 2001 - Encyclopédie des plantes médicinales. Ed.Larousse-Bordas, Paris : 275p.
 90. J.O.R.A n°70. (2004).Arrêté 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour l'essai et les dilutions en vue de l'examen microbiologique.
 91. Jarez M., Pinelo M., Sineiro J. & JoséNúñez M., 2006- Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. Journal of Food Chemistry, vol. 94: 406-414p.
 92. Jaspard E. 2013. Rôle de GLUT4, de l'insuline et du glucagon dans la régulation de la glycolyse. Faculté de médecine d'Anger. Disponible sur : http://biochimej.univangers.fr/Page2/TexteTD/6ModuleS5BG2/ZsuiteTDS5BG2/3RoleInsulinGlucagon/1RoleInsulinGlucag_on.htm.
 93. Jeantet R. 2007. Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits.Paris, Lavoisier, 456p.
 94. Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. 2006. Sciences des aliments. Tome 1. Stabilisation biologique et physico-chimique. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. 381p.
 95. JORA N° 69, 1993. Journal officiel de la République algérienne.
 96. Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsen R., Brodelius P., Da Silva Figueiredo A C., Pais M. S. S. 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. Phytochemistry, 29(5): 1405-1410p.
 97. JORA N°39. (2017).Arrêté du 2 juillet 2017. Fixant les critères microbiologiques des denrées.
 98. Kaneda, M., Tominaga, N. 1975. Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. Journal of Biochemistry, 78:1287-1296p.
 99. Khalik, Sm Abdel, Miyase, Toshio, El-Ashaal, Hanan A. 2000. Triterpenoid saponins from *Fagonia cretica*.Phytochemistry, vol. 54, no 8. 853-859p.
 100. Kone, M., Bleyere, N.M. Yapo, A.P. Vangah, M.O. Ehile, E.E. 2009. Evaluation de la toxicité d'un extrait aqueux de *Sacoglottisga bonensis*(Baille) urban (Humiriaceae) chez les rongeurs, une plante utilisée dans le traitement de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Int. J. Biol. Chem. Sci., 3(6) : 1286-1296p.
 101. Koubaa, I., Damak, M. 2003. A new dilignan from *Cynara cardunculus*. Fitoterapia, 74(1-2) : 18-22. Doi :10.1016/s0367-326x (02)00300-3
 102. Kraut J. 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Annual Review of Biochemistry, 46: 331-580p.
 103. Kumari M., Sharma A., Jagannadham M V. 2012. Decolorization of crude latex by activated charcoal, purification and physico-chemical characterization of religiosin, a milk clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 8027-8034p.
 104. Labioui L., Elmoualdi A., Benzakour M., Elyachioui E., Berny M., Ouhssine., 2009. "Étude physicochimique et microbiologique de laits crus", Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux, vol.148. 7-16p.
 105. Ladoh-Yemeda C.F., Vandi D., Dibong S.D., MpondoMpondo E., Wansi J.D., Betti J.L., Choula F., Ndongo D. et TomediEyango M. 2016. Étude ethnobotanique des plantes médicinales commercialisées dans les marchés de la ville de Douala, Cameroun. Journal of Applied Biosciences, 99 : 9450-9468p.
 106. Lahsaoui, S. 2009. Étude du procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel Algérien (Kilila)', Thèse de Doctorat : Science Agronomie, université de Batna. Algérie .20p.
 107. Lakouéténé D. P. B., Ndolngar G., Berké B., Moyen J. M., Komba É. K., Zinga I., Silla S., Millogo-Rasolodimby J., Vincendeau P., Syssa-Magalé J. L., Nacoulma-Ouedraogo O. G., Laganier R., badoc A., Chèze C. 2009. Enquête ethnobotanique des plantes

- utilisées dans le traitement du paludisme à Bangui. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 148 : 123-138p.
108. Leksir C, Boudalia S, Moujahed N, Chemmam M. 2019. Traditional dairy products in Algeria: case of Klila cheese. Journal of Ethnic Foods 6(1), 1- 14p.
 109. Lemouchi, L. 2008. Le fromage traditionnel Bouhezza : enquête dans la wilayade Tébessa et suivie de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de deux fabrications. Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie, 65p.
 110. Lenoir J., Lamberet G., Schmidt J.L., Tourneur C., 1985. La maîtrise du biocatalyseur fromage. Biofutur., 12 : 23-50p.
 111. Lenoir J., Remeuf F. & Schneid N. 1997. L'aptitude du lait à la coagulation par la présure. In : le fromage, 3^{ème} édition Tec et Doc Lavoisier, Paris. 229-256p.
 112. Lenoir J., Remeuf F., Schneid N., 2006. Le lait de fromagerie in : « le fromage ». Paris. 454p.
 113. 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(8): 2439-2443p.
 114. Lorente B E., Christiana B B., Caffini N O. 2004. Purification and characterization of a milk-clotting proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 8182-8189p.
 115. Lovisi P., Jolivet P., Jagic F., Dalgleish D. et Chardot T. 2003. A protein kinase is located in the micellar fraction of fresh pasteurized skimmed farm milk. J DairySci, 86: 1147-1156p.
 116. Luquet F M., Corrieu G. 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 307p.
 117. Macedo A C., Xavier Malcata F et Oliveira, J C. (1993). The Technology, Chemistry, and Microbiology of Serra Cheese: A Review. Journal of Dairy Science, 76(6), 1725–1739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77505-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77505-0)
 118. Mahaut M., Jeantet R., Brule G. 2000. Initiation à la technologie fromagère. Tech et Doc Lavoisier. 1-21p.
 119. Majhenic L., Kerget M.S. "&" Knez Z., 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, 104: 1258-1268p.
 120. Mamadou B. 2012. Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat, Mali. 92p.
 121. Matallah, S., Matallah, F., Djedidi, I., Mostefaoui, K. N., & Boukhris, R. 2017. Qualités physico-chimique et microbiologique de laits crus de vaches élevées en extensif au Nord-Est Algérien. Livestock Research for Rural Development, 29(11).
 122. Mathieu J. 1998. Initiation à la physicochimie du lait. Tec & Doc, Paris, France, 220p.
 123. Melek, F. R., Miyase, T., El-Gindy, M. R., Abdel-Khalik, S. M., Ghaly, N. S., et El-Kady, M. (2000). Saponins from *Fagonia glutinosa*. Die Pharmazie, 55(10), 772-776p.
 124. Melek, F. R., Miyase, Toshio, El-Gindi, O. D., et Al, 1996. Saponins from *Fagonia mollis*. Phytochemistry, , Vol. 42, No 5, P. 1405-1407p.
 125. Mibindzou Mouellet A. 2004. Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L (Papilionaceae) et *Halleaciliata* Aubrev et Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon, thèse de doctorat, Mali. 58p.
 126. Mietton B., Desmazeaud M., Deroissard H. "&" Weber F. 1994. Transformation du lait en fromage ; in Bactéries lactiques II, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris. 543p.
 127. Monti R., Basilio C. A., Trevisan H. C., Contiero J. 2000. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. Brazilian Archives of Biology and Biotechnology, 43: 501-507p.
 128. Mohammad A., Mohammad S., Elshikh, Soo-Yong K., Fahad A, Joongku L., Dorjay L., Abhijit C., Tapan K.P. 2019. Génome chloroplastique complet de l'herbe chaude du désert *Fagonia indica* (Zygophyllaceae) du centre-sud de l'Arabie. ADN mitochondrial partie B, 4(2): 3904-3905p.

129. Moro L P., Cabral H., Okamoto D N., Hirata I., Juliano M A., Juliano L., Bonilla G. O R. 2013. Characterization, subsite mapping and N-terminal sequence of miliin, a serineprotease from the latex of *Euphorbia milii*. *Process Biochemistry*, 48: 633-637p.
130. Napper A D., Bennett S P., Borowski M., Holdridge M B., Leonard M J., Rogers E E., Shames S L. 1994. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *The Biochemical Journal*, 301: 727-35p.
131. Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M., Dadie A. 2009. Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*, 7(1): 20-29p.
132. Oliver, D. 1868. *Flora of Tropical Africa*, Vol. 1, 74-81. L. Reeve & Co. Ltd., Ashford, Kent.
133. OMSG : Organisation Mondiale de la Santé Genève. (2003). Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales, 73 p.
134. Otsuki, N., Dang, N. H., Kumagai, E., Kondo, A., Iwata, S., Morimoto, C. 2010. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3): 760-767p.
135. Owusu-kwarteng J., akabanda F., Nielsen D. S., K, tano-debrah K., glover R. L., Jespersen L. 2012. Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana, *Food microbiology*, 32(1): 72-78p.
136. Ozenda P., Quezel P. 1956. Les Zygophyllacées de l'Afrique du Nord et du Sahara. *Trav. Inst. Rech. Sahar.* 14 : 68p.
137. Paris R.-R., Moysse H. 1971. Précis de matière médicale : Pharmacognosie spéciale : Dicotylédones (suite) : Gamopétales. Edition Masson.
138. Pezeshki A., Hesari J., Ahmadi A. Z., Ghambarzadeh, B. 2011. Purification and biochemical characterization of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125: 1005-1012P.
139. Pougheon, S .2001. Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et leurs conséquences en technologies laitières. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 109p.
140. Rama S, Zabita k, Shinwari. 2019. Comparaison des profils potentiels antioxydants et antifongiques in vitro d'extrait au méthanol de *Fagonia indica*, *Fagonia bruguieri* et *Fagonia paulayana*. *International Journal of Botany Studies*, Volume 4. 69-76p.
141. Ramade F. 1984. *Eléments d'écologie. Ecologie fondamentale.* Edition Mc. Graw-Hill, Paris. 379p.
142. Ramet, J P. 1997. Les agents de transformation du lait, la présure et les enzymes coagulantes In, *Le Fromage.* Ed., A. Eck, 3^{ème} Edition, Edition Tec et Doc, Lavoisier, 539p.
143. Rawlings N D., Barrett A J. 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in Enzymology*, 248: 183-228p.
144. Rayanatou I. A. 2017. Etude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi au Niger. *Alimentation et Nutrition. Agro campus Ouest, Français.* NNT : 2017NSARB307
145. Remeuf F., Sodini I., Mohammed S. & Corrieu G. 2002. Effets de l'enrichissement protéique et du chauffage du lait sur la microstructure et les propriétés physiques du yaourt brasse. *Les Rencontres de l'INA. Nutrition et alimentation animale et humaine, sécurité des aliments, qualité.* 22-56p.
146. Remeuf., 1994. Relations Entre les caractéristiques physico-chimiques et aptitudes fromagères des laits. *Rec. Méd. Vét*, vol. 170, no 6/7. 359-365p.
147. Ribadeau-Dumas B. 1981. Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Rev. Lait. Fr.*, 400 : 17-32p.

148. Ribéreau-Gayon P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris. 254p.
149. Richard V J. 1990. Production de lait cru de bonne qualité bactériologique. *Microb-Hyg-alim* 2 (1). 33p.
150. Richardson B.C., Creamer L K, Pearce K N. & Munford R E. 1974. Comparative micelle structure. II. Structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. *J. DairyRes.* 41 : 239-247p.
151. Roseiro L B., Barbosa M., Ames J M., Wilbey R A. 2003. Cheese making with vegetable coagulants-the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2): 76-85p.
152. Roupas, P. 2001. On-farm practices and post farmgate processing parameters affecting composition of milk for cheesemaking. *The Australian Journal of DairyTechnology*, 56(3) : 219-232p.
153. Rozier J. 1982. La qualité hygiénique des aliments. Edition RTVA. 214p.
154. Sampaio P N., Fortes A M., Cabral J M S., Pais M S., Fonseca L P. 2008. Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4): 305-312p.
155. Sana E O K., El Owni O A O., Abdalla M O M. 2011. Comparison of quality of Sudanese white cheese (Gibnabayda) manufactured with *Solanum dubium* fruit extract and rennet. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 : 106-111p.
156. Saoucha C . 2017. Qualités physico-chimique et microbiologique et aptitude de transformation du lait (vache et chèvre) en yaourt, mémoire master, Université Mohamed Boudiaf - M'sila. 59p.
157. Sarmiento A C., Lopes H., Oliveira C S., Vitorino R., Samyn B., Sergeant K., Barros, M. T. 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, 230(2): 429-439p.
158. Schmidt D G. 1982. Association of casein and casein micelle structure. In: *Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins* Fox P.F., ed., Applied Sci. Public., London, 61-86p.
159. Schmidt D.G. 1980. Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy Res.*, 34: 42-64p.
160. Scott R. 1981. *Cheese making practice*. Applied Science Publisher, London. 44-165p.
161. Scriban R. 1999. *Biotechnologie. 5^{ème} Edition*, Edition Tech et Doc. Lavoisier. Paris. 432p.
162. Serieys, F. 2006. Impact de facteurs épidémiologiques, zootechniques, de conduite d'élevage et de prix sur l'intérêt économique du traitement en lactation des mammites subcliniques. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 431-434p.
163. Shah M A., Mir S A., Paray M A. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: a review. *Dairy Science and Technology*, 94: 5-16p.
164. Shaker KH., Bernhardt M., Elgamal M., Hani A., et al.(1999). Triterpenoid, saponins from *Fagonia indica*. *phytochemistry*, 51(8), 1049-1053p.
165. Sidrach L., García-Cánovas F., Tudela J., & Rodríguez-López J N. 2005. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus L.*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66(1): 41-49p.
166. Siew Y.-Y., Zareisedehizadeh S., Seetoh W.-G., Neo S.-Y., Tan C.-H. et Koh H.-L. 2014. Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. *Journal of Ethnopharmacology*, 155:1450-1466p.
167. Silva E. M., Rogez H. & Larondelle Y., 2007- Optimisation of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Journal of Separation and Purification Technology*, vol. 55:381-387.
168. Silva S.V., Malcata F.X. 2005. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food chemistry*, 89: 19-26p.
169. Singh A N., Jagannadham M V., Dubey V K. 2010. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to Procerain. *Process Biochemistry*, 45: 399-406p.

170. Singleton V.L. et Rossi J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16: 144-158p.
171. Soares P M S., Calixto F C., Planta R J. 2000. Production by yeast of aspartic proteinases from plant origin. Instituto de Ciencia Aplicada e Tecnologia. International Patent WO 00/75283 A1.
172. Sousa, M. J., Malcata, F. X. 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) *in vitro* and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, 82: 151- 170p.
173. Souza S S., Cruz A G., Walter E H M., Faria J A F., Celeghini R M S., Ferreira M M C., Granato D., & Sant'Ana A S. 2011. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: a chemometric approach. *Food Chemistry*, 124. 692–695p.
174. Steinsholt K. 1973. The use of an Instron Uni-versai Testing Instrument in studying the rigidity of milk during coagulation by rennin. *Milchwissenschaft* 28: 94-97p.
175. St-Gelais D., Tirard-Collet p. 2002. Fromage, in : Vignola C.L, 2002. Science et technologie du lait : transformation du lait. Presse international e polytechnique, Montréal (Canada). 349-415p.
176. Storer, A C., Ménard R. 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244: 486–500p.
177. Sudesh G., Bhawana G., Karishma K., Pooja S. 2012. Ethnopharmacological potential of *Calotropis procera*: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*, 3: 19-22p.
178. Suguna K., Padlan E A., Smith C W., Carlson W D., Davies D R. 1987. Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20): 7009-7013p.
179. Sullivan G A., Calkins C R. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*, 85(4): 730–734p.
180. Sun B., Ricardo-da-Silva J. M. & Spranger I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric. Food Chem.*, 46 (10):4267-4274p.
181. Talantikite-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. 159p.
182. Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. and El-Elimat, T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* 104 : 1372-1378p.
183. Teixeira G., Santana A R., Pais M S., Clemente A. 2000. Enzyme of *Opuntia ficus indica* (L.) Miller with potential industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 88: 299-312p.
184. Teklehaymanot T. 2017. Une étude ethnobotanique des plantes médicinales et comestibles de *Yalo Woreda* dans l'état régional Afar, en Ethiopie. *Journal d'ethnobiologie et d'ethnomédecine*, 13 (1): 40p.
185. Telli A. 2017. Activite anti-oxidante, antimicrobienne, antidiabétique de deux espèces spontanée utilisée dans le traitement de diabète dans la région de Ouargla : *Amoducus locotruchuset Anevillaradiata*. Thèse doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 52p.
186. Touati K. 1990. Contribution à l'étude microbiologique et physico-chimique d'un fromage artisanal algérien "la klila". Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie. 78p.
187. Toutain J. 1979. *Eléments d'Agronomie Saharienne ; de la Recherche au Développement*. Edition I.N.R.A, Paris. 296 p.
188. Tripathi P., Tomar R., Jagannadham, V. 2011. Purification and biochemical characterization of a novel cystein protease streblin. *Food Chemistry*, 125: 1005-1012p.
189. Valentão P., Fernandes E. 2002. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17): 4989-4993p.
190. Veisseyre R. 1975. *Technologie du lait*. 3^{ème} Edition. Edition La Maison Rustique, Paris,

- France. 713p.
191. Verissimo P., Faro C., Moir A J., Lin Y., Tang J., Pires E. 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, 235: 762-768p.
 192. Vieira, M., Pissarr J., Verissimo P., Castanheira P., Costa Y., Pires E., Faro C. 2001. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, 45(5): 529-539p.
 193. Vignola C. L. 2002. *Science et technologie du lait*. Ed. Ecole polytechnique de Montréal. Canada. 600p.
 194. Vincken J P., Heng L., De Groot A., Gruppen, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68 :275–297p.
 195. Vuorela S. 2005. Analyse, isolement et bioactivités des composés phénoliques de colza (mémoire). Université d'Helsinki, *Série EKT*, vol. 1343p.
 196. Walstra P., Jenness R. 1984. In: *Dairy Chemistry and Physics*, Publication John Wiley & Sons Inc., New York, USA. 467p.
 197. Waugh D F., Creamer L K., Slattery C W. et Dresdner G W. 1970. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, 9: 786-795p.
 198. Yadav R NS., Agarwala M. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12): 10-14p.
 199. Yagil., 1985. *The Desertcamel; comparative physiological adaptation*. Ed. KARGER, Berlin, Allemagne. 8p.
 200. Yazid A. M., Fong H. M., Sipat A B., Shuhaimi M., Idris, Y. M. A. 1999. Proteolysis of milk and casein fractions by *Streblus asper* (Kesinai) extract. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2: 654-659p.
 201. Yoshida-Yamamoto S., Nishimura S., Okuno T., Rakuman M. & Takii, Y. 2010. Efficient DNA extraction from nail clippings using the protease solution from Cucumismelo. *Molecular Biotechnology*, 46(1): 41-48p.
 202. Zikiou A., 2017. *La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (Cynara cardunculus L)*, Mémoire de magister. 85 p.

Sites internet

203. (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/details/species/id/b037533b1ec41b54012e2830523cdddd>). Consulter le 2 / 8 / 2020 / à 11h 43
204. (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/details/species/id/c5fcafc2575e114896180c15da5dfe0d>). Consulter le 2 / 8 / 2020 à 11h50

ANNEXES

Annexe 01 : Appareillage

Laboratoire de biochimie faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre département de biologie de l'université de Ghardaïa

- Balance analytique (0,01g) et de précision (0,1 mg)
- Centrifugeuses
- Spectrophotomètre
- pH mètre
- Bain- Marie
- Agitateurs (magnétique et basculant)
- Dessiccateur

Laboratoire de contrôles de qualité et suppression des fraudes d'El Atteuf(Ghardaïa)

- Balance
- Loupe binoculaire
- Autoclave
- Etuve
- Bec Benzine

Laboratoire de contrôle de qualités de l'institut Mesaadia Cherif à Nomirate (Ghardaïa)

- Dessiccateur
- Balance
- Etuve
- pH mètre
- Conductimètre
- Bain- Marie
- Lactodensimètre
- Hôte
- Centrifugeuses

Annexe 02 : Fiche questionnaire

« Les plantes utilisées traditionnellement dans la coagulation du lait dans la région de Ghardaïa »

➤ Informateur

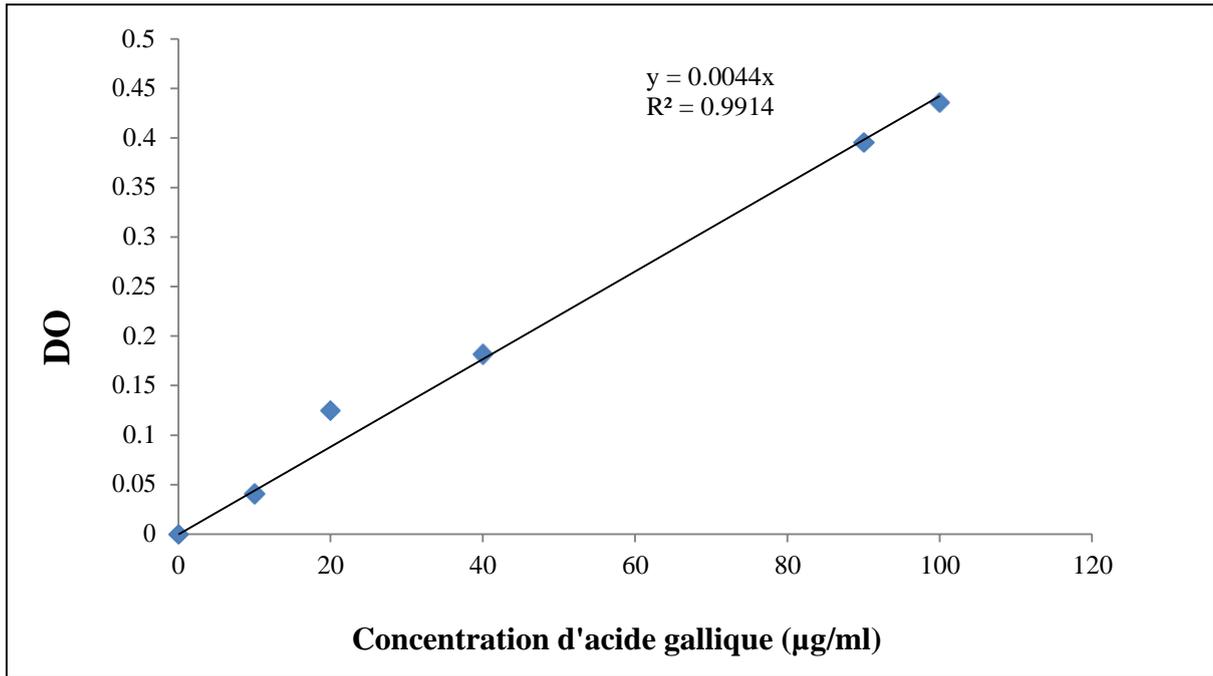
- Age :
- Sexe : Masculin Féminin
- Adresse :
- Préférez-vous : Fromage traditionnelle Fromage moderne

➤ Les plantes utilisées dans la coagulation du lait :

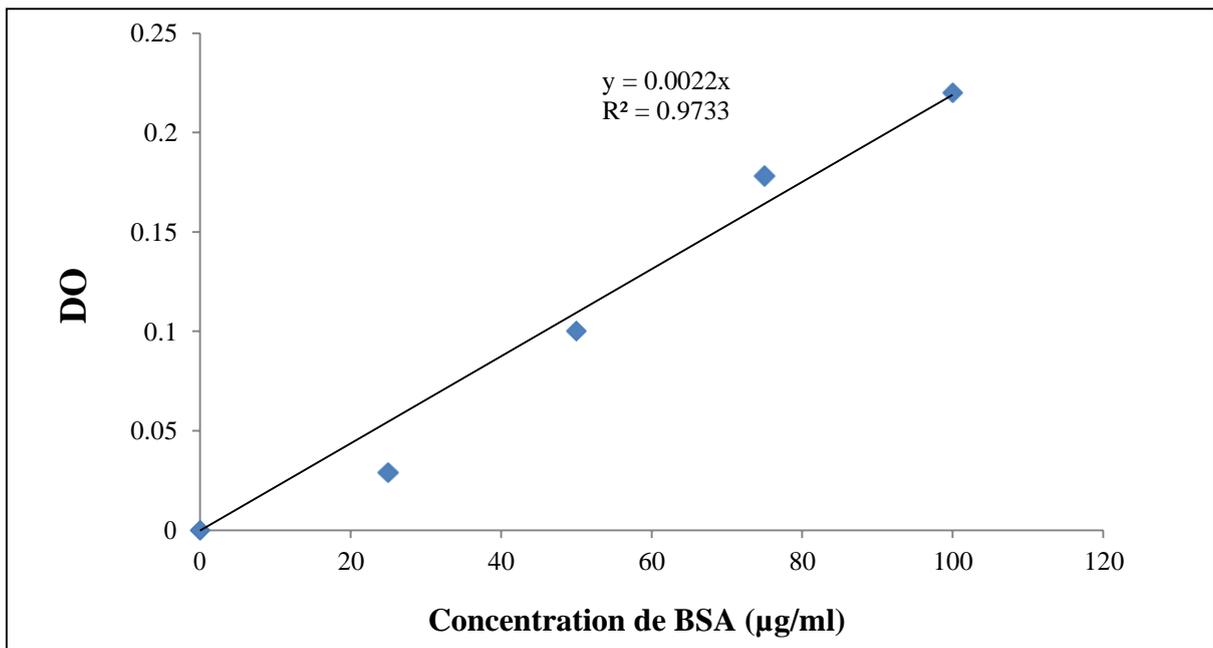
- Connaissez-vous des plantes utilisées traditionnellement pour coaguler le lait :
Oui Non
- pouvez-vous me donner les noms de quelques espèces utilisées :
- Ces plants sont : spontanés cultivées
- Spontanée, elle est : Sahara autre région
- Nom vernaculaire des plantes :
- La meilleure période de sa cueillette : Printemps Eté Automne
Hiver Toute l'année
- Etat d'utilisation : Sec Frais Sec et frais
- Parties utilisées : Tiges Fleurs Fruits
Graines Ecorces Feuilles
Plante entière
- Dose utilisée : Dose précise Dose non précise
- La dose est précise, elle est : cuillère poignet
- Mode d'utilisation : Poudre Semi poudre Directe
- Utilisation : Seule Mixte
- L'espèce utilise est toxique : Oui Non

Le fromage préparé :

- Nom de fromage :
- Comment vous les procurez-vous ? Achat Don Production personnelle
- Méthode de préparation du fromage :
- Mode de conservation :
- Durée de conservation : Moins d'un jour Plus d'un jour
Une semaine Plus qu'une semaine
- Type du lait utilisé : Chèvre Vache Camelin Brebis



Annexe 03 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.



Annexe 04 : Courbe d'étalonnage de BSA



Ethnobotanical study of wild plants used in the Algerian traditional cheese-making of *Kemariya* in the M'Zab Valley (Algeria)

Maroua Kheloufi¹, Mira Meddah¹, Nadjette Djemouai^{1,2,3*}, Alia Telli⁴

¹Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algeria

²Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), tfgcole Normale Supérieure de Kouba, Algiers, Algeria

³Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides (LRZA), Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), BP32 tfl-Alia, 16111 Bab tfgzouar, Algiers, Algeria

⁴Laboratory of tfgcosystems Protection in Arid and Semi-Arid Area, University of Kasdi Merbah, 30000 Ouargla, Algeria

Key words: Traditional cheese, *Kemariya*, ethnobotanical survey, *Cynara cardunculus*, *Fagonia glutinosa*, Ghardaïa.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/4.12.1-8>

Article published on June 31, 2019

Abstract

The traditional cheese known by *Kemariya* occupies a very important socio-economic place in the M'Zab Valley. It is considered as one of the popular traditional cheese in the region that is coagulated by animal rennet as well as by some plant species. In order to determine and catalog the plant species used in the coagulation of milk, an ethnobotanical survey was carried out with the local population of Ghardaïa province (Algeria). This study was conducted using semi-structured questionnaires that were distributed to 100 people of two ethnics (57 Arab and 43 Mozabites). Among them, 10 informants were herbalists. The obtained results showed that nine plant species are well known and used for *Kemariya* preparation among them *C. cardunculus*. and *F. glutinosa* are the most cited. In addition, the harvest of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* is done in spring during the flowering period (48% and 59% of responses, respectively). The used part for *C. cardunculus* was flowers (100% of responses), while for *F. glutinosa* were seeds (44.4%) and leaves (33.3%). *C. cardunculus* and *F. glutinosa* can be used either in the fresh or dry state. Goat milk was the most used milk by the local population for *Kemariya* production. These results highlight the importance of the use of the Algerian flora in cheese production. Further studies are required to preserve the Algerian culinary heritage and to identify the active ingredients of these plant species for the production of plant coagulants substituting the rennet in cheese fabrication.

* **Corresponding Author:** Nadjette Djemouai ✉ nadjetdjm@hotmail.fr

Introduction

Ethnobotanical studies deal with the interactions between humans and plants as well as the study of traditional knowledge. Moreover, the interaction of plants with human societies varies due to their uses, relative importance in addition to varying social, cultural and ethnic factors (Panhwar and Abro, 2007; Thakur *et al.*, 2014).

High plant diversity is noted in Algeria because of its geographical situation, soil composition and climate (Mediterranean climate in the North, semi-arid climate in the steppe plains, arid climate in arid areas and desert climate in the Sahara) which is favorable for growth and development of rich flora (Azzi *et al.*, 2012).

The dairy sector provides quality and nutritious milk and milk products for the human population. Milk has essential nutrients such as high biological value proteins, vitamins and minerals which is an attractive resource for the economic livelihood in countries with hot climate (Pulina *et al.*, 2018).

For instance, the warm climate and poor hygienic conditions, combined with inadequate refrigeration increase biohazard of raw milk. This poses health safety concerns but also economic and ecological problems. Indeed, during periods of milk overproduction (lactation period), prices can be lower and milk collection centers can become saturated, and so a part of the production is lost. Besides, the short shelf life of dairy products is an obstacle to distribution over long distances (Dupas *et al.*, 2019).

The consumption of dairy products in Algeria is an old tradition linked to livestock farming, since dairy products are made employing ancient artisanal processes, using milk or mixtures of milk from different species (Leksir *et al.*, 2019).

In Algeria, traditional cheese production has always involved the use of coagulant plant extracts in their crude state, obtained from fig tree sap, artichoke and cardoon flowers or pumpkin seeds for the preparation of

fresh cheese. They are used for the *Djeben* made from goat and sheep milk in the North part of Algeria and *Kemariya* which is made with cow, goat and sometimes camel milk in the South of Algeria (Nouani *et al.*, 2009).

The use of coagulant plants instead of rennet in the cheese manufacture is suitable for specific diets as for vegetarianism as well as religious restrictions especially for Muslims (Halal products). The process has been preserved in several Mediterranean countries such as Spain and Portugal which are the most important producers of cheese made with coagulant plants (Shah *et al.*, 2014; Dupas *et al.*, 2019).

In Algeria, at least ten types of traditional cheese from different regions of the country are currently listed with the best known are *Djben*, *Klila* and *Kemariya* which is also called *Takammart* by local people. This last is a traditional cheese that is very popular in the South of Algeria, especially in the province of Ghardaïa (McSweeney *et al.*, 2004; Leksir *et al.*, 2019).

The objective of this work is to review the traditional uses of plants for the cheese-making of *Kemariya* through an ethnobotanical survey. In this sense, this study aims to document the traditional use of spontaneous plants by the local population of M'Zab Valley for milk coagulation and traditional cheese "*Kemariya*" production.

Materials and methods

Study area

This study was conducted in Ghardaïa province, one of the most important Wilaya of the South of Algeria that covers an area of 86 560 km². It is located at an altitude of 450 m above the sea level and it is approximately 600 km far from Algiers; the capital of Algeria (Fig. 1). This province is located in the northern and central part of the Sahara between 4°-7° E and 35°-36° N. The territory of the M'Zab Valley (Wilaya of Ghardaïa) has been awarded national heritage in 1971 and world heritage by UNESCO in 1982 (<http://www.andi.dz/PDF/monographies/Ghardaia.pdf><https://www.mosaicnorthafrica.com/portfolio/mzab-valley/>).

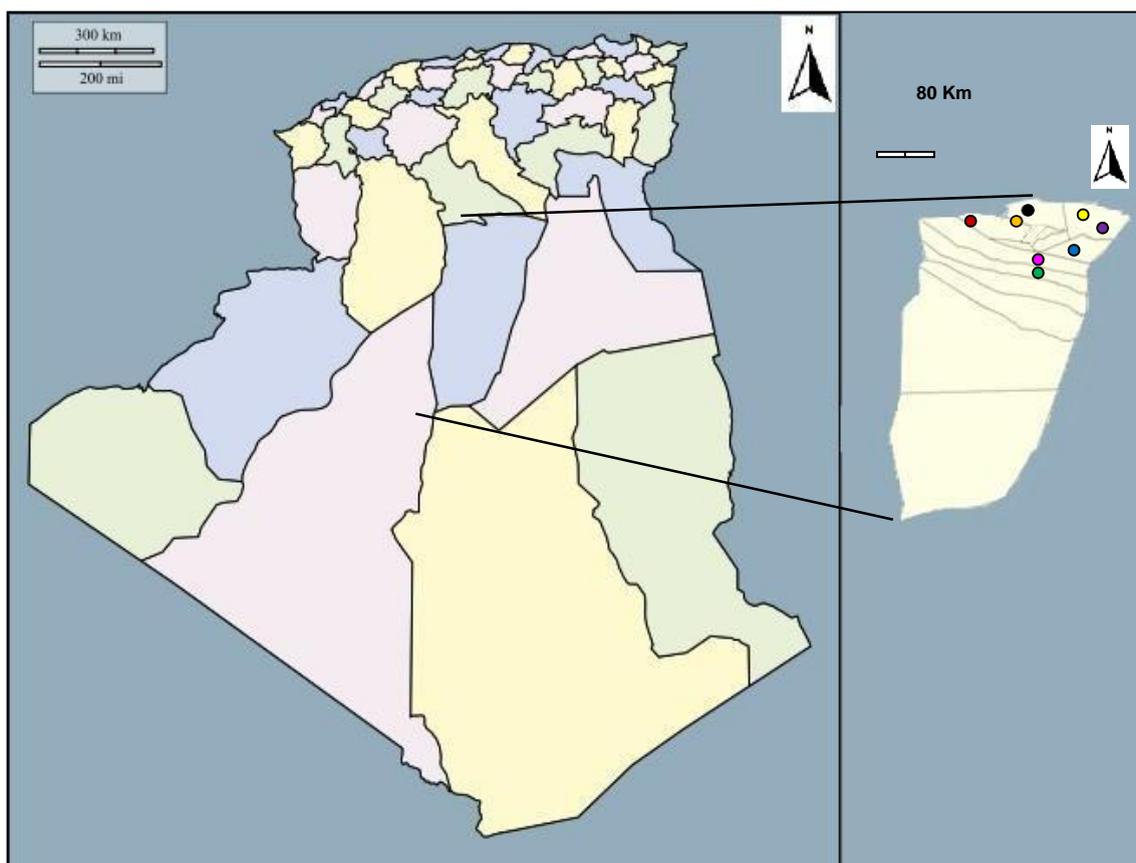


Fig. 1. Map of Algeria showing Ghardaïa province and the locations of the studied areas. Zelfana in bleu, El Guerrara in yellow, El Atteuf in purple, Sebseb in green, Berriane in black, Ghardaïa (village center) in orange, Metlili in pink and Dahayet Bendhahoua in red.

This region is characterized by very low precipitations (160mm per year). Its climate is hot and dry in the summer with temperatures that vary between a maximum of around 45°C and a minimum of 20°C, thus giving a large diurnal temperature swing; whereas, winter temperatures vary between a maximum of 24°C and a minimum of 0°C. The average annual range is about 12.2°C amplitudes of monthly average temperatures and is moderate in winter than in summer (averages are 11°C in winter and 13.5°C in summer) (Bekkouche *et al.*, 2013).

Data collection

The method used during this study consisted of semi-structured questionnaires intended for the inhabitants of the eight studied municipalities between the 1st of October, 2019 and 1st of March, 2020. The interviews were conducted with local people who were born and lived their entire lives in the studied areas. The informants of each studied

municipality were selected for the interviews on a random basis. The interviews focused on the informant's sex and age. During the interviews, the informants were asked also about: local names of the plants used in the cheese-making of *Kemariya*, the period of plants harvest, parts used, preparation conditions, methods of preparation, type of the used milk, doses, duration of conversation of *Kemariya* as well as toxicity of the used plants. Means, percentages, tabulations and graph drawings were used to analyze the collected data with Excel software (Microsoft Corporation, 2016).

Results

Characteristics of survey participants

In this survey, the mean age of interviewers was 60 years (minimum 19 and maximum 102). Of the 100 informants, more than 50% were over the age of 40 years, while the interviewers with an age under 40 years represented only 36% (Fig. 2). It appears that

the use of plants as coagulants for *Kemariya* production is more important by women (56%) than by men (44%) (Fig. 3). However, women and men are equally responsible for collecting the plants used in milk coagulation, with the participation of men, especially in areas known to be dangerous. Women mainly take care of the drying, storage and artisanal preparation of *Kemariya*, they are the most knowledgeable in the traditional manufacture of cheese because of their responsibility as mothers, who give meals that are rich in nutrients for their families.

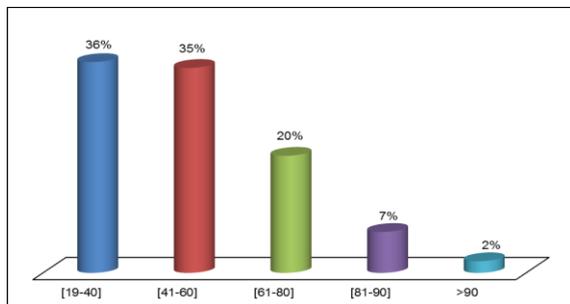


Fig. 2. Informant’s distribution in age-classes.

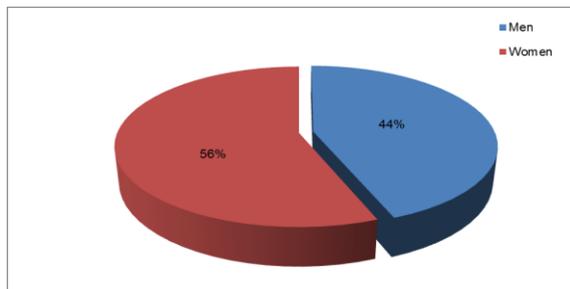


Fig. 3. Percentage of information provided by gender.

The use of plants for the preparation of *Kemariya* in the M’Zab Valley was widespread in all age groups with predominance among people of [41 to 60] years old (35%) (Fig. 4).

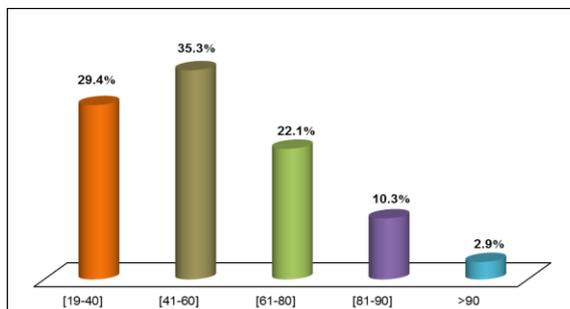


Fig. 4. Distribution of the population using plants in milk coagulation according to age-classes.

Plants used in the production of traditional cheese “Kemariya”

The obtained results showed that more than 68% of questioned people know and use plants as coagulants in the preparation of traditional cheese *Kemariya*, while 32% did not know about plant species used in the coagulation procedure (Fig. 5). These results prove that the local population of Ghardaïa knows and uses plants in their daily life for the preparation of traditional cheese.

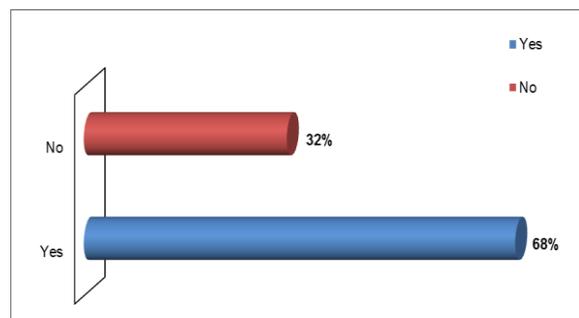


Fig. 5. Knowledge about the use of substitute vegetable rennet.

Concerning the type of cheese preferred by the local population, we found that the majority of the questioned population preferred the traditional cheese *Kemariya* (82%) and only 18% of people preferred modern cheese (Fig. 6). The preference of traditional cheese by the local population of Ghardaïa can be linked to the isolation of rural areas, the inexistence or scarcity of commercial infrastructures, the high cost of modern cheese, the modest income of the studied population as well as the habit of eating *Kemariya* as a dessert during the festive seasons (Leksir *et al.*, 2019).

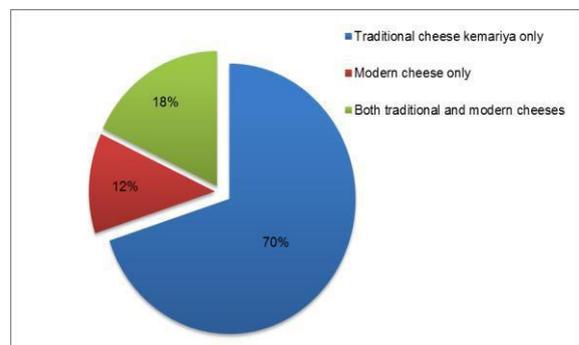


Fig. 6. Preferred type of cheese for consumption in Ghardaïa province.

The plant species used in milk coagulation and traditional cheese “kemariya” preparation are summarized in Table 1. The botanical name, vernacular name, plant part used and frequency of citation of each species were provided. Nine plant species are traditionally used in Ghardaïa province for milk coagulation and cheese production. The most cited species are *Fagonia glutinosa* Delil.

(Zygophyllaceae) which is the most used plant with a proportion of 39.7%, followed by *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae) with a rate of 33.8% (Fig. 7). The other species were less used in comparison with the two first (Table 1). Two species are also used to flavor the cheese produced which are *Artemisia campestris* L. (Asteraceae) and *Rhantherium adpressum* Coss. & Dur. (Asteraceae).

Table 1. Coagulant plants used by local population of Ghardaïa province.

Scientific name	Family	Local name	French name	English name	Used part	Citation frequency (%)
<i>Artemisia campestris</i> L.	Asteraceae	Alala Dgfouft	Aurone Armoise des champs Armoise champêtre	Field Sagewort Field-Southernwood Field-Wormwood	Leaves	2.9
<i>Cynara cardunculus</i> L.	Asteraceae	El'Khorchof Thaga	Carde Cardon Cardonette	Cardoon Cardoon artichoke	Flowers	33.8
<i>Emex spinosa</i> L. Campd	Polygonaceae	Homayde	Emex épineux	Spiny Emex Spiny- threecoverjack	Fruits	1.5
<i>Fagonia glutinosa</i> Delil	Zygophyllaceae	El'Chraika Komida	/	/	Seeds Leaves Flowers Fruits	39.7
<i>Ficus carica</i> L.	Moraceae	Karma	Figuier Figuier de carie	Fig Fig-tree Edible Fig	Latex	10.3
<i>Pituranthos chloranthus</i> Coss. & Dur.	Apiaceae	Guezah Tattayt	Pituranthose à balait	/	Aerial parts	4.4
<i>Rhantherium adpressum</i> Coss. & Dur.	Asteraceae	Arfadja	/	/	Aerial parts	1.5
<i>Silybum marianum</i> L.	Asteraceae	Chawk l'djamal	Chardon-Marie Artichaut- sauvage Chardon marbré Silybe de marie	Thistle Variegated Milk thistle Blessed milk thistle	Flowers	4.4
<i>Teucrium polium</i> L.	Lamiaceae	Jaada Gattaba Khayatit lajrah	Herbe de marie Germandrée blanc- grisâtre Polio de montagnes	Poley Ezovion	Aerial parts	1.5

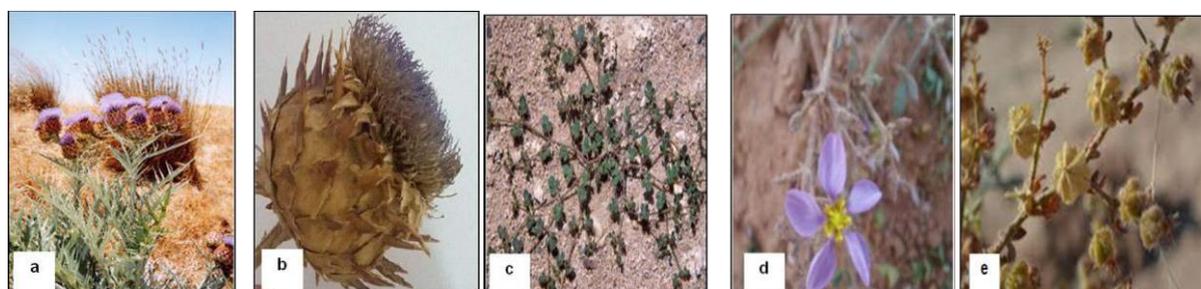


Fig. 7. Morphological aspect of *C. cardunculus* and *F. glutinosa*. Aerial parts of *C. cardunculus* (a), dried flower of *C. cardunculus* (b), *F. glutinosa* in its natural environment (c), its flower (d) and its fruits (e).

The harvest period of plants depends on the parts that will be used to prepare the cheese. The information concerning the appropriate period of harvest of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* by the local population of Ghardaïa is shown in Fig. 8. *C. cardunculus* is usually harvested in spring (48%), autumn (35%) or summer (17%). For the harvest of *F. glutinosa*, it is generally done in spring and autumn with the proportions of 59% and 37%, respectively, but its harvest can take place throughout the whole year (4%).

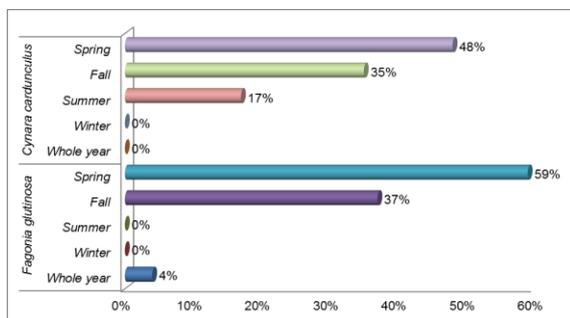


Fig. 8. Different periods of harvest of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* for *Kemariya* production.

The most used parts of the cited plants are flowers and aerial parts (3 species for each), followed by leaves and fruits (2 species) and one specie for seed and latex (Table 1). Concerning *C. cardunculus*, we found that all respondents said that the flowers were usually the part used in milk coagulation (100%), while they were seed and leaves for *F. glutinosa* (with 44.4% and 33.3% of respondents, respectively) (Fig. 9).

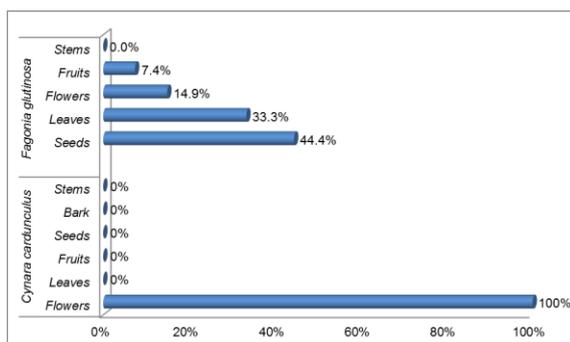


Fig. 9. Used parts of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* in the *Kemariya* production.

The use of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* in the coagulation of milk according to the state of the part used is shown in Fig. 10. The obtained results show

that the two plants can be used either in the fresh or dry states. *C. cardunculus* is employed by 39% of the population in the fabrication of traditional cheese, both in fresh and dry states. Some of the questioned people preferred using this species at fresh state (30%). Of the total of respondents, 52% of the population said that *F. glutinosa* was used in the fresh or dry state depending on availability (Fig. 10). Natural drying is an effective method of conservation for avoiding contamination of the target plants; it increases its lifespan and decreases its weight to facilitate its transport (Conceição *et al.*, 2018).

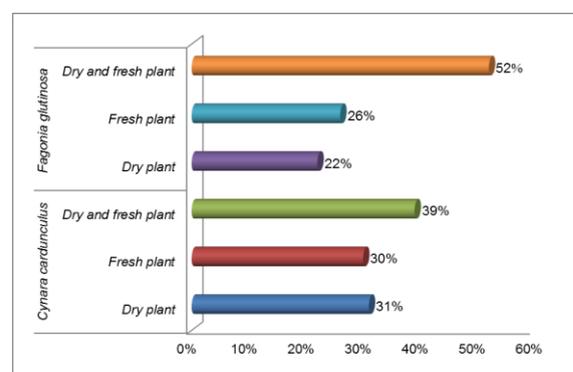


Fig. 10. Used forms of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* used for the *Kemariya* production.

As regards to the toxicity, all the questioned population of Ghardaïa province mentioned that the plant species used in coagulation milk and cheese fabrication were not toxic. The results of the ethnobotanical study show the richness and diversity of knowledge on the use of plants in the coagulation of milk in Ghardaïa province. Some species were characterized by a strong consensus of use in the artisanal preparation of the traditional cheese called *Kemariya*.

The used milk and produced *Kemariya*

The totality of the interviewed population used *C. cardunculus* or *F. glutinosa* directly in milk without a combination with other ingredients. From Fig. 11 that show the proportions of the used type of milk for the preparation of *Kemariya* by the local population of the Ghardaïa province, we noticed that goat milk represented the most used milk for the preparation of *Kemariya* when using substitute vegetable rennet of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* with proportions of

89% and 61%, respectively. The local population used also cow milk with a proportion of 7% and 17% for the two plants, respectively. Finally, people used both goat and cow milk with a proportion of 22% for *F. glutinosa* and 4% for *C. cardunculus*.

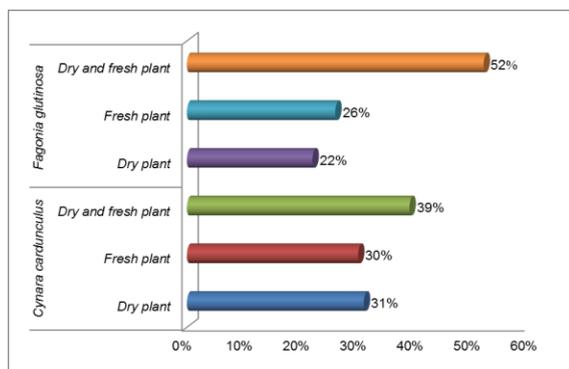


Fig. 10. Used forms of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* used for the *Kemariya* production.

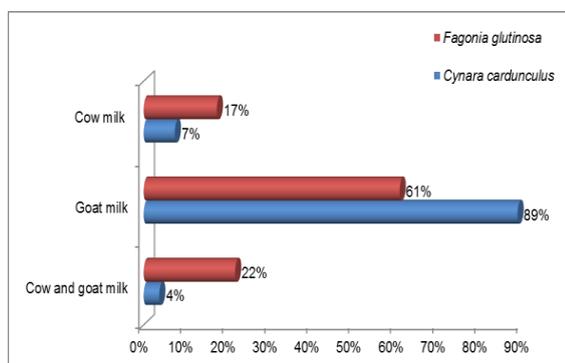


Fig. 11. Types of milk used for *Kemariya* production.

The use of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* in the coagulation of milk and cheese production according to the dose is shown in Fig. 12. We noticed that more than 50% of the studied population used *C. cardunculus* (65%) and *F. glutinosa*, (52%) with non-precise doses; whereas a small number of people mentioned the use of these two species with precise doses (Fig. 12). In addition, the entire 100% of the population that used *F. glutinosa* for the manufacture of *Kemariya* said that the duration of conservation of this type of cheese is less than a day, while the duration of conservation of *Kemariya* prepared from *C. cardunculus* is less than a day with a proportion of 74%, followed by a duration of one week at most and more than a day with the proportions of 22% and 4%, respectively (Fig. 13).

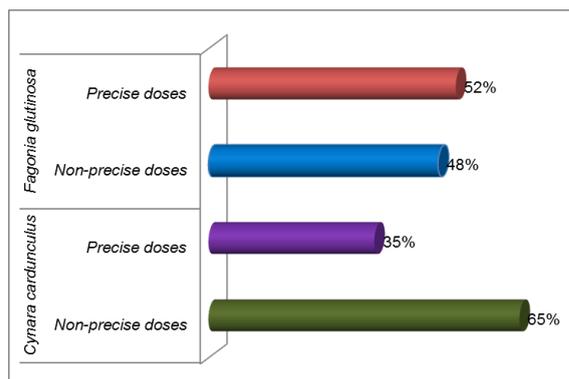


Fig. 12. Dose type of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* used for *Kemariya* preparation.

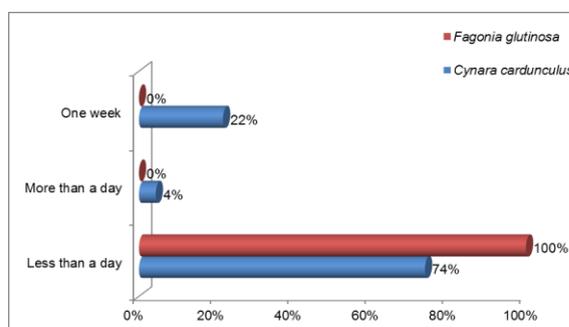


Fig. 13. Conservation period of *Kemariya*.

Presentation of the two most used plants in *Kemariya* production

The two plants with the highest usage in the coagulation of milk in Ghardaïa province are named *C. cardunculus* and *F. glutinosa* were in-depth analyzed in this study.

Cynara cardunculus

This plant is commonly known as cardoon or artichoke. It is an herbaceous plant that develops into a rosette, and then emits a thick and branching main stem that can reach 1.50 to 2m high, carrying at its ends terminal flower heads. Very large and long leaves, with toothed and thorny edges, deeply divided into acute lobes, silver-green or gray-green, its flowers are purple, solitary and often exceeding 6 cm in diameter (Fig. 7). The cardoon has a very deep pivoting root system, which gives it good resistance to drought and non-severe cold (Quézel and Santa, 1962; Djerroumi and Nacef, 2004). Cardoon flowers are rich in proteases such as cardosins A and B, aqueous extracts of flowers have long been used to make cheese (Silva and Malcata, 2005; Fernández et

al., 2006), dry flowers are macerated in a small amount of salted water and then the filtrate is added to the milk (Macedo *et al.*, 1993).

Fagonia glutinosa

Fagonia genus is well distributed in arid areas of all continents except Australia. It is found in different localities such as Algeria, Tunisia, Palestine, Syria, Saudi Arabia, Mesopotamia and Persia (Batanouny and Batanouny, 1970; Beier *et al.*, 2004).

F. glutinosa is a perennial, prostrate, pubescent, pale green plant with long internodes, trifoliate leaves, short spines, as long as petioles, small purplish-pink flowers, opening in a star and subsequently giving small capsules. Their main habitat is on sandy and rocky sandy soils (Ozenda and Quézel, 1956) (Fig. 7).

Artisanal manufacturing of traditional Kemariya cheese

In rural areas, milk is abundant during periods of high lactation. For lack of means of preservation, it is difficult to keep the excess of this quickly perishable food; the main part of the production is therefore transformed into cheese. *Kemariya* obtained from cow's milk or goat's milk, is made by women according to traditional methods in the regions of "M'zab", using vegetable rennet of the 9 plant species cited in Table 1. For example, *C. cardunculus* flowers and *F. glutinosa* (seeds, flowers, leaves or fruits) in dried form are used by addition 2 to 4 g per 1 L of milk for 30 min until coagulation. After 1 h to 24 h, the mixture will undergo the separation of the remaining liquid. The last step is to place the coagulum in molds (Fig. 14).

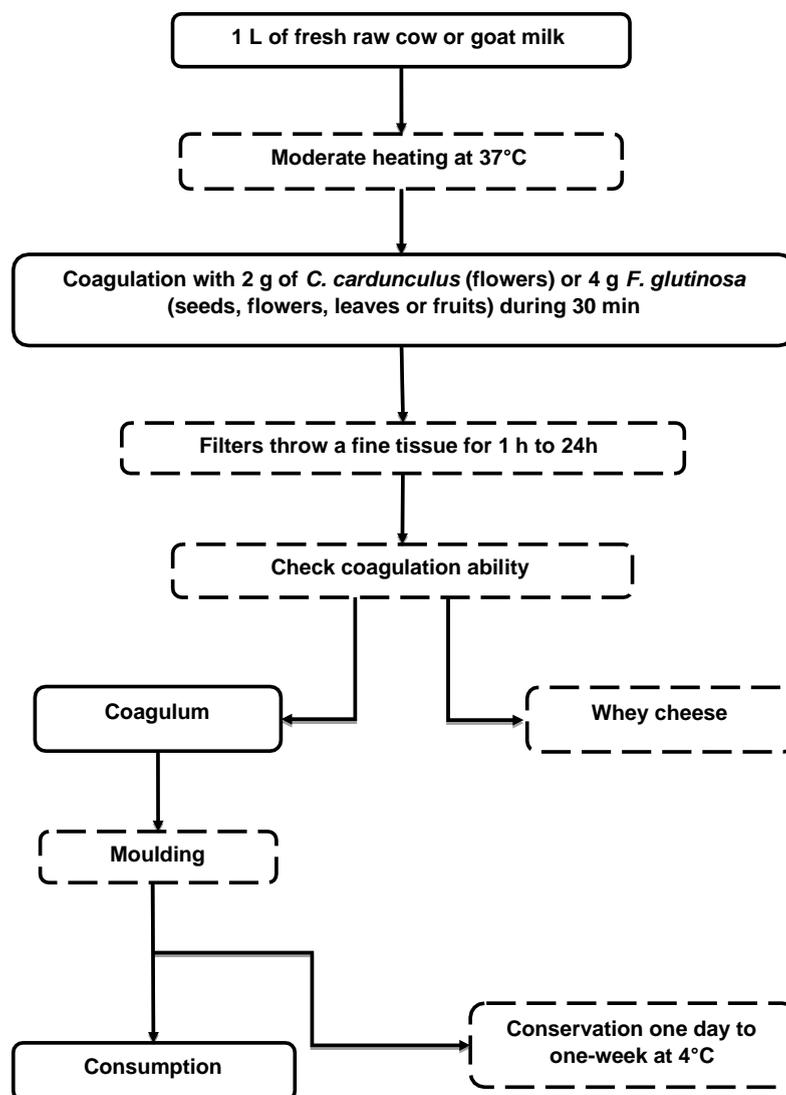


Fig. 14. Schematic diagram of traditional manufacture for *Kemariya* production in Ghardaïa province.

Kemariya cheese-making experiment

For the experimental part of the manufacturing of *Kemariya*, it was done according to the traditional method of the inhabitants of the province of Ghardaïa. The milk used to make the cheese is raw goat milk. The used milk is distributed in two containers of 1000ml at a temperature of 37°C. *C. cardunculus* (2g of flowers in a fine tissue) were added in the first container and 4g of seeds of *F.*

glutinosa (in a fine tissue) were added in the other container. Both containers were incubated for 30 min and as soon as the two phases of the milk (whey and curd) were separated, the mixture is poured onto a filter cloth to facilitate drainage. Then the containers are placed to rest for 1h to 24h and drip whey is collected in full. Finally, the curds were placed in molds and *Kemariya* can be conserved from one day to one week at 4°C (Fig. 15).

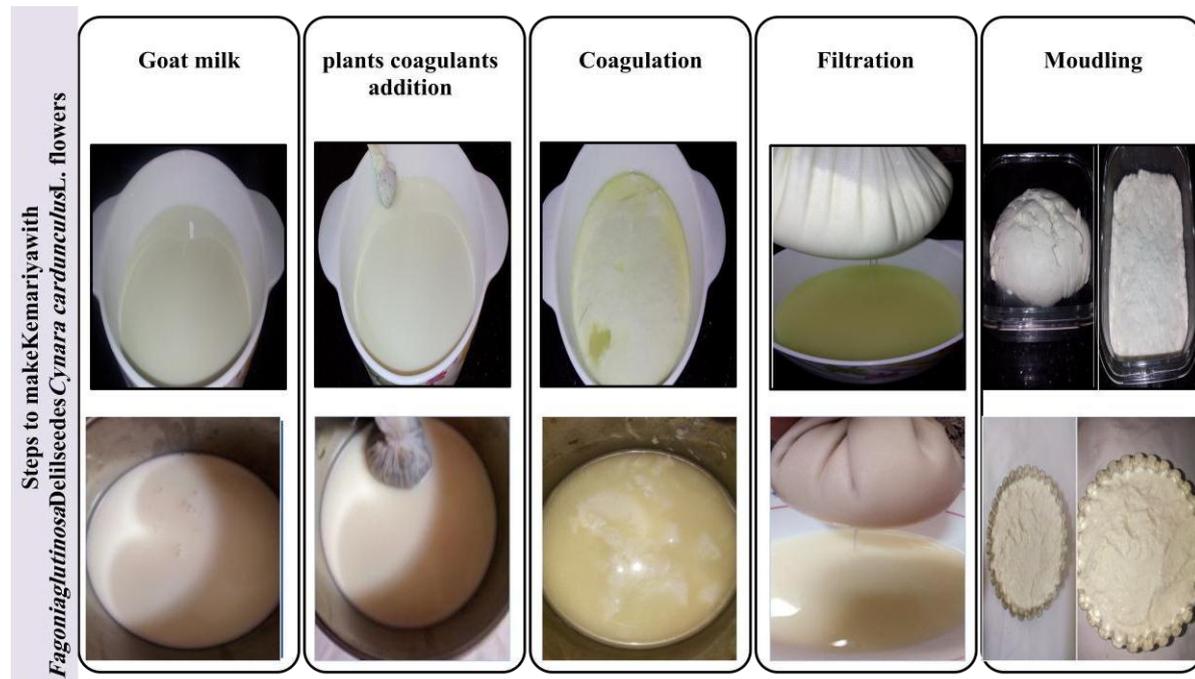


Fig. 15. Workflow used in cheese-making of *Kemariya* using vegetable rennet and goat milk. The top photos show the use of *C. cardunculus* flowers in making *Kemariya* while the bottom photos show the making of *Kemariya* with *F. glutinosum* seeds.

Discussion

Plants have been traditionally used for centuries in cheese manufacturing, either for their aromatic properties or as technological auxiliaries (e.g. milk-clotting enzyme preparations and cheese wrappers) (Dupas *et al.*, 2019). Our results showed that a 68% of the questioned residents in the studied areas preferred using plants as a milk coagulant for the preparation of the artisanal cheese *Kemariya*. This is often because they are readily accessible, trusted and they are directly derived from local plants or other substances found within the community (Guedje *et al.*, 2011; Worley, 2011). On the other hand, the use of spontaneous plants can be economically beneficial, bearing in mind that most of the rennet used by

Algerian cheese-making factories is imported (Zikiou et Zidoune, 2018). Traditional cheeses have a special place among various food preparations (Leksir *et al.*, 2019). Our results showed the majority of local populations of Ghardaïa province prefer the traditional cheese *Kemariya*. On one hand, *Kemariya* cheese may represent an alternative to modern cheese which is often felt to be expensive. On the other hand, the isolation of rural areas, the inexistence or scarcity of commercial infrastructures, the modest income of the studied population and the high demand for this cheese during the festive season as the main dessert eaten with honey, peanuts, and served with mint tea are the causes of its preferred use (Leksir *et al.*, 2019). Demographic factors such as age, gender and

occupation are important determinants of knowledge (Lara Reimers *et al.*, 2018). Our results showed that both males and females practiced the traditional preparation of *Kemariya* but there was slightly higher knowledge among women than men. Women are usually in charge of drying, storing and preparing recipes for the care of family members (Mehdioui and Kahouadji, 2007). According to Leksir *et al.* (2019), traditional dairy products, with strong cultural, medicinal and economic values, are the historical product of the social and economic dynamism of the rural communities. In fact, women are the most holders of traditional knowledge; they share their responsibility as mothers and give first aid especially for their children (Bakiri *et al.*, 2016). In addition, our study showed that the elderly people (aged 41 to 60) have expectedly greater knowledge upon the utilization of coagulant plants including *C. cardunculus* and *F. glutinosa* due to their long-lasting direct and regular contact with nature resources. In contrast, the younger generation showed less interest in these traditional practices mostly because of changing dietary habits (Leksir *et al.*, 2019). Hence, elder people must provide and transmit their knowledge to the new generation (Lakouéténé *et al.*, 2009; Chekole *et al.*, 2015). Traditional cheeses are cultural goods that deserve to be studied, characterized and protected (El Rhazi *et al.*, 2015; McSweeney *et al.*, 2004). Some types of cheese are known, made, and eaten to the present day, while others are unfortunately endangered for various reasons, namely the unavailability of fodder (food availability), the rural exodus and the change in food habits (Benkerroum and Tamime, 2004; Benkerroum, 2013; Leksir *et al.*, 2019).

According to Dupas *et al.* (2019) and Shah *et al.* (2014), plants since ancient times have been used in the preparation of many types of cheese with the most commonly encountered one is fresh cheese. This last is the product of plants addition to milk to facilitate its coagulation. In the present study, we found nine plant species that are traditionally used in the manufacturing of traditional *Kemariya* cheese in the study area including *C. cardunculus* and *F. glutinosa*. According to Shah *et al.* (2014), *Cynara* spp. in

particular *C. cardunculus*, also known as “wild cardoon” is the most used vegetal coagulant. This plant is widely used in the making of various Spanish and Portuguese cheeses in some Mediterranean countries (Fernández-Salguero and Sanjuán, 1999).

Despite an important variation of methods used by the cheese-makers, our results show that the traditional method of *Kemariya* making was similar to those obtained by Macedo *et al.* (1993) and Dupas *et al.* (2019). According to Tavhare and Nishteswar (2014), the climate, temperature, rainfall, duration of daylight, methods of collection, processing and storage have an impact on the secondary metabolites of the plant. However, it is well known that the concentration of biologically active constituents varies with the stage of plant growth and development (WHO, 2003). Consequently, the activity of the plant extracts is extremely variable depending on the variety, the stage of maturity, the part of plants used, the drying time and the final moisture content. Our results showed that the best time of *C. cardunculus* and *F. glutinosa* harvest is in spring. According to Fernández-Salguero *et al.* (2002), the flowers of *C. cardunculus* can also be picked at different stages of flowering and from different geographical areas (Barbosa, 1983; Cordeiro *et al.*, 1991; Martins *et al.*, 1996). For our local interviewed population, the harvest of *C. cardunculus* flowers was mostly done in spring which is the period of high lactation and milk abundance. For lack of means of preservation, it is difficult to keep the excess of this quickly perishable food, thus milk is collected in milking vases and the main part of the milk is therefore transformed into cheese (Leksir *et al.*, 2019).

Several studies have been performed on *C. cardunculus* flowers that were used as coagulants in cheese-making and many attempts were made to characterize this plant coagulant with a special focus on the proteolytic and lipolytic agents during cheese ripening (Sousa et Malcata, 1996; 1997; 1998; 2002).

As for the *F. glutinosa* plant, in addition to seeds, other different parts (leaves, flowers and fruits) are also used for cheese preparation. Preparation

conditions have a significant influence on the proteolytic and milk-clotting activities of the coagulants (Amira *et al.*, 2018). Our results are similar to the findings of Sousa and Malcata (2002) describing *C. cardunculus* flowers as the most used part in cheese making. *C. cardunculus* and *F. glutinosa* plant parts can be used either fresh or in the dry state after various drying and storage operations. A high percentage of the informants indicated that the dried plant parts were used more frequently in the studied areas.

According to Sousa and Malcata (2002) after collection from the mature plants of *C. cardunculus*, the flowers are usually dried in the shade in the open air. It is now accepted that only the stylets and stigma (violet part) possess a milk-clotting capacity (Faro, 1991; Ramalho-Santos *et al.*, 1997). Furthermore, natural drying is an effective conservation method by avoiding the contamination, increasing the used plants parts lifespan and reducing their weight in order to facilitate their transport (Bourkhiss *et al.*, 2009). Our results on the mode of the preparation of *Kemariya* and the used milk type are similar to those reported by Leksir *et al.* (2019) and McSweeney *et al.* (2017). In our case, the traditional cheese was made from cow milk and more frequently with goat milk and they were coagulated by vegetable rennet only without other addition. According to Benderouich (2009), sedentary and nomadic livestock systems are important in the province of Ghardaïa, especially the family breeding of the goat species is very widespread, for satisfying the family's needs for milk and dairy products.

The collected information revealed that the doses used for *C. cardunculus* and *F. glutinosa* in the traditional making of *Kemariya* are non-precise, this is often because the dose used varies depending on the amount of milk used to make *Kemariya* cheese (Benderouich, 2009). On the other hand, the obtained data revealed that a high proportion of informants conserve *Kemariya* cheese in short durations for one day to one week; this is because the study area is considered as a desert area with a lack of means of conservation and cooling. As a result of that,

Kemariya spoilage accelerates, especially since it is considered as a soft cheese (Benderouich, 2009; Leksir *et al.*, 2019).

Concerning toxicity of *C. cardunculus* and *F. glutinosa*, almost all informants reported their non-toxicity. According to Lakhdari *et al.* (2016), *F. glutinosa* leaves are useful against skin diseases, mouth problems for babies, body weakness, fractures, and muscle spasms. For *C. cardunculus*, in addition to its flowers usage in making *Kemariya* cheese, different parts of the plants such as leaves, fleshy leaf petioles and receptacles are used for soups, stews and salads preparations (do Amaral Franco, 1976; Fernández *et al.*, 2006). There are also some reports of usage of its petioles and roots if properly prepared (Kelly and Pepper, 1996). Cardoon is traditionally used as a diuretic, choleric, cardiogenic and antihemorrhoidal agents. Cardoon leaves are used for their cholagogue, choleric and choliokinetic actions, for treatment of dyspepsia and as antidiabetics (Koubaa *et al.*, 1999).

Conclusion

In Algeria, several traditional kinds of cheese are endangered and deserve special attention especially as the traditional Algerian dairy products are less and less prepared by the young population. The traditional transformation of milk is partly unknown, neglected and, unfortunately, totally undervalued. The absence of written history about the food in Algeria, non-transmission of information and rural exodus; are the main causes in addition to the ignorance of our inheritance.

This work consisted of documenting the traditional use of plants as coagulant substitute rennet and especially the two endemic Algerian plants; *C. cardunculus* and *F. glutinosa* in the coagulation of milk. Information gathered from the local population of Ghardaïa has shown that these plants are used in the preparation of the traditional cheese called *Kemariya*. This study also showed that especially elderly people have a better knowledge of coagulant plants while the younger generation showed less interest in traditional practices which is mainly due to the non appreciation of

traditions and change of food habits. Thus, more attention must be put on the documentation of this knowledge before it's loose or disappearance.

References

- Amira AB, Blecker C, Richel A, Arias AA, Fickers P, Francis F, Attia H.** 2018. Influence of the ripening stage and the lyophilization of wild cardoon flowers on their chemical composition, enzymatic activities of extracts and technological properties of cheese curds. *Food chemistry* **245**, 919-925. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.082>
- Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal FZ, Benmehdi H, Belkacem N.** 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**, 2041- 2050.
- Bakiri N, Bezzi M, Khelifi L, Khelifi-Slaoui M.** 2016. Enquête ethnobotanique d'une plante médicinale *Peganum harmala* L. dans la région de M'sila. *Revue Agriculture* **1**, 38- 42.
- Barbosa M.** 1983. "Cardo" (*Cynara cardunculus* L.) as vegetable rennet, *Boletim do Departamento de Tecnologia e Indústria Alimentar, LNETIDTIA, Lisboa, Portugal*.
- Batanouny K, Batanouny M.** 1970. Autecology of common Egyptian *Fagonia* species. *Phyton* **14(1-2)**, 79- 92.
- Beier BA, Nylander JAA, Chase MW, Thulin M.** 2004. Phylogenetic relationships and biogeography of the desert plant genus *Fagonia* (Zygophyllaceae), inferred by parsimony and Bayesian model averaging. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33(1)**, 91- 108.
- Bekkouche SMA, Benouaz T, Cherier MK, Hamdani M, Yaiche RM, Khanniche R.** 2013. Influence of building orientation on internal temperature in saharian climates, building located in Ghardaïa region (Algeria). *Thermal Science* **17(2)**, 349- 364. <https://doi.org/10.2298/tsci110121112B>
- Benderouich B.** 2009. La kémaria: un produit du terroir à valoriser, mémoire d'ingénieure, université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie. 82 p.
- Benkerroum N, Tamime AY.** 2004. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology* **21(4)**, 399- 413.
- Benkerroum N.** 2013. Traditional fermented foods of North African countries: technology and food safety challenges with regard to microbiological risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**, 54- 89.
- Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhsine M, Chaouch A, Satrani B.** 2009. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agro Sol* **20**, 45-48.
- Chekole G, Asfaw Z, Kelbessa E.** 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants in the environs of Tara-gedam and Amba remnant forests of LiboKemkem District, northwest Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **11**, 1-38.
- Conceição C, Martins P, Alvarenga N, Dias J, Lamy E, Garrido L, Gomes S, Freitas S, Belo A, Brás T, Paulino A, Duarte MF.** 2018. Chapter 5. *Cynara cardunculus*: use in cheese making and pharmaceutical applications. In *Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing* Nurcan Koca, *IntechOpen* **2018**, 73- 96. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76530>
- Cordeiro MC, Pais MS, Brodelius PE.** 1991. Cinarases (proteases) de *Cynara cardunculus* L.: estudo da actividade enzimática em vários ecotipos de Portugal. First International Symposium NOPROT, Faro, Portugal, September 2-6.
- Djerroumi A, Nacef M.** 2004. 100 Plantes médicinales d'Algérie. Edition palais du livre, Algérie. 55 p.
- do Amaral Franco J.** 1976. *Cynara* L. In T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, & S.M. Walters, *et al.* (Eds.). *Flora Europaea* (Vol. 4). Cambridge: Cambridge University Press.

- Dupas C, Métoyer B, El Hatmi H, Adt I, Mahgoub SA, Dumas E.** 2019. Plants: a natural solution to enhance raw milk cheese preservation. *Food Research International* **130**, 108883. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108883>
- El Rhazi K, Garcia-Larsen V, Nejari C.** 2015. Chapter 12 - Socioeconomic factors affecting adherence to the Mediterranean diet in North Africa. In: Preedy VR, Watson RR, editors. *The Mediterranean Diet*. San Diego: Academic Press 123- 132.
- Faro CJ.** 1991. Purificação e caracterização Físico-Química da protease de *Cynara cardunculus* L. Ph.D. Thesis, Universidade de Coimbra, Portugal.
- Fernández J, Curt MD, Aguado PL.** 2006. Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products* **24(3)**, 222- 229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.010>
- Fernández-Salguero J, Sanjuán E.** 1999. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese, *Food Chemistry* **64**, 177- 183.
- Fernández-Salguero J, Tejada L, Gomez R.** 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82(4)**, 464- 468. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1066>
- Guedje N, Fokunang C, Jiofack R, Dongmo R.** 2011. Opportunités d'une exploitation soutenue des plantes médicinales dans l'aménagement Forestier. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **4(4)**, 1346- 1372. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v4i4.63070>
- Kelly M, Pepper A.** 1996. Controlling *Cynara cardunculus* (Artichoke Thistle, Cardoon, etc.). In J. E. Lovich, J. Randall, & M. D. Kelly (Eds.). *Proceedings of the California exotic pest plant council symposium (Vol. 2, pp. 97-101)*. San Diego: California Exotic Pest Plant Council.
- Koubaa I, Damak M, McKillop A, Simmonds M.** 1999. Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia* **70**, 212- 213.
- Lakhdari W, Dehliz A, Acheuk F, Mlik R, Hammi H, Doumandji-Mitiche B, Gheriani S, Berrekbia M, Guermit K, Chergui S.** 2016. *Journal of Medicinal Plants Studies* **4(2)**, 204- 211.
- Lakouéténé DPB, Ndoingar G, Berké B, Moyen GM, Kosh Komba É, Zinga I, Millogo-Rasolodimby J, Vincendeau P, Syssa-Magalé JL, Nacoulma-Ouedraogo OG, Laganier R, Badoc A, Chèze C.** 2009. Enquête ethnobotanique des plantes utilisées dans le traitement du paludisme à Bangui. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* **148**, 123- 138.
- Lara Reimers EA, Fernández Cusimamani E, Lara Rodríguez EA, Zepeda del Valle JM, Polesny Z, Pawera L.** 2018. An ethnobotanical study of medicinal plants used in Zacatecas state, Mexico. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **87**, 3- 15. <https://doi.org/10.5586/asbp.3581>
- Leksir C, Boudalia S, Moujahed N, Chemmam M.** 2019. Traditional dairy products in Algeria: case of Klila cheese. *Journal of Ethnic Foods* **6(1)**, 1- 14. <https://doi.org/10.1186/s42779-019-0008-4>
- Macedo AC, Xavier Malcata F, Oliveira JC.** 1993. The technology, chemistry, and microbiology of serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science* **76(6)**, 1725- 1739. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(93\)77505-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(93)77505-0)
- Martins APL, Vasconcelosmm P, Sousa RB.** 1996. Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheese making: short characterization. *Lait* **76**, 473- 477.
- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox P.** 2004. Diversity of cheese varieties: an overview. *Major Cheese Groups* **2**, 1- 23. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80037-X](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80037-X)

- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF.** 2017. Chapter 31 - Diversity and classification of cheese varieties: an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. Cheese. Fourth edition San Diego: Academic Press p. 781- 808.
- Mehdioui R, Kahouadji A.** 2007. Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). Bulletin de l'Institut Scientifique Rabat, Section Sciences de la Vie **29**, 11- 20.
- Nouani A, Dako E, Morsli A, Belhamiche N, Belbraouet S, Bellalmm, 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 cheese in Algeria. Journal of Food Technology **7**, 20- 29. <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=jfTECH.20>
- Ozenda P, Quézel P.** 1956. Les Zygophyllacées de l'Afrique du Nord et du Sahara. Trav. Inst. Rech. Sahar. **14**, 68 p.
- Panhwar AQ, Abro H.** 2007. Ethnobotanical studies of Mahalkohistan (Khirthar national park). Pakistan Journal of Botany **39(7)**, 2301- 2315.
- Pulina G, Milán MJ, Lavín MP, Theodoridis A, Morin E, Capote J, Thomas DL, Francesconi AHD, Caja G.** 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. Journal of Dairy Science **101(8)**, 6715- 6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>
- Quézel P, Santa S.** 1962. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques meridionales. Tome 1, Edition CNRS, Paris, France. 1170p.
- Ramalho-Santos M, Pissarra J, Verissimo P, Pereira S, Salema R, Pires E, Faro CJ.** 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. Planta **203**, 204-212.
- Shah MA, Mir SA, Paray MA.** 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: a review. Dairy Science & Technology **94(1)**, 5- 16. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>
- Silva SV, Malcata FX.** 2005. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. Food Chemistry **89(1)**, 19- 26.
- Sousa MJ, Malcata FX.** 1996. Influence of pasteurization of milk and addition of starter cultures on protein breakdown in ovine cheeses manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. Food Chemistry **57**, 549- 556.
- Sousa MJ, Malcata FX.** 1997. Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. Z Lebensm Unters Forsch A **205**, 97- 103.
- Sousa MJ, Malcata FX.** 1998. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts of *Cynara cardunculus*. Enzyme Microbial Technology **22**, 305- 314.
- Sousa MJ, Malcata FX.** 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.
- Tavhare D, Nishteswar K.** 2014. Collection practices of medicinal plants - vedic, ayurvedic and modern perspectives. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives **5**, 54- 61.
- Thakur KS, Kumar M, Bawa R, Bussmann RW.** 2014. Ethnobotanical study of herbaceous flora along an altitudinal gradient in Bharmour forest division, district Chamba of Himachal Pradesh, India. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2014**, 1- 7. <https://doi.org/10.1155/2014>
- WHO, World Health Organization.** 2003. Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 84 p.

Worley J. 2011. The blend of traditional and modern medicine: case studies from Latin America as lessons for the united states. World Languages, Literatures and Cultures Undergraduate Honors Theses. <http://scholarworks.uark.edu/wllcult/1>

Zikiou A, Zidoune MN. 2018. Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. International journal of dairy technology **72(1)**, 89-99. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>