



**UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1**

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



N° d'ordre :.....

N° de série :.....

**Thèse de Doctorat en Sciences**  
**Spécialité : Sciences Alimentaires**

présentée par :

**Abdellah ZIKIOU**

---

**Valorisation de fleurs de charbon algérien : caractérisation,  
action coagulante sur le lait et fabrication de fromage**

---

Soutenue le : 26 / 01 / 2021

Devant le Jury composé de :

Président(e) :	<b>Pr. BENATALLAH L.</b>	<b>Professeur</b>	<b>INATAA, UFMC 1, Constantine</b>
Rapporteur :	<b>Pr. ZIDOUNE M.N.</b>	<b>Professeur</b>	<b>INATAA, UFMC 1, Constantine</b>
Co-rapporteur :	<b>Pr. BARROS M.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Universidade Católica Portuguesa, Viseu, Portugal</b>
Examineurs :			
	<b>Pr. MADANI T.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Ferhat Abbas, Sétif</b>
	<b>Dr. AISSAOUI-ZITOUNE O.</b>	<b>MCA</b>	<b>INATAA, UFMC 1, Constantine</b>
	<b>Dr. MANSOUR L.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université Ferhat Abbas, Sétif</b>

## **Remerciements**

*Ce travail n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans la patiente assistance, les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'ont prodigué mon promoteur, Pr. ZIDOUNE Mohammed Nasreddine et ma co-promotrice Pr. BARROS Marlene qui ont accepté de m'encadrer. Je leur témoigne ici, de ma gratitude et reconnaissance.*

*Je tiens également à remercier :*

*Pr. BENATALLA L. pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.*

*Pr. MADANI T, Dr. AISSAOUI-ZITOUN O. et Dr. MANSOUR L. pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie le Centre de Recherche en Biotechnologie C.R.Bt de Constantine ainsi que l'ensemble de son personnel pour avoir financé une grande partie de ce travail via le projet de recherche à intérêt socio-économique : contrat N°240.*

*Je remercie particulièrement, les membres de l'équipe T.E.P.A. du laboratoire L.N.T.A. et les membres du laboratoire SalivaTec de l'Universidade Catholica Portuguesa, Viseu, Portugal, pour leurs valeureuses contributions et le temps qu'ils ont bien voulu consacrer pour l'achèvement de ce travail de thèse.*

*Egalement, mes vifs remerciements vont à Dr. MANADAS B. et Dr. ANJO S. du laboratoire de spectrométrie de masse du centre Biocant, Cathande, Portugal, aussi à Dr. BARRACOSA P. et la ferme Casa Da Insua pour m'avoir accueilli et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail.*

*Je remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé ou encouragé, à quelque titre ou degré que ce soit, à entreprendre et à achever cette thèse.*

*A celles et ceux qui sont toujours de ce monde*

Les mots me semblent peu suffisants, frêles et fugaces pour vous exprimer ma gratitude et mon amour. Il m'est difficile d'adresser à chacun de vous les mots qu'il faut, les mots justes, et ceux qui permettent de parvenir à vos cœurs pour vous dire en toute humilité : merci.

*A celles et ceux qui ne sont plus de ce monde, celles et ceux qui sont partis à jamais*

A vous qui avez gravité autour de moi et m'avez marqué de vos souvenirs doux et indélébiles. Je ne vous oublie pas, vous êtes au plus profond de moi et vous me donnez le courage de me remettre en orbite.

A toi qui est parti sans que je te dise les mots d'amour que je n'ai jamais osé te dire. Je garde mes pépites de souvenirs avec toi dans les tréfonds de mon âme. Mon épopée s'écrira en ton nom et je vivrai des jours meilleurs pour toi.

*« Il y a des êtres ainsi qui laissent en nous comme une poussière d'étoiles qui brillera toujours sur nos souvenirs »*

Amina Mekahli

« Nomade Brûlant »

---

## SOMMAIRE

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Liste des abréviations

## Introduction..... 1

### Données bibliographiques

I. Étude botanique de la plante.....	4
I.1. Origine et conditions de culture.....	4
I.2. Floraison de la plante et anatomie de la fleur de cardon .....	6
II. Généralités sur les protéases des fleurs de cardon .....	8
II.1. Extraction et purification des cardosines .....	9
II.2. Localisation des cardosines et leurs fonctions biologiques.....	9
II.3. Caractérisation des cardosines .....	11
II.4. Spécificité des cardosines.....	15
II.4.1. Action des cardosines sur les caséines du lait .....	18
II.4.2. Action des cardosines sur le collagène humain.....	22
II.4.3. Action des cardosines sur la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée .....	23
III. Utilisation des cardosines en industrie fromagère .....	23
III.1. Mécanisme de la coagulation du lait par les cardosines .....	23
III.2. Les fromages fabriqués par l'utilisation des fleurs cardon .....	25
III.3. Préparation de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon .....	26
III.4. Composition chimique et microbiologique de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon...	27
III.5. Effet des protéases des fleurs de cardon sur les caractéristiques des fromages.....	28
III.5.1. Effets sur les rendements fromagers .....	28
III.5.2. Effets sur la texture et les propriétés sensorielles des fromages .....	29

---

## Etude expérimentale

### I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal de l'étude .....	30
I.2. Caractérisation des cardosines .....	31
I.2.1. Obtention de l'extrait enzymatique brut des fleurs de cardon .....	31
I.2.2. Purification et distinction des catégories de cardosines .....	32
I.2.2.1. Elimination des impuretés par chromatographie d'exclusion moléculaire .....	34
I.2.2.2. Fractionnement du contenu enzymatique par chromatographie échangeuse d'ions .....	35
I.2.2.3. Dessalage des cardosines par chromatographie d'exclusion .....	35
I.2.3. Quantification des protéines .....	36
I.2.4. Estimation des poids moléculaires et des degrés de pureté .....	36
I.2.4.1. Electrophorèse sur gel polyacrylamide sous conditions dénaturante (SDS-Page) .....	37
I.2.4.2. Electrophorèse capillaire .....	38
I.2.5. Révélation de la glycosylation des cardosines purifiées .....	42
I.2.6. Approche de séquences d'acide aminés par spectrométrie de masse LC-MS/MS .....	43
I.2.6.1. Préparation des échantillons .....	44
I.2.6.2. Le déroulement de l'analyse LC-MS/MS .....	44
I.2.6.3. Identification des protéines .....	45
I.2.7. Distinction de la spécificité d'action des cardosines .....	46
I.2.7.1. Action sur la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée .....	46
I.2.7.2. Action sur la caséine $\kappa$ .....	46
I.3. Evaluation de l'aptitude des cardosines à la coagulation du lait en fromagerie .....	47
I.3.1. Mesure de l'activité coagulante .....	47
I.3.2. Mesure de l'activité spécifique .....	48
I.3.3. Mesure de l'activité protéolytique non spécifique .....	48
I.3.4. Mesure du rendement fromager théorique et aptitude à l'égouttage .....	48

---

I.3.5. Appréciation à l' <i>Optigraph</i> de la coagulation du lait par les cardosines.....	49
I.3.5.1. Présentation et principe de l'appareil .....	49
I.3.5.2. Déroulement des essais de coagulation et définitions des paramètres étudiés .....	50
I.3.6. Approche des interactions impliquées dans la formation des gels .....	52
I.4. Application des fleurs de cardon en fromagerie : Utilisation des fleurs de cardon dans la fabrication du fromage type « <i>Serra da Estrela</i> ».....	53
I.4.1. Conditions de fabrication artisanale du fromage .....	54
I.4.2. Appréciation des fromages obtenus.....	55
I.5. Essais de conservation des fleurs de cardon par séchage .....	55
I.5.1. Type du sécheur et conditions du séchage.....	56
I.5.2. Effet du séchage sur les profils cardosines des fleurs .....	58
I.5.3. Effet du séchage sur l'aptitude technologique des fleurs séchées .....	58
I.6. Etude statistique des résultats .....	58
II. Résultats et discussion	
II.1. Caractéristiques des protéases des fleurs de cardon.....	59
II.1.1. Types de cardosines révélées .....	59
II.1.2. Poids moléculaires et glycosylation des cardosines .....	65
II.1.3. Distinction des enzymes selon les séquences d'acides aminés .....	70
II.1.4. Action spécifique des cardosines .....	75
II.1.4.1. Sur la caséine kappa .....	75
II.1.4.2. Sur la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée .....	77
II.2. La coagulation du lait par les protéases des fleurs de cardon .....	81
II.2.1. L'activité coagulante .....	81
II.2.2. L'activité protéolytique non spécifique.....	82
II.2.3. Les rendements fromagers théoriques.....	83
II.2.4. Les propriétés coagulantes et comportement des gels estimés par l' <i>Optigraph</i> .....	85

---

II.2.5. Les interactions impliquées dans la formation des gels cardosines .....	92
II.2.5.1. Importance des liaisons hydrogène .....	92
II.2.5.2. Importance des liaisons calciques .....	93
II.2.5.3. Importance des liaisons hydrophobes .....	93
II.3. Résultats de l'utilisation des fleurs de cardon algérien dans la fabrication du fromage type <i>Serra da Estrela</i> .....	96
II.3.1. Composition physico-chimique du lait utilisé.....	96
II.3.2. Caractéristiques des fromages fabriqués .....	96
II.4. Effet du séchage comme procédé de conservation, sur les cardosines .....	98
II.4.1. Effet sur les profils enzymatiques des fleurs .....	99
II.4.2. Effet sur les caractéristiques technologiques des fleurs .....	100
<b>Conclusion</b> .....	<b>105</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

### **Publications internationales**

Zikiou, A., & Zidoune, M. N. (2019). 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, 89-99.

Zikiou, A., Esteves, A. C., Esteves, E., Rosa, N., Gomes, S., Martins, A. P. L., Zidoune, M.N. & Barros, M. (2020). Algerian cardoon flowers express a large spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking. *International Dairy Journal*, 104689.



## LISTE DES FIGURE

<b>Figure 1.</b> Distribution du carbon spontané <i>Cynara cardunculus</i> Var. <i>sylvestry</i> s dans le bassin de la méditerranée .....	5
<b>Figure 2.</b> Les conditions climatiques et les caractéristiques du sol favorables pour le développement des variétés <i>Cynara cardunculus</i> L. ....	6
<b>Figure 3.</b> Les différents stades de Florescence de <i>Cynara cardunculus</i> L. ....	7
<b>Figure 4.</b> Florescence et fleurs de <i>Cynara cardunculus</i> L. ....	8
<b>Figure 5.</b> Purification et séparation des cardosines.....	10
<b>Figure 6.</b> Localisation des cardosines A et B dans le tissu floral .....	12
<b>Figure 7.</b> Schéma du processus protéolytique d'activation des cardosine A et cardosine B....	13
<b>Figure 8.</b> Séquences des chaines d'acides aminés constituant les procardosine A et procardosine B .....	14
<b>Figure 9.</b> Purification et isolation des cardosines E, F, G et H constituant le groupe cardosine A <sub>0</sub> .....	16
<b>Figure 10.</b> Séquences des chaines d'acides aminés constituant les enzymes à l'état mature du groupe nommé cardosine A <sub>0</sub> .....	17
<b>Figure 11.</b> L'action des cardosins sur la caséine $\alpha_{s1}$ d'origine bovine .....	19
<b>Figure 12.</b> L'action des cardosins sur la caséine $\beta$ d'origine bovine.....	20
<b>Figure 13.</b> L'action de la cardosin A sur le collagène humain .....	22
<b>Figure 14.</b> Structure des micelles de caséines .....	24
<b>Figure 15.</b> Localisation géographique des sites d'échantillonnage des fleurs de carbon <i>Cynara cardunculus</i> L.....	30
<b>Figure 16.</b> Capitules des fleurs de carbon <i>Cynara cardunculus</i> L. utilisés dans l'étude.....	31
<b>Figure 17.</b> Protocole suivi pour l'obtention de l'extrait brut des fleurs de carbon .....	32
<b>Figure 18.</b> Principe de l'analyse par chromatographie liquide .....	33
<b>Figure 19.</b> Etapes de purification des cardosines A <sub>0</sub> , A et B .....	34
<b>Figure 20.</b> Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire.....	39

<b>Figure 21.</b> Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électro-osmotique (FEO) à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon .....	40
<b>Figure 22.</b> Présentation du système <i>Experion</i> pour l'électrophorèse capillaire.....	41
<b>Figure 23.</b> Principe général de la préparation des échantillons pour identification des protéines par LC-MS/MS.....	44
<b>Figure 24.</b> Equipement <i>Optigraph</i> Conçu pour l'étude de la coagulation du lait.....	50
<b>Figure 25.</b> Logiciel de contrôle de l'équipement <i>Optigraph</i> .....	51
<b>Figure 26.</b> Paramètres technologiques étudiés par l' <i>Optigraph</i> .....	52
<b>Figure 27.</b> Diagramme de fabrication du fromage type <i>Serra da Estrela</i> .....	54
<b>Figure 28.</b> Sécheur <i>TRY DRIER UOP8 (Armfield Limited, Hampshire Angleterre)</i> , Equipement utilisé pour le séchage des fleurs de cardon .....	57
<b>Figure 29.</b> Chromatogrammes obtenus après chromatographie d'exclusion moléculaire des extraits brut obtenus à partir des fleurs de cardon étudiées.....	60
<b>Figure 30.</b> Profils en cardosines obtenus après chromatographie d'échange d'ions sur colonne QFF.....	60
<b>Figure 31.</b> Chromatogramme type d'une cardosine pure après dessalage.....	61
<b>Figure 32.</b> Profils en cardosines obtenus après chromatographie d'échange d'ions sur colonne QHP .....	64
<b>Figure 33.</b> Profils sur gels SDS-Page des protéases des fleurs des trois variétés de cardon étudiées.....	66
<b>Figure 34.</b> Profils sur électrophorèse capillaire des fractions actives obtenues après chromatographie d'exclusion moléculaire .....	66
<b>Figure 35.</b> Profils sur électrophorèse capillaire des cardosines purifiées à partir des variétés étudiées.....	67
<b>Figure 36.</b> Glycosylation des cardosines pures.....	69
<b>Figure 37.</b> Séquences d'acides aminés des cardosines purifiées à partir des fleurs du des variétés cardon étudiées .....	71
<b>Figure 38.</b> Alignement des séquences des cardosines A matures purifiées avec la séquence Procardosine A (SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA) répertoriée dans la base des données numérique <i>Uniprot</i> .....	74
<b>Figure 39.</b> Action des cardosines purifiées sur la caséine kappa.....	76

<b>Figure 40.</b> Séquence d'acides aminés et structure secondaire de la chaîne $\beta$ de l'insuline bovine oxydée .....	77
<b>Figure 41.</b> Profils typiques obtenus par HPLC des produits de digestion de la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée par les cardosines .....	78
<b>Figure 42.</b> Dendrogramme illustrant les groupes des cardosines purifiées .....	80
<b>Figure 43.</b> Evolution en fonction du temps, des propriétés rhéologiques des gels lactiques obtenus après coagulation avec l'utilisation des protéases des fleurs de cardon.....	90
<b>Figure 44.</b> Analyse en composantes principales (ACP) des caractères technologiques des cardosines .....	91
<b>Figure 45.</b> Effets des agents dissociant, (A) : l'urée, (B) : l'EDTA et (C) : l'SDS sur la solubilisation des protéines des gels obtenus après coagulation par les cardosines et par la présure .....	95
<b>Figure 46.</b> Effets des températures de séchage sur les profils en cardosines des fleurs de cardon .....	101

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Paramètres enzymatiques des protéases des fleurs de cardon <i>Cynara cardunculus</i> .	18
<b>Tableau 2.</b> Spécificité des cardosine A et B en vis-à-vis des caséines $\alpha_{s1}$ , $\beta$ et $\kappa$ de différents laits .....	21
<b>Tableau 3.</b> Les types de fromages fabriqués par l'utilisation des fleurs de <i>Cynara</i> répondus dans la péninsule Ibérique .....	25
<b>Tableau 4.</b> Compositions physico-chimique et microbiologique moyennes des fleurs de cardon .....	27
<b>Tableau 5.</b> Concentration des agents chimiques dissociant utilisés .....	53
<b>Tableau 6.</b> Profils quantitatifs des cardosines purifiées à partir des fleurs de cardon (/1g base sèche) .....	62
<b>Tableau 7.</b> Profils quantitatifs (/1g base sèche) des cardosines récupérées à partir des trois variétés étudiées .....	64
<b>Tableau 8 :</b> Poids moléculaires des grandes et petites chaînes de cardosines purifiées estimés par électrophorèse capillaire .....	68
<b>Tableau 9.</b> Similarités des chaînes d'acides aminés des cardosines purifiées avec les séquences peptidiques et protéiques répertoriées sur la base de données numérique <i>Uniprot</i> ...	72
<b>Tableau 10.</b> Taux relatifs des produits majeurs de la réaction d'hydrolyse de la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée par les cardosines .....	79
<b>Tableau 11.</b> Identification des Fragments produits après hydrolyse de la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée par les cardosines .....	79
<b>Tableau 12.</b> Rendements fromagers théoriques sur le lait standard (IDF), des préparations enzymatiques étudiées .....	85
<b>Tableau 13.</b> Propriétés coagulantes des protéases des fleurs de cardon mesurées par l' <i>Optigraph</i> sur un lait standard (IDF) .....	89
<b>Tableau 14.</b> Caractéristiques physico-chimiques du lait de brebis utilisé (lait collecté en mois de Novembre 2018) .....	96
<b>Tableau 15.</b> Attributs physico-chimiques des fromages <i>Serra da Estrela</i> fabriqués par les fleurs de la variété ALG1 et du fromage témoin (fabriqué et commercialisé par la fromagerie) .....	97
<b>Tableau 16.</b> Effet des températures de séchage sur les profils quantitatifs des cardosines.....	99
<b>Tableau 17.</b> Effet des différentes températures du séchage sur les caractéristiques technologiques des fleurs de cardon .....	102

### Liste des abréviations

ALG 1 : cardon algérien spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris*  
ALG 2 : cardon algérien cultivé *Cynara cardunculus var. atililis*  
POR : variété de cardon portugaise de référence  
DOP : dénomination d'origine protégée  
PSI : plant specific insert (peptide spécifique des plante)  
FPLC : chromatographie liquide à basse pression  
LC/MS-MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem  
QFF : colonne *Q-sepharose fast flow*  
QHP : colonne *Q-Sepharose High Precision*  
NaCl : chlorure de sodium  
PM : Poids moléculaire  
Sp : séquence protéique  
k-CN : caséine kappa  
T<sub>0</sub> : Temps de l'ajout de l'enzyme au substrat  
T<sub>40</sub> : Temps de l'arrêt de la réaction enzymatique correspondant à 40 minutes  
IDF : fédération internationale de lait  
ISO : association internationale de standardisation  
UP : unité présure  
IUMC : unité coagulante internationale  
NNP : azote non protéique  
Nt : azote total  
ACP : analyse composante principale  
PC1 : première composante principale  
PC2 : seconde composante principale  
R : temps de floculation  
AR : texture après deux fois le temps de floculation  
A2R : texture après trois fois le temps de floculation  
A20 : texture après 20 minutes de coagulation  
A40 : texture après 40 minutes de coagulation  
OK 20 : vitesse de raffermissement  
EDTA : éthylène diamine tétra acétique  
SDS : dodécylsulfate de sodium  
PAGE : électrophorèse sur gel polyacrylamide

PS/PT : protéines solubles /protéines totales

Excl.mol : fraction active obtenue après chromatographie d'exclusion moléculaire

NaOH : hydroxyde de sodium

ET : écart type

°C : degré Celsius

MS : matière sèche

v : volt

p/p : poids par poids

v/v : volume par volume

p/v : poids par volume

pH : potentiel hydrogène

Hcl : acide chlorhydrique

BSA : bovin sérum albumine

EOF : flux électro-osmotique

CZE : électrophorèse capillaire en zone

MEKC : électrophorèse capillaire micellaire

cIEF : focalisation isoélectrique en capillaire

CGE : électrophorèse en gel et en capillaire

PVDF : membrane poly-vinylidene difluoride

CAPS : acide 3-cycloheylamino-1-propanesulfonic

SPE : extraction en phase solide

IDA : information-dépendance acquisition

FA : acide formique

ACN : acétonitrile

ESI : source d'ionisation electrospray

TFA : acide trifluoroacétique

HPLC : chromatographie liquide haute pression

CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium

$a_t$  : activité coagulante totale

$t_{ref}$  : temps de floculation

$a_{ref}$  : activité de la présure de référence

$t_t$  : temps de floculation

NSP : activité protéolytique non spécifique

TCA : acide trichloroacétique

NIR : proche infra-rouge

t/min : tour par minute

var : variété

ssp : sous espèce

DAN : Diazoacetyl Norleucine methyl

N-Dom : domaine du N-terminal

C-Dom : domaine du C-terminal

kDa : kilo dalton

CMP : macro-peptide caséique

# *Introduction*



## Introduction

La fabrication des fromages à l'échelle artisanale tout comme à l'échelle industrielle, passe par des étapes communes dont la plus importante reste la coagulation du lait. Elle consiste à la transformation du lait de son état initial liquide, à un état semi-solide appelé gel ou coagulum. Ce phénomène intervient suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines, protéines majeures du lait. En fromagerie, la coagulation du lait est assurée grâce à des enzymes appartenant à une classe nommée protéases permettant de déstabiliser ces micelles. Ces dites protéases, sont des macromolécules qu'on retrouve chez les animaux, les végétaux et les microorganismes où elles assurent diverses fonctions vitales (Amid *et al.*, 2011). L'agent coagulant le plus connu et le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. C'est un mélange d'enzyme de la caillette de veaux non sevrés constitué de chymosine (75%) et de pepsine (25%).

La production et la consommation sans cesse croissante des fromages dans le monde et des considérations ethniques et religieuses (Islam, Judaïsme et végétarianisme) ont fait que la présure soit de plus en plus coûteuse et difficilement accessible. Ceci a suscité la recherche d'autres sources d'enzymes pour substituer la présure lors de la fabrication des fromages. Actuellement, plusieurs autres sources d'enzymes coagulant le lait, moins coûteuses et plus disponibles ont été identifiées et mises à exploitation. En effet, plusieurs enzymes d'origines animale (abats de poissons, proventricule de poulet, pepsine porcine et autres) végétale (papaine, calotropine, ficine, cardosines, et autres) ou microbienne (Champignons, *Bacillus*, *Actinomycetes* et autres) ont été rapportées comme étant capables de coaguler le lait et donc d'être utilisées en industrie fromagère.

Les succédanés de présure extraits à partir des végétaux ont suscité un intérêt particulier : Ils sont issus de matières premières disponibles, connues traditionnellement moins valorisées et ayant des activités coagulantes vérifiées. Cependant, des études signalent quelques limites à leur usage liées à des activités protéolytiques pouvant être excessives affectant la qualité finale des fromages.

Des études rapportent que les protéases de fleurs de cardon *Cynara cardunculus* sont une exception. L'extrait aqueux de ces fleurs a été utilisé depuis des siècles pour la fabrication de plusieurs fromages traditionnels dans le bassin méditerranéen. A l'heure actuelle, certains d'entre eux ont bénéficié d'une labélisation « Dénomination d'Origine Protégée (D.O.P) » tels comme par

exemple : au Portugal (*Serra da Estrela*, *Serpa* et *Azeitão*), en Espagne (*La Serena*, *Manchego* et *Torta del Casar*) et en Italie (*Fiore sardo* et *Cacio Fiore*) (Aquilanti, *et al.*, 2011; Francisco- José, Joaquín, José, Ramírez, & Isidro, 2010; Llorente, *et al.*, 2014; Macedo et Malcata, 1997 ; Ordiales, *et al.*, 2016; Prados *et al.*, 2007; Roseiro, *et al.*, 2003).

En Algérie aussi, deux variétés de cardon sont connues, consommées et largement répandues : le cardon spontané *Cynara cardunculus* *Var. sylvestris* et le cardon cultivé *Cynara cardunculus* *Var. atililis*. Il est aussi connu que la population rurale utilise les fleurs du cardon spontané depuis une époque lointaine pour la fabrication de divers fromages traditionnels (Nouani *et al.*, 2009 ; Aquilanti *et al.*, 2011 ; Benheddi *et Hellal*, 2019). Néanmoins, les fleurs de cardon restent une source très peu exploitée. La valorisation du savoir-faire ancestral algérien, à travers l'utilisation des fleurs de cardon comme succédané de présure peut être économiquement très bénéfique pour stimuler l'industrie fromagère locale. Sachant que l'Algérie importe la totalité des enzymes de coagulation de lait pour subvenir aux besoins des transformations fromagères, ces importations sont le plus souvent subordonnées aux fluctuations des marchés internationaux, constituant de ce fait une véritable contrainte pour nos entreprises. La conjoncture actuelle du pays de veiller à la sécurité alimentaire de la population, fait que la tendance doit être orientée vers la limitation des importations et l'encouragement de la production locale sous toutes ses formes.

Le présent travail de thèse est une suite des travaux de recherches menés par l'Equipe de Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) de l'institut I.N.A.T.A.A., portant sur l'axe de recherche la valorisation des substituts de présure. Il entre dans le cadre du projet à impact socio-économique affilié au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine C.R.Bt (contrat N°240) ; intitulé : « Valorisation des pratiques traditionnelles Algériennes en fromagerie : Production des succédanés de présure » et financé par le Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. Aussi, une partie de ce travail était menée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Biochimie de l'Universidade Catolica Portuguesa (U.C.P.), Center for Interdisciplinary Research in Health, Viseu, Portugal via le projet : « iCheese Project (PDR2020-101-031002) » financé par *Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 (PDR2020)* sous Portugal 2020 et à travers *Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural (FEADER)*.

Le principal objectif de cette thèse se dessine à travers une stratégie d'investigation sur les protéases extraites à partir des fleurs de cardon algérien *C. cardunuculus* afin de mieux situer les possibilités de leur utilisation comme agent coagulant du lait. Une utilisation rationnelle de ces protéases doit se baser sur leurs caractéristiques biochimiques et technologiques. Dans un premier temps, un état de l'art est établi présentant l'étude botanique du cardon, des rappels sur les cardosines et une brève présentation des fromages D.O.P. issus de l'utilisation des fleurs de cardon. Par la suite, quatre principaux volets ont été abordés de façon exhaustive : la purification et la caractérisation des cardosines, l'étude de la coagulation et des caractéristiques des coagulums obtenus, la fabrication artisanale d'un fromage portugais avec suivi de l'évolution de ses qualités et finalement, une étude sur la possibilité de conservation des fleurs de cardon par séchage.

# *Données bibliographiques*

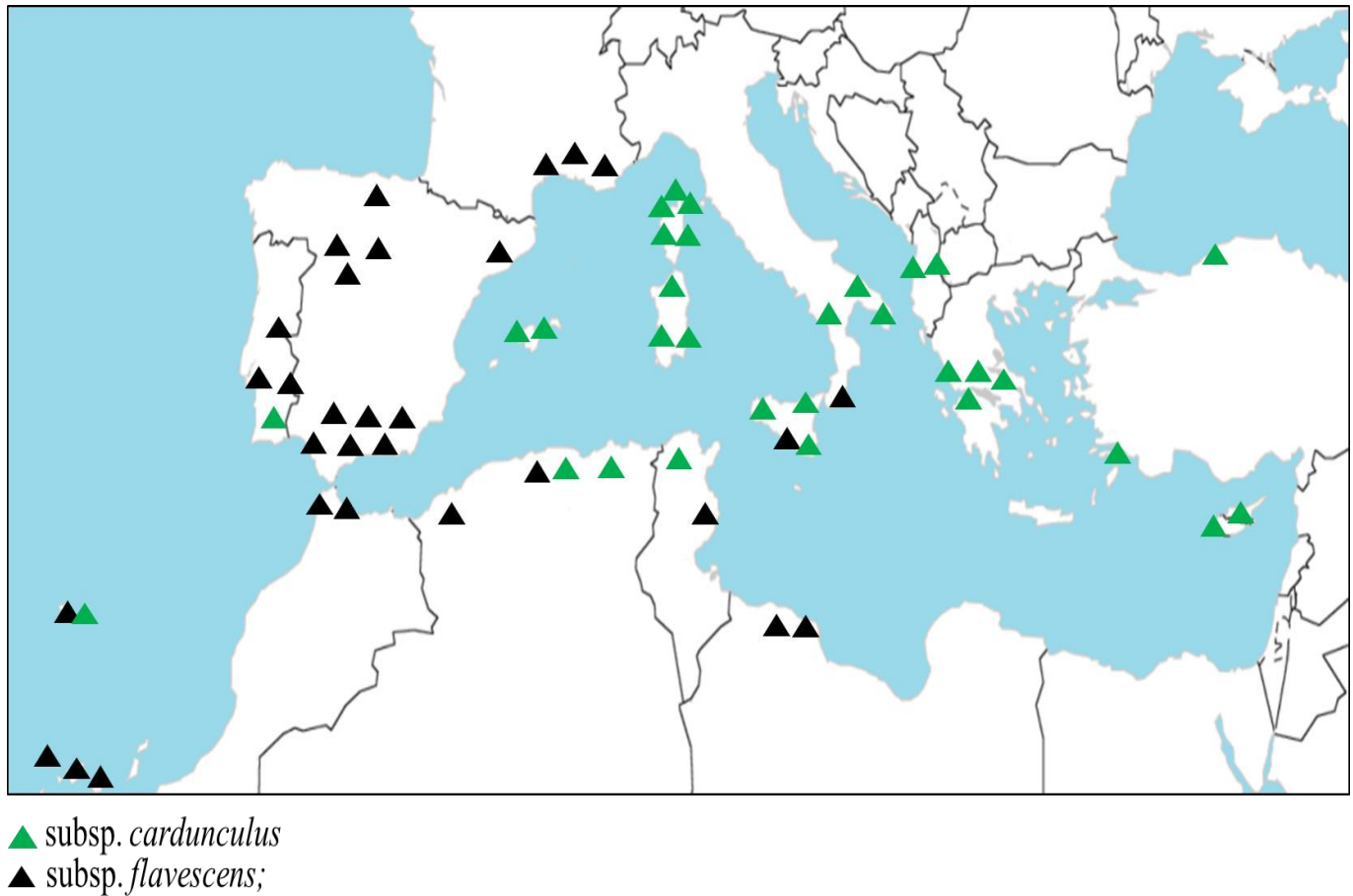
## I. Etude botanique de la plante

### I.1. Origine et conditions de culture

Le cardon *Cynara acrdunculus L.* est une plante diploïde appartenant à la famille des *Asteraceae*, native du bassin Méditerranéen (Sonnante *et al.*, 2007). La domestication du cardon spontané [var. *sylvestris* (Lamk) Fiori] a donné naissance à deux autres variétés : l'artichaut [var. *sativa* Moris, var. *scolymus* (L.) Fiori, ssp. *scolymus* (L.) Hegi] et le cardon cultivé (var. *altilis* DC), des variétés largement répandues dans les deux rives de la Méditerranée (Rottenberg and Zohary, 1996). L'artichaut est cultivé par voie végétative et le capitule est sa partie la plus importante (Bianco, 1990). Le cardon est principalement cultivé pour ses tiges charnues et sa multiplication se fait par semences (Dellacecca, 1990).

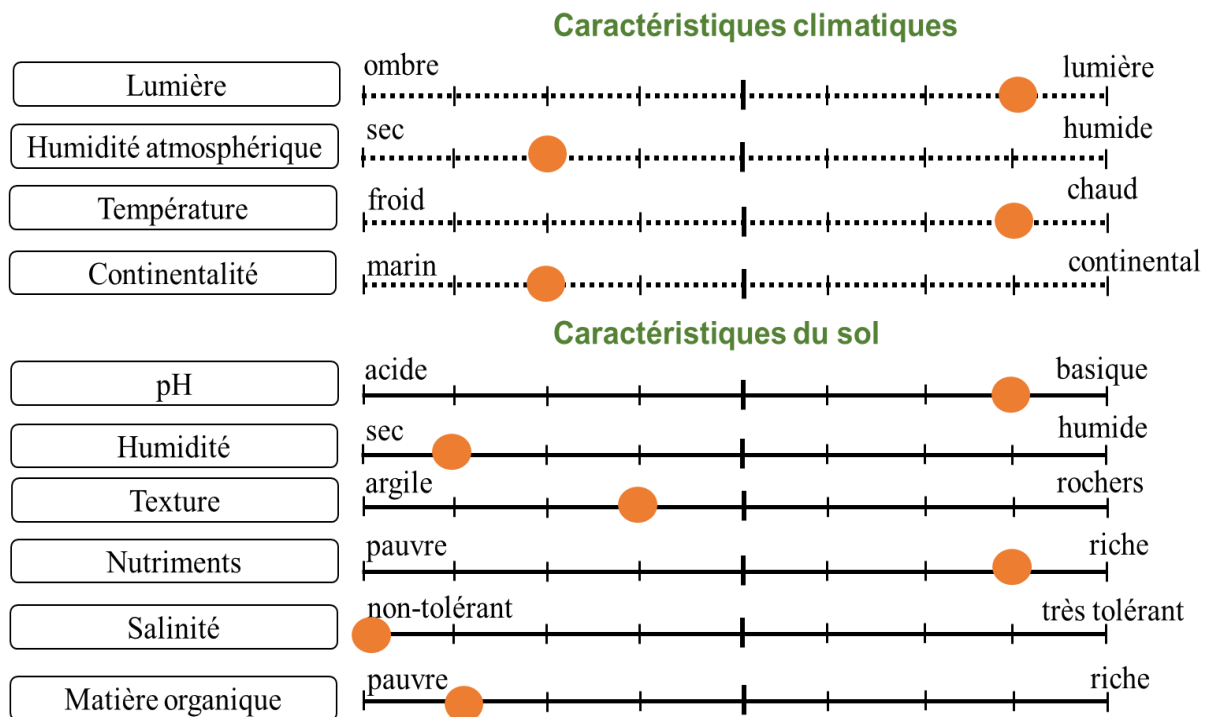
Différentes approches ont été suivies pour déterminer l'époque, le lieu exact et le comment de la domestication du cardon spontané, néanmoins, l'histoire de son amélioration et de sa culture demeure floue et incertaine. Foury (1996) rapporte que l'artichaut était probablement, cultivé pour la première fois au moyen âge par les musulmans, en Andalousie et/ou en Tunisie. Quant à Sonnante *et al.* (2007), ils avancent que l'artichaut a été cultivé initialement en Sicile à l'époque des Romains, aussi, d'après ces mêmes auteurs, la culture du cardon (var. *altilis* DC) est apparue plus tard dans la région ouest de la méditerranée probablement, en Espagne et en sud de la France. Dans une étude basée sur les caractéristiques morphologiques (Wiklund, 1992) a confirmé l'appartenance de l'artichaut, du cardon cultivé et du cardon spontané à une même espèce : *Cynara cardunculus L.* De plus, l'auteur a distingué suivant les différences morphologiques et la distribution géographique, deux sous-espèces du cardon spontané (le progéniteur), il s'agit du ssp. *flavescens* qui est répandue dans la région ouest de la méditerranée et du ssp. *cardunculus* du côté est du bassin, les deux sous-espèces sont présentes en Algérie (Figure 1).

Etant natives de la région de méditerranée, les variétés *Cynara cardunculus L.* montrent une adaptation optimale au climat méditerranéen, un climat qui se caractérise par un hiver humide et froid et d'un été sec et chaud. Au stade de semis, la plante est sensible aux basses températures, cependant, une fois au stade rosette, *Cynara* peut tolérer des températures allant jusqu'à -5°C. Le développement de la plante dépend fortement des quantités d'eau disponibles, la précipitation cumulée de pluie idéale pour *Cynara* est de 450mm. Des précipitations inférieures engendrent une réduction dans la production de la biomasse (Fernandez et Curt, 1995).



**Figure 1.** Distribution du cardon spontané *Cynara cardunculus* Var. *sylvestris* dans le bassin de la méditerranée, adapté à partir de [Wiklund \(1992\)](#).

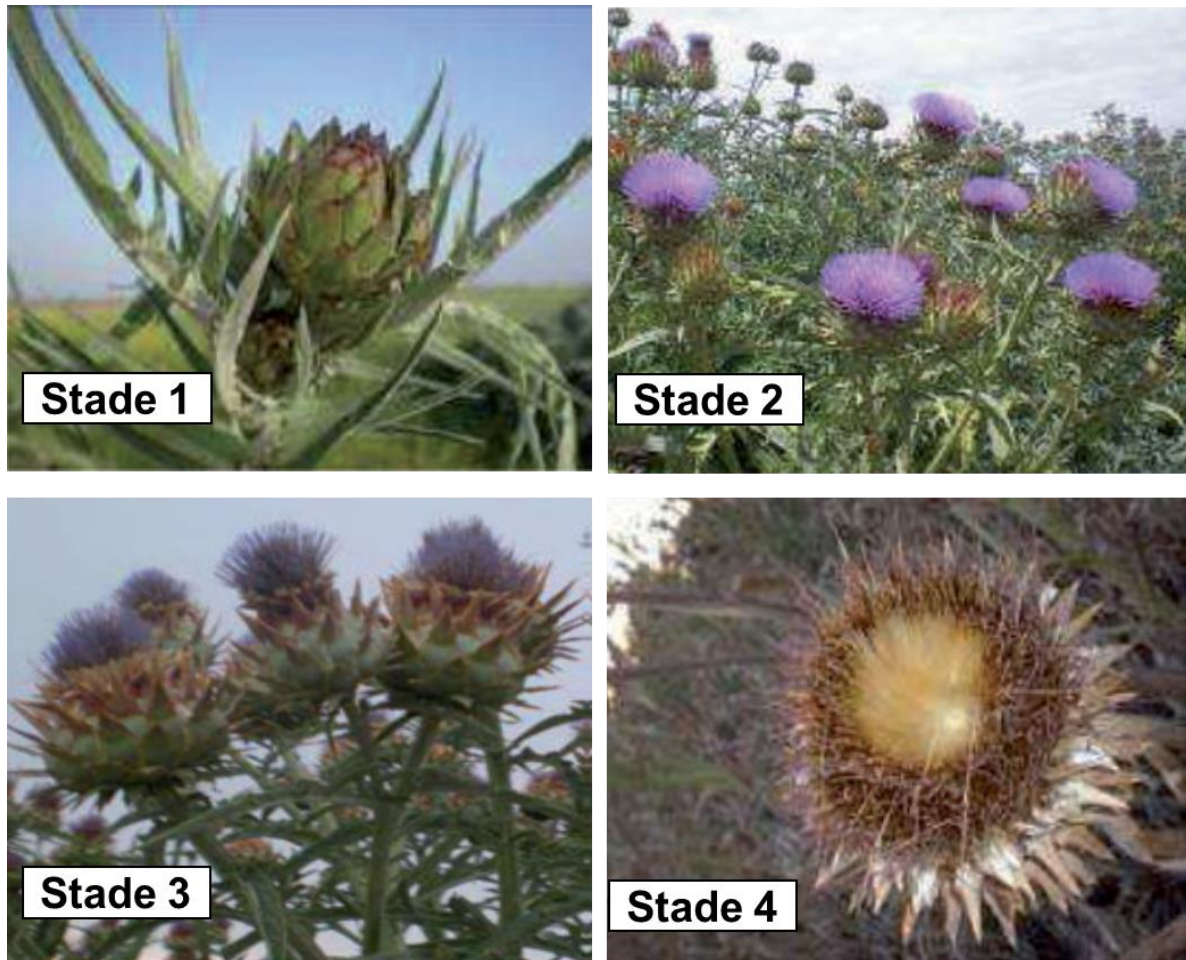
Le développement des variétés *Cynara* nécessite des sols profonds, avec un taux de calcaire modéré et une texture légère relativement argileuse. *Cynara* pousse d'une meilleure façon dans des sols à pH basique et tolère peu la salinité ([Fernandez et Curt, 1995](#)). Les principales conditions de culture des variétés sont récapitulées en [Figure 2](#).



**Figure 2.** Les conditions climatiques et les caractéristiques du sol favorables pour le développement des variétés *Cynara cardunculus L.* adapté à partir de (Fernandez et Curt, 1995).

## II.2. Floraison de la plante et anatomie de la fleur du cardon

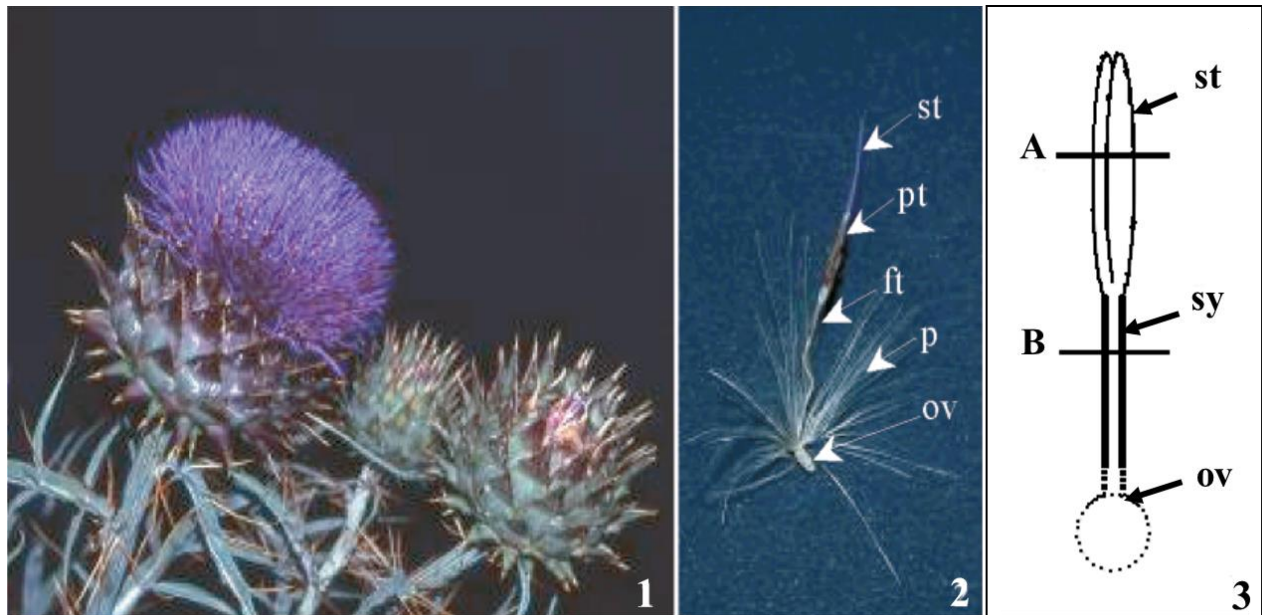
La période de floraison des variétés *Cynara cardunculus* s'étale principalement entre les mois de Mai et Juillet (Wiklund, 1992). Archontoulis *et al.* (2010) l'ont répartie en quatre principaux stades (Figure 3). Le premier stade est caractérisé par l'émergence d'une tige nommée « tige principale » et l'apparition d'un capitule. Le capitule connu aussi sous le nom de la tête, est d'une forme ovale (33-75mm x 32-95mm de taille) et considéré comme étant la base de floraison (Gominho *et al.*, 2009). Le deuxième stade est celui de la floraison proprement dite, et consiste au développement d'un nombre important de fleurs ou fleurets tubulaires. Les troisième et quatrième stades consistent respectivement, aux stades de vieillissement des fleurs et de maturation des graines.



**Figure 3.** Les différents stades de Florescence de *Cynara cardunculus* L. adapté à partir de (Archontoulis *et al.* 2010).

Les fleurs ont toutes une même forme, elles sont androgynes tubulaires se terminant par 5 pointes. Elles ont des tailles de 4-5 cm et elles sont d'une couleur allant du bleu au violet (Figure 4). Chacune des fleurs matures est composée d'une partie femelle appelée pistil, du tube floral (ft), des pétales (pt) et d'akène (p). Le pistil quant à lui, il est constitué d'un stigma (st), d'un stylet (sy) et de l'ovaire (Rahmalho-Santos *et al.*, 1997 ; Duarte *et al.*, 2006).





**Figure 4.** Florescence et fleurs de *Cynara cardunculus* L. adaptée à partir de (Duarte *et al.*, 2006). **1** : Aspect général du capitule composé d'un nombre indéfini de fleurs insérées sur un réceptacle commun. **2** : Fleur isolée de *C. cardunculus* constituée du stigma (st) et du stylet (sy) entourés par les pétales (pt), du tube floral (ft) et des akènes (p) nécessaires pour le déplacement des graines dans l'air, (ov) un ovaire. **3** : Diagramme schématisant le pistil (organe femelle de la fleur) comprenant le stigma (st), le stylet (sy) et l'ovaire (ov), A et B sont des plans représentant les sections du stigma et du stylet.

## II. Généralité sur les protéases des fleurs de cardon

Les protéases des fleurs de cardon nommées cardosines, représentent environ 70% du taux des protéines totales et sont des enzymes organo-spécifiques exprimées exclusivement dans les pistils des fleurs (Rahmalho-Santos *et al.*, 1997 ; Faro *et al.*, 1998). Nombreux sont les travaux qui ont été menés sur les enzymes des fleurs du genre *Cynara cardunculus* L. et plusieurs protéases ont été purifiées et identifiées. Il s'agit principalement, de la cardosine A, la cardosine B et du groupe cardosine A0, ce dernier est constitué de quatre cardosines appelées : cardosine E, F, G et H (Faro *et al.*, 1992 ; Sarmiento *et al.*, 2009). L'ensemble des cardosines appartiennent à la classe d'enzymes appelée aspartate-protéases (EC 3.4.23), un groupe d'enzymes dont l'activité catalytique est assurée grâce à leurs sites actifs constitués d'acides aspartiques (Faro *et al.*, 1998 ; Sarmiento *et al.*, 2009 ; James, 2012 ; Nair et Jayachandran, 2019).

## II.1. Extraction et purification des cardosines

Les cardosines sont les protéases obtenues à partir des fleurs de *Cynara cardunculus*. Les recherches menées sur le sujet ont conclu que l'activité enzymatique des fleurs est due à la présence de plusieurs différentes protéinases qu'on a nommé cardosine A et cardosine B (Verissimo *et al.*, 1996). Plus récemment, Sarmiento *et al.* (2009) ont pu séparer à partir des fleurs de cardon un autre groupe nommé cardosine A0, un groupe qui est constitué de quatre cardosines : E, F, G et H.

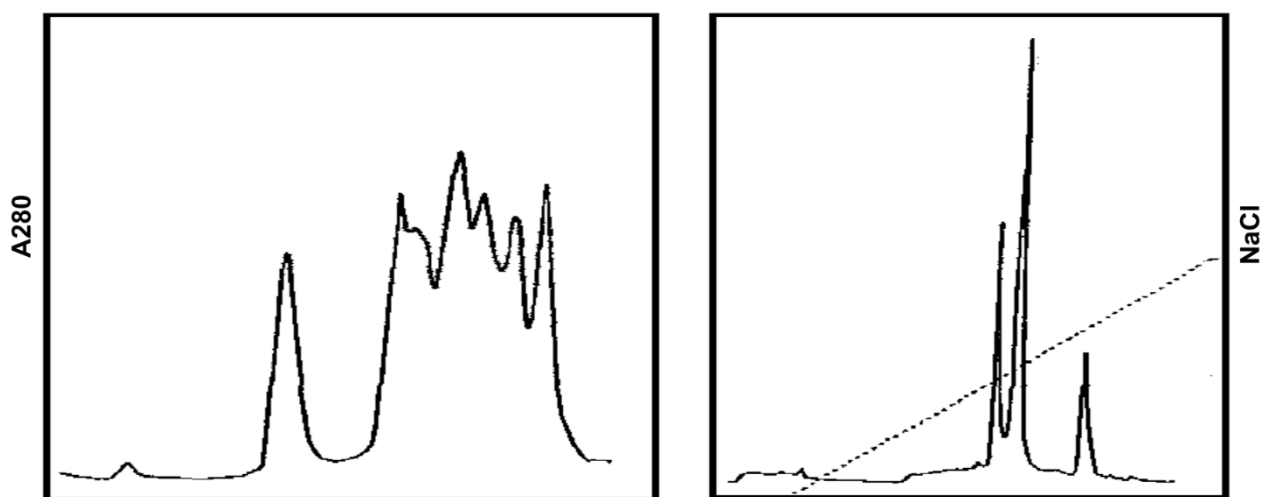
Un protocole d'extraction et de purification des cardosines a été précédemment développé. Il consiste à une extraction acide par macération des fleurs suivie d'une chromatographie d'exclusion moléculaire (gel filtration) puis une deuxième chromatographie d'échange d'ions. L'extraction aqueuse acide élimine les impuretés et par conséquent, permet d'avoir une solution enzymatique d'une activité spécifique meilleure (supérieure 5 fois à un extrait obtenu à pH neutre) (Faro *et al.*, 1995). Les protéines actives sont récupérées après la chromatographie gel filtration en un seul pic, avec un rendement d'environ 70%. Les pics élués après la fraction active, ont été identifiés comme étant des molécules non protéiques (essentiellement des phénols et des pigments). Ladite fraction active est par la suite soumise à une chromatographie d'échange d'ions suite à laquelle résultent les pics correspondant respectivement au groupe cardosine A0, à la cardosine A et la cardosine B (Figure 5) (Faro *et al.*, 1995 ; Verissimo *et al.*, 1996 ; Sarmiento, 2003).

## II.2. Localisation des cardosines et leurs fonctions biologiques

De par leur abondance et leur expression organo-spécifique, les cardosines sont considérées comme étant uniques d'entre les aspartates protéases des plantes. En effet, plusieurs protéases ont été purifiées et identifiées à partir de différents organes de plantes allant des graines jusqu'aux fruits (Shah *et al.*, 2014) mais souvent à de faibles taux et difficiles à isoler sous état pur ce qui n'est pas le cas des cardosines. Les aspartates protéases des plantes ont été souvent associées au phénomène de renouvellement des protéines (*protein turnover*) ou aux processus protéolytiques spécifiques d'autres protéines (Kervinen *et al.*, 1995) mais à l'exception des plantes insectivores (Tokes *et al.*, 1975), leurs rôles biologiques exactes restent très peu connus, c'est le cas aussi des cardosines. Quelques hypothèses sur les fonctions biologiques des cardosines ont été avancées :

Les cardosines A et B sont probablement impliquées dans les interactions entre pollen et pistil qui s'établissent durant la reproduction de la plante. Le tissu papillaire du stigma est le site où le pollen

établit le premier contact avec le sporophyte femelle dans son parcours vers l’ovaire. C’est au niveau de ce tissu que le pollen est capturé, fixé à la surface du stigma, hydraté et se fait germer. Tous ces processus certainement, impliquent à l’échelle moléculaire des événements de reconnaissance, de signalisations et de réponses (Elleman et Dickinson, 1994). Le fait que la cardosine A est localisée dans les vacuoles du tissu papillaire du stigma suggère un possible rôle de l’enzyme durant ces processus (Faro *et al.*, 2012). L’implication de la cardosine B dans les interactions pollen-pistil semble intervenir sous un contexte différent, le tissu transmetteur est le support qui favorise la croissance du tube pollinique vers l’ovaire, ceci nécessite une dégradation en continu de la matrice extracellulaire permettant de nourrir le tube pollinique mais aussi d’assurer son mouvement à travers le pistil. Du fait qu’elle est une enzyme extracellulaire exprimée dans le tissu transmetteur, la cardosine B peut contribuer dans les deux processus et par conséquent, peut avoir une fonction primordiale dans la reproduction sexuelle du cardon (Faro *et al.*, 2012).



**Figure 5.** Purification et séparation des cardosines adapté à partir de (Verissimo *et al.*, 1996). **A:** Chromatogramme montrant la fraction active obtenu après une chromatographie d’exclusion moléculaire (gel filtration) ; **B:** Les différentes fractions de cardosines obtenues suite à la soumission de la fraction active à une deuxième chromatographie d’échange d’ions. A280 : Absorbance à 280 nM ; NaCl : gradient de sel.

L’accumulation abondante de la cardosine A dans les cellules périphériques du stigma peut suggérer aussi, l’implication de cette enzyme dans l’auto défense de la plante contre les pathogènes et/ou les insectes. L’implication de la cardosine B dans ce processus est peu probable du moment

que son expression est apparemment, limitée dans une partie interne du pistil qui est en principe, non facilement accessible aux pathogènes et aux insectes (Faro *et al.*, 2012).

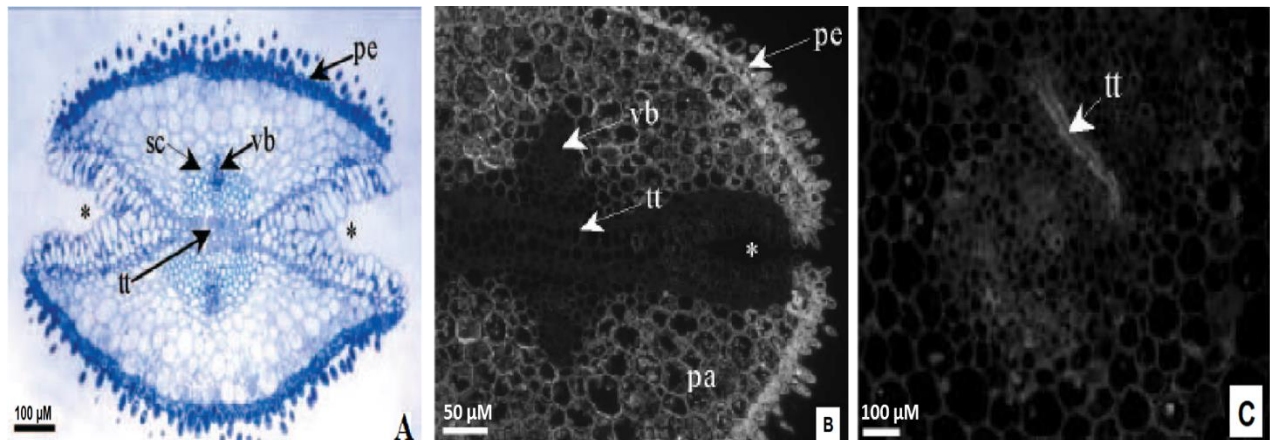
L'implication des cardosines dans le phénomène de sénescence des fleurs n'est pas aussi exclue, bien que ça puisse paraître qu'il s'agit d'une fonction secondaire des cardosines. L'activité des enzymes peut de ce fait, contribuer à la libération des graines et finalement, signaler la sénescence de la plante entière. Puisque les protéases vacuolaires ne participent pas à la dégradation des protéines durant le processus de sénescence, excepté au stade final, après rupture des membranes de vacuoles (Boller, 1986), la cardosine B étant une enzyme extracellulaire est supposée jouer le rôle le plus important durant ce processus (Faro *et al.*, 2012).

En conclusion, la cardosine A joue un rôle primaire dans l'interaction avec les pathogènes et ensemble avec la cardosine B, elles sont impliquées dans les interactions pollen-pistil qui s'établissent durant la reproduction sexuelle de la plante. Les deux cardosines peuvent aussi intervenir durant la sénescence des fleurs même si ceci n'est certainement, qu'une fonction secondaire des deux enzymes.

### II.3. Caractérisation des cardosines

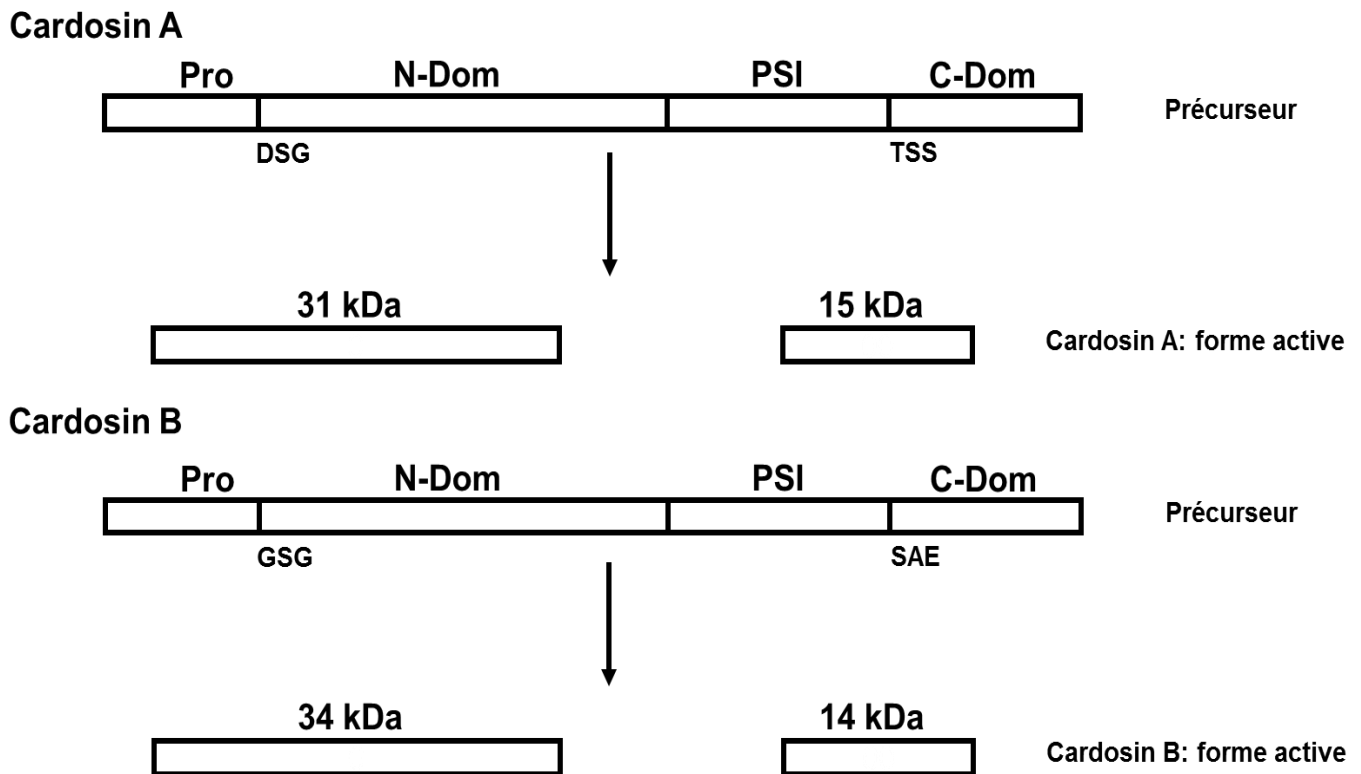
Des cardosines purifiées, la cardosine A et la cardosine B étaient les plus étudiées et les plus caractérisées. Les deux cardosines dérivent de deux différents gènes et sont exclusivement exprimées au niveau du pistil (Figure 6). La cardosine A est la plus abondante des protéases des fleurs de *Cynara cardunculus* et s'accumule dans les vacuoles et dans les cellules du tissu épidermique quant à la cardosine B elle est accumulée dans les parois cellulaires et dans la matrice extracellulaire des tissus (Rahmalho-Santos *et al.*, 1997 ; Duarte *et al.*, 2006).

A l'état mature, les deux cardosines sont des dimères et chacune d'elles est constituée de deux polypeptides : des polypeptides de 31 kDa et 15 kDa pour la cardosine A, et de 34 kDa et 14 kDa pour la cardosine B (Verissimo *et al.*, 1996). Les deux cardosines sont actives à des pH compris entre 2 et 7 avec un optimum d'activité à un pH proche de 5. Les deux enzymes sont aussi inhibées par l'ester Diazoacetyl Norleucine methyl (DAN) et la pepstatine A, ce qui confirme l'appartenance des cardosines A et B à la classe des aspartates protéines (Verissimo *et al.*, 1996). Également, il a été rapporté que les cardosines sont stables à des températures élevées allant jusqu'à 65°C (Roseiro *et al.*, 2003).



**Figure 6.** Localisation des cardosines A et B dans le tissu floral. **A :** Structure du stigma et du stylet matures, coupe transversale au niveau de la région médiane du stigma montrant deux évidentes rainures longitudinales du stigma (\*), pe : papilles dermiques, sc : sclérenchyme, vb : faisceau vasculaire, tt : tissu transmetteur. **B :** Image immuno-fluorescente montrant la localisation de la cardosine A dans une section du stigma d'une fleur mature de *C. cardunculus*. La cardosine A est présente avec abondance au niveau des papilles dermiques (pe) et du parenchyme (pa). **C :** Image immuno-fluorescente montrant la localisation de la cardosine B dans le stylet. A ce stade de développement, la cardosine B est détectée au niveau du tissu transmetteur (tt). Figures adaptées à partir de (Duarte *et al.*, 2006).

Comme c'est le cas pour plusieurs enzymes, les cardosines sont synthétisées sous formes de proenzymes non actives, et ce n'est qu'après avoir subi un processus protéolytique que ces dernières se transforment en enzymes matures (Rahmalho-Santos *et al.*, 2012). Le précurseur de la cardosine A est nommé cardosineogen A et il est constitué de 504 acides aminés et celui de la cardosine B procardosine B est constitué de 506 acides aminés. La conversion des précurseurs vers la forme active des enzymes se fait grâce au clivage de deux liaisons peptidiques internes. Durant ce processus d'activation, la séquence peptidique nommée « PSI » qui est une séquence caractéristique de toutes les aspartate-protéases d'origine végétale, serait complètement séparée dans le cas de la cardosine A tandis que pour la cardosine B la séquence PSI n'est que partiellement éliminée. Ceci peut expliquer la différence du poids moléculaire entre les sub-unités (Figure 7) (Verissimo *et al.*, 1996 ; Faro *et al.*, 1998 ; Rahmalho-Santos *et al.*, 2012).



**Figure 7.** Schéma du processus protéolytique d'activation des cardosine A et cardosine B adapté de [Verissimo et al. \(1996\)](#). Les processus d'activation des deux enzymes commencent d'abord, par séparer le peptide signe (PS) et la pro-séquence (Pro) du côté du N-terminal, puis par l'élimination d'une séquence spécifique aux aspartiques protéases d'origine végétale (PSI). Les deux enzymes sont des dimères et chacune d'elles à l'état mature, est constituée de deux chaînes d'acides aminés : de 31 kDa et 15 kDa pour la cardosine A et de 34 kDa et 14 kDa pour la cardosine B. N-Dom : domaine du N-terminal ; C-Dom : domaine du C-terminal ; DSG, TSS, GSG, SAE : sites de clivage.

Le séquençage des chaînes des deux cardosines matures a été établi à l'échelle protéine ([Verissimo et al., 1996](#)). Les séquences d'acides aminés ont révélé que les deux cardosines sont similaires mais pas identiques. Également, la séquence complète du génome responsable de l'expression de la cardosine A (cDNA) est actuellement disponible sur les bases de données en ligne, tandis que pour la cardosine B le génome (cDNAs) n'est que partiellement identifié ([Figure 8](#)) ([Rahmalho-Santos et al., 2012](#)).

	<b>Signal peptide</b>	<b>Propeptide</b>	
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>MGTSIKANVLALFLFYLLSPTVFSVSDG</u>	..... LIRIGLKKRKVDRLDQLRGRRALMEGNARKD	60
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>MGTPIKASLLALFLFLLSPTAFS</u>	..... VSNGLLRVGLKKRKVDRLDQLRAHGVMHMLGNARKD	60
		<b>Chaîne longue</b>	
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	..... <u>FGFRGTVRDSGSAVVALTNRD</u>	TSYFGEIGIGTPPQKFTVIF	120
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	..... <u>FGFRRTLSDSGS</u>	GIIVALTNRDRTAYYGEIGIGTPPQNFVIF	120
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>ACRAHSMYESSDSSTYKENGTFGAI</u>	IYGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVK	180
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>ACVIHPRYDSGDSSTYKNGTTAS</u>	IQYGTGAI VGFYSQDSVEVGD	180
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>DNVFLHRLFDGILGLSFQ</u>	TISS---VPVWYNMLNQGLVKERRFS	236
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>DTVFLKSEFDGILGLGFQ</u>	EISAGKAVPVWYNMNVNQGLVEEAVFS	240
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>FGGLDPNHFRGDHTYVPV</u>	TYQYVWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFAD	296
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>FGGVDPNHFRGNHTYVPV</u>	TRKGYWQFEMGDVLIGDKSSGFCAGGCAAIAD	300
		<b>Séquence spécifique des plante protéases (PSS)</b>	
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>AIVTQINHAIGANGVMNQCKT</u>	VVSRYGRDIIEMLRSKIQPKICSHMKLCTFDGARDVS	356
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>AIIITQINQAIGAKGVLNQCKT</u>	LVGQYGNMIQMLTSEVQPKICSHMKLCTFDGAHDVR	360
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>SIIESVVDKNNDKSSGGIHDEMCT</u>	FCEMAVVVMQNEIKQSETEDNIINYANELCEHLSTS	416
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>SMIESVVDKNNDKSSGG---</u>	EICTFCEMALVRMQNEIKRNETEDNIINHVNEVCDQLPTS	417
		<b>Petite chaîne</b>	
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>SEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKFGLTPEQYI</u>	LKVGKGEATQCI SGFTAMDAT-LLGP	475
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>SAESIVDCNGISSMPNIAFTIGSKLF</u>	EVTPPEQYIYKVGEGEAATCISGFTALDIMSPOGP	477
SP Q9XFX3 CARDA_CYNCA	<u>LWILGDVFM</u>	RPYHTVFDYGNLLVGF	504
SP Q9XFX4 CARDB_CYNCA	<u>IWILGDMFM</u>	GPYHTVFDYGKLRVGF	506

**Figure 8.** Séquences des chaînes d'acides aminés constituant les procardosine A et procardosine B. l'alignement est effectué en utilisant la base de donnée *Uniprot*. Les deux procardosines sont constituées respectivement du signal peptide (—), du propeptide (···) qui sont les deux premiers peptides à être séparés pendant le processus d'activation, de la chaîne longue de l'enzyme mature (—), de la séquence PSS : séquence spécifique de toutes les aspartates protéases dérivées des plantes (···) et de la petite chaîne de l'enzyme mature (—). Les sites actifs sont présentés en rouge.

L'analyse de la séquence complète du cDNA a révélé que la cardosine A est synthétisée sous forme de pré-pro-enzyme composé : du peptide signe (PS constitué de 24 acides aminés), d'un pro-segment (Pro constitué de 42 acides aminés) et d'une séquence de 438 d'acides aminés. En commun avec d'autres aspartates protéases, la cardosine A cDNA contient une séquence interne nommée « PSI » d'une longueur de 102 acides aminés. Cette dernière sépare la chaîne 31 kDa de celle de 15 kDa. Les deux sites actifs de l'enzyme sont localisés dans la chaîne 31 kDa au niveau de Asp-Thr-Gly et Asp-Ser-Gly (Runeberg-Roos *et al.*, 1991 ; Cordeiro *et al.*, 1994 ; Asakura *et al.*, 1995 ; Rahmalho-Santos *et al.*, 2012).

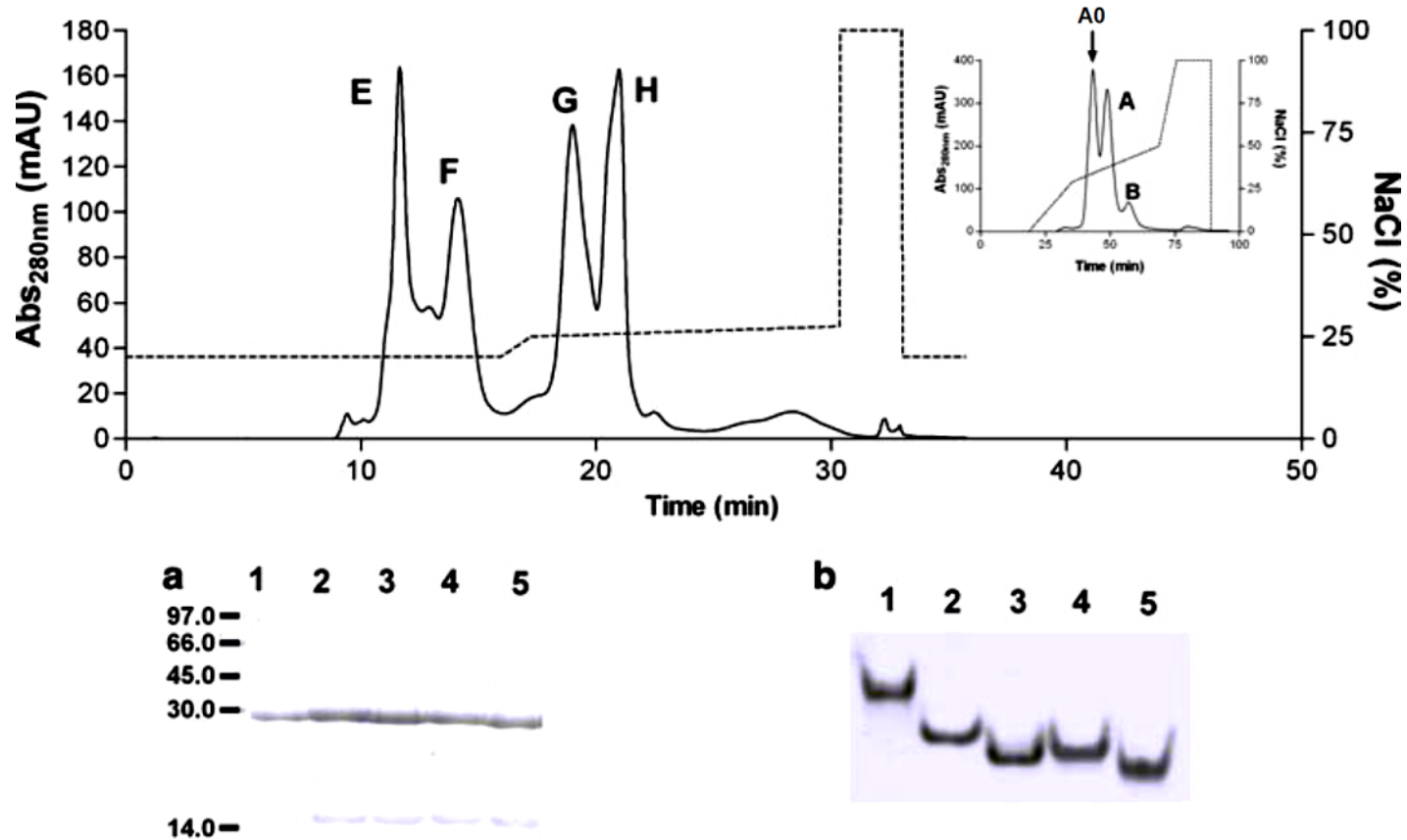
De plus le fait qu'elles sont des dimères, les cardosines A et B sont également des hétéroprotéines. En effet, elles sont considérées comme étant des glycoprotéines. Ceci est dû aux sucres (glycanes) qui sont liés aux acides aminés. Il a été démontré que les deux chaînes de la cardosine A sont glycosylées quant à la cardosine B, la glycosylation n'est observée que pour la chaîne 34 kDa. Les acides aminés glycosylés (Asn-71 et Asn-314) ont été identifiés loin des sites actifs ce que suggère que la glycosylation n'affecte pas l'activité ou la spécificité des cardosines, néanmoins, il se peut qu'elle joue un rôle important dans la stabilisation des enzymes (Rahmalho-Santos *et al.*, 2012).

Le groupe cardosine A<sub>0</sub> est constitué de quatre cardosines appelées cardosine E, F, G et H. il est le groupe le plus récemment découvert par Sarmiento *et al.*, (2009). Ainsi, le nombre de cardosines purifiées à partir des fleurs de *Cynara cardunculus* est porté à six. Semblables aux autres cardosines, les cardosines du groupe A<sub>0</sub> sont des glycoprotéines et à l'état mature sont constituées de deux chaînes peptidiques. Selon les auteurs, ce groupe est plus similaire mais pas identique à la cardosine A (Figures 9 et 10).

#### II.4. Spécificité des cardosines

La spécificité des cardosines essentiellement, la cardosine A (la cardosine la plus abondante) a été étudiée en vis-à-vis différents substrats. La spécificité et les paramètres cinétiques des cardosines ont été étudiés sur le lait, les caséines, l'insuline (la chaîne  $\beta$  oxydée), le collagène et sur certains peptides synthétiques (les paramètres enzymatiques sont résumés dans le Tableau 1). Les résultats suggèrent que les caractéristiques de la cardosine A sont plus proches à ceux de la chymosine quant à la cardosine B, ses paramètres sont similaires à ceux de la pepsine (Verissimo *et al.*, 1996).





**Figure 9.** Purification et isolation des cardosines E, F, G et H constituant le groupe cardosine A<sub>0</sub> (Sarmiento *et al.*, 2009). Le pic A<sub>0</sub> est obtenu suite à une chromatographie d'échange d'ions sur une colonne *Q-Sepharose* et puis injecté une seconde fois à travers une colonne *Mono Q* pour séparer les cardosines E, F, G et H. (a) : électrophorègramme des quatre cardosines obtenu sous conditions dénaturantes SDS-PAGE ; (b) : électrophorègramme des quatre cardosines obtenu sous conditions natives. Ligne 1 : cardosine E, Ligne 2 : cardosine F, Ligne 3 : cardosine G, Ligne 4 : cardosine H, Ligne 5 : cardosine A.

SP P85136 CARDE_CYNCA	-DSGSAIVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKYTVIY <b>D</b> TGSSVLWVPSSK-----	47
SP P85137 CARDF_CYNCA	ADSGSAVVALTNDRDTSYYGEIGIGTPPQKFTVIF <b>D</b> TGSSVLWVPSSKAHSMYESSGSST	60
SP P85138 CARDG_CYNCA	-DSGSTVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIF <b>D</b> TGSSYLWVPSSKAHSMYESSDSST	59
SP P85139 CARDH_CYNCA	-DSGSAVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIF <b>D</b> TGSSVLWVPSSKAHSMYESSGSST	59
SP P85136 CARDE_CYNCA	-----EQDFIEATDETDNVFLH-----	64
SP P85137 CARDF_CYNCA	YKSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATEEADNVFLNRLFDGILGLSFQTISVPVWYNMLNQGLV	120
SP P85138 CARDG_CYNCA	YK-----EQDFIEATEEADNVFLNRLFDGILGLSFQTISVPVWYNMNVNQGLV	106
SP P85139 CARDH_CYNCA	YK-----EQDFIEATDETDNVFLHRLFDGILGLSFQTISVPVWYNMLNQGLV	106
SP P85136 CARDE_CYNCA	RRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGF	124
SP P85137 CARDF_CYNCA	KRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGF	180
SP P85138 CARDG_CYNCA	KRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGF	166
SP P85139 CARDH_CYNCA	KRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGF	166
SP P85136 CARDE_CYNCA	CAPGCQAFAD <b>D</b> SGTSLLSGPTAIVTQINHAIGAN-SEELNVKFGLTPEQYILKGEATQCIS	183
SP P85137 CARDF_CYNCA	CAPGCQAFAD <b>D</b> SGTSLLSGPTAIVTQINHAIGANGSEELNVKFGLTPEQYILKGEATQCIS	240
SP P85138 CARDG_CYNCA	CAPGCQAFAD <b>D</b> SGTSLLSGPTAIVTQINHAIGAN-SEELNVKFGLTPEQYILKGEATQCIS	225
SP P85139 CARDH_CYNCA	CAPGCQAFAD <b>D</b> SGTSLLSGPTAIVTQINHAIGAN-SEELNV-FGLTPEQYILKGEATQCIS	224
SP P85136 CARDE_CYNCA	GFTAMDATLLGPLWILGDVFMRYHTVFDYGNLLVGFAEAA	224
SP P85137 CARDF_CYNCA	GFTAMDATLLGPLWILGDVFMRYHTVFDYGNLLVGFAEAA	281
SP P85138 CARDG_CYNCA	GFTAMDATLLGPLWILGDVFMRYHTVFDYGNLLVGFAEAA	266
SP P85139 CARDH_CYNCA	GFTAMDATLLGPLWILGDVFMRYHTVFDYGNLLVGFAEAA	265

**Figure 10.** Séquences des chaînes d'acides aminés constituant les enzymes à l'état mature du groupe nommé cardosine A<sub>0</sub>. L'alignement est effectué en utilisant la base de données *Uniprot*. Le groupe cardosine A<sub>0</sub> est constitué de quatre différentes cardosines : cardosine E, F, G et H (CARDE, CARDF, CARDG et CARDH respectivement). Les sites actifs sont présentés en rouge.

**Tableau 1.** Paramètres enzymatiques des protéases des fleurs de cardon *Cynara cardunculus* (Ben Amira *et al.*, 2017).

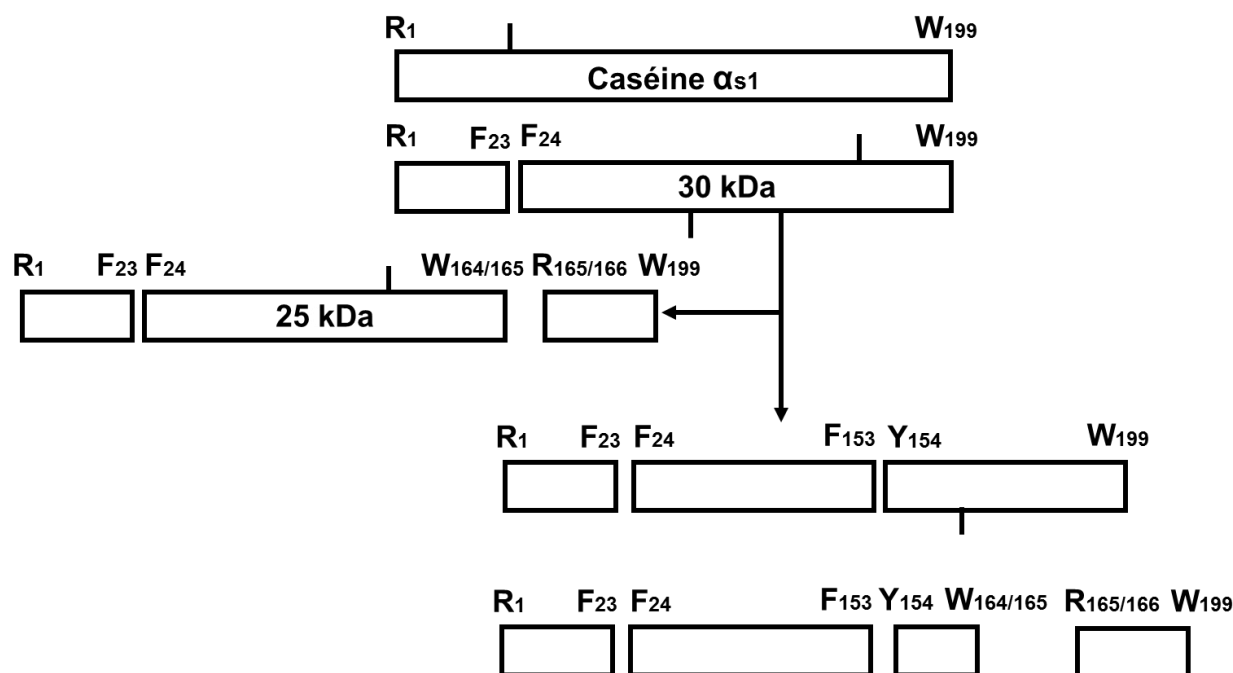
Enzyme	Substrat	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat} / K_m$ ( $mM^{-1}.s^{-1}$ )
Extrait brut	FTC- $\kappa$ -casein	-	0.225 ( $V_m = 3.912$ )	-
Cardosin A	KPAEFF(NO <sub>2</sub> )AL	18	0.14	129
Cardosin B	Leu-Ser-Phe(NO <sub>2</sub> )- Nle-Ala-Leu-oMe	85.5	0.08	1057
Cardosin (A+B)	$\kappa$ -casein	1.04	0.00016	6500
Cardosin E	KPAEFF(NO <sub>2</sub> )AL	25	0.64	39
Cardosin G	KPAEFF(NO <sub>2</sub> )AL	35	0.37	95

#### II.4.1. Action des cardosines sur les caséines du lait

L'action des cardosines (principalement les cardosin A et B) sur les différentes caséines a été largement étudiée :

Rahmalho-Santos *et al.* (1996) ont choisi la caséine  $\alpha_1$  comme substrat pour les cardosines pour deux raisons : premièrement parce qu'il s'agit d'une protéine contenant un taux élevé de résidus hydrophobiques (43%), ce qui permet une étude appropriée de la spécificité des aspartates protéases connues pour leur préférence à couper les liaisons hydrophobes qui s'établissent entre des résidus volumineux. La seconde raison est le fait que la caséine  $\alpha_1$  est l'une des caséines majeures du lait et justement, les cardosines sont considérées comme des agents de coagulation de lait. Les caséines interagissent entre elles d'une manière complexe pour former des micelles, et fromagerie, la coagulation du lait est induite suite à la déstabilisation de ces micelles (Schmidt, 1982 ; Dalgleish et Corredig, 2012). De plus, l'hydrolyse de la caséine  $\alpha_1$  peut engendrer des peptides ayant d'intéressantes activités biologiques. Pour ces raisons, l'action des cardosine A et B sur la caséine  $\alpha_1$  d'origine bovine a été étudiée avec détails (Rahmalho-Santos *et al.* 1996). Les auteurs ont rapporté que la liaison la plus susceptible d'être coupée en premier est Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub>. Aussi, la cardosine A et B coupent à des vitesses différentes, la séquence Trp<sub>164</sub>-Tyr<sub>166</sub> localisée dans la région hydrophobe proche du carboxyle terminal C-terminal (l'hydrolyse se fait plus rapidement avec la cardosine B). Les cardosines coupent les deux liaisons Trp<sub>164</sub>-Trp<sub>165</sub> et Trp<sub>165</sub>-

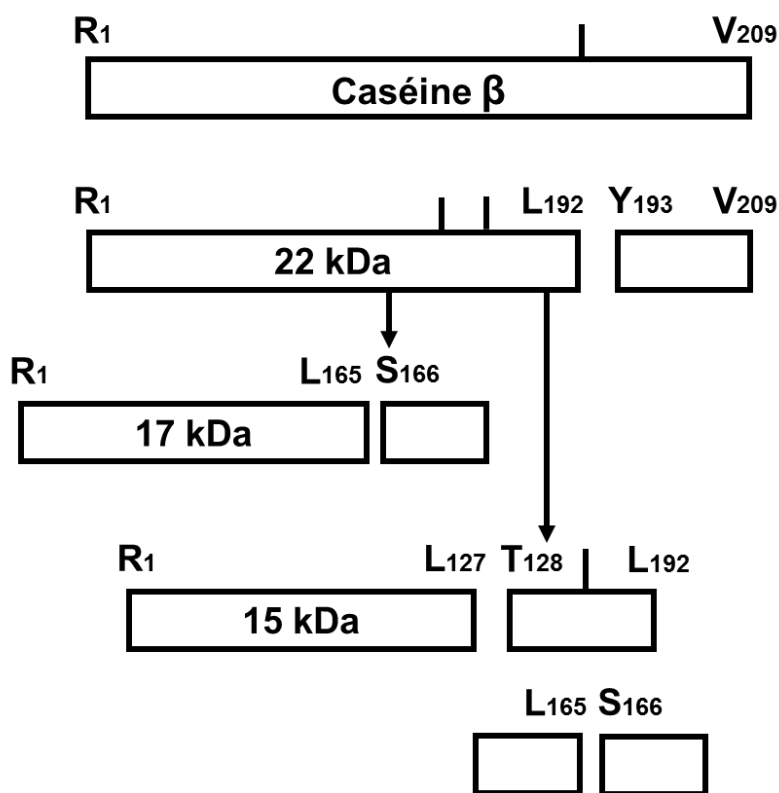
Tyr<sub>166</sub> mais pas simultanément dans la même molécule du substrat. Par la suite, les cardosines procèdent à l'hydrolyse de la partie azote terminal (N-terminal) avec le clivage de la liaison Phe<sub>153</sub>-Tyr<sub>154</sub>. Du fait que la cardosine A agit moins rapidement sur la région Trp<sub>164</sub>-Tyr<sub>166</sub>, un peptide Tyr<sub>154</sub>-Trp<sub>199</sub> intermédiaire se forme (Figure 11). Dans ce même travail, il a été rapporté aussi, que les cardosines ont montré une limite de spécificité comparées à la chymosine. Cependant, les résultats ont indiqué que les cardosines ont une préférence pour les liaisons hydrophobes entre les larges résidus.



**Figure 11.** L'action des cardosins sur la caséine  $\alpha_1$  d'origine bovine. Figure adapté à partir de (Rahmalho-Santos et al. 1996).

L'action des cardosines sur la caséine  $\alpha_2$  pure n'a pas été étudiée, cependant, dans un autre travail (Macedo et al., 1996), un mélange des caséines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  comme a été utilisé substrat. Les résultats ont révélé que les cardosines catalysent l'hydrolyse de deux liaisons peptidiques entre des acides aminés très hydrophobes Phe<sub>88</sub>-Tyr<sub>89</sub> et Tyr<sub>95</sub>-Leu<sub>96</sub>, engendrant un peptide de nature lipophile Tyr<sub>89</sub>-Tyr<sub>95</sub> détecté par une chromatographie phase inverse (RP-HPLC).

La spécificité des cardosines sur la caséine  $\beta$  à son tour, a été largement abordée (Sarmiento, 2003) utilisant des techniques électrophorétiques et chromatographiques (SDS-PAGE et RP-HPLC). Plusieurs auteurs (Mcedo *et al.*, 1996 ; Sarmiento, 2003) ont démontré que la caséine  $\beta$  est principalement, hydrolysée par les cardosines du côté du C-terminal considéré comme étant la région la plus hydrophobe de cette molécule. D'après les auteurs, les liaisons de caséine  $\beta$  coupées sont : Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub>, Leu<sub>165</sub>-Ser<sub>166</sub> et Leu<sub>127</sub>-Thr<sub>128</sub> (Figure 12). Tous les auteurs ont agréé que la liaison Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> est la plus susceptible à être hydrolysée, ceci peut être lié au fait que cette liaison est la plus exposée aux solvants, et par conséquent, la plus accessible aux enzymes protéolytiques (Kumosinski *et al.*, 1993).



**Figure 12.** L'action des cardosins sur la caséine  $\beta$  d'origine bovine adapté à partir de (Sarmiento *et al.*, 1996).

L'hydrolyse de la caséine- $\kappa$  a aussi été largement étudiée. Grâce à la capacité des cardosines à couper la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> ou dans certains cas, la liaison Ser<sub>104</sub>-Phe<sub>105</sub> que les micelles de caséines sont déstabilisées et que la coagulation du lait est induite. La grande habilité à hydrolyser la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> était prouvée non seulement pour les cardosines mais aussi pour la

chymosine et toutes les aspartates protéases ayant une capacité à coaguler le lait (Drose et Foltmann, 1989). D'après la structure tridimensionnelle de la caséine- $\kappa$ , la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> est située dans une région riche en proline ; entre la séquence Pro-His-Pro (résidu 99-101) et une Pro-Pro séquence (résidu 109-110), ce qui peut expliquer la forte habilité du clivage de la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> par les aspartates protéases. Bien que cette région puisse s'arranger dans une structure secondaire comme une hélice- $\alpha$ , la présence des séquences Pro-X-Pro et Pro-Pro favorise la formation d'une boucle qui expose les deux résidus hydrophobiques en surface (Kumosinski *et al.*, 1991).

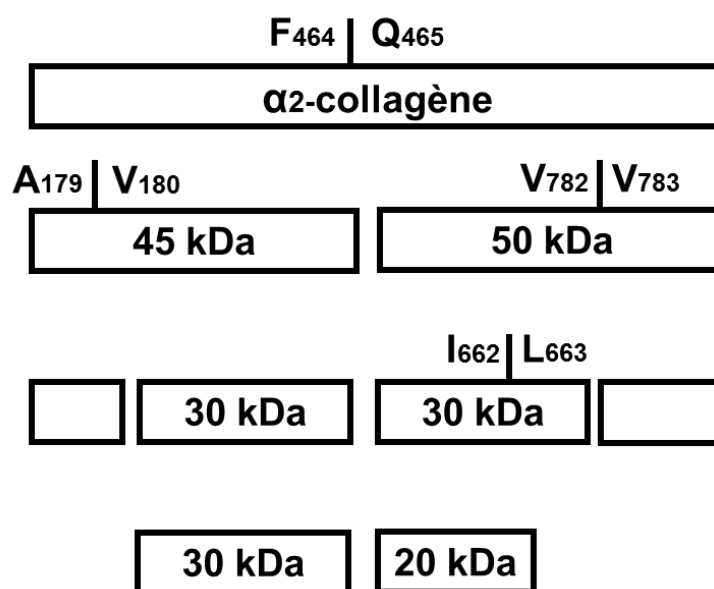
Un récapitulatif de l'action des cardosines A et B sur les caséines isolées à partir de différents laits et les liaisons peptidiques hydrolysées est présenté sur le [tableau 2](#).

**Tableau 2.** Spécificité des cardosine A et B en vis-à-vis des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  de différents laits (Cavalli *et al.*, 2013).

Enzyme	Origine du lait	Type de Caséines		
		Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\beta$	Caséine $\kappa$
Cardosin A	Bovine	Phe <sub>23</sub> -Phe <sub>24</sub>	Leu <sub>127</sub> -Thr <sub>128</sub>	Phe <sub>105</sub> -Met <sub>106</sub>
		Phe <sub>153</sub> -Tyr <sub>154</sub>	Leu <sub>165</sub> -Ser <sub>166</sub>	
		Trp <sub>164</sub> -Tyr <sub>165</sub>	Leu <sub>192</sub> -Tyr <sub>193</sub>	
		Tyr <sub>165</sub> -Tyr <sub>166</sub>		
Cardosin B	Bovine	Phe <sub>23</sub> -Phe <sub>24</sub>	Leu <sub>165</sub> -Ser <sub>166</sub>	Phe <sub>105</sub> -Met <sub>106</sub>
		Phe <sub>150</sub> -Arg <sub>151</sub>	Leu <sub>192</sub> -Tyr <sub>193</sub>	
		Phe <sub>153</sub> -Tyr <sub>154</sub>		
		Trp <sub>164</sub> -Tyr <sub>165</sub>		
Cardosin A+B	Caprine	Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\beta$	Caséine $\kappa$
		Phe <sub>153</sub> -Tyr <sub>154</sub>	Leu <sub>127</sub> -Thr <sub>128</sub>	Phe <sub>105</sub> -Met <sub>106</sub>
Cardosin B	Ovine	Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\beta$	Caséine $\kappa$
		Leu <sub>156</sub> -Asp <sub>157</sub>	Leu <sub>127</sub> -Thr <sub>128</sub>	Phe <sub>105</sub> -Met <sub>106</sub>
		Trp <sub>164</sub> -Tyr <sub>165</sub>	Leu <sub>165</sub> -Ser <sub>166</sub>	
			Leu <sub>90</sub> -Tyr <sub>191</sub>	

#### II.4.2. Action des cardosines sur le Collagène humain

Dans un précédent travail, [Duarte \*et al.\* \(2005\)](#) ont étudié l'activité collagénolytique de la cardosine A. Les auteurs ont prouvé que la cardosine A peut hydrolyser le collagène humain type I au niveau de certaines liaisons spécifiques. Dans ce travail, on a démontré que la cardosine A a une préférence pour la chaîne  $\alpha_2$  du collagène humain type I en hydrolysant cette chaîne plus rapidement. Les points d'hydrolyse ont été déterminés séquençage de de la partie de l'azote terminal (N-terminal) et par *immuno-blotting* en utilisant des anticorps spécifiques aux séquences  $^{447}\text{QGVQGGKEG}_{457}$  et  $^{482}\text{ERGLHGEFGL}_{492}$ . D'après les résultats obtenus, les auteurs ont suggéré que suite au clivage de la chaîne  $\alpha_2$  du collagène humain type I par la cardosine A, les premiers fragments engendrés sont d'une taille de 45kDa et 50kDa la protéolyse se poursuit et produit par la suite, plus de fragments ([Figure 13](#)). Le N-terminal consiste au fragment  $^{465}\text{QGLP}_{468}$  démontrant ainsi, que le clivage est effectué au niveau de la liaison peptidique  $\text{F}_{464}\text{-Q}_{465}$ . Cette dernière, consiste à la première liaison à être hydrolysée lors de la digestion du collagène par la cardosine A.



**Figure 13.** L'action de la cardosin A sur le collagène humain adapté à partir de ([Duarte \*et al.\*, 2005](#)).

### II.4.3. Action des cardosines sur la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée

Faro *et al.* (1992) ont décrit la spécificité de l'action des cardosines sur la chaîne  $\beta$  oxydée de l'insuline. Ce travail a caractérisé les peptides produits suite à l'hydrolyse générée par les protéases isolées à partir de *Cynara cardunculus*. Les auteurs ont identifié quatre liaisons peptidiques susceptibles d'être hydrolysées : Phe<sub>1</sub>-Val<sub>2</sub>, Leu<sub>15</sub>-Tyr<sub>16</sub>, Leu<sub>17</sub>-Val<sub>18</sub> et Phe<sub>25</sub>-Tyr<sub>26</sub>. Ils ont conclu que la spécificité des cardosines n'est pas entièrement déterminée par la nature des résidus contenant les acides aminés coupés. Cependant, ils ont expliqué l'hydrolyse de la partie N-terminal par la nature hydrophobe de la séquence hydrolysée. L'hydrolyse des mêmes liaisons a été rapportée dans le cas d'autres protéinases tel que la pepsine et les enzymes isolées à partir de *Mucor pusillus* (Daldleish, 1982).

## III. Utilisation des cardosines en industrie fromagère

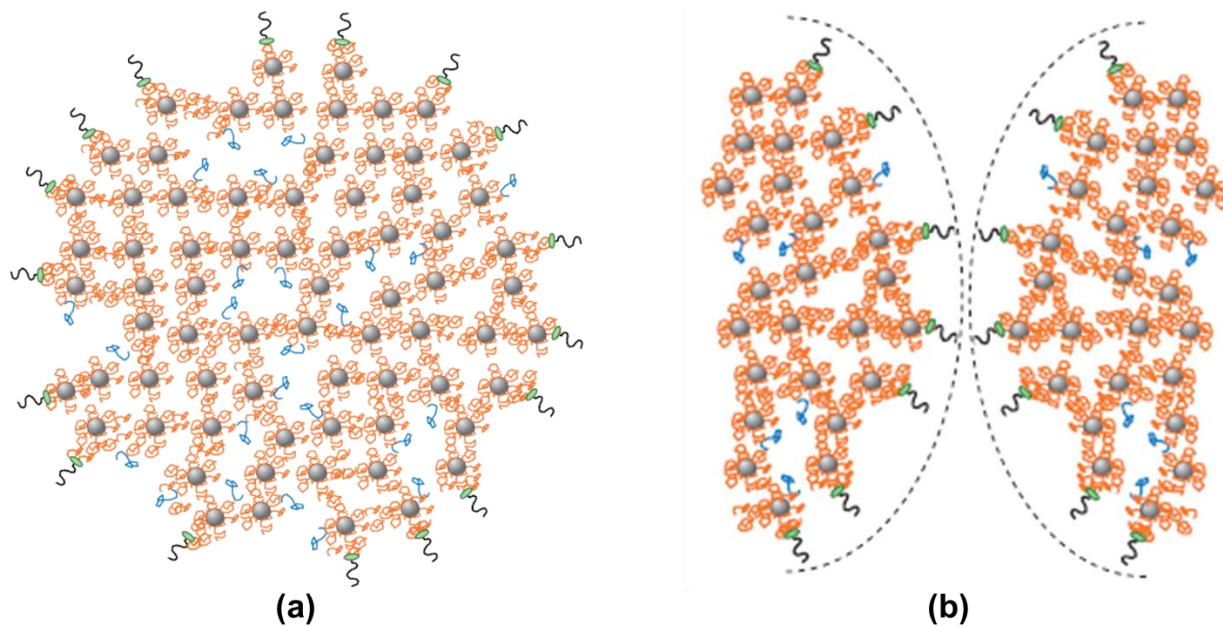
La transformation du lait en fromage est le procédé biotechnologique le plus ancien, datant probablement, de 6000 an A.C (Fox et Mc Sweeney, 1997). Le fromage est également considéré comme étant un des aliments les plus divers, avec ses plusieurs variétés, il a suscité l'intérêt d'un grand nombre de scientifiques de différents domaines. En effet, et pendant des années, des chimistes, biochimistes, microbiologistes, nutritionnistes, spécialistes en rhéologie et en biologie moléculaire, ont trouvé en fromage un champ fertile de sujets de recherche. Par conséquent, un archif considérable traitant les différents aspects du fromage est disponible. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur les fromages fabriqués par l'utilisation des fleurs de cardon comme agent de coagulation du lait, et sur les rôles que peuvent avoir les cardosines durant le processus de fabrication des fromages.

### III.1. Mécanisme de coagulation du lait par les cardosines

La coagulation du lait est la première étape en fromagerie, elle résulte d'un changement irréversible du lait de l'état liquide vers un état semi solide appelé gel ou coagulum (Cecchinato *et al.*, 2012). Les caractéristiques physico-chimiques du gel obtenu, conditionnent l'aptitude à l'égouttage et les caractéristiques finales du fromage (Hsieh et Pan, 2012). Dans le cas de la grande majorité des fromages (75% des fromages), cette étape est assurée grâce à l'addition d'une petite quantité d'enzymes protéolytiques (Hyslop, 2003). La coagulation du lait résulte suite à la déstabilisation des micelles de caséines (protéines majeures du lait). Les micelles de caséines sont relativement



larges, ce sont des gros agrégats sphériques de molécules de caséines individuelles. Ces agrégats ont des dimensions colloïdales et forment une suspension stable en milieu aqueux. Chaque micelle peut être constituée par des milliers de molécules de caséines, principalement, les  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ , et la caséine- $\kappa$ . Le maintien des micelles entre elles est assuré grâce aux forces hydrophobes et ioniques qui s'établissent. La caséine- $\kappa$  est considérée comme étant la fraction ayant le rôle le plus critique dans le maintien de la stabilité des micelles. Il est connu que la caséine- $\kappa$  se situe à la surface des micelles et qu'elle est constituée d'une partie hydrophobe et d'un macro-peptide (CMP) hautement hydrophile. Ces CMP forment une couche stérique d'électrolytes qui génère des forces répulsives assurant ainsi, la stabilité des micelles (Figure 14) (Hyslop, 2003 ; Dalgleish et Corredig, 2012).



**Figure 14.** Structure des micelles de caséines adaptée à partir de (Dalgleish et Corridg, 2012). (a) : Schéma d'une de micelle de caséine montrant les régions d'eau à l'intérieur de la micelle. Les  $\alpha_s$  et  $\beta$  caséines (en orange) sont attachées et lient les nano-clusters du calcium phosphate (sphères grises). La para-caséine  $\kappa$  (en vert) et la chaîne du macro-peptide caséique (filaments en noir) entourent la surface de micelle. (b) : La stabilité des micelles natives est assurée grâce aux forces stériques générées par les macro-peptides (la zone d'interaction stérique est illustrée par les lignes pointues).

Le principal rôle des cardosines lors de la coagulation du lait, est similaire à celui de la présure ou autre agent coagulant, il consiste à l'hydrolyse de la liaison peptidique Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>. Ce qui scinde la molécule de caséine- $\kappa$  en deux : la para-caséine  $\kappa$  (résidu 1-105) qui est un segment hautement

hydrophobe, et le caséino-macro-peptide (CMP) (résidu 106-169). La séparation des CMP, composés qui passent à la phase aqueuse de par leur nature hydrophile, engendre une neutralisation des forces répulsives générés par la couche d'électrolytes et cause ainsi, l'augmentation de la viscosité du lait jusqu'à ce que plus de 85% de caséine- $\kappa$  soit hydrolysée. A ce point précis, le peu de caséine- $\kappa$  résiduel ne génère plus suffisamment de forces permettant de garder la stabilité, les micelles commencent à s'agréger et le coagulum est ainsi formé (Verissimo *et al.*, 1996 ; Roseiro *et al.*, 2003 ; Claverie-Hernandez, 2007 ; De Kruif *et al.*, 2012 ; Dalglish et Corredig, 2012).

### III.2. Les fromages fabriqués par l'utilisation des fleurs cardon

La fabrication des fromages par l'utilisation des fleurs de cardon est une pratique antique connue depuis l'époque romaine (Roseiro *et al.*, 2003). Les fromages fabriqués par cet agent coagulant sont réponsés principalement dans la région méditerranéenne, notamment, l'Espagne et le Portugal qui ont une large variété de fromages produits par les fleurs de cardon (Tableau 3).

**Tableau 3.** Les types de fromages fabriqués par l'utilisation des fleurs de *Cynara* réponsés dans la péninsule Ibérique (Roseiro *et al.*, 2003).

Pays	Nom du fromage	Type du lait utilisé
Portugal	Serra da Estrela	Brebis
	Serpa	Brebis
	Azeitão	Brebis
	Nisa	Brebis
	Castelo Branco	Brebis
	Evora	Brebis
Espagne	Casar de Cáceres	Brebis
	Torta del Casar	Brebis
	La Serena	Brebis
	Los Pedroches	Brebis
	Los Ibores	Chèvre
	Flor de Guía	Brebis et chèvre

Ces fromages sont souvent fabriqués à l'échelle artisanale au niveau des fermes ou de petites fromageries. Ils sont fabriqués avec du lait cru de brebis et sont très appréciés, certains types de ces fromages bénéficient de la dénomination d'origine protégée (DOP). Les fromages prennent le nom des régions dont ils sont fabriqués. Bien qu'elle soit à petite échelle, cette activité semble avoir un important impact socio-économique et une contribution non négligeable au développement du secteur du lait au niveau régional de chaque pays, elle joue un rôle avéré dans l'économie d'agriculture locale. Les techniques de fabrication de ces fromages sont souvent simples, la coagulation se déroule à des températures comprises entre 27°C et 30°C, le coagulum est coupé, partiellement égoutté, moulé et pressé manuellement pour aider le drainage du lactosérum. Les pièces du fromage sont par la suite, mises dans des caves ou des hâloirs pour affinage à des températures 8-13°C et des taux d'humidité entre 85% et 90%.

En Algérie, et plus exactement dans les petits villages qui entourent la région des *Aures*, l'extrait des fleurs de cardon est utilisé durant l'été, pour la fabrication d'un des fromages les plus communs du pays le *Djben* à base de lait de brebis. Les fleurs cueillies des capitules de cardon, sont utilisées directement sans être préalablement séchées ; Une touffe de fleurs est prise et mise dans un peu de laine lavée ; Cette touffe est bien écrasée durant quelques minutes à l'intérieur de la laine, pour faire sortir l'extrait enzymatique des fleurs ; Le tout est bien essoré au-dessus d'une quantité de lait (1 à 5 litres) et ceci jusqu'à l'obtention de quelques gouttes d'un liquide jaunâtre qui seront ajoutées au lait. Le lait est bien mélangé et mis au soleil durant environ 30 min. Le caillé obtenu est débarrassé de son sérum par un égouttage assez poussé à l'aide d'une toile ; Le *Djben* obtenu peut être consommé directement ou après salage (Aquilanti *et al.*, 2011 ; Zikiou, 2013).

### **III.3. Préparation de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon**

Il existe différentes manières de préparation des extraits aqueux des fleurs de cardon pour la fabrication des fromages, on peut dire que chaque fromager a sa propre façon de faire. Cependant, le point commun, est que l'extrait est toujours préparé le jour même de la fabrication pour être utilisé frais. Généralement, les fleurs utilisées sont récoltées et séchées l'été d'avant, et les fromagers s'en approvisionnent à partir des marchés locaux en quantités suffisantes pour toute une année de production. Brièvement, Les fleurs sèches sont trempées dans de l'eau à température ambiante pour des périodes variables tout en les écrasant à l'aide d'un pilon. Par la suite, les fleurs sont filtrées en utilisant un tissu ou du coton, un liquide d'une couleur violette ou marron est obtenu

et ajouté au lait. La coagulation dure entre 30 et 60 minutes selon le type du fromage. Les taux des fleurs sèches et de l'eau utilisés dépendent des quantités du lait à transformer, de la qualité des fleurs et de l'expérience du fromager.

#### III.4. Composition chimique et microbiologique de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon

La composition des fleurs de cardon (Tableau 4) et de leur extrait enzymatique dépendent de plusieurs facteurs, elle est influencée par le climat, la nature du sol sur lequel pousse la plante, et par la saison durant laquelle les fleurs sont cueillies. A l'image des autres coagulants d'origines végétales, cette grande variation dans la composition est considérée comme étant l'un des facteurs qui limitent l'utilisation des fleurs de cardon pour la fabrication des fromages (Roseiro *et al.*, 2003).

**Tableau 4.** Compositions physico-chimique et microbiologique moyennes des fleurs de cardon (Roseiro *et al.*, 2003).

Paramètre	Valeur
pH	5.8
Matière sèche (%)	95.0
Protéines (%)	26.0
Sucres totaux (%)	42.5
Tanins (%)	4.5
Sel (% Cl <sup>-</sup> )	9.5
Germes totaux (cfu/g)	9.8 x 10 <sup>4</sup>
<i>Lactobacillus</i> (cfu/g)	5.1 x 10 <sup>4</sup>
Bactéries protéolytiques (cfu/g)	3 x 10 <sup>3</sup>
Bactéries lipolytiques (cfu/g)	5 x 10 <sup>3</sup>
Coliformes /0.1g	Négatif
Entérocoques /0.01g	Positif
Staphylocoques /0.01g	Négatif
Spores et clostridium /0.1g	Négatif
Levures et champignons (cfu/0.1g)	98

Shelyuto *et al.* (1975) ont rapporté avoir isolé à partir de l'extrait éthanolique des fleurs de cardon de l'apigenin, de luteolin et du kaempferol. L'acide 4-hydroxybenzoïque, le phloroglucinol et l'acide

protocatechuic composés de dégradation du apigenin et du luteolin, ont également été détectés. [Andrade et al \(1998\)](#) à leur tour ont confirmé la présence de l'apigenin et du luteolin mais pas du kaempferol. De plus, 29 composés ont été isolés à partir l'huile essentielle des fleurs de cardons, il s'agit d'acides, d'esters, des aldéhydes, d'hydrocarbures et des alcools ([Mucaji et al., 2001](#)). La variabilité de la composition chimique ou microbiologique peut mener à des variations dans les caractéristiques finales des fromages. Le taux d'humidité des fleurs est aussi un facteur influençant la composition des extraits ([Martins et al., 1996](#)).

### **III.5. Effet des protéases des fleurs de cardon sur les caractéristiques des fromages**

L'activité coagulante et la spécificité de l'agent coagulant en vis-à-vis des protéines du lait, ont un rôle conséquent sur les propriétés du coagulum et la qualité des fromages obtenus ([Mazorra-Manzano et al., 2018](#)). De ce fait, plusieurs études sur les propriétés des coagulums, le rendement fromager et la qualité sensorielle des fromages fabriqués avec les fleurs de cardon ont été menées ([Roseiro et al., 2003](#) ; [Ordiales et al., 2014](#) ; [Mazorra-Manzano et al., 2018](#) ; [Ben Amira et al., 2018](#)).

#### **III.5.1. Effets sur les rendements fromagers**

Un des facteurs les plus importants pour le choix d'un agent coagulant est le rendement fromager. Un rendement fromager optimal est primordial pour le processus de fabrication du fromage tel que soit son type. Une vitesse de dégradation élevée de la caséine- $\kappa$  induit une coagulation rapide du lait. Cependant, une préparation enzymatique ayant une activité protéolytique élevée, peut affecter d'une manière dramatique le rendement fromager. Mais aussi, utiliser une préparation à faible activité et laisser le lait en contact avec l'agent coagulant pour des durées assez longue peut causer une protéolyse excessive du réseau caséique et induire par conséquent, une perte de rendement comprise approximativement entre 0.3% et 0.7% ([Jacob et al., 2011](#)). Le faible rendement fromager qu'ils engendrent est le facteur qui limite le plus l'utilisation de la plupart des agents coagulants d'origine végétale. Néanmoins, les extraits des fleurs de cardon semblent être une exception. En effet, les rendements de cet agent coagulant sont satisfaisants et les fromages fabriqués y'avec sont d'une grande qualité et très estimés par les consommateurs. Dans le cas des fromages portugais fabriqués par ces fleurs, même une perte de matière protéique ne devrait poser problème du moment que le lactosérum est utilisé pour la fabrication d'un autre fromage traditionnel appelé *Requijão* ([Rseiro et al., 2003](#) ; [Shah et al., 2014](#) ; [Ben Amira et al., 2017](#)).

### III.5.2. Effets sur les propriétés sensorielles et la texture des fromages

Les fleurs de cardon sont utilisées pour la fabrication d'une large variété de fromages DOP à pâte dure, mi-dure et molle, principalement à base de lait de brebis et de chèvre. Ces fromages présentent des caractéristiques organoleptiques typiques. Ils ont une couleur jaunâtre plus intense, un aspect onctueux crémeux, un goût légèrement acide avec une amertume non désagréable et piquants à des stades avancés de maturation (Rseiro *et al.*, 2003 ; Shah *et al.*, 2014 ; Ben Amira *et al.*, 2017). Hormis les fromages traditionnels, les fleurs de cardon ont été utilisées pour substituer la présure dans la fabrication de certains types de fromages, à titre d'exemple : le Camembert, le Roquefort, le Cheddar, l'Edam et le Gouda (Christen et Virasoro, 1935 ; Barbosa *et al.*, 1976 ; Banks *et al.*, 1998 ; Llorente *et al.*, 2014). Les différents auteurs ont rapporté une texture plus moelleuse, un goût légèrement amer des fromages fabriqués par les fleurs de cardon par comparaison à ceux obtenus par l'utilisation de la présure. Dans certain cas, principalement pour la fabrication des fromages à base de lait de vache, l'utilisation des fleurs de cardon est moins suggérée vu les défauts qui peuvent être causés dans la texture et dans le goût de ces produits. La différence la plus significative entre le lait de vache et les autres laits est la composition en protéine, un important composant impliqué directement dans la coagulation (Shah *et al.*, 2014 ; Ben Amira *et al.*, 2017). Ces défauts peuvent être limités grâce à l'ultrafiltration du lait, un procédé qui permet le contrôle et la manipulation du taux de protéine du lait. En effet, l'application de l'extrait des fleurs de *Cynara cardunculus* pour la fabrication de fromage à base d'un lait de vache concentré par ultrafiltration (Agboola, 2002) a permis d'avoir un fromage ayant des propriétés sensorielles similaires à celui obtenu par l'utilisation de la présure.

# *Partie expérimentale*

***Chapitre I :***  
***Matériel et Méthodes***



### I.1. Matériel végétal de l'étude

Les fleurs de cardon utilisées durant cette étude sont récupérées à un stade avancé de floraison (ayant une couleur violette foncée), à partir de capitules frais et bien développés. Ceci afin d'obtenir une activité coagulante optimale et un meilleur rendement lors de l'extraction (Roseiro *et al.*, 2003). Deux échantillons de fleurs ont été récoltés aléatoirement à partir de deux champs situés en Kabylie, une région du nord d'Algérie (Figures 15 et 16).



**Figure 15.** Localisation géographique des sites d'échantillonnage des fleurs de cardon *Cynara cardunculus* L. **1** : Akbou, Béjaia, site de collecte des fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* (ALG 1); **2** : Mâatkas, Tizi Ouzou, site de collecte des fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* (ALG 2); **3** : Ansião , Portugal, site de collecte des fleurs du cardon référence (POR).

Le premier échantillon (nommé ALG 1) correspond aux fleurs obtenues à partir des capitules du cardon spontané *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestis*. Elles ont été récupérées en fin du mois de Juin 2013 à partir d'un champ sis à Akbou dans la wilaya de Béjaia. Les fleurs ont été séchées par lyophilisation jusqu'à un taux d'humidité de 7.65% (p/p).

D'autre part, le second échantillon (nommé ALG 2) représente les fleurs collectées à partir des capitules du cardon cultivé *Cynara cardunculus L. var atililis*. Les fleurs récoltées en Juillet 2013 dans un champ sis à Mâatkas (localité dans la wilaya de Tizi Ouzou), ont été conservées par séchage traditionnel à l'air libre, à l'abri de lumière et dans un endroit sec. Leur taux d'humidité final est de 5.80% (p/p).

Les échantillons des fleurs algériennes ont été caractérisés par comparaison à une variété portugaise prise comme référence (nommée POR). Des fleurs récoltées en Juin 2001 dans une région appelée Viseu (ville au nord du Portugal) et conservées à -80°C, leur taux d'humidité est de 43.90 % (p/p). Les enzymes extraites à partir de ces dernières ont déjà été séquencées et répertoriées dans les bases de données numériques.



**Figure 16.** Capitules des fleurs de cardon *Cynara cardunculus L.* utilisés dans l'étude ALG 1 : Fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris*; ALG 2 : Fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis*; POR : Fleurs du cardon référence.

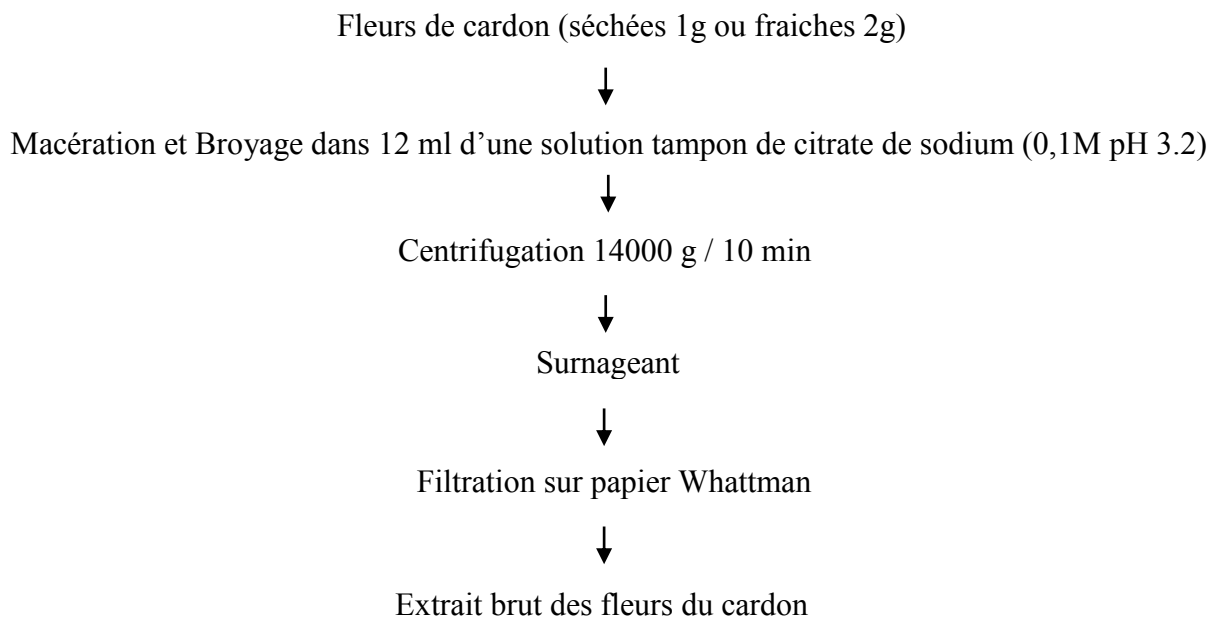
## I.2. Caractérisation des cardosines

### I.2.1. Obtention de l'extrait enzymatique brut des fleurs de cardon

Pour extraire le système enzymatique des fleurs sèches de cardon, plusieurs types d'extractions ont été appliqués et de nombreux protocoles ont été décrit ; il peut s'agir d'une extraction aqueuse par macération des fleurs soit dans de l'eau (Fernandez *et al.*, 2008 ; Aquilanti *et al.*, 2011), dans une solution saline (Tsouli, 1974 ; Martins *et al.*, 1996) ou dans une solution tampon (Sousa *et*

Malacata, 2002 ; Lamas *et al.*, 2001). Aussi, d'une extraction alcoolique par macération dans de l'éthanol (Christen *et Virasoro*, 1935 ; Tsouli, 1974). Ou encore, d'une extraction à l'azote liquide (Verissimo *et al.*, 1996).

Le protocole d'extraction adopté est celui optimisé par Faro *et al.*, (1992) légèrement modifié par Sarmiento *et al.*, (2009). Brièvement, 1g des fleurs sèches (ou 2g dans le cas des fleurs fraîches) été macérées, broyées à l'aide d'un mortier et homogénéisées dans 12 mL d'une solution tampon citrate de sodium (0.1M et pH=3.5) puis centrifugées 10 min à 14000g. Le surnageant est par la suite filtré à travers un papier Wathmann (0.2 $\mu$ M). Le filtrat correspond à l'extrait brut (Figure 17).



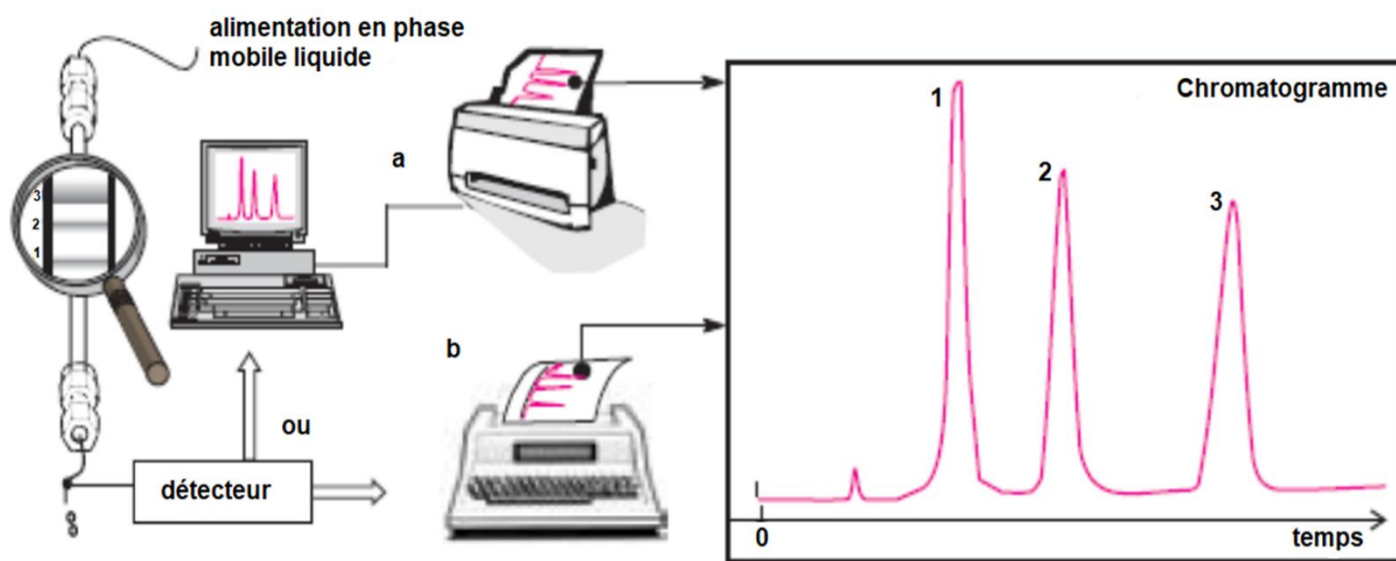
**Figure 17.** Protocole suivi pour l'obtention de l'extrait brut des fleurs de cardon (Sarmiento *et al.*, 2009).

### I.2.2. Purification et distinction des catégories de cardosines

Etant une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative, la chromatographie phase liquide a été utilisée durant cette étude pour les principaux objectifs suivants :

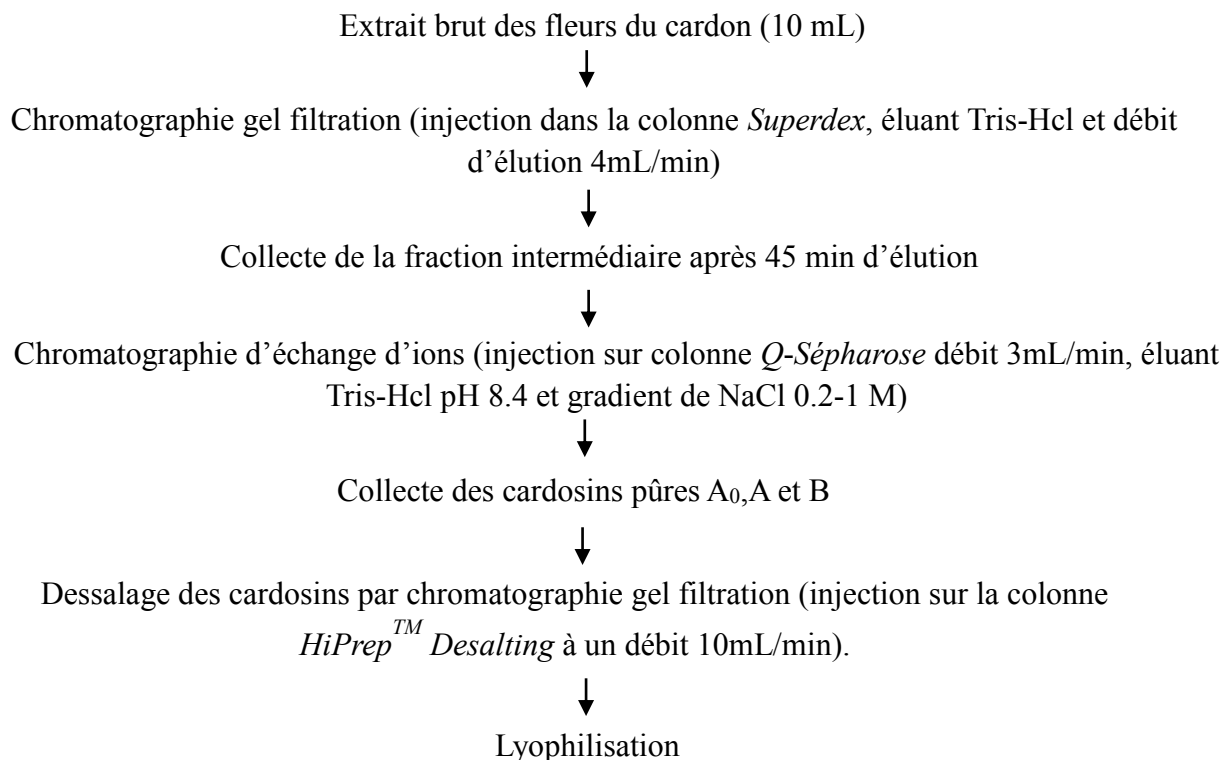
Pour purifier les protéases à partir des extraits bruts des fleurs de cardon, séparer les différentes fractions de cardosins y contenues et pour déterminer les profils enzymatiques de chaque échantillon de fleurs.

La chromatographie phase liquide, connue aussi en tant que méthode préparative de séparation, occupe une place importante parmi les procédés physico-chimiques de purification des produits biotechnologiques. Son principe consiste à la séparation des composés sur une phase stationnaire solide (colonne) à travers laquelle l'échantillon est élué grâce à une phase mobile liquide. Selon leurs propriétés, les composés migrent à des vitesses différentes, ils pourront ainsi être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile (Figure 18) (Rouessac et Rouessac, 2016).



**Figure 18.** Principe de l'analyse par chromatographie liquide adapté à partir de (Rouessac et Rouessac, 2016). Le chromatogramme est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur. Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de 3 constituants. L'ordre de l'apparition des pics est relatif à la position de chaque constituant dans la colonne.

Dans notre cas, nous avons procédé suivant le protocole optimisé par Sarmiento *et al.*, (2009) : Trois étapes successives de chromatographie liquide ont été menées, et pour ceci, nous avons utilisé trois types de colonnes connectées à un système de chromatographie liquide à basse pression FPLC (Äkta<sup>TM</sup>, Amersham, Pharmacia Biotech, Suède) (Figure 19).



**Figure 19.** Etapes de purification des cardosines A<sub>0</sub>, A et B (Sarmiento *et al.*, 2009).

### I.2.2.1. Elimination des impuretés par chromatographie d'exclusion moléculaire

Cette première étape de chromatographie permet de séparer le mélange des cardosins (fraction intermédiaire nommée : M. Excl) des autres constituants des fleurs. La chromatographie d'exclusion moléculaire (gel filtration ou stérique) permet la séparation des molécules en fonction de leurs tailles. La taille des pores de la phase stationnaire détermine le domaine de séparation. C'est une chromatographie considérée dans la plupart des cas comme étant une technique de séparation préparative. Il existe de nombreux supports de la phase stationnaire (exemple : le dextrane, l'agarose) et le choix est fait en fonction des molécules à séparer.

Dans ce travail, la colonne utilisée est une *Superdex™ G75 26/10 prep grade* de chez *GE Healthcare Bio-sciences AB*, Suède. En bref, un volume de 5 à 10 mL de l'extrait brut des fleurs de cardon est injecté dans le système à l'aide d'une valve d'injection, l'élution se fait par la suite, à un débit de 4 mL/minute et la phase liquide est une solution tampon Tris-HCl (25 mM, pH= 7.6). La fraction active qui correspond aux cardosins (M. Excl) est collectée approximativement, après 44 minutes d'élution, sous forme d'un seul pic.

### **I.2.2.2. Fractionnement du contenu enzymatique par chromatographie échangeuse d'ions**

La séparation des cardosins est réalisée grâce à une chromatographie échangeuse d'ions qui est une technique qui permet le fractionnement des protéines en fonction de leurs points isoélectriques. Le choix du pH de travail est primordial et l'échangeur à utiliser doit être anioniques (si le  $\text{pH} > \text{PI}$  de la protéine) ou cationiques (si le  $\text{pH} < \text{PI}$ ). Cet échangeur est une matrice insoluble dans laquelle sont fixés des groupements chargés positivement (échange d'anions) ou négativement (échange de cations). Les protéines seront plus ou moins liées à ladite matrice en fonction de leurs charges globales. L'application d'un gradient de sel, permet l'élution de ces protéines à des temps différents et par conséquent, leur séparation.

La fraction active (M. Excl) obtenue précédemment après chromatographie d'exclusion moléculaire, était sujette à une autre chromatographie d'échange d'ions, précisément, à une chromatographie échangeuse d'anions. Deux types de colonnes ont été utilisées comme supports, une colonne *Q-Sépharose FF XK 26* et pour une meilleure résolution une colonne *Q-Sépharose HP 16/10* a été aussi utilisée (les deux colonnes sont de chez *GE Healthcare Bio-sciences AB*, Suède). Brièvement, 10 mL de la fraction M. Excl ont été injecté et l'élution s'est faite à un débit de 3 mL/ minute grâce à une solution tampon Tris-HCl (25 mM,  $\text{pH} = 7.6$ ) et un gradient de sel NaCl compris entre 0.2 et 1 M a été appliqué et a servi comme une force ionique pour détacher les fractions de cardosins. La fraction éluée à l'intervalle compris entre 27-30% de sel correspond au groupe cardosin A0, celle obtenue à l'intervalle compris entre 37-38% est la cardosin A et la fraction obtenue entre 40-46 % représente la cardosin B. L'étude quantitative, qualitative et comparative des profils obtenus est accomplie en utilisant le logiciel *UNICORN* version 5.1.

### **I.2.2.3. Dessalage des cardosins par chromatographie d'exclusion**

Une troisième étape de chromatographie été utilisée pour éliminer le sel des fractions obtenues précédemment. Il s'agit d'une autre chromatographie d'exclusion moléculaire, et le protocole consiste à l'injection de 10 mL de la fraction de cardosin à travers la colonne *HiPrep<sup>TM</sup> Desalting 26/10* de chez *GE Healthcare Bio-sciences AB*, Suède. Le débit été de 10 mL/minute et l'eau ultrapure été utilisée pour l'élution. La fraction pure dessalée de cardosin est obtenue en un seul pic après 3 minutes d'élution. Ces fractions sont par la suite, concentrées par lyophilisation et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### I.2.3. Quantification des protéines

Le dosage des protéines été fait suivant une méthode colorimétrique utilisant l'acide Bicinchoninic (BCA). L'analyse était de routine et accomplie par l'utilisation d'un kit commercial de quantification de protéines *Micro BCA<sup>TM</sup>* (Pierce) de chez *Sigma Aldriech USA*.

Le principe de la méthode consiste à la réduction par les protéines des ions  $\text{Cu}^{+2}$  on  $\text{Cu}^{+1}$  dans un milieu alcalin (Smith *et al.*, 1985). L'acide Bicinchoninic forme en présence de  $\text{Cu}^{+1}$ , un composé soluble dans l'eau de couleur violette intense mesurable à une longueur d'onde de 562 nm. Il a été démontré que l'apparition de ces composés colorés est influencée à la fois, par la structure macromoléculaire des protéines, par la nature des liaisons peptidiques et par la composition en certain acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) (Sarmiento, 2003). Le choix de cette méthode est motivé par sa grande sensibilité qui permet la quantification des protéines même à des concentrations très diluées (intervalle de sensibilité : de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  à 20  $\mu\text{g/mL}$ ).

L'analyse est conduite suivant les instructions du fournisseur (*Sigma Aldriech USA*) : un volume d'enzyme est dilué jusqu'à 500  $\mu\text{L}$  dans de l'eau ultrapure, auquel on ajoute 500  $\mu\text{L}$  des réactifs de travail. Après 60 minutes d'incubation à 60°C, les échantillons sont mis pour refroidir à 25°C pendant 40 minutes. Et l'absorbance est mesurée à 562 nm. Les concentrations sont mesurées grâce à une courbe d'étalonnage préparée par l'utilisation du bovin sérum albumine (BSA).

### I.2.4. Estimation des poids moléculaires et des degrés de pureté

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines du fait de leur caractère amphotère peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode ou la cathode. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, elles se matérialiseront sur l'électrophorègramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes (Rouessac et Rouessac, 2016).

Au cours de cette étude, deux techniques d'électrophorèse ont été utilisées pour répondre aux objectifs suivants :

- Déterminer les profils électrophorétiques des protéines contenues dans les différentes variétés des fleurs de cardon ;

- Évaluer les degrés de pureté des cardosins extraites tout le long des étapes de purification ;
- Identifier les poids moléculaires des fractions de cardosins.

Les dites techniques consistent à : l'électrophorèse capillaire et l'électrophorèse sur gel polyacrylamide sous conditions dénaturantes (SDS-PAGE) en présence d'un détergeant anionique nommé Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

#### **I.2.4.1. Electrophorèse sur gel polyacrylamide sous conditions dénaturante (SDS-PAGE)**

La séparation des cardosins par électrophorèse en milieu dénaturant en présence de SDS : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) était effectuée suivant la méthode décrite par [Laemmli, \(1970\)](#). Il s'agit d'une technique de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide sous conditions dénaturantes selon leurs poids moléculaire. Ce gel est un réseau avec mailles de tailles variables en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide dont il est constitué. Il se comporte comme un tamis moléculaire. Le SDS, en solubilisant les protéines et en leurs conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction du poids des protéines et de la taille des mailles du gel ([Voet et Voet, 2005](#)).

##### **➤ Préparation des échantillons**

20 à 25 µg de chaque cardosin sont dissoutes dans un tampon dénaturant. Il se compose de Tris-Hcl 100 mM, Urée 8 M, SDS 2%, glycérol 2.5%, β-mercaptoetanol 2% et le bleu de bromophénol à 0,08 %, le tout est ajusté à pH 6,8. Les échantillons sont ensuite chauffés à une température de 100°C pendant 5 minutes afin de pousser la dénaturation.

##### **➤ Dépôt des échantillons**

Les échantillons sont déposés dans des puits formés dans le gel de concentration (4% d'acrylamide-bisacrylamide) après polymérisation. Le gel de séparation est d'une concentration de 15% d'acrylamide-bisacrylamide. Pour pouvoir déterminer les poids moléculaires des protéines contenues dans les différents échantillons, une solution contenant des marqueurs de masses moléculaires est déposée dans le premier puits (All blue precision Bio-Rad, USA). Le gel est ensuite placé dans une cuve d'électrophorèse remplie avec le tampon de migration qui se compose



du tris-Hcl 100 mM, la glycine 100 mM et le SDS 1 %. La solution tampon est ajustée à pH 8,3. La migration s'est produite sous une tension de 100 volts pendant 2 à 3 heures.

➤ **Révélation des protéines**

Après migration, les protéines sont fixées dans une solution dite de fixation (éthanol 15 %, acide acétique 5 % concentration finale). Le gel est ensuite coloré à l'aide d'une solution contenant 40% de l'éthanol, 10 % d'acide acétique et 2,9 mM du bleu de Coomassie R 250. La coloration est réalisée pendant en moins 2h sous agitation. Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs et sous agitation dans la solution de décoloration, qui est la même solution qui a servi à la fixation. La décoloration se poursuit jusqu'à bonne lisibilité des bandes protéiques.

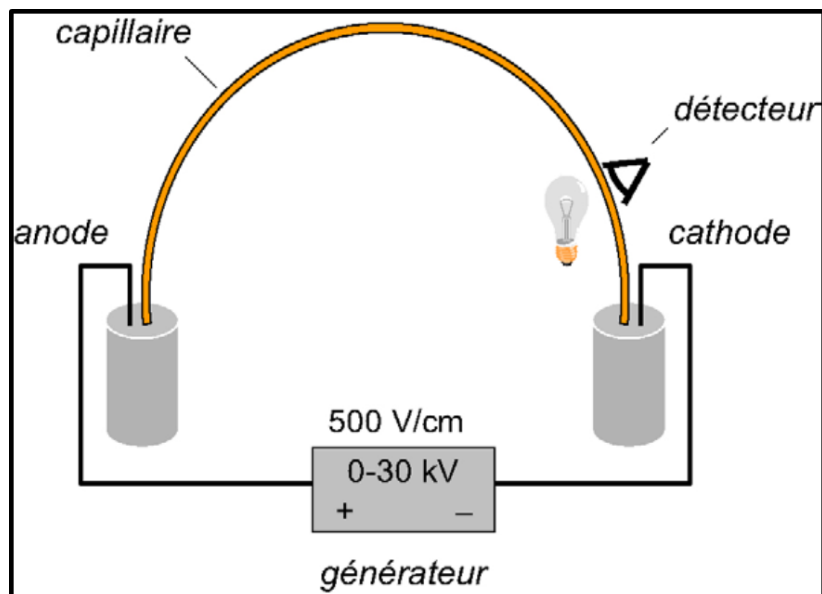
Les gels ont été par la suite, scannés grâce à un système d'imagerie (FX-710 ChemiDoc, Bio-Rad, USA). Leurs études densitométriques et les calculs des poids moléculaires des bandes protéiques ont été réalisés par l'utilisation du logiciel Quantity 1 version 6.0 (Bio-Rad, USA).

**I.2.4.2. Electrophorèse capillaire**

L'électrophorèse capillaire implique la séparation d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique, généralement sur base de leur rapport charge/masse. Dans le cadre particulier de l'analyse protéique, elle présente des avantages par rapport aux méthodes en gel : faible volume d'échantillon, détection en ligne sans étape de coloration, quantification immédiate et possibilité de collecte de fractions ([Cotton et al., 2006](#)).

➤ **Principe de l'électrophorèse capillaire**

Classiquement, l'électrophorèse capillaire est pratiquée dans un tube de silice fondue recouvert d'une couche de polyimide de 20 à 200 cm de longueur pour un diamètre interne de 20 à 200 µm. Le capillaire, enfermé dans un système de thermostatisation, est rempli de tampon et plonge dans deux réservoirs contenant cette même solution. Chaque réservoir est connecté à une électrode reliée à un générateur de courant. L'appareillage comporte de plus un système de détection, le plus souvent un spectrophotomètre UV-visible ou un fluorimètre. La connexion à un spectromètre de masse est également possible ([Figure 20](#)).



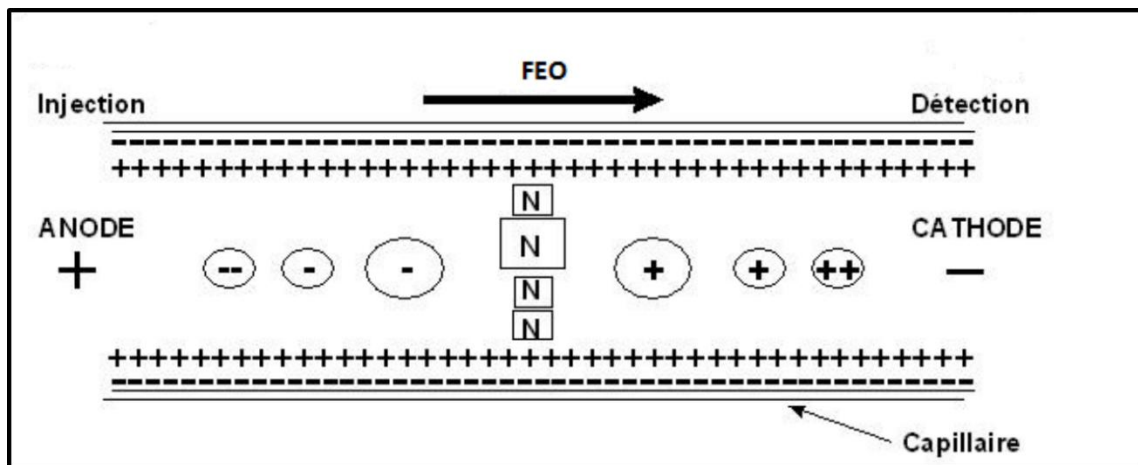
**Figure 20.** Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire (Cotton *et al.*, 2006).

La caractéristique essentielle de l'électrophorèse capillaire vient de l'interface solide-liquide entre la paroi du capillaire en silice et le tampon qui le remplit (Figure 21). En fonction du pH, les groupements silanols de la silice s'ionisent, conférant à la paroi des charges négatives à l'origine du flux électro-osmotique (EOF) orienté vers la cathode. L'EOF prend naissance au niveau des parois du capillaire et génère un profil de migration élution plat (plug flow) (Guerard, 2014).

L'électrophorèse capillaire regroupe de nombreuses techniques présentant des principes et des avantages différents :

- L'électrophorèse capillaire en zone (CZE) classique où les molécules sont séparées en fonction de leur rapport  $Q/r$  ;
- L'électrophorèse capillaire micellaire (MEKC), dans laquelle le tampon de séparation contient un tensioactif à un taux supérieur à sa concentration micellaire critique, constituant ainsi une phase hydrophobe dans un système comparable à la chromatographie en phase inverse ;

- La focalisation isoélectrique en capillaire (cIEF) où des ampholytes sont introduits dans le tampon de manière à créer un gradient de pH et à séparer les molécules selon leur point isoélectrique ;
- L'électrophorèse en gel et en capillaire (CGE) utilisant un polymère linéaire introduit dans le capillaire pour séparer des macromolécules par rapport à leur taille comme en PAGE.

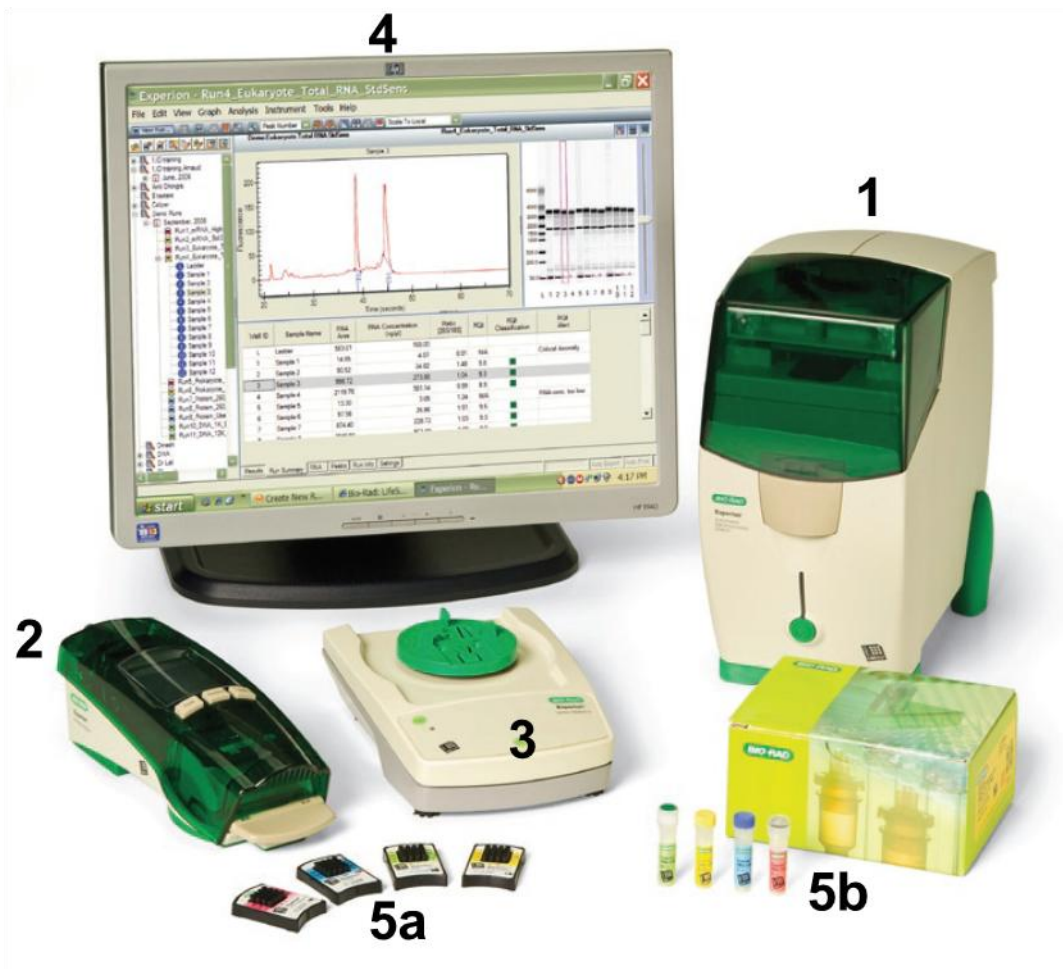


**Figure 21.** Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électro-osmotique (FEO) à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon (Guerard, 2014).

### ➤ Fonctionnement du système *Experion*

Le système automatique *Experion* (Bio-Rad, USA) (Figure 22) utilise une technologie de micro-fluide appelée *LabChip* pour l'automatisation de l'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques (Manuel d'utilisation). C'est une plate-forme qui permet la séparation, la détection et l'analyse des données. Son principal avantage est d'utiliser des quantités d'échantillon et de réactifs largement inférieures à celles des méthodes standards. L'analyse complète sur ce système est effectuée en une seule étape de 30 à 40 minutes.

Dans notre cas, le système *Experion* était utilisé pour quantifier et déterminer les poids moléculaires des cardosins. Ce qui nous a permis d'évaluer leurs degrés de pureté et donc, d'optimiser les protocoles de purification.



**Figure 22.** Présentation du système *Experion* pour l'électrophorèse capillaire. il est constitué de 1: Une station automatique d'électrophorèse; 2: Station de priming; 3: Une station vortex pour les acides nucléiques uniquement; 4: Système de contrôle et d'analyse des données; 5: kit d'analyse qui inclus a: les chips et b: les réactifs pour analyse des protéines (Pro 260 kit) (Manuel de l'équipement).

➤ **Description du protocole et du kit d'analyse utilisé**

Le kit utilisé au cours de cette étude est appelé *Experion pro260* (Figure 22.5), c'est un kit qui permet la séparation et la quantification des protéines ayant des poids moléculaires compris entre 10 et 260 kDa. Le kit inclus l'*Experion pro260 ladder* qui est constitué de 9 protéines recombinées pures et va servir comme marqueur de tailles pour la mesure des poids moléculaires des

échantillons de protéines analysés sur le chip (chaque chip peut séparer jusqu'à 10 échantillons de protéines par analyse).

L'analyse a été menée selon le protocole décrit par le fabricant ([Annexe 1](#)). Brièvement, 4  $\mu\text{L}$  de l'échantillon de cardosin ont été dénaturés par l'ajout de 2  $\mu\text{L}$  de la solution de réduction contenant 3 % de  $\beta$ -mercaptoethanol, le tout incubé pendant 10 min à 95°C puis dilué dans 84  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure. Après le priming du chip contenant le gel et la solution de coloration, les enzymes et le *ladder* ont été déposés dans les puits. Le temps de migration et la concentration de chaque cardosin dans les échantillons ont été standardisés au *ladder* qui sert comme marqueur de tailles. Les électrophorégrammes et les gels virtuels ont été analysés en utilisant le logiciel *Experion softwer* version 3.20 (Bio-Rad, USA).

### **I.2.5. Révélation de la glycosylation des cardosines purifiées**

La détection des glycoprotéines et la mesure des degrés de glycosylations des cardosins ont été évaluées par l'utilisation d'un kit de coloration spécifique (*Glycoprotein Staining Kit G-Biosciences, 786-254, Bio-Rad, USA*). Le principe est basé sur la méthode utilisant le Périodique Acide-Schiff (PAS) qui détecte les glycoprotéines séparées sur gel d'électrophorèse et transférées vers des membranes nitrocellulosiques. D'abord, l'acide périodique réagit avec les groupements cis-1,2-diol et les oxyde en aldéhydes, par la suite, ces aldéhydes vont réagir avec le réactif de Schiff et seront colorés en rose ([Zacharius et al., 1969](#)).

Après une électrophorèse SDS-PAGE réalisée suivant le protocole de [Laemmli, \(1970\)](#) (décrit précédemment dans la section I.2.4.1.), les bandes de cardosins obtenues sont transférées à une membrane poly-vinylidene difluoride (PVDF Bio-Rad, USA) par l'utilisation de l'acide 3-cycloheylamino-1-propanesulfonic (CAPS) comme solution tampon (Sigma, Allemagne). Le transfert s'est réalisé à l'aide du système de transfert (Trans-Blot transfer system, Bio-Rad, USA) pendant 10 min sous un ampérage de 400 mA. Les membranes ont été par la suite colorées pour la détection des glycoprotéines suivant les instructions du fournisseur ([Annexe 2](#)). Pour l'étude des bandes glycoprotéiques les membranes ont été scannés par à un système d'imagerie (FX-710 ChemiDoc, Bio-Rad, USA). Finalement, les mêmes membranes ont été colorées par une autre solution (RAPIDstain™, G-Biosciences, USA) qui est une coloration de Coomassie poussée et donc sert à mettre en évidence les protéines totales.

L'étude quantitative de la glycosylation était réalisée par densitométrie en utilisant le logiciel Quantity 1 version 6.0 (Bio-Rad, USA). Le degré de glycosylation de chaque bande de cardosin est exprimé par le rapport (%) bande glycosylée (densité de la bande après coloration aux glycoprotéines kit) / bande totale (densité de la même bande après coloration au bleu de Coomassie).

### **I.2.6. Approche de séquences d'acide aminés par spectrométrie de masse LC-MS/MS**

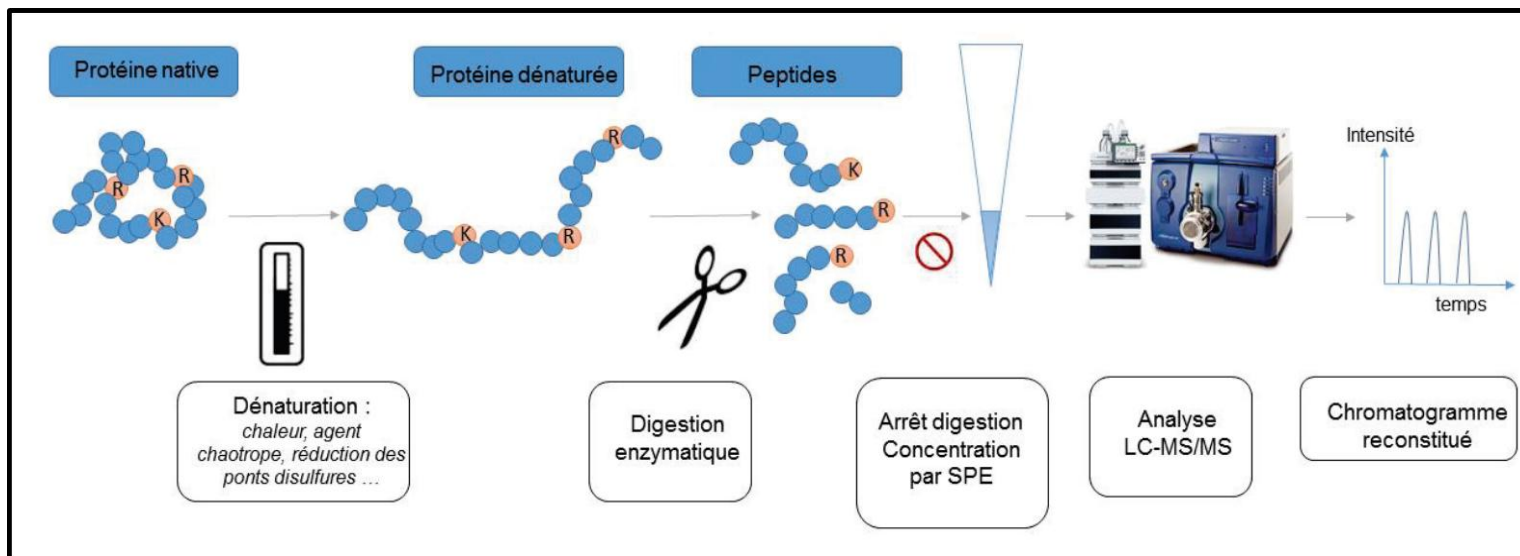
La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique qui a marqué de grandes avancées. Ses performances lui ont permis désormais, d'être une technique de choix largement appliquée dans l'étude des complexes biologiques, notamment, pour l'identification, la validation et/ou la quantification des protéines ([Andrews et al., 2011](#)).

Le principe général de l'identification des protéines par cette technique est décrit sur la [Figure 23](#). Les protéines sont tout d'abord dénaturées et réduites en milieu salin afin de détruire leurs structures secondaire et tertiaire. Cela consiste à les déplier et à rompre leurs ponts disulfures. Une enzyme, généralement la trypsine, est ensuite utilisée pour couper la liaison peptidique en C-terminal de la lysine ou de l'arginine. Généralement le mélange de peptides ainsi généré, est purifié par extraction en phase solide (SPE), concentré, puis séparé par chromatographie liquide avant d'être analysé par spectrométrie de masse ([Rougemont, 2016](#)).

L'étape de digestion enzymatique complexifie l'échantillon. C'est pourquoi, une séparation des peptides en amont de l'analyse est souvent effectuée par chromatographie liquide. Les peptides sont élués et introduits successivement dans le spectromètre de masse, permettant ainsi de réduire l'effet matrice (suppression d'ionisation) ([Stahnke et al., 2012](#)). L'analyse MS est réalisée en continu. En représentant le signal détecté en fonction du temps de rétention, il est possible d'obtenir un chromatogramme reconstitué. La mesure se fait par l'intégration du pic chromatographique proportionnel à la concentration de l'analyte. Les peptides ainsi détectés permettront alors de remonter à la structure primaire de la protéine ainsi qu'à sa concentration dans l'échantillon de départ ([Rougemont, 2016](#)).

Au cours de la présente étude, l'identification par spectrométrie de masse LC-MS/MS des cardosins purifiées, était menée par les Dr. Bruno MANADAS et Dr. Sara ANJO au sein de leur laboratoire : « Laboratoire de spectrométrie de masse » du Centre « *Biocant UC Biotech - Parque Tecnológico*

de Cantanhede » sis à Cantanhede, Portugal. L'analyse est effectuée suivant le protocole mis en place par ce laboratoire :



**Figure 23.** Principe général de la préparation des échantillons pour identification des protéines par LC-MS/MS (Rougemont, 2016).

### I.2.6.1. Préparation des échantillons

Les échantillons d'enzymes ont été quantifiés par l'utilisation du 2-D kit et 5 µg de protéines totales ont été utilisées pour l'identification par l'analyse LC-MS/MS (Anjo *et al.*, 2015). Après dénaturation, les échantillons ont été alkylés par l'acrylamide et soumis à une gel-digestion l'approche *short-GeLC* décrite par Anjo *et al.* (2015). Chaque échantillon est subdivisé en trois différentes fractions. Avant l'analyse par spectrométrie de masse, les peptides formés ont été soumis à une SPE utilisant des embouts OMIX contenant la résine C18 comme phase stationnaire (Agilent Technologies) tel que recommander par le fabricant (Anjo *et al.*, 2017).

### I.2.6.2. Le déroulement de l'analyse LC-MS/MS

Les cardosins pures ont été analysée par un Triple TOF<sup>TM</sup> 5600 System (AB Sciex®) en mode information-dépendance acquisition (IDA). Les Peptides ont été séparés par une chromatographie liquide (nanoLC Ultra 2D, Eksigent®) sur une colonne MicroLC ChromXP<sup>TM</sup> C18CL (300 µm ID × 15cm length, 3 µm particles, 120 Å pore size, Eksigent®) à un débit 5µL/min avec un gradient

multi étapes : 0-1 min 2 % de phase mobile (B) et 1-30 min gradient linéaire de 2 à 30 % de (B). La phase mobile (A) correspond à 0.1 % d'acide formique (FA), et la phase mobile (B) à 0.1 % FA dans de l'acétonitrile (ACN). Les peptides ont été injectés au spectromètre de masse par l'utilisation d'une source d'ionisation (ESI) (electrosprey : DuoSpray™ Source, ABSciex®) ayant un diamètre interne de 50 µm (ID) et l'émetteur est en acier inoxydable (ABSciex®).

Le spectromètre de masse été réglé pour un scan du spectre complet (full spectra à 350-1250 m/z) pour 250 ms, suivi par jusqu'à 80 MS/MS scans (100–1500 m/z d'un temps dynamique d'accumulation. Pour maintenir un temps de cycle de 2.707 s, le précurseur a été mis au minimum 30 ms à une intensité supérieur au seuil de 1000 m/z). Les ions ayant des charges comprises entre +2 et +5 et comptent plus du seuil minimum de 10 comptes par seconde ont été isolé pour fragmentation. Un spectre MS/MS est collecté avant d'ajouter ces ions à la liste d'exclusion pour 15 secondes (le spectromètre de masse opère par Analyst® TF 1.7, ABSciex®). Une dispersion d'énergie de collision de 5 a été utilisée.

### **I.2.6.3. Identification des protéines**

Les protéines ont été identifiés est obtenue par la combinaison des trois fractions de chaque échantillon. La recherche sur les bases de données été effectuée grâce au logiciel ProteinPilot™ (v5.1, ABSciex®), configuré aux paramètres suivants :

- ✓ La recherche effectuée en se référant à la base de données Uniprot pour l'espèce *Cynara cardunculus* (téléchargée en Juillet 2016) ;
- ✓ Modifications fixes : Cystéines alkylée par l'acrylamide ;
- ✓ Digestion type : La trypsine ;
- ✓ Paramètres spéciaux : Les modifications biologiques et les acides aminés de substitutions.

L'identification est considérée positive lorsque les protéines ont plus de deux peptides qui ont atteint un score individuel supérieur à 95% de confiance et avec un score non-utilisé de 1.300 (ce qui veut dire 95% de confiance au niveau de la protéine).



### **I.2.7. Distinction de la spécificité d'action des cardosines**

La chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée, la caséine  $\kappa$  et la caséine totale ont été utilisées comme substrats pour l'étude de la spécificité de l'hydrolyse des cardosins purifiées. Les protocoles suivis pour cette partie du travail sont ceux décrits par [Faro \*et al.\*, \(1992\)](#), légèrement modifiés par [Sarmiento \*et al.\*, \(2004\)](#).

#### **I.2.7.1. Action sur la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée**

La chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée (sigma) a été incubée avec les cardosins purifiées pendant 2h à 37°C. Le formate de sodium (100 mM, pH = 3.0) a été utilisé comme solution tampon. La réaction débute immédiatement après l'ajout de l'enzyme au substrat (rapport enzyme/substrat est de 1/250 p/p). Après 40 minute d'incubation, la réaction est stoppée par l'ajout d'un volume égal de l'acide trifluoroacétique (TFA) à une concentration de 1.2% v/v et le mélange est vigoureusement agité.

L'analyse des produits de l'hydrolyse générés a été menée par une chromatographie phase inverse, sur une colonne C18 (250 x 4.6mm *LiChroCART*<sup>TM</sup> 100 RP-18, 5mm, *Merck*) par l'utilisation d'un système de chromatographie liquide haute pression HPLC (*Shimadzu*, Columbia, MD, USA) équipé d'un détecteur à réseau photodiode. La phase mobile consistait en l'eau acidifiée par 0.1 % de TFA (v/v) et éluée grâce à un gradient d'acétonitrile avec 0.1 % de TFA (v/v) de 0 à 100% (v/v). Le débit était de 0.8 mL/min et la détection s'est faite à 215 nm.

Les chromatogrammes obtenus qui représentent les profils des produits d'hydrolyse ont été analysés par le logiciel *GraphPad Prism 7* (*GraphPad Software*).

#### **I.2.7.2. Action sur la caséine $\kappa$**

Les caséines sont les protéines majoritaires du lait. La stabilité des caséines est assurée grâce à la caséine  $\kappa$ . L'objectif de cette partie du travail est d'étudier l'action des cardosines purifiées sur ce substrat et d'identifier les produits d'hydrolyse générés par chaque fraction d'enzyme.

La caséine  $\kappa$  ( $\kappa$ -CN) a été solubilisée dans une solution tampon de phosphate de sodium (100 mM et pH= 6.2). La réaction est initiée suite à l'ajout de l'enzyme avec un rapport enzyme/substrat à raison de 1/500 (p/p). Le mélange est incubé à 30°C pendant 40 minutes, puis la réaction est stoppée par l'ajout du tampon de dénaturation SDS-PAGE (1:2 v/v) et chauffé à 100°C pendant 10 minutes.

Les produits d'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  ont été analysés par électrophorèse capillaire en utilisant le système automatique *Experion* (Bio-Rad, USA). Les électrophorégrammes et les gels virtuels des produits de l'hydrolyse ont été analysés via le logiciel « *Experion softwer* » version 3.20 (Bio-Rad, USA).

### I.3. Evaluation de l'aptitude des cardosines à la coagulation du lait en fromagerie

#### I.3.1. Mesure de l'activité coagulante

Les activités de coagulantes des extraits enzymatiques bruts des fleurs de cardon et des cardosins purifiées ont été mesurées selon la méthode décrite par la fédération internationale du lait (IDF) [ISO 23058 IDF199](#). Le principe de la méthode se base sur la détermination du temps de floculation qui par définition, consiste à l'intervalle de temps compris entre le moment de l'ajout de la solution enzymatique et la floculation du lait ([Alais, 1984](#)).

Brièvement, 0.5 mL de la solution enzymatique est ajoutée à 25 mL du lait standard préparé par la dissolution à raison de 11% (p/v) d'une poudre de lait écrémé et séché à faible température dans une solution de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (0.01M pH= 6.5). Le mélange est incubé à 32°C sous une faible agitation. Le temps (en secondes) compris entre l'addition de l'enzyme et l'apparition des premiers flocons solides visibles à l'œil nu, est le temps de floculation. Ce temps est comparé à celui obtenu par une présure standard (adult bovin rennet, Chr. Hansen, Denmark) avec une composition chymosine/pepsine de 75 :25 et dont l'activité est préalablement connue et égale à 1000 unités internationales par gramme (IUMC/g). L'activité coagulante totale ( $a_t$ ) exprimée en IUMC par 1 mL de solution enzymatique est calculée par l'application de la formule suivante :

$$a_t = t_{ref} * 0.003 * d * a_{ref} / t_t$$

Avec :  $t_{ref}$  : Comme temps de floculation (en secondes) déterminé pour la présure de référence,  $d$  : Le facteur de dilution de la solution enzymatique testée,  $a_{ref}$  : L'activité de de la présure de référence (1000 IUMC) et  $t_t$  : temps de floculation de la solution enzymatique testée.

**NB :** Etant une formule empirique, la formule ci-dessus n'est juste que si le temps de floculation  $t_f$  est compris entre 5 et 15 minutes. De ce fait, nous avons procédé à des dilutions des solutions de cardosins pour avoir des temps de floculation compris dans cet intervalle.

### **I.3.2. Mesure de l'activité spécifique**

C'est le rapport entre l'activité coagulante totale et la teneur en protéines des solutions enzymatiques et exprimée en IUMC/mg :  $\text{Activité spécifique} = \frac{\text{activité coagulante totale (IUMC)}}{\text{teneur en protéines (mg)}}$ .

### **I.3.3. Mesure de l'activité protéolytique non spécifique**

L'activité protéolytique non spécifique (NSP) de l'extrait brut des fleurs de cardon et des cardosins purifiées est mesurée selon la méthode décrite par l'IDF [ISO 8968-4/IDF 20-4 \(ISO/IDF, 2001\)](#). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par la présure de référence (adult bovin rennet, Chr. Hansen, Denmark). Brièvement, 1 mL de la préparation enzymatique est ajouté à 40 mL du lait standard (préparé comme décrit précédemment). Le mélange est incubé à 32° C et la réaction est stoppée après 2heure par l'ajout de 10 mL de l'acide trichloroacétique (TCA). Le coagulum est par la suite coupé et filtré via papier Whatmann. Le taux d'azote soluble dans le filtrat est par la suite mesuré par la méthode *Kjeldahl* ([Bradstreet, 1954](#)) en utilisant le système de digestion *Tecator* (Foss, Hillerod, Danemark).

### **I.3.4. Mesure des rendements fromagers théoriques et aptitude à l'égouttage**

Les rendements théoriques en fromage et l'aptitude à l'égouttage (ou synérèse) des coagulums obtenus par l'utilisation des cardosines pures et des extraits bruts ont été déterminés. La méthode utilisée est celle décrite par [Remeuf et al., \(1989\)](#) légèrement modifiée par [Gomes et al., \(2019\)](#).

1 mL de l'agent coagulant est ajouté à 20 mL du lait standard (préparé tel que décrit précédemment) stabilisé antérieurement à 32°C. Après une heure de coagulation, les coagulums sont coupés et centrifugés 15 minutes à 3500g. Le volume du lactosérum exsudé est mesuré et les rendements fromagers théoriques ont été calculés sur base fraîche et sèche selon les formules suivantes :

$$\text{Rendement brut (g/100mL)} = (\text{poids du coagulum obtenu (g)} \times 100) / \text{Volume (mL) initial du lait utilisé}$$

$$\text{Rendement sur base sèche (g MS/100mL)} = (\text{Rendement brut} \times \text{matière sèche du coagulum} \times 100) / \text{Volume (mL) initial du lait utilisé}$$

L'humidité des coagulums est déterminée par la méthode [ISO 5534/IDF 4 \(ISO/IDF, 2004\)](#). Les résultats sont comparés à ceux obtenus sous les mêmes conditions par la présure animale de référence (*Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark*).

### **I.3.5. Appréciation à l'Optigraph de la coagulation du lait par les cardosines**

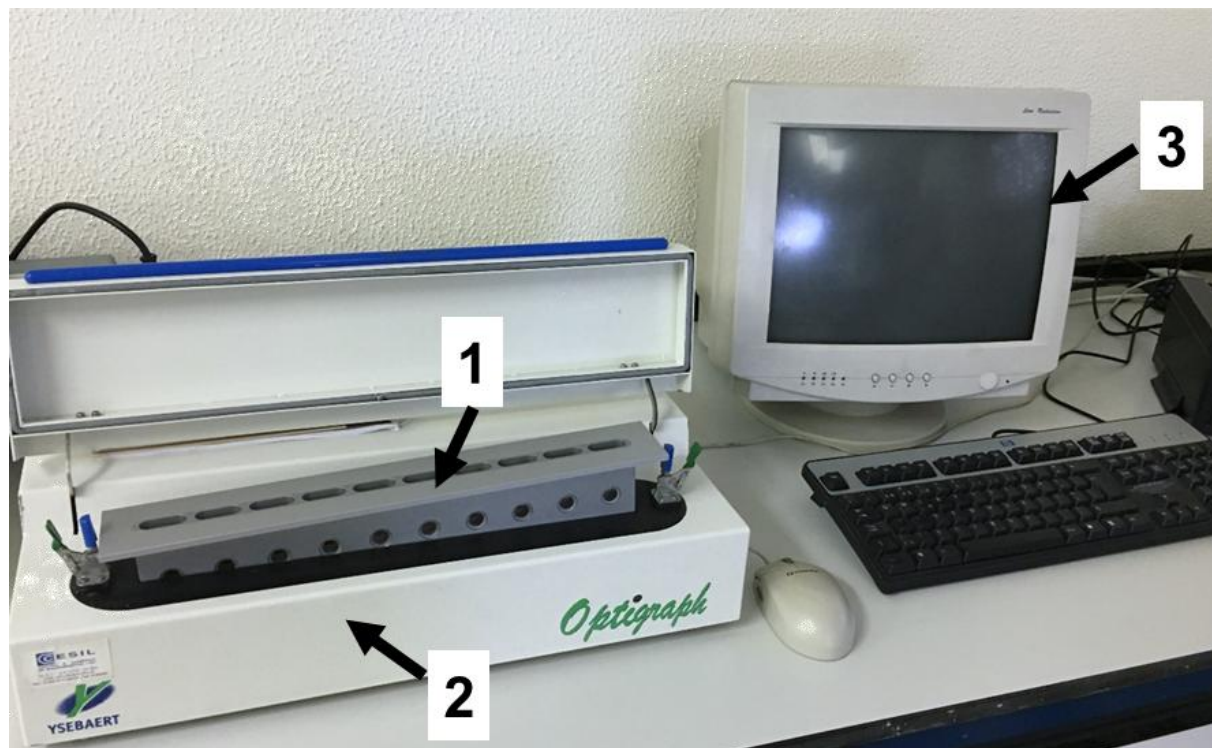
Les propriétés de coagulation des laits sont d'une importance pour l'industrie des fromages. Elles influent considérablement sur les rendements et la qualité des fromages ([Kubarsepp et al., 2005](#)). Nombreuses sont les recherches menées les propriétés coagulantes des laits ([Okigbo et al., 1985](#) ; [Jakob et Puhan, 1992](#) ; [Macheboeuf et al., 1993](#) ; [Lodes et al., 1996](#) ; [Ostersen et al., 1997](#) ; [Ojala et al., 2005](#)) et les méthodes utilisées pour leur étude sont basées sur les changements physicochimiques qui se produisent durant le procédé de coagulation enzymatique du lait.

Lors de cette partie de travail, l'aptitude à la coagulation du lait standard (préparé comme décrit précédemment) a été étudiée et les propriétés coagulantes et rhéologiques ont été mesurées en utilisant un équipement nommé « Optigraph ».

#### **I.3.5.1. Présentation et principe de l'appareil**

L'Optigraph est le seul appareil sur le marché développé spécifiquement pour contrôler l'aptitude des laits à coaguler. Il a été développé par Alliance Instruments (Frepillon, France) en partenariat avec l'INRA, qui recherchait un nouveau type d'analyseur pour remplacer l'ancienne technologie du Formagraph. Basé sur la technologie proche infrarouge, et entièrement géré par informatique, il rend beaucoup plus simple et facile ce type de contrôle. Très utilisé par les industries de transformation du lait, tant en Recherche-Développement qu'en process ou en contrôle qualité, l'Optigraph permet de mieux maîtriser son process (standardisation, qualité des laits, propriétés coagulantes des enzymes...etc.). Il s'agit d'un système simple et entièrement automatisé, dédié au contrôle simultané de la coagulation de 10 échantillons de lait ([Figure 24](#)). Basé sur la mesure de

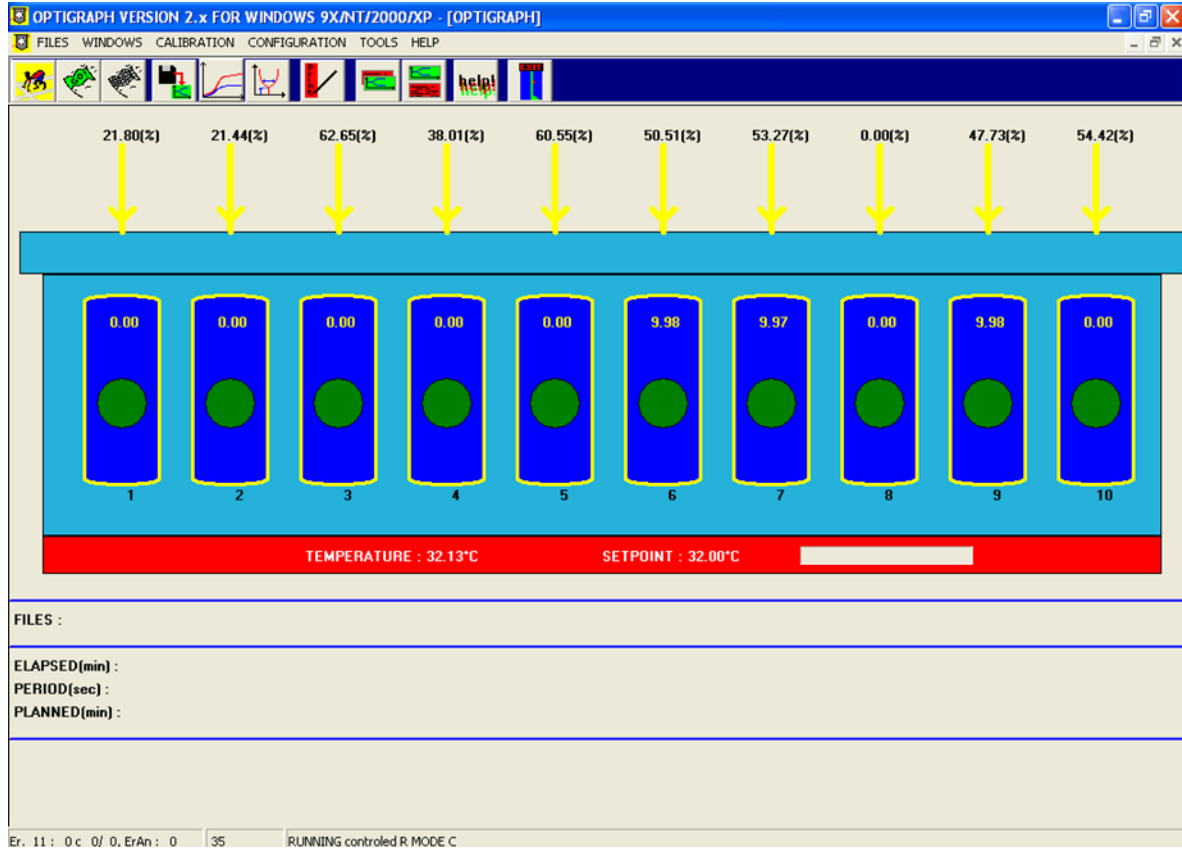
l'atténuation d'un signal proche infrarouge. Au cours du test de coagulation, le signal lumineux émis et traversant le lait s'affaiblit progressivement suite aux changements dans la structure des micelles de caséine. L'Optigraph calcule en temps réel et sans destruction de l'échantillon, tous les paramètres nécessaires au process de coagulation de lait : temps de prise, évolution de la fermeté et la vitesse de raffermissement (Manuel d'utilisation de l'Optigraph).



**Figure 24.** Equipement Optigraph Conçu pour l'étude de la coagulation du lait. 1 : Cuvettes ; 2 : Spectrophotomètre fonctionnant avec une technologie proche infra-rouge (NIR) ; 3 : Unité de contrôle de l'équipement.

### I.3.5.2. Déroulement des essais de coagulation et définitions des paramètres étudiés

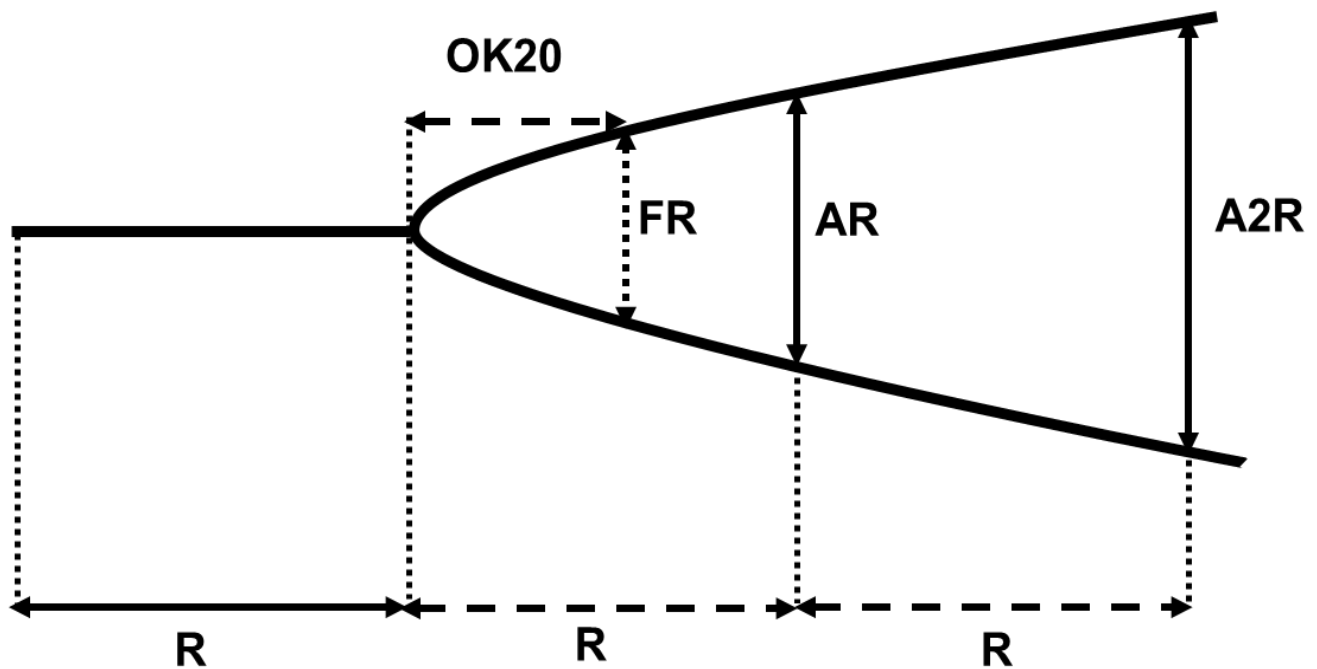
Chacune des 10 cuvettes de l'équipement (Figure 25) est remplie avec 10 mL de lait, préalablement stabilisé à 32°C (pendent 2 heures) et ajusté à un pH de 6.6. 1 mL de la préparation enzymatique est ensuite ajouté à chaque cuvette.



**Figure 25.** Logiciel de contrôle de l'équipement Optigraph : schéma des 10 cuvettes composant l'équipement.

Les tests de coagulation ont été menés à 32°C, le signal émis été réglé à 7 Volt et la lecture des résultats s'est faite à un log phase égale à 2 minutes. Les paramètres de coagulations déterminés (Figure 26) sont : le paramètre **R** : qui correspond temps de floculation en secondes nécessaire pour la déstabilisation de 87% de la caséine kappa ; le paramètre **AR** : il correspond à la texture (fermeté) du coagulum à un temps égal à 2 fois R ; le paramètre **A2R** : représente la fermeté du coagulum après à un temps égal à 3 fois R ; les paramètres **A20** et **A40** : ils correspondent respectivement à la fermeté du coagulum après 20 et 40 minutes de réaction ; le paramètre **OK20** : dit vitesse de raffermissement ou vitesse d'agrégation des caséines, il correspond au temps en seconde nécessaire

pour atteindre une fermeté référence (Fixée à 2.5 volt). Les cinétiques de l'évolution de la texture des coagulums en fonction du temps ont été tracées.



**Figure 26.** Paramètres technologiques étudiés par l'Optigraph. **R**: Temps de floculation ; **AR** : La texture (fermeté) du coagulum au temps égal à 2 fois **R** ; le paramètre **A2R** : représente la fermeté du coagulum après à un temps égal à 3 fois **R** ; **A20** et **A40** : ils correspondent respectivement à la fermeté du coagulum après 20 et 40 minutes de réaction ; le paramètre **OK20** : dit vitesse de raffermissement ou vitesse d'agrégation des caséines, il correspond au temps en seconde nécessaire pour atteindre une fermeté référence (**FR**) (égale 2.5 volt).

### I.3.6. Approche des interactions impliquées dans la formation des gels

La méthode utilisée est celle proposée par [Lefebvre-cases et al., \(1998\)](#) et [Benyahia-krid et al., \(2010\)](#). Le principe est basé sur la destruction par des agents dissociant, des interactions impliquées dans la formation et le maintien des structures des coagulums de lait obtenus. Les agents chimiques utilisés sont : le Sodium dodecyl sulfate (SDS), l'urée, et l'acide éthyle diamine tétra acétique (EDTA). L'urée établit des liaisons hydrogènes fortes avec les liaisons peptidiques et dénature la protéine en rompant les liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les détergents ioniques tels que le SDS sont incapables de détruire les liaisons hydrogènes des peptides qui stabilisent la structure

secondaire des protéines. Cependant le SDS réagit avec les groupes chargés des chaînes latérales des protéines provoquant des répulsions électrostatiques intramoléculaires conduisant à une destruction compétitive des interactions hydrophobes. L'EDTA est utilisé comme agent chélateur du calcium et permet de situer l'importance des liaisons calciques.

Le lait destiné à l'approche des interactions est maintenu à 30°C pendant 2 heures pour qu'un équilibre s'établisse, puis, 1 mL de la solution enzymatique est additionné. Après 30 minutes de coagulation, la solution de l'agent dissociant est ajoutée au coagulum formé à raison de 1/5 (v/v) (4 ml de coagulum dans 16 ml de l'agent dissociant). Pour l'échantillon témoin, le coagulum est mis dans de l'eau distillée. L'échantillon est ensuite homogénéisé rapidement à l'aide d'un Polytron pendant 30 secondes à 20000 t/min. ensuite une centrifugation des dispersions de gel obtenues à 14000g pendant 90 min. Les concentrations des agents dissociant utilisés sont regroupées dans le [tableau 5](#).

**Tableau 5.** Concentration des agents chimiques dissociant utilisés.

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

Le surnageant est délicatement récupéré et stocké à 4 °C jusqu'à analyse. L'estimation des protéines libérées dans le surnageant est déterminée par dosage selon la méthode de [Lowry, \(1951\)](#).

#### **I.4. Application des fleurs de cardon en fromagerie : Utilisation des fleurs de cardon dans la fabrication du fromage type « Serra da Estrela »**

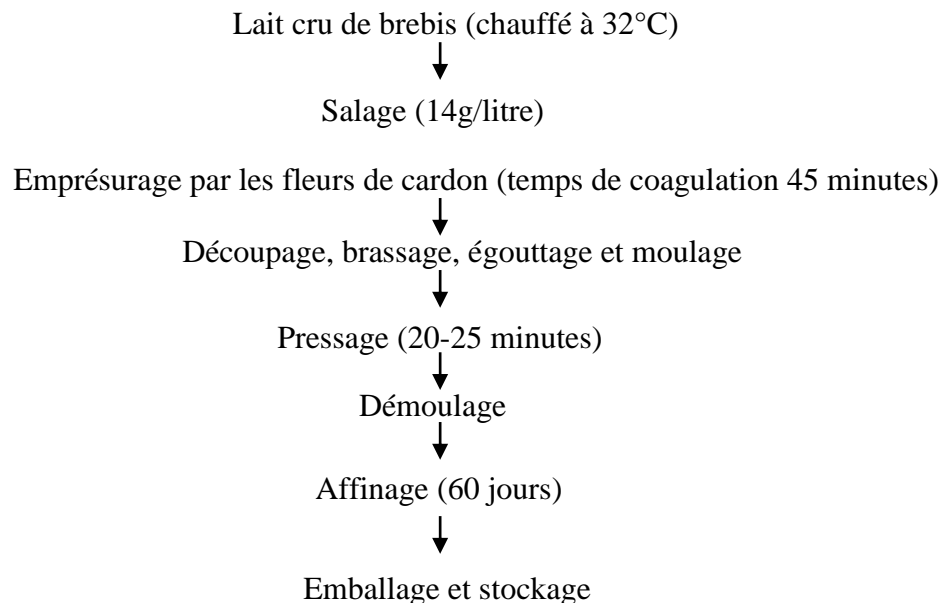
Le fromage *Serra da Estrela* est un fromage traditionnel portugais qui bénéficiant d'une appellation d'origine protégée (D.O.P.). C'est un fromage fabriqué en utilisant le lait de brebis (lait issu exclusivement des brebis de la région *Serra da Estrela*), les fleurs de cardon comme agent de coagulation et le sel ([Fogeiro et al., 2020](#)). Il est caractérisé principalement, par son arôme fort, sa pâte de texture semi-solide et son goût légèrement amer ([Tavaria et al., 2003](#)). Les propriétés finales de ce type de fromage dépendent de plusieurs facteurs incluant les caractéristiques des



ingrédients utilisés et le déroulement du procédé de fabrication (Fogeiro *et al.*, 2020). Les fleurs de cardon, de par leurs profils biochimiques variés et par conséquent, leurs processus de protéolyse différents, sont considérées comme un de ces facteurs influents (Barracosa *et al.*, 2018). Lors de cette partie du travail, des fleurs issues de la variété algérienne (ALG 1) ont été utilisées pour mener des essais de fabrication de ce type du fromage. Les caractéristiques physico-chimiques, la couleur et la texture du fromage obtenu sont par la suite, évaluées et comparées à celles du fromage D.O.P. fabriqué dans les mêmes conditions et commercialisé par la fromagerie.

#### I.4.1.1. Conditions de fabrication artisanale du fromage

Les essais se sont déroulés au sein de la ferme *Casa da Insua* sise dans la région nommée *Penalva do Castelo* au Portugal selon leur diagramme de fabrication adopté (Figure 27). A deux bacs de 30 litres de lait chacun, sont ajoutés les extraits préparés préalablement par broyage des fleurs dans de l'eau. Les concentrations sont de 0.4 g de fleurs sèches/litre de lait dans le cas des fleurs utilisées par la fromagerie, et à raison et de 0.2 g par litre dans le cas des fleurs de la variété algérienne ALG1. Après une durée d'affinage de 60 jours, 3 pièces de fromage ( $\pm 0.5$ kg chacune) de chaque bac sont utilisées pour analyses.



**Figure 27.** Diagramme de fabrication du fromage type *Serra da Estrela*.

#### **I.4.1.2. Appréciation des fromages obtenus**

La composition physico-chimique des fromages expérimental et témoin a été déterminée par la mesure des taux de matière grasse ([méthode de Gerber ISO : 3433-2002](#)), des teneurs en protéines ([méthode de Kjeldahl](#)) et de l'extrait sec total ([AFNOR 1986](#)).

Dans le but d'identifier les éventuels changements des caractéristiques organoleptiques du fromage (couleur et texture) dues au remplacement des fleurs de cardon habituellement utilisées au niveau de la ferme par nos fleurs algériennes de cardon spontané, nous avons procédé au test sensoriel appelé : test descriptif tel que décrit par [Felix et Strigler \(1998\)](#). La couleur des fromages sur les deux niveaux : la croûte et la pâte intérieure ainsi que les attributs sensoriels décrivant la texture : la dureté, l'adhésivité, l'élasticité et la cohésion ont été évalués par un panel de dégustateurs.

Les échantillons sont présentés dans des contenants identiques, codés avec un numéro aléatoire à 3 chiffres. Chaque échantillon a un numéro distinct, et sur une fiche conçue pour ce dit test descriptif ([Annexe n°3](#)) chaque dégustateur note l'intensité perçue des attributs sensoriels de chaque échantillon sur une échelle d'intervalles allant d'une faible intensité à une forte intensité (de 1 à 9). Les notes de chaque échantillon sont présentées sous forme de tableau et analysées au moyen de l'analyse de variance (ANOVA) afin de déterminer s'il y a des différences significatives entre les échantillons au seuil de signification de 5%.

#### **I.5. Essais de conservation des fleurs de cardon par séchage**

Traditionnellement, les fleurs de cardon sont récoltées et conservées par séchage à l'air libre. Elles ne subissent aucun autre traitement spécifique et les conditions de la récolte et/ou du séchage ne sont pas standardisées ([Tajeda et al., 2008](#)). Ceci peut affecter considérablement la qualité hygiénique des extraits coagulants et réduire leur activité, ce qui se traduit souvent, par des défauts dans la qualité des fromages y fabriqués avec. C'est un inconvénient majeur qui limite l'utilisation des fleurs de cardon en industrie fromagère. Ainsi, l'étude des procédés de conservation afin de déterminer les bonnes pratiques à suivre pour garantir la meilleure préservation possible des fleurs cardon, a fait l'objet de certains travaux de recherches ([Martins et al, 1996](#) ; [Tajeda et al., 2008](#)). Dans son travail [Martins, \(1999\)](#) rapporte que le procédé de séchage des fleurs permet de réduire significativement les risques de leur contamination mais en parallèle, des pertes d'activité coagulante en été observées.

Le présent chapitre est un travail effectué dans le cadre du projet *iCheese* (PDR2020-101-031002) financé par *Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 (PDR2020)* sous Portugal 2020 et à travers *Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural (FEADER)*. L'objectif de cette partie de travail, est d'optimiser l'opération du séchage des fleurs de cardon. Nous avons varié les températures de séchage et étudié par la suite les effets sur les profils enzymatiques des fleurs et sur leurs aptitudes technologiques.

Les essais ont été menés sur une variété portugaise *C.cardunculus var atililis* cultivée dans un champ expérimental appelé ESAV sis à Viseu, région nord du Portugal.

### **I.5.1. Type du sécheur et conditions du séchage**

Le séchage des fleurs de cardon a été mené par Dr. Maria Poças et Dr. Cristina Mena au sein de leur laboratoire. Un sécheur industriel ([Figure 27](#)) était utilisé pour conduire l'opération du séchage. C'est un sécheur à plateau qui permet la diffusion de l'air d'une façon homogène à travers l'échantillon. Pour chaque essai 400 grammes de fleurs fraîches ont été étalées sur les plateaux du sécheur. La vitesse et l'humidité relative de l'air ont été fixées et nous avons varié les températures du séchage. Les températures étudiées sont 40, 45, 50, 55 et 60° C. La perte du poids a été suivie grâce à des pesées périodiques (chaque 2 heures) et l'opération du séchage est considérée achevée au moment où le poids des fleurs se stabilise. Une fois séchées, les fleurs sont par la suite mises dans des sacs hermétiques imperméables à l'humidité et l'oxygène jusqu'au moment de l'analyse.



**Figure 28.** Sécheur *TRY DRIER UOP8* (*Armfield Limited*, Hampshire Angleterre), Equipement utilisé pour le séchage des fleurs de carbon.

### I.5.2. Effet du séchage sur les profils enzymatiques des fleurs

Les variations qualitatives et quantitatives des profils enzymatiques des fleurs de cardon engendrées par les différentes températures de séchage ont été étudiées. Des extraits bruts ont été obtenus à partir de 1g de chaque échantillon de fleurs séchées (selon le protocole décrit précédemment). 8 mL de chacun de ces extraits sont par la suite injectés à une colonne de chromatographie liquide (*Superdex<sup>TM</sup> G75 26/10 prep grade* de chez *GE Healthcare Bio-sciences AB*, Suède) pour purification d'exclusion moléculaire. La fraction active obtenue est à son tour soumise à une seconde chromatographie d'échange d'ions sur la colonne *Q-Sépharose HP 16/10* (de chez *GE Healthcare Bio-sciences AB*, Suède) suivant le même protocole décrit précédemment en section I.2.2. Les profils obtenus sont analysés quantitativement et qualitativement par le logiciel *UNICORN* (version 5.1.) et comparés à celui obtenu à partir des fleurs fraîches.

### I.5.3. Effet du séchage sur les caractéristiques technologiques des fleurs

Le principal objectif de l'étude des conditions de conservation des fleurs de cardon est d'évaluer les variations induites par le procédé de séchage sur l'aptitude technologique des fleurs et de leurs extraits coagulants. Les caractéristiques technologiques des lots de fleurs séchées à différentes températures (40, 45, 50, 55 et 60°C) ont été comparées à celles des fleurs fraîches. La préparation des extraits s'est faite tel que décrit précédemment en section I.2.1. et les paramètres mesurés sont :

- ✓ L'activité coagulante selon le protocole [ISO 23058 IDF199](#)
- ✓ L'activité protéolytique selon le protocole [ISO 8968-4/IDF 20-4 \(ISO/IDF, 2001\)](#).
- ✓ Les rendements fromagers théoriques selon le protocole décrit par [Gomes et al., \(2019\)](#).
- ✓ Les paramètres R, AR, A2R, A20, A40 et OK20 mesurés par l'*Optigraph* selon le même protocole décrit dans la section I.3.5.

### I.6. Analyse statistique des résultats

Toutes les expérimentations ont été procédées au minimum trois fois. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne  $\pm$  écartype. L'analyse de la variance ANOVA à un seul facteur est réalisée au seuil de signification 5% et par l'utilisation du logiciel *GraphPad Prism 7 (GraphPad Software)*. Le pack *Statistica® package* été utilisé pour effectuer l'analyse en composante principale (ACP) et le test de classification hiérarchique (HCA).

***Chapitre II :***  
***Résultats et discussion***

## II.1. Caractéristiques des protéases des fleurs de cardon

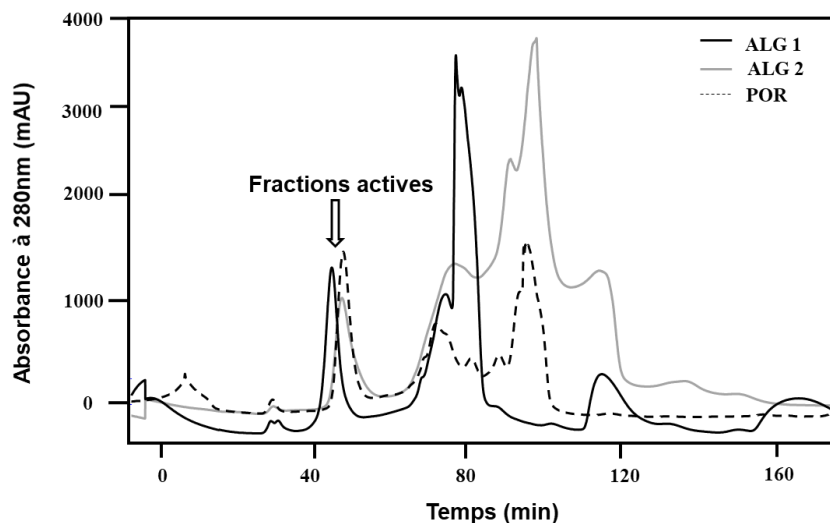
### II.1.1. Types de cardosines révélées

Les préparations coagulantes à partir des fleurs de cardon sont traditionnellement obtenues par macération dans l'eau ou par un broyage grossier dans des solutions salines. Communément, les extraits obtenus suite à cette procédure avaient des pH avoisinant les 5.5. Ce qu'a fait que ce pH soit initialement utilisé pour extraire les cardosines à partir des fleurs fraîches (Verissimo *et al.*, 1996). Cependant, après un travail d'optimisation (Sarmiento *et al.*, 2009) il a été prouvé que les extraits obtenus à pH 3.0 présentent de meilleures activités protéolytiques. De plus, l'extraction à des faibles pH élimine une grande part d'impuretés et engendre par conséquent, des extraits enzymatiques moins contaminés.

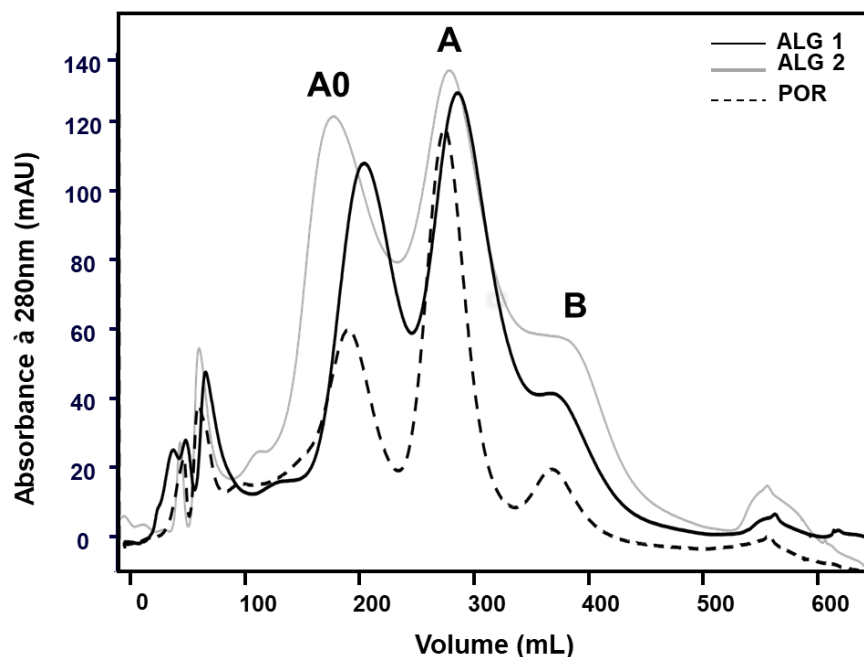
Dans cette étude, nous avons procédé à une extraction acide des cardosines suivie par une étape de purification. A partir des fleurs de chacune des variétés étudiées (ALG1, ALG2 et POR), nous avons pu purifier trois cardosines : A<sub>0</sub>, A et B. Pour cette partie d'étude, nous nous sommes basés sur le protocole établi par Sarmiento *et al.* (2009) en procédant à trois étapes chromatographiques successives.

D'abord, les extraits bruts ont été injectés dans un système FPLC (*Akta Pharmacia*) pour une chromatographie d'exclusion moléculaire sur une colonne *Superdex*. Pour les trois échantillons des fleurs, le totale de l'activité protéolytique était récupéré en un seul pic (Figure 29), cependant, les temps d'éluions diffèrent. En effet, la fraction intermédiaire active de la variété ALG1 (ALG1 M.Excl) a été récupérée après 43 minutes quant à celles de ALG2 (ALG2 M.Excl) et POR (POR M.Excl) ont été éluées après 48 minutes. Les pics élués après la fraction active étaient de couleur jaunâtre et ne présentaient aucune activité protéolytique.

Les trois fractions intermédiaires à leur tour, étaient sujettes à une deuxième chromatographie d'échange d'ions en les injectant sur une colonne Q-Sepharose Fast Flow (QFF). Ainsi, de chaque fraction trois pics actifs ont été obtenus : les cardosines : A<sub>0</sub>, A et B (Figure 30). Les cardosines A<sub>0</sub> (ALG1 A<sub>0</sub>, ALG2 A<sub>0</sub> et POR A<sub>0</sub>) ont été élués à un gradient de sel NaCl compris entre 0.27 et 0.3M, les cardosines A (ALG1 A, ALG2 A et POR A) à un gradient de 0.34 à 0.38M et les cardosines B (ALG1 B, ALG2 B and POR B) étaient éluées entre 0.4 et 0.46 M de NaCl.



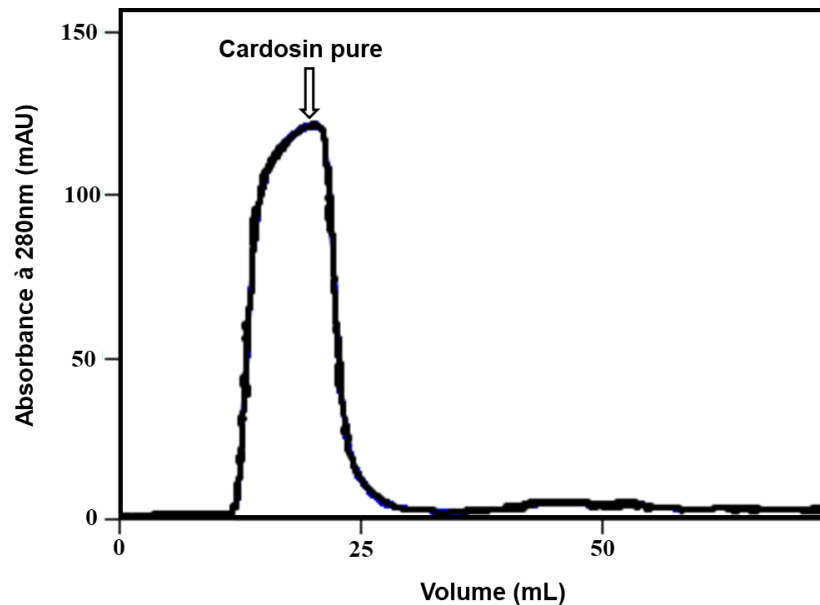
**Figure 29.** Chromatogrammes obtenus après chromatographie d'exclusion moléculaire des extraits brut obtenus à partir des fleurs de cardon étudiées. ALG1: fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2: fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atilis* ; POR: fleurs du cardon référence.



**Figure 30.** Profils en cardosines obtenus après chromatographie d'échange d'ions sur colonne QFF. Les pics de cardosines sont obtenus à partir des fractions actives préalablement séparés par chromatographie d'exclusion moléculaire. La colonne utilisée est la QFF XK 26. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atilis* ; POR : fleurs du cardon référence. Les cardosines A<sub>0</sub> ont été élués à un gradient de sel NaCl compris entre 0.27 et 0.3M, les cardosines A à un gradient de 0.34 à 0.38M et les cardosines B étaient éluées entre 0.4 et 0.46 M.



Finale­ment, pour éliminer les sels (NaCl et Tris) des enzymes purifiées, nous avons procédé à une chromatographie d'exclusion moléculaire. L'utilisation de la colonne *Desalting* nous a permis de séparer les protéines des sels. Comme montré sur la [Figure 31](#), grâce aux différences des poids moléculaires, les cardosines n'interagissent pas avec la résine (une G25) or que le sel est retenu sur la colonne.



**Figure 31.** Chromatogramme type d'une cardosine pure après dessalage. Les cardosines obtenues après chromatographie d'échange d'ions ont été injectées dans une colonne d'exclusion moléculaire (*HiPrep 26/16 Desalting*) pour éliminer le sel. L'élution été faite utilisant l'eau ultrapure sous un débit de 10 mL/min et à température ambiante.

L'étude quantitative des fractions protéiques récupérées est présentée sur le [tableau n°6](#) Nous pouvons constater que :

- Comparé aux variétés algériennes, l'extrait brut obtenu à partir de la variété portugaise présente le taux de protéines totales le plus élevé (29.4 mg/g de fleurs base sèche) ;
- Le taux de la fraction active (représentant le taux cardosines/protéines totales) obtenue après la première chromatographie de la variété POR (42.12%) est nettement inférieur à ceux de ALG1 et ALG2 70.57% et 62.15% respectivement. Ceci est peut-être dû à la dégradation des cardosines suite à la longue période de conservation des fleurs (les fleurs étaient récoltées et conservées depuis Juin 2001) ;

- La cardosine A est la fraction dominante pour toutes les variétés étudiées avec (38.5%, 30.7% et 31.4% des protéines totales pour ALG1, ALG2 et POR, respectivement) ;
- La cardosine B est la fraction la moins abondante (4.87%, 4.82% et 3.12% des protéines totales pour respectivement, ALG1, ALG2 et POR) ;
- La cardosine A<sub>0</sub> est plus abondante dans les variétés algériennes (ALG1 et ALG2 avec des taux de : 23.88% et 17.54% respectivement) comparées à celle du Portugal (POR) (seulement 7.16% des protéines totales).

**Tableau 6.** Profils quantitatifs des cardosines purifiées à partir des fleurs de cardon (/1g base sèche). ALG1 : fleurs du cardon spontané algérien *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé algérien *C. cardunculus* L. var. *altilis* ; POR : fleurs références ; IUMC : unité coagulante internationale ; ET : écart type ; NNP : azote non protéique, Nt : Azote total. <sup>a,b,c</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres minuscules, indiquent des différences significatives entre les groupes d'enzymes dans la même variété ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres majuscules, indiquent des différences significatives entre les variétés pour le même groupe d'enzyme ( $p < 0.05$ ).

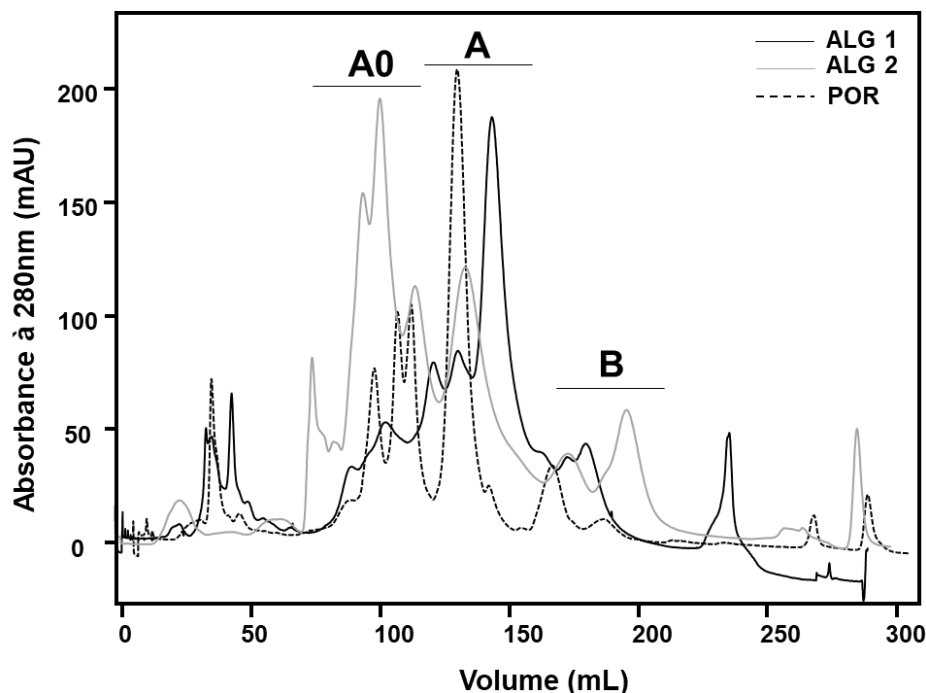
	Concentration des protéines (mg/g ± ET)	Taux de récupération des protéines (%)	Activité coagulante (IUMC ± ET)	Activité protéolytique non spécifique (g NNP/100g Nt)	Activité spécifique (IUMC/mg)
<b>ALG1 Extrait brut</b>	26.1 ± 0.8 <sup>a,B</sup>	100.0	67.8 ± 0.1 <sup>cd,A</sup>	6.1 ± 0.2 <sup>a,A</sup>	2.6
<b>ALG1 Exclusion mol</b>	18.4 ± 0.4 <sup>b,A</sup>	70.6	329.8 ± 1.19 <sup>a,A</sup>	3.4 ± 0.1 <sup>b,A</sup>	17.9
<b>ALG1 Cardosine A<sub>0</sub></b>	6.2 ± 0.0 <sup>d,A</sup>	23.9	83.4 ± 1.1 <sup>c,A</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>d,AB</sup>	13.4
<b>ALG1 Cardosine A</b>	10.0 ± 0.0 <sup>c,A</sup>	38.5	228.9 ± 1.4 <sup>b,A</sup>	2.1 ± 0.5 <sup>bc,A</sup>	22.7
<b>ALG1 Cardosine B</b>	1.3 ± 0.1 <sup>e,A</sup>	4.9	41.2 ± 0.5 <sup>d,A</sup>	3.2 ± 0.7 <sup>b,A</sup>	33.0
<b>ALG2 Extrait brut</b>	21.3 ± 0.4 <sup>a,C</sup>	100.0	62.3 ± 0.9 <sup>c,A</sup>	5.8 ± 0.5 <sup>a,A</sup>	2.9
<b>ALG2 Exclusion mol</b>	13.2 ± 0.3 <sup>b,B</sup>	62.1	228.9 ± 2.0 <sup>a,B</sup>	3.6 ± 0.0 <sup>b,A</sup>	17.3
<b>ALG2 Cardosine A<sub>0</sub></b>	3.7 ± 0.1 <sup>d,BC</sup>	17.5	51.2 ± 1.8 <sup>c,B</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>c,A</sup>	13.8
<b>ALG2 Cardosine A</b>	6.5 ± 0.1 <sup>c,B</sup>	30.7	115.6 ± 0.7 <sup>b,B</sup>	2.3 ± 0.4 <sup>c,A</sup>	17.7
<b>ALG2 Cardosine B</b>	1.0 ± 0.1 <sup>e,A</sup>	4.8	25.6 ± 0.7 <sup>d,B</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>d,B</sup>	25.1
<b>POR Extrait brut</b>	29.4 ± 1.8 <sup>a,A</sup>	100.0	36.7 ± 0.9 <sup>c,B</sup>	3.4 ± 0.6 <sup>a,B</sup>	1.2
<b>POR Exclusion mol</b>	12.4 ± 0.2 <sup>b,B</sup>	42.1	133.4 ± 0.1 <sup>b,C</sup>	3.7 ± 0.7 <sup>a,A</sup>	10.8
<b>POR Cardosine A<sub>0</sub></b>	2.1 ± 0.1 <sup>d,C</sup>	7.2	51.5 ± 0.2 <sup>c,B</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>c,B</sup>	24.4
<b>POR Cardosine A</b>	9.2 ± 0.1 <sup>c,A</sup>	31.4	210.4 ± 0.4 <sup>a,A</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>b,A</sup>	22.8
<b>POR Cardosine B</b>	0.9 ± 0.0 <sup>e,A</sup>	3.1	36.6 ± 0.4 <sup>c,AB</sup>	3.2 ± 0.8 <sup>a,A</sup>	39.2

Ces résultats sont plus ou moins en concordance avec ceux obtenus précédemment par certains auteurs. [Verissimo et al., \(1996\)](#) ont obtenu un taux de récupération des protéines dans la fraction intermédiaire active égal à 72%. Dans ce même travail, trois différentes fractions ont été récupérées, cependant, une d'entre elles n'était pas active (probablement la cardosine A<sub>0</sub>). Les deux autres fractions sont les cardosines A et B. [Heimgartner et al., \(1990\)](#) ont aussi réussi à purifier trois protéases à partir des fleurs de cardon qu'ils ont appelées cynarase 1, 2 et 3. Les auteurs ont rapporté que les trois enzymes présentaient une activité de coagulation de lait. Dans une étude plus récente [Sarmiento et al., \(2009\)](#), la même procédure de purification des cardosines a été suivie et les mêmes fractions ont été récupérées. Dans ce dit travail, les auteurs ont soumis la fraction de cardosine A<sub>0</sub> seule à une troisième chromatographie d'échange d'ions et ont réussi à séparer 4 autres cardosines qu'ils ont nommées : cardosines E, F, G et H.

Dans ce présent travail, une deuxième procédure était mise en place et ayant comme objectif d'étudier la biodiversité entre les fleurs des trois variétés en matière de cardosines exprimées. En effet, l'injection des fractions actives intermédiaires (M. Excl) sur la colonne *Q-Sepharose High Precision* (QHP) (en remplacement à la colonne QFF), accompagnée d'une optimisation du gradient de sel appliqué, nous a permis d'observer avec une meilleure résolution les profils en cardosines ([Figure 32](#)). Les chromatogrammes obtenus montrent que les trois échantillons de fleurs expriment une large diversité en matière de cardosines. Effectivement, des différences qualitatives et quantitatives du contenu en cardosines ont été constatées entre les trois échantillons des fleurs [tableau n°7](#). Ces différences résident principalement, dans le contenu en les fractions des cardosines A<sub>0</sub> et cardosine B.

La biodiversité des cardosines contenus dans les fleurs issues de différentes variétés de cardon ont fait l'objet de certaines études. Dans leur travail, [Barracosa et al., \(2018\)](#) ont souligné une large diversité des profils biochimiques de cardosines purifiées à partir de six cultivars de fleurs de différentes régions du Portugal. Les auteurs ont conclu que ces différences influent significativement sur principalement, les caractéristiques sensorielles des fromages fabriqués avec ces échantillons de fleurs. A leur part, [Ben Amira et al. \(2017\)](#) ont suivi une approche protéomique pour identifier les protéases des fleurs de cardon spontané originaire de Tunisie. Les auteurs ont constaté l'absence des cardosines F et B dans ces échantillons de fleurs. Selon [Ordiales et al., \(2006\)](#), plusieurs facteurs peuvent être responsables de la variabilité des contenus des fleurs en

cardosines ; les auteurs citent les caractéristiques des sols, les variations du climat, la période de récolte et le stage de maturation des fleurs.



**Figure 32.** Profils en cardosines obtenus après chromatographie d'échange d'ions sur colonne QHP. Les pics de cardosines sont obtenus à partir des fractions actives préalablement séparés par chromatographie d'exclusion moléculaire. La colonne utilisée est la QHP. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* ; POR : fleurs du cardon référence.

**Tableau 7.** Profils quantitatifs (/1g base sèche) des cardosines récupérées à partir des trois variétés étudiées. Les pics sont obtenus en utilisant la colonne de séparation QHP. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* ; POR : fleurs du cardon référence.

	Cardosine E (mg/g)	Cardosine F (mg/g)	Cardosine G (mg/g)	Cardosine H (mg/g)	Cardosine A (mg/g)	Cardosine B (mg/g)
<b>ALG 1</b>	0.80 ± 0.36	1.15 ± 0.71	1.45 ± 0.47	2.04 ± 0.31	8.98 ± 1.31	1.08 ± 0.07
<b>ALG 2</b>	1.02 ± 0.24	2.84 ± 1.23	4.12 ± 1.06	2.28 ± 0.87	6.79 ± 0.72	2.14 ± 0.18
<b>POR</b>	0.47 ± 0.16	1.21 ± 0.50	1.42 ± 0.91	1.71 ± 0.07	8.18 ± 0.09	0.94 ± 0.23

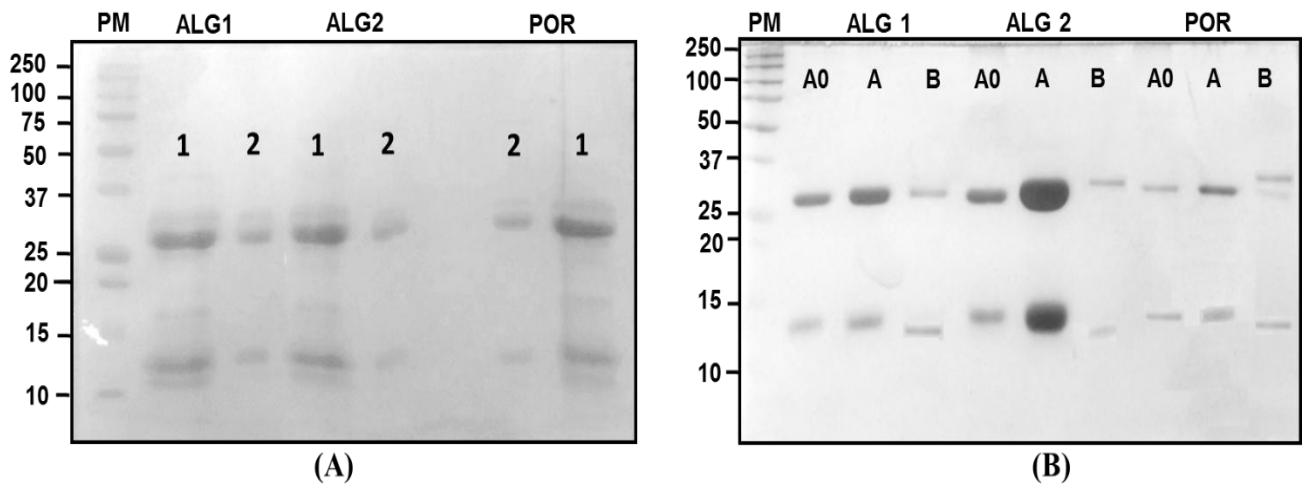
### II.1.2. Poids moléculaires et glycosylation des cardosines

Différentes techniques électrophorétiques ont été appliquées pour suivre les degrés de pureté de nos enzymes ainsi que pour déterminer leurs poids moléculaires.

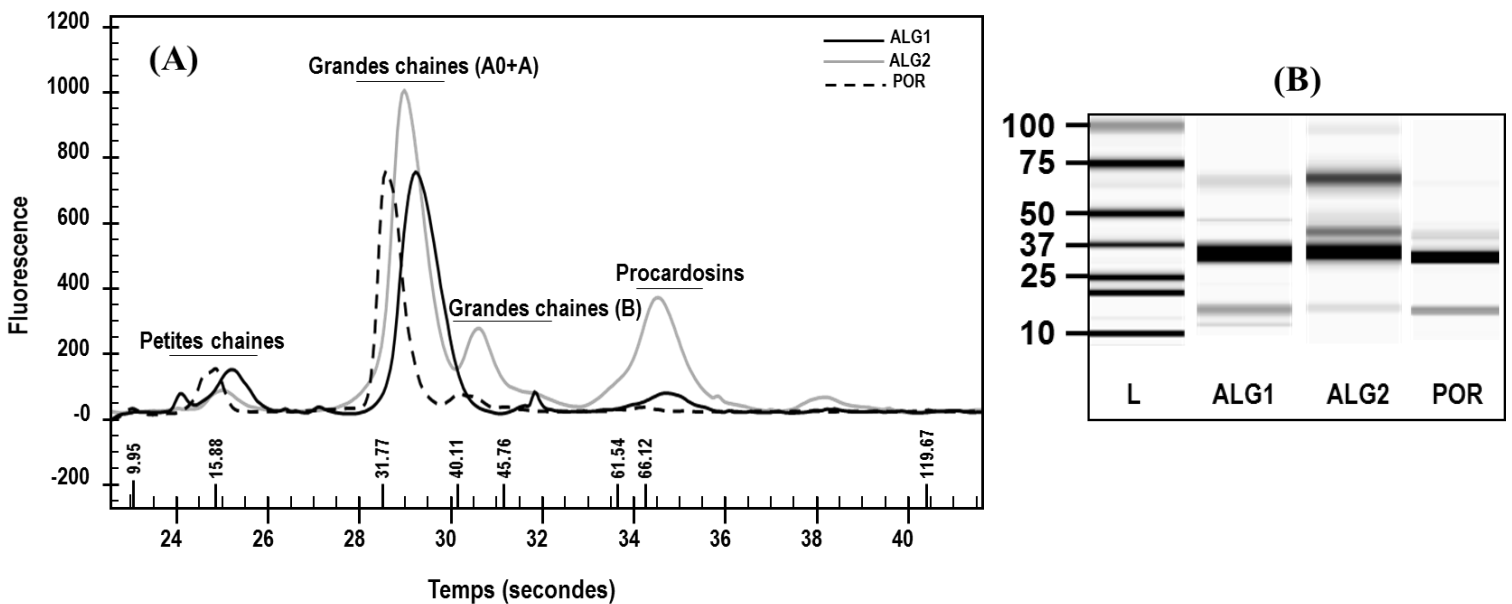
Les profils électrophorétiques des extraits bruts, des fractions actives intermédiaires et des cardosines purifiées à partir des trois variétés de cardon sont illustrés dans les [Figures 33, 34, 35 et 36](#). Les résultats obtenus montrent :

- Des profils similaires entre les trois variétés dans les cas des extraits bruts et des fractions intermédiaires issus de la chromatographie d'exclusion moléculaires ;
- Toutes les cardosines purifiées à partir des trois échantillons de fleurs sont des dimères constitués de deux chaînes peptidiques : grande et petite ;
- Les poids moléculaires ([Tableau 8](#)) des grandes chaînes de cardosines A<sub>0</sub> et A sont plus élevés dans le cas des deux variétés algériennes ;
- Les profils électrophorétiques des cardosines purifiées ont révélé des degrés de pureté de 100% à l'exception de la cardosine B. Dans ce cas, une petite contamination avec la cardosine A était constatée ;
- Les cardosines A<sub>0</sub> et A des variétés algériennes sont moins glycosylées que celles de la variété portugaise ;
- La cardosine B est la fraction la plus glycosylée dans le cas des trois variétés.

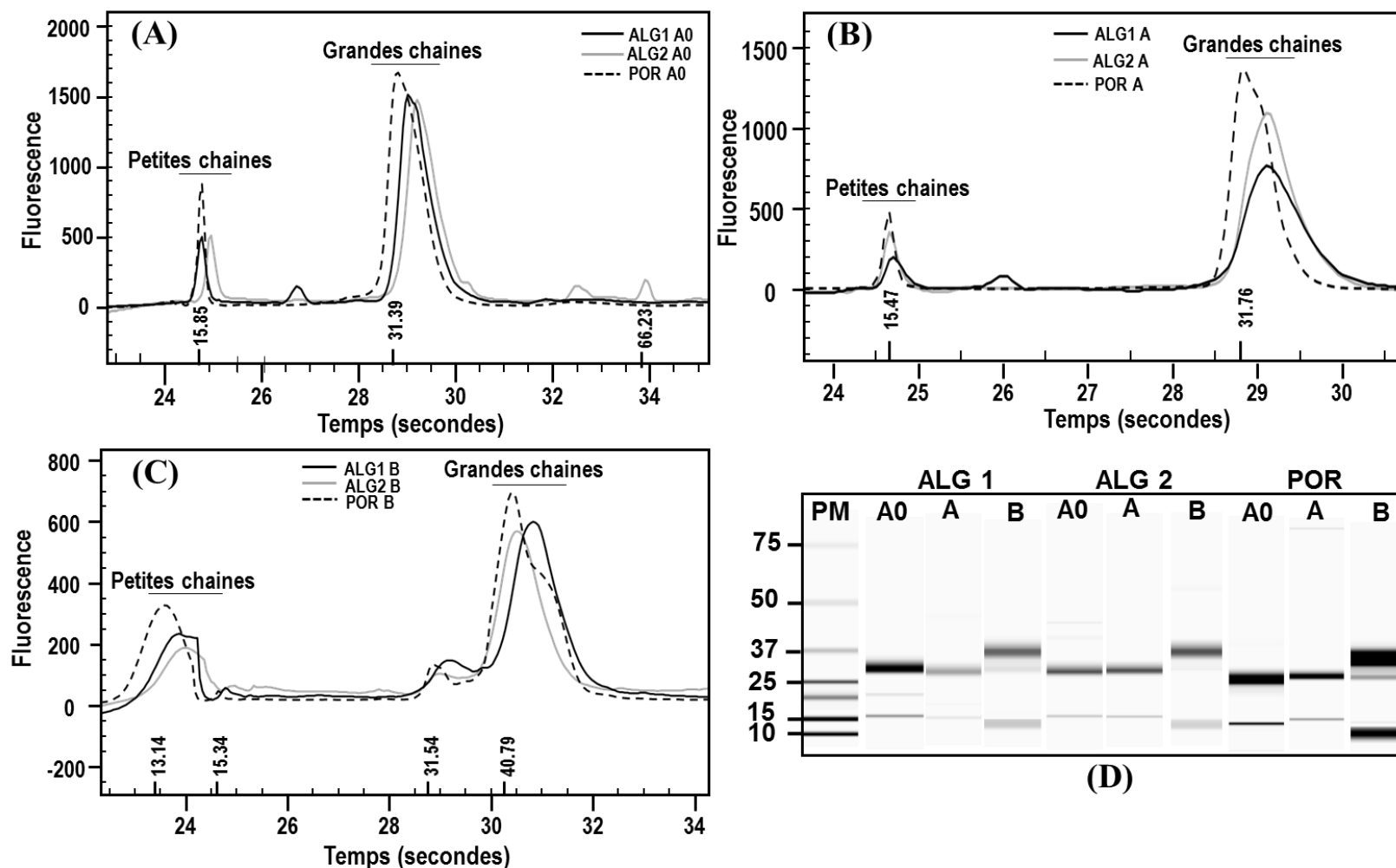
Nos résultats confirment ceux obtenus par plusieurs auteurs précisant que les cardosines sont des glycoprotéines dimères ([Faro et al., 1992](#) ; [Verissimo et al., 1996](#) ; [Rahmalho-Santos et al., 1997](#) ; [Roseiro et al., 2003](#) ; [Sarmiento et al., 2009](#)). Ils sont aussi proches de ceux de ; [Verissimo et al. \(1996\)](#) qui ont rapporté que la cardosine A et B sont constituées de deux chaînes peptides chacune. Selon ces mêmes auteurs les peptides de la cardosine A ont des poids moléculaires d'environ 31 et 15 kDa quant à ceux de la cardosine B ils ont des poids de 34 et 14 kDa. D'après [Sarmiento et al., \(2009\)](#), les quatre cardosines purifiées par à partir de la fraction cardosine A<sub>0</sub> avaient des poids moléculaires similaires à ceux de la cardosine A cependant, les charges étaient différentes.



**Figure 33.** Profils sur gels SDS-Page des protéases des fleurs des trois variétés de cardon étudiées. (A) : Profils sur SDS-Page des 1 : extraits bruts et 2 : fractions actives obtenues après chromatographie d'exclusion moléculaire ; (B) : Profils sur SDS-Page des cardosines pures obtenues. PM : Poids moléculaire ; ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis* ; POR : fleurs du cardon référence.



**Figure 34.** Profils sur électrophorèse capillaire des fractions actives obtenues après chromatographie d'exclusion moléculaire. (A) Pics correspondant aux bandes obtenues à une fluorescence 280 nM ; (B) : Gel virtuel conçu par le logiciel sur la base des pics (A). ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis* ; POR : fleurs du cardon référence ; L : Poids moléculaires de référence



**Figure 35.** Profils sur électrophorèse capillaire des cardosines purifiées à partir des variétés étudiées. (A) : Pics correspondant aux chaînes des cardosines A<sub>0</sub> obtenus à une fluorescence 280 nM ; (B) : Profils Pics correspondant aux chaînes des cardosines A obtenus à une fluorescence 280 nM ; (C) : Profils Pics correspondant aux chaînes des cardosines A obtenus à une fluorescence 280 nM ; (D) : Gel virtuel conçu par le logiciel sur la base des pics (A), (B), et (C). ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* ; POR : fleurs du cardon référence ; PM : Poids moléculaires de référence.

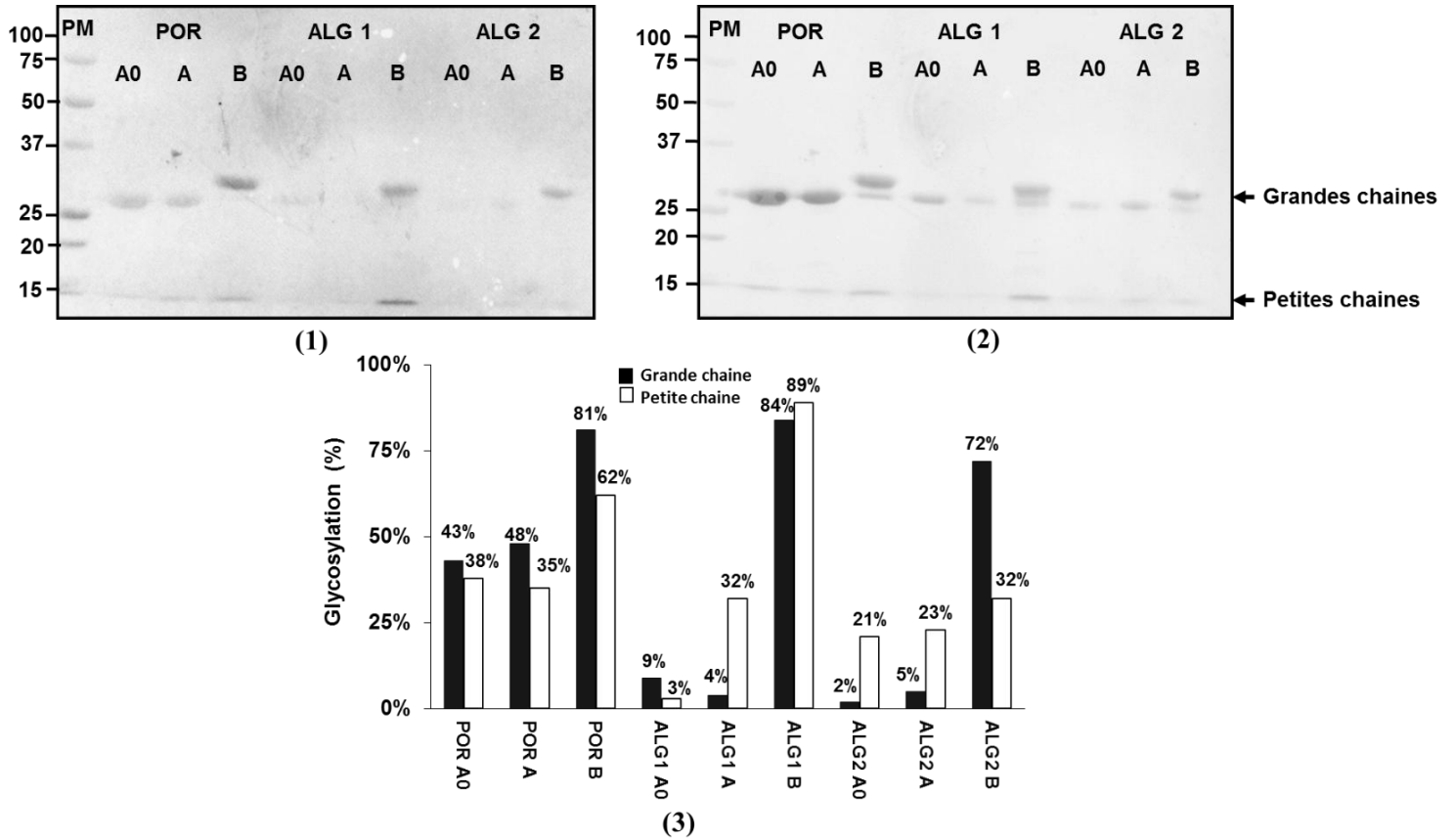
**Tableau 8 :** Poids moléculaires des grandes et petites chaînes de cardosines purifiées estimés par électrophorèse capillaire. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis* ; POR : fleurs du cardon référence.

Cardosines	Grande chaîne (kDa)	Petite chaîne (kDa)
<b>ALG1 A<sub>0</sub></b>	16.2 ± 00.0 <sup>a,A</sup>	33.1 ± 00.0 <sup>b,A</sup>
<b>ALG1 A</b>	16.2 ± 00.1 <sup>a,A</sup>	33.3 ± 00.1 <sup>b,A</sup>
<b>ALG1 B</b>	14.4 ± 00.1 <sup>b,A</sup>	42.3 ± 00.1 <sup>a,A</sup>
<b>ALG2 A<sub>0</sub></b>	16.4 ± 00.1 <sup>a,A</sup>	33.1 ± 00.0 <sup>b,A</sup>
<b>ALG2 A</b>	16.1 ± 00.0 <sup>a,A</sup>	33.2 ± 00.0 <sup>b,A</sup>
<b>ALG2 B</b>	14.6 ± 00.1 <sup>b,A</sup>	40.1 ± 00.2 <sup>a,AB</sup>
<b>POR A<sub>0</sub></b>	16.2 ± 00.0 <sup>a,A</sup>	31.3 ± 00.1 <sup>b,B</sup>
<b>POR A</b>	16.2 ± 00.1 <sup>a,A</sup>	31.1 ± 00.0 <sup>b,B</sup>
<b>POR B</b>	13.1 ± 00.0 <sup>b,B</sup>	40.2 ± 00.0 <sup>a,B</sup>

<sup>a,b,c</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres minuscules, indiquent des différences significatives entre les groupes d'enzymes dans la même variété ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres majuscules, indiquent des différences significatives entre les variétés pour le même groupe d'enzyme ( $p < 0.05$ ).

D'après Duarte *et al.*, (2006) la glycosylation est une expression secondaire qui permet à la plante de mieux stabiliser ses protéines et ainsi, une meilleure adaptation avec son milieu extérieur. Les différences significatives ( $p < 0.05$ ) que nous avons enregistrés entre les degrés de glycosylation des cardosines, peuvent être l'origine des variations des temps d'éluions observées lors de la chromatographie d'échange d'ions. En effet, les liaisons de glycosylation influent sur les charges totales des protéines ce qui se traduit par des interactions avec la colonne d'échange d'ions plus ou moins différentes.





**Figure 36.** Glycosylation des cardosines pures. Les cardosines pures ont été séparées par une électrophorèse SDS-Page puis colorées par le kit de détection des glycoprotéines (1), et par la suite, par le bleu de Coomassie (2). Les degrés de glycosylation sont mesurés par une étude densitométrique des bandes (3). ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* ; POR : fleurs du cardon référence ; PM : Poids moléculaires de référence.

### II.1.3. Distinction des enzymes selon les séquences d'acides aminés

Les séquences d'acides aminés des cardosines purifiées ont été identifiées par une chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). Les résultats obtenus ont révélé que nos cardosines sont constituées de séquences d'acides aminés similaires mais pas identiques (Figure 37).

**>sp|ALG1\_A0|**

KDFGFRGTVRDSGSAVVALTNRDRTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSK  
 AHSMYESSDSSTYKTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLFDG  
 ILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHT  
 YVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIG  
 ANTLSSMPNVSFTIGGKKFGLTPEQYILKTAMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDY  
 GNLLVGFAEAA

**>sp|ALG2\_A0|**

VDRIDQLRGRGTVRDSGSAVVALTNRDRTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWV  
 PSSKAHSMYESSDSSTYKGGFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRTISVP  
 VWYNMLNQGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTYQYYWQF  
 GIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIGANKFGLTPEQYI  
 LKTAMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGFAEAA

**>sp|POR\_A0|**

VDRIDQLRGRGTVRDSGSAVVALTNRDRTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWV  
 PSSKAHSMYESSDSSTYKGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLH  
 RLFDGILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNH  
 RGDHTYVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQI  
 NHAIGANDIIEMLRKFGLTPEQYILKVGKTAMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDY  
 GNLLVGFAEAA

**>sp|ALG1\_A|**

GRRALMEGNARKDFGFRGTVRDSGSAVVALTNRDRTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDT  
 GSSVLWVPSSKAHSMYESSDSSTYKGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDE  
 ADNVFLHRLFDGILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFG  
 GLDPNHFRGDHTYVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGP  
 TAIVTQINHAIGANDIIEMLRSKKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLG  
 PLWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGFAEAA

**>sp|ALG2\_A|**

KDFGFRGTVRDSGSAVVALTNRDRTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSK  
 AHSMYESSDSSTYKGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLFD

GILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDH  
 TYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAI  
 GAFGLTPEQYILKTAMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGFAEAA

>sp | POR\_A |

KDFGFRGTVRDSGS AVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSK  
 AHSMYESSDSSTYKGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLFD  
 GILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDH  
 TYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAI  
 GANDIIEMLRKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLGPLWILGDVFMRPY  
 HTVFDYGNLLVGFAEAA

>sp | ALG1\_B |

KDFGFRGTVRDSGS AVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSK  
 AHSMYESSDSSTYKGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLFD  
 GILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVRF SFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHT  
 YVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIGANSSMPNVSFTI  
 GGKKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDYG  
 NLLVGFAEAA

>sp | ALG2\_B |

VRDSGS AVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSKAHSMYESS  
 DSSTYKGFSSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLNMLNQGLVKFSFWLNR  
 NVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQ  
 AFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIGANKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDA  
 TLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGFAEAA

>sp | POR\_B |

RDSGS AVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSKAHSMYESSD  
 SSTYKGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRTI SVPVWYNMLN  
 QGLVKRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHTYVPVTTYQYYWQFGIGDVL I  
 GDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIGANKFGLTPEQYILKPYHTV  
 FDYGNLLVGFAEAA

**Figure 37.** Séquences d'acides aminés des cardosines purifiées à partir des fleurs du des variétés cardon étudiées. Sp : séquence protéique ; ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* ; POR : fleurs du cardon référence.

Le tableau 9 résume les similarités des séquences identifiées avec les protéines répertoriées dans la base des données numérique *UniProt*. Pour toutes nos cardosines purifiées, la séquence présentant le plus grand nombre de « peptides correspondants » est celle de la protéine procardosine A extraite à partir de *Cynara cardunculus* L. (avec des nombres de peptides allant de 81 dans le

cas de la POR B et 122 pour la POR A). Cependant, les cardosines E, F, G extraites à partir de *Cynara cardunculus L.* sont les séquences les plus couvertes (taux de couvertures supérieur à 80%). Une protéine non caractérisée extraite à partir de l'artichaud *Cynara scolymus* est largement couverte (taux de couvertures supérieur à 90%) par les séquences des cardosines purifiées à partir des deux variétés algériennes. Ceci peut nous renseigner sur un probable croisement (peut-être dû à une interpollinisations à l'aide des abeilles) entre les variétés du cardon algérien et l'artichaud qui lui aussi est largement répondu en Algérie.

**Tableau 9.** Similarités des chaînes d'acides aminés des cardosines purifiées avec les séquences peptidiques et protéiques répertoriées sur la base de données numérique *Uniprot*. Le test de similarité est réalisé pour les peptides identifiés à 95% et plus. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis* ; POR : fleurs du cardon référence.

	Code d'accèsion	Nom de la protéine	Espèce d'origine	Nombre de peptides correspondants	Taux de couverture %
<b>ALG1 A0</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	121	57.74
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	3	17.39
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	10	83.83
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	7	19.17
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	22	94.31
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	15	91.52
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	4	13.95
	tr K7PMR5 K7PMR5_CYNCS	Protéine non caractérisée	<i>C.scolymus</i>	4	94.64
<b>ALG1 A</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	115	57.34
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	3	19.76
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	14	87.22
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	9	19.17
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	7	94.31
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	8	91.52
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	4	16.7
	tr K7PMR5 K7PMR5_CYNCS	Protéine non caractérisée	<i>C.scolymus</i>	6	94.64
<b>ALG1 B</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	72	58.13
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	11	44.27
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	18	89.47
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	44	46.05
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	6	89.68
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	9	85.71
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	5	21.35
	tr K7PMR5 K7PMR5_CYNCS	Protéine non caractérisée	<i>C.scolymus</i>	7	92.86
<b>ALG2 A0</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	122	51.39
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	5	16.21
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	70	93.98

	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	3	17.00
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	5	89.68
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	2	90.18
<b>ALG2 A</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	116	61.11
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	6	21.74
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	20	97.74
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	3	20.75
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	5	97.51
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	4	97.32
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	3	16.70
	tr K7PMR5 K7PMR5_CYNCS	Protéine non caractérisée	<i>C.scolymus</i>	3	94.64
<b>ALG2 B</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	73	49.01
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	36	42.49
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	15	83.08
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	9	39.33
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	4	86.83
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	2	90.18
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	2	17.76
<b>POR A0</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	114	56.75
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	7	19.37
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	36	93.98
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	2	18.58
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	17	93.59
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	12	90.63
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	3	13.95
<b>POR A</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	121	59.33
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	5	22.73
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	10	92.48
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	7	18.97
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	18	93.95
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	7	90.63
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	3	13.95
	tr K7PMR5 K7PMR5_CYNCS	Protéine non caractérisée	<i>C.scolymus</i>	3	94.64
<b>POR B</b>	sp Q9XFX3 CARDA_CYNCA	Procardosin-A	<i>C.cardunculus</i>	81	48.61
	sp Q9XFX4 CARDB_CYNCA	Procardosin-B	<i>C.cardunculus</i>	57	49.21
	sp P85138 CARDG_CYNCA	Cardosin-G	<i>C.cardunculus</i>	5	79.32
	tr Q14K91 Q14K91_CYNCA	Aspartate protéase	<i>C.cardunculus</i>	15	45.65
	sp P85137 CARDF_CYNCA	Cardosin-F	<i>C.cardunculus</i>	19	82.92
	sp P85136 CARDE_CYNCA	Cardosin-E	<i>C.cardunculus</i>	6	81.70
	sp P40782 CYPR1_CYNCA	Cyprosin	<i>C.cardunculus</i>	3	15.43

De plus, un alignement des séquences des cardosins A (cardosins majoritaires) des variétés algériennes avec la séquence procardosin A répertoriée a été fait grâce à la base des données *UniProt* (Figure 38). L'alignement montre clairement, des segments des parties pro-peptide et PSI supposées ne pas être présentes dans la cardosin mature. Ceci laisse supposer que le processus d'activation des cardosins qui se produit lors de la maturation des fleurs, est différent dans le cas des variétés algériennes.

	<b>Peptide signe</b>	<b>Propeptide</b>	
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	MGTSIKANVLAFLFLYLLSPTVFSVSDGLIRIGLKKRQVDRIDQLRGRALMEGNARKD		60
sp   ALG1_A	-----	-----GRRALMEGNARKD	13
sp   ALG2_A	-----	-----KD	2
		**	
	<b>Grande chaîne de l'enzyme mature</b>		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	FGFRGTVRDSGSAVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPKFTVIFD	TGSSVLWVPSSKCINSK	120
sp   ALG1_A	<b>FGFRGTVR</b> DSGSAVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPK <b>F</b> T	VIFDGTGSSVLWVPSSK----	68
sp   ALG2_A	<b>FGFRGTVR</b> DSGSAVVALTNDRDTSYFGEIGIGTPPKFTVIFDGTGSSVLWVPSSK----		57
	*****		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	ACRAHSMYESSDSSTYKENGTFGAIYGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEA		180
sp   ALG1_A	---AHSMYESSDSSTYK-----GTGSITGFFSQDSVTIGDLVV <b>K</b> EQDFIEATDEA		115
sp   ALG2_A	---AHSMYESSDSSTYK-----GTGSITGFFSQDSV <b>T</b> IGDLVVKEQDFIEATDEA		104
	*****		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	DNVFLHRLFDGILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVKERRF SFWLNRRNVDEEEGGELVFGGL		240
sp   ALG1_A	<b>D</b> NVFLHRLFDGILGLSFQTI SVPVWYNML <b>N</b> QGLVK--RFSFWLNRRNVDEEEGGELVFGGL		173
sp   ALG2_A	DNVFLHRLFDGILGLSFQTI SVPVWYNMLNQGLVK--RFSFWLNRRNVDEEEGGELVFGGL		162
	*****		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	DPNHFRGDHTYVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFAD	SGTSLLSGPTAIVT	300
sp   ALG1_A	DPNHFRGDHTYVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFAD	SGTSLLSGPTAIVT	233
sp   ALG2_A	DPNHFRGDHTYVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFAD	SGTSLLSGPTAIVT	222
	*****		
	<b>PSI</b>		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	QINHAIGANGVMNQCKTVVSRVGRDIEMLRSKI QPDKICSHMKLCTFDGARDVSSII E		360
sp   ALG1_A	QINHAIGAN <b>DIIE</b> -----M-----		247
sp   ALG2_A	QINHAIGA-----		230
	*****		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	SVVDKNNDKSSGGIHDEMCTFCEMAVVWMQNEIKQSE TEDNI INYANELCEHLSTSSEEL		420
sp   ALG1_A	-----		
sp   ALG2_A	-----		
	<b>Petite chaîne de l'enzyme mature</b>		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	QVDCNTLSSMP <b>N</b> VSFTIGGKKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLGPLWILG		480
sp   ALG1_A	----- <b>LRS</b> KKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLGPLWILG		291
sp   ALG2_A	-----FGLTPEQYILK-----TAMDATLLGPLWILG		256
	*****		
SP   Q9XFX3   CARDA_CYNCA	DVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEA A		504
sp   ALG1_A	DVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEA A		315
sp   ALG2_A	DVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEA A		280
	*****		

**Figure 38.** Alignement des séquences des cardosines A matures purifiées avec la séquence Procardosine A (SP | Q9XFX3 | CARDA\_CYNCA) répertoriée dans la base des données numérique *Uniprot*. Les segments colorés en gris sont supposés ne pas être présents dans la cardosine A mature. Les acides aminés colorés en vert sont différents de la séquence référence. (\*) : acide aminé identique dans toutes les séquences alignées. (-) : acide aminé non identifié. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis* ; PSI : segment spécifique aux protéases d'origine végétale ; sp : séquence protéique.

## II.1.4. Action spécifique des cardosines

### II.1.4.1. Sur la caséine kappa

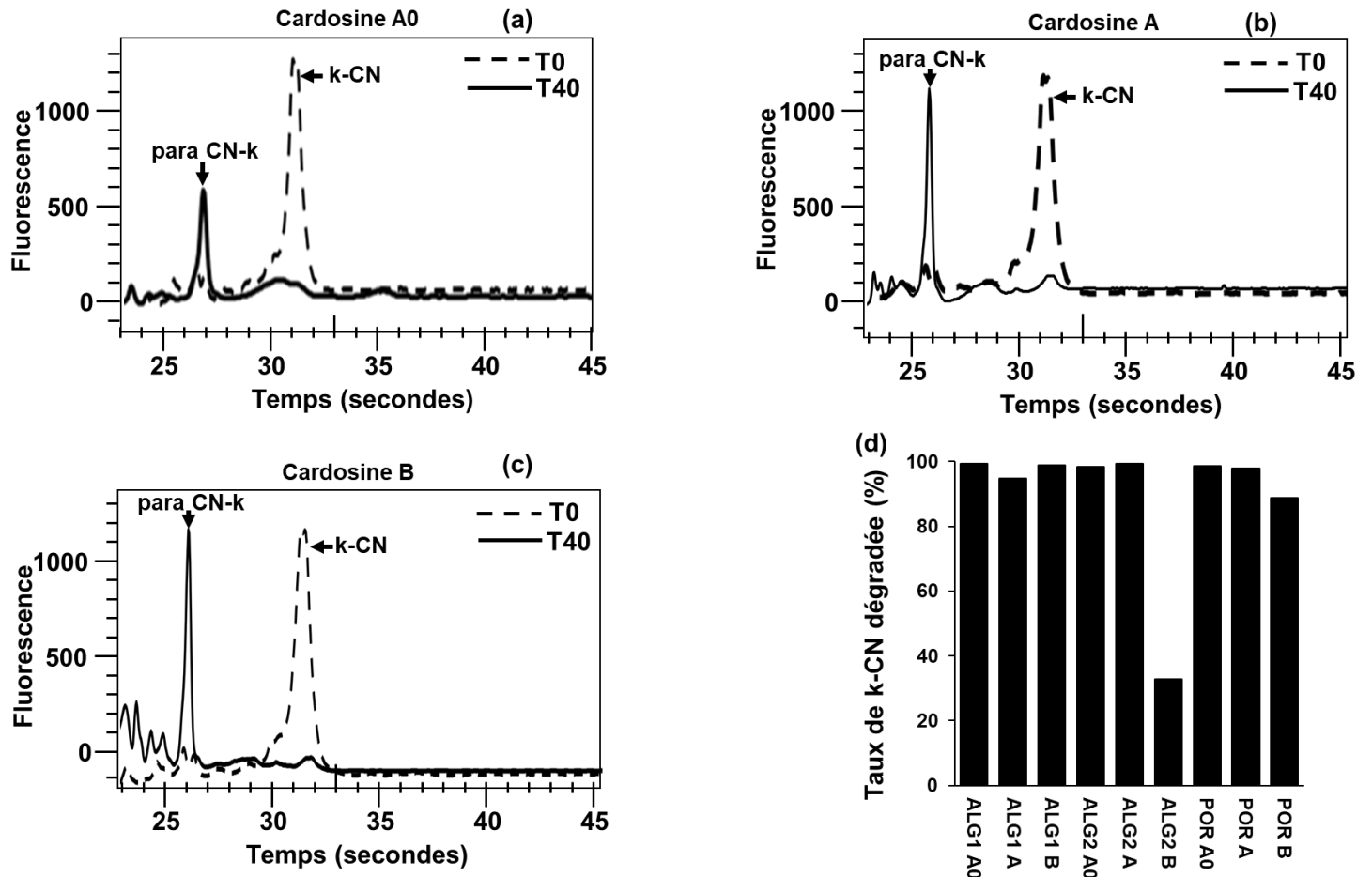
Les caséines sont les protéines majoritaires du lait. La déstabilisation du réseau micellaire des caséines est due à l'hydrolyse de la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la caséine kappa (*k*-CN) par l'agent coagulant (Drohse et Foltman, 1989). Pour cette raison la *k*-CN était utilisée comme substrat pour l'étude de la spécificité des cardosins purifiées. Cette caséine est aussi considérée comme étant un substrat idéal pour l'étude des aspartates protéases du fait qu'elle possède un nombre élevé de résidus hydrophobes dans sa structure primaire.

L'hydrolyse de la caséine kappa par les cardosines purifiées a été menée selon la méthode décrite par Faro *et al.* (1992). La température de la réaction, le pH et le rapport enzyme/substrat ont été choisis par les auteurs sur la base de travaux précédents menés sur la chymosine. L'hydrolyse de la caséine *k*-CN induits l'apparition de deux peptides : un fragment à faible poids moléculaire caséine macro peptide (CMP : Met<sub>106</sub>-Ala-Ile-Pro<sub>109</sub>), et un peptide à haut poids moléculaire nommé para-caséine kappa (le fragment Glu<sub>1</sub>-Phe<sub>105</sub>) (Sarmiento, 2003). L'hydrolyse de la *k*-CN est faite à 30°C sous agitation et près analyse des produits de la digestion par électrophorèse capillaire, seul le fragment de la para para-caséine kappa qui est détecté (Figure 39).

Les résultats ont montré que toutes les cardosines purifiées peuvent hydrolyser la *k*-CN. En effet, après 40 minutes de réaction on remarque la disparition de la *k*-CN et l'apparition du fragment para-caséine kappa (Figure 39). Également, nous avons constaté que les mêmes cardosines engendrent les mêmes profils de digestion, ce qui nous mène à dire qu'il n'y a pas un effet significatif de la variété sur la spécificité des cardosines en vis-à-vis la *k*-CN. Cependant, les trois cardosines B ont généré plus de produits d'hydrolyse comparées aux autres fractions, ce qui renseigne sur le pouvoir protéolytique supérieur de la cardosine B (Figure 39.c).

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par certains auteurs (Faro *et al.*, 1992 ; Verissimo *et al.*, 1996 ; Faro *et al.*, 1998) qui ont rapporté une protéolyse de la *k*-CN plus élevée par la cardosine B que par cardosine A. De plus, Drohse et Foltman, (1989) ont signalé une spécificité d'hydrolyse de la caséine kappa similaire entre les protéases de *Cynara cardunculus L.*

et d'autres aspartates protéases comme la chymosine, la pepsine ou la protéase fongique extraite à partir *Mucor Miehei*.

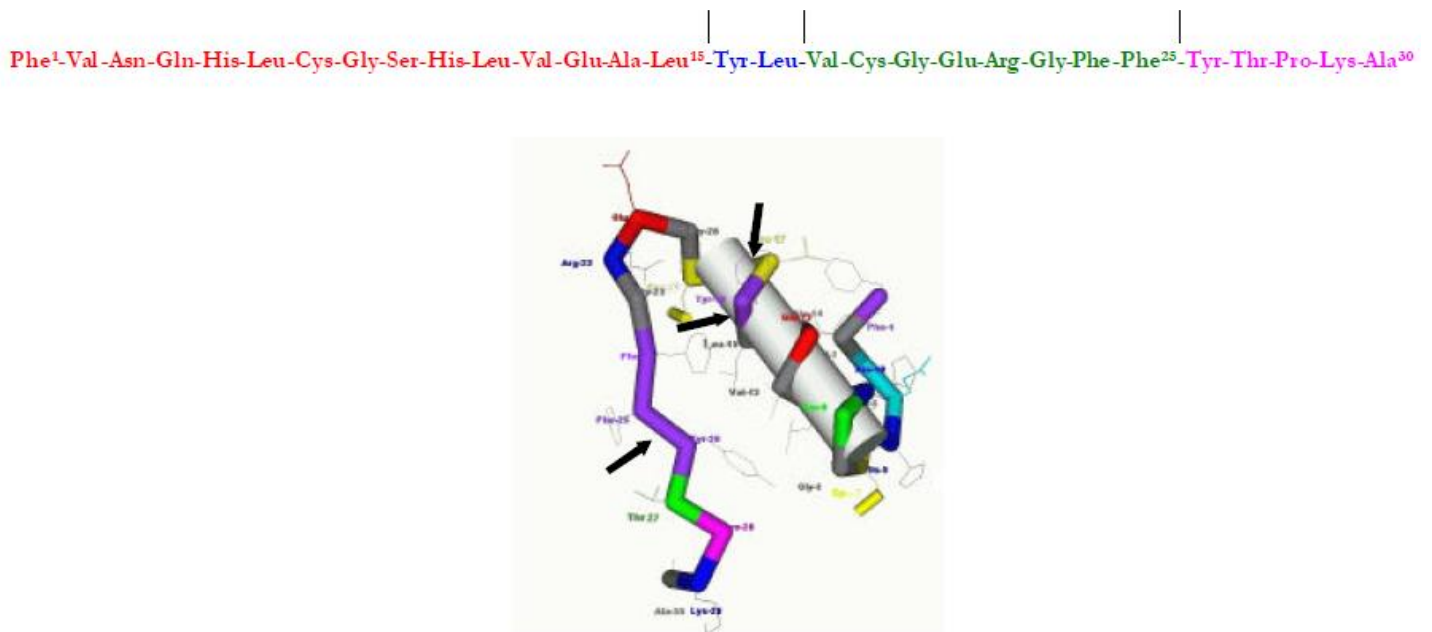


**Figure 39.** Action des cardosines purifiées sur la caséine kappa. (a) : Profil modèle de l'action des trois cardosines A<sub>0</sub>. (b) : Profil modèle de l'action des trois cardosines A. (c) : Profil modèle de l'action des trois cardosines B. (d) : Profils quantitatifs de digestion de la caséine kappa par les cardosines purifiées. k-CN : caséine kappa ; T<sub>0</sub> : Temps de l'ajout de l'enzyme au substrat ; T<sub>40</sub> : Temps de l'arrêt de la réaction enzymatique correspondant à 40 minutes ; ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atilis* ; POR : fleurs du cardon référence.



### II.1.4.2. Sur la chaîne $\beta$ de l'insuline oxydée

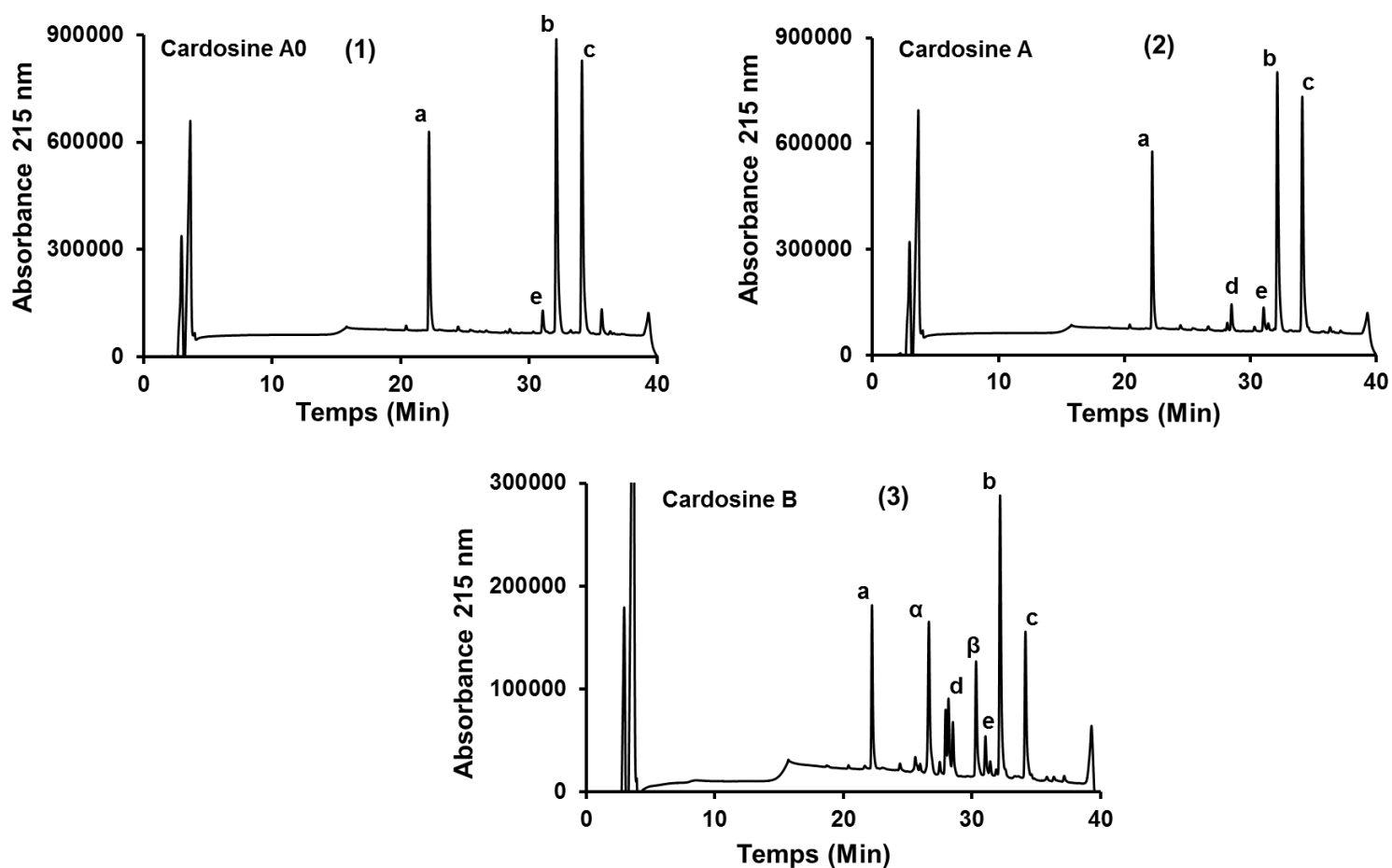
Traditionnellement, la digestion d'une séquence protéique standard, telle que la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée ou l'hémoglobine, est étudiée pour définir la spécificité d'une nouvelle protéinase (Sarmiento, 2003). La chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée est utilisée pour l'étude de la spécificité des aspartates protéases plus précisément. Le choix de ce substrat était motivé par les avantages qu'offre cette séquence : son prix abordable, la disponibilité des réactifs nécessaires pour la réaction et la parfaite connaissance des produits de l'hydrolyse générés. La chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée est constituée de 30 résidus plusieurs d'entre eux sont des acides aminés hydrophobes (Figure 40) (Gursky *et al.*, 1992).



**Figure 40.** Séquence d'acide aminés et structure secondaire de la chaîne  $\beta$  de l'insuline bovine oxydée. Les flèches montrent les sites d'action de la cardosine A (Gursky *et al.*, 1992 ; Sarmiento, 2003).

La digestion de la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée par nos cardosines purifiées a généré plusieurs peptides (Figure 41). Comme était le cas pour la *k*-CN, il a été constaté que qualitativement, la variété de carbon n'influe pas sur les produits de l'hydrolyse générés et que la cardosine B génère plus de peptides que les cardosines A<sub>0</sub> et A. Les taux relatifs des produits majeurs de l'hydrolyse générés par les cardosines sont présentés dans le (tableau 10). Comme montré, les fractions de cardosines A<sub>0</sub> ont généré 4 peptides exceptée la ALG2 A<sub>0</sub> qui n'a généré que 3 peptides. Les

cardosines A ont produit 5 pics (les 4 générés par les A<sub>0</sub> plus un autre pic) quant aux cardosines B elles ont généré 7 différents peptides (tous les peptides produits par les cardosine A plus 2 autres).



**Figure 41.** Profils typiques obtenus par HPLC des produits de digestion de la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée par les cardosines. (1) profils obtenus sous action des cardosines A<sub>0</sub>; (2) : profils obtenus sous action des cardosines A ; (3) : profils obtenus sous action des cardosines B. Les résultats sont obtenus après 3 heures de réaction enzymatique.

**Tableau 10.** Taux relatifs des produits majeurs de la réaction d'hydrolyse de la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée par les cardosines. Pour chaque produit, le taux 100% est attribué au pic présentant le taux le plus élevé. Les résultats sont obtenus après 3 heures de réaction enzymatique. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus var. atililis* ; POR : fleurs du cardon référence.

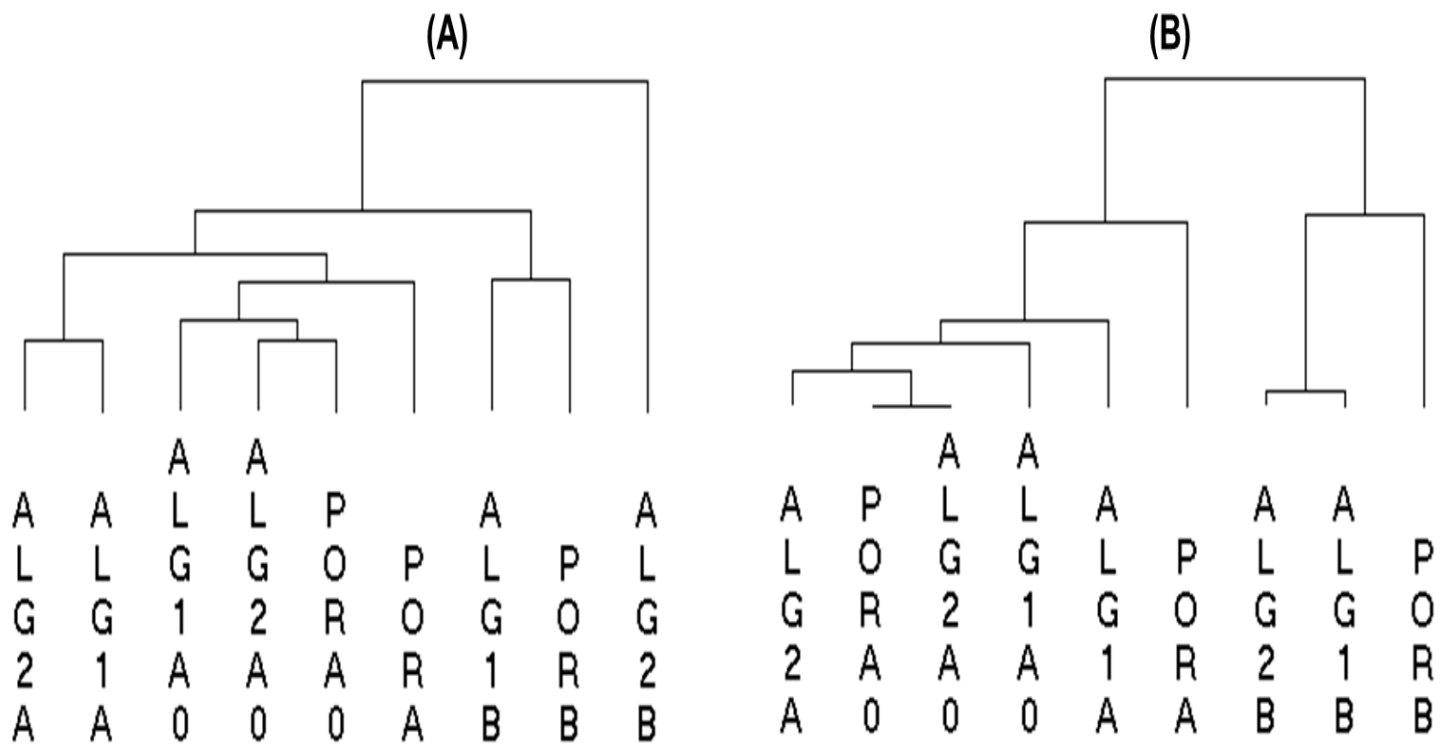
		Pic a	Pic b	Pic c	Pic d	Pic e	Pic $\alpha$	Pic $\beta$
<b>ALG1</b>	<b>Cardosine A<sub>0</sub></b>	96	98	96	0	86	0	0
	<b>Cardosine A</b>	87	88	84	60	91	0	0
	<b>Cardosine B</b>	87	92	78	95	56	100	94
<b>ALG2</b>	<b>Cardosine A<sub>0</sub></b>	0	98	97	0	71	0	0
	<b>Cardosine A</b>	100	100	100	0	100	0	0
	<b>Cardosine B</b>	95	98	98	0	61	53	95
<b>POR</b>	<b>Cardosine A<sub>0</sub></b>	78	21	49	0	20	0	0
	<b>Cardosine A</b>	55	58	50	7	84	0	0
	<b>Cardosine B</b>	27	32	18	100	69	59	100

Les mêmes profils de digestions ont été obtenus dans des travaux similaires menés sur la spécificité des Cardosines A et B : [Faro et al., \(1992\)](#) et plus tard [Verissimon et al., \(1996\)](#). Suite à l'identification des chaînes peptidiques, les auteurs ont démontré qu'après 3h de réaction avec la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée, les Cardosines peuvent couper 3 liaisons peptidiques ([tableau 11](#)) donnant naissance à 5 peptides dans le cas de la Cardosine A et 7 dans le cas de la Cardosine B.

**Tableau 11.** Identification des Fragments produits après hydrolyse de la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée par les cardosines. Adapté à partir de [Faro et al. \(1992\)](#) et [Sarmiento, \(2003\)](#).

Peptide	Site de clivage	Séquence peptidique
<b>Pic a</b>	Phe <sub>25</sub> -Tyr <sub>26</sub>	Tyr <sub>26</sub> -Ala <sub>30</sub>
<b>Pic b</b>	Leu <sub>17</sub> -Val <sub>18</sub> et Phe <sub>25</sub> -Tyr <sub>26</sub>	Val <sub>18</sub> -Phe <sub>25</sub>
<b>Pic c</b>	Leu <sub>15</sub> -Tyr <sub>16</sub>	Phe <sub>1</sub> -Leu <sub>15</sub>
<b>Pic d</b>	Leu <sub>15</sub> -Tyr <sub>16</sub> et Phe <sub>25</sub> -Tyr <sub>26</sub>	Tyr <sub>16</sub> -Phe <sub>25</sub>
<b>Pic e</b>	Leu <sub>17</sub> -Val <sub>18</sub>	Phe <sub>1</sub> -Leu <sub>17</sub>
<b>Pic <math>\alpha</math></b>	Leu <sub>15</sub> -Tyr <sub>16</sub>	Tyr <sub>16</sub> -Ala <sub>30</sub>
<b>Pic <math>\beta</math></b>	Leu <sub>17</sub> -Val <sub>18</sub>	Val <sub>18</sub> -Ala <sub>30</sub>

A partir de ces résultats nous pouvons conclure que : les Cardosines A<sub>0</sub>, A et B peuvent hydrolyser les liaisons peptidiques suivantes : Phe-Tyr, Leu-Val et Leu-Tyr. L'analyse statistique de similarité (Figure 42) confirme les ressemblances entre les Cardosines A<sub>0</sub> et A lors de l'hydrolyse de la CN-*k* et la chaîne β de l'insuline oxydée. La Cardosine B est la fraction qui génère les profils d'hydrolyses les plus différents.



**Figure 42.** Dendrogramme illustrant les groupes des cardosines purifiées. (A) : dendrogramme issu suite à l'action des cardosines sur la chaîne β de l'insuline oxydée (3 heures de réaction). (B) : dendrogramme issu suite à l'action des cardosines sur la caséine kappa (45 minutes de réaction). L'arrangement des groupes est obtenu suite à des tests hiérarchiques effectués sur à l'aide du logiciel *PermutMatrix*. ALG1 : fleurs du cardon spontané *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé *Cynara cardunculus* var. *atilis* ; POR : fleurs du cardon référence.

## II.2. La coagulation du lait par les protéases des fleurs de cardon

La coagulation du lait est une étape clef lors de la fabrication des fromages. Les agents coagulants utilisés jouent un rôle important dans la définition des caractéristiques des coagulums et des gels lactiques. Ils influent sur l'agrégation des micelles de caséines et interfèrent dans la vitesse de raffermissement des gels et ainsi, dans la texture finale des coagulums (Ramet et Weber, 1980 ; Gomes *et al.*, 2019). Ceci peut par la suite, avoir des effets sur les propriétés du drainage du lactosérum par le coagulum, sur le taux de l'humidité et sur la texture et la flaveur des fromages (Mazorra-Manzana *et al.*, 2013).

Dans cette partie du travail, nous avons évalué les propriétés technologiques et fromagères des extraits des trois variétés de fleurs de cardon étudiées, ainsi que celles des différentes Cardosines purifiées à partir de chaque variété. L'étude s'est basée sur la mesure des activités coagulantes et protéolytiques ; le calcul des rendements fromagers théoriques ; et l'estimation des propriétés coagulantes de chaque préparation enzymatique et son effet sur l'évolution de la texture des coagulums. Tout le travail était mené par comparaison à une présure animale standard fournie par l'IDF.

### II.2.1. L'activité coagulante

Lors de l'étude d'un potentiel substitut de présure, il est particulièrement important d'évaluer son activité coagulante (Fox et McSweeney, 1997) qui détermine la capacité de l'enzyme en question, à hydrolyser spécifiquement la caséine kappa (Jacob *et al.*, 2011).

Les activités coagulantes des extraits bruts des fleurs des trois variétés de cardon et celles des cardosines purifiées sont présentées sur le [tableau 6](#) (page 62). Les résultats montrent des variabilités entre les différentes préparations enzymatiques. Les extraits obtenus à partir des variétés ALG1 et ALG2 ont des activités totales de coagulation (respectivement,  $67.8 \pm 0.1$  et  $62.3 \pm 0.9$ ) significativement supérieures ( $p < 0.05$ ) à celui de la variété POR ( $36.7 \pm 0.9$ ). Ceci est peut-être expliqué par le faible taux de Cardosines contenus dans cette dernière (42.1 % contre 70.6% et 62.1 % pour les variétés ALG1 et ALG2 respectivement). Ces résultats restent nettement inférieurs à la moyenne rapportée par Martins *et al.* (1996) pour les extraits des fleurs sèches de cardon ( $64 \text{ UP g}^{-1}$  approximativement égale à  $110 \text{ IUMC g}^{-1}$ ). Dans un autre travail, Gomes *et al.*, (2019) ont obtenus des résultats similaires aux nôtres pour certains écotypes de cardon cultivés

dans la région de *Alentajo* au sud du Portugal. Les auteurs ont caractérisé des extraits bruts de 13 cultivars de cardon et ont obtenus des activités coagulantes comprises entre 57 et 128 IUMC g<sup>-1</sup>.

D'autre part, nous avons constaté que toutes les Cardosines purifiées possèdent des activités coagulantes, ce qui confirme la possibilité de leur application en industrie fromagère. Pour les trois variétés, la Cardosine A est la fraction responsable de la majorité de l'activité coagulante des extraits. De plus, indépendamment de son origine, la Cardosine B présente l'activité spécifique la plus élevée. Ces résultats concordent avec ceux de certaines études déjà menées traitant l'activité coagulante de la Cardosine A et B (Roa *et al.*, 1999 ; Verissimo *et al.*, 1995). A notre connaissance, la présente étude, est le premier travail qui met en évidence l'activité coagulante de la Cardosine A<sub>0</sub>. La Cardosine A<sub>0</sub> comme mentionné précédemment (partie bibliographique), est constituée d'un groupe de 4 enzymes les Cardosine E, F, G et H, très similaires mais pas identiques à la Cardosine A (Sarmiento *et al.*, 2009).

### II.2.2. L'activité protéolytique non spécifique

Toutes enzymes qu'elle soit d'origine animale, végétale ou microbienne, capable d'hydrolyser la caséine-κ, provoquant ainsi la coagulation du lait est susceptible d'être utilisée en industrie fromagère (Alais, 1984). Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître sur les fromages, ces coagulases doivent présenter une protéolyse générale faible. Le rapport activité coagulante/activité protéolytique est déterminant pour mesurer l'applicabilité d'une quelconque protéase en fromagerie (Roseiro *et al.*, 2003 ; Shah *et al.*, 2014 ; Amid *et al.*, 2011 ; Jacob *et al.*, 2011 ; Folgado et Abranches, 2020).

Les activités protéolytiques non spécifiques (PA) des extraits bruts et des cardosines purifiées ont été mesurées selon le protocole ISO 8968-4/IDF 20-4 (ISO/IDF, 2001) décrit par Gomes *et al.*, (2019). Les taux de l'azote non protéique (NNP) généré par chaque enzyme, après 2 h de coagulation sont rapportés dans le [tableau 6](#) (page 62).

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits bruts des variétés algériennes présentent des activités protéolytiques élevées ( $6.1 \pm 0.2$  et  $5.8 \pm 0.5$  pour ALG1 et ALG2 respectivement) par comparaison à celui de la variété témoin ( $3.4 \pm 0.6$ ). Ce résultat est probablement dû aux différences

notées sur les profils enzymatiques des fleurs. Ou encore, à des différences dans le contenu de ces fleurs en composés phénoliques (tanins). En effet, les fleurs de cardon sont riches en tanins (Roseiro *et al.*, 2003) qui sont des composés qui peuvent se complexer avec les caséines et induire ainsi, la coagulation du lait (Abi Azar, 2007). Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Gomes *et al.*, (2019) qui ont rapporté des PA comprises entre 3.63 et 5.07 g NNP 100 g<sup>-1</sup>Nt après 2 h de coagulation par les extraits des fleurs obtenus à partir de 13 cultivars de cardon de la région *Alentajo* au Portugal. Par comparaison à la présure animale, comme attendu, les extraits des fleurs de cardon ont manifesté des PA nettement supérieures. Cette activité excessive est peut-être la résultante de l'action des enzymes et/ou des tanins envers les autres fractions de caséines du lait particulièrement, les caséines  $\alpha$ s et  $\beta$ . Cette non spécificité d'hydrolyse générale des Cardosines et d'autres protéases d'origine végétale est largement rapportée en bibliographie (Roseiro *et al.*, 2003 ; Nouani *et al.*, 2009 ; Amid *et al.*, 2011 ; Jacob *et al.*, 2011 ; Shah *et al.*, 2014). Par ailleurs, les Cardosines purifiées ont manifesté en général, de meilleures spécificités. Les Cardosines A<sub>0</sub> présentent les PA les plus faibles quant au Cardosine B les plus élevées (à l'exception de celle de ALG2). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Sidrach *et al.*, (2005) qui ont purifié trois formes d'enzymes à partir des fleurs de *Cynara cardunculus* qu'ils ont appelées Cynarase A,B et C. Les auteurs ont constaté une faible activité protéolytique de la fraction Cynarase A (probablement, la Cardosine A<sub>0</sub>) et ont rapporté une PA élevée pour la Cynarase C (Cardosine B). Dans un autre travail Verissimo *et al.*, (1996) ont étudié et caractérisé deux formes d'enzymes obtenues à partir des fleurs de cardon et qu'ils les ont appelées Cardosine A et Cardosine B. Les auteurs ont mentionné l'PA élevée de la Cardosine B et ont conclu que la Cardosine A agit d'une façon similaire à la chymosine alors que la Cardosine B a une activité semblable à celle de la pepsine ce qui offre à l'extrait enzymatique des fleurs de cardon une bonne aptitude pour la coagulation du lait.

### II.2.3. Les rendements fromagers théoriques

Le rendement fromager est un facteur économique très important en fromagerie. C'est l'un des paramètres les plus essentiels à étudier lors du choix d'un substitut approprié de présure animale, pour la fabrication des fromages (Khan et Masud, 2013 ; Ben Amira *et al.*, 2017). La notion du rendement fromager est définie par la répartition dans le fromage et dans le lactosérum, de la matière sèche du lait après sa transformation. C'est l'expression mathématique de la quantité de

fromage (frais et/ou sur base sèche) obtenu à partir d'une quantité donnée de lait (100 l ou 100 Kg). Le rendement fromager reflète globalement comment a été réalisé la répartition lors de l'égouttage. Il permet donc, de juger pour un type de fromage donné, si la fabrication a été menée dans de bonnes conditions (Barbosa *et al.*, 1986 ; Remeuf *et al.*, 1989 ; Colin *et al.*, 1992 ; Nouani, 2009 ; Zikiou, 2013).

Les rendements fromagers théoriques bruts et sur base sèche obtenus sur le lait standard, par l'utilisation de nos préparations enzymatiques sont montrés sur le [tableau 12](#). Les rendements frais les plus élevés sont ceux obtenus par les Cardosines A (des rendements supérieurs à 50g 100 mL<sup>-1</sup>). Quant aux plus faibles ils ont été générés par les extraits bruts. Les Cardosines A<sub>0</sub> et B ont en général, présenté des rendements frais moyens compris entre ceux des Cardosines A et ceux obtenus par les extraits bruts (entre 44.9 et 48.3 g 100 mL<sup>-1</sup>). Cependant, les rendements sur base sèche sont plus importants dans le cas des Cardosines B (supérieurs à 8g 100g<sup>-1</sup>). Ce qui confirme les différences de spécificité des Cardosines envers les protéines du lait. De plus, les résultats obtenus montrent que les volumes des lactosérums générés sont inversement proportionnels aux rendements fromagers frais. Ceci peut être expliqué par le fait que les peptides générés lors de la coagulation du lait par la Cardosine A, sont relativement, de grandes tailles ce qui permet de garder l'eau à l'intérieur du réseau caséique. Les coagulum obtenus seront donc, plus humides est plus lourds. Par contre, la Cardosine B de par sa faible spécificité, engendre des peptides de faibles tailles ce qui accélère l'exsudation du lactosérum et mène par conséquent, à des coagulum plus secs. Dans leur étude portant sur les extraits des fleurs de 13 cultivars de cardon, Gomes *et al.*, (2019) ont obtenu des résultats nettement inférieurs aux nôtres. En effet, les auteurs ont souligné des rendements fromagers frais compris entre 22.8 et 28.9 g/100mL et des rendements sur base sèche compris entre 4.5 et 5.2 g/100g.

D'autre part, par comparaison à la présure, l'utilisation des protéases des fleurs de cardon, à l'état pur ou non, engendre des pertes en termes de rendements fromagers. Ceci est un inconvénient qui peut être un facteur limitant de l'utilisation de ces protéases en industrie. La standardisation du lait par l'enrichissement de son extrait sec total peut être un moyen pour améliorer les rendements. Les faibles rendements fromagers obtenus par les coagulants végétaux en général dont l'extrait des fleurs de cardon ont été soulignés par de nombreuses études (Barbosa *et al.*, 1986 ; Faro *et al.*, 1992 ; Roseiro *et al.*, 2003 ; Jacob *et al.*, 2011 ; Shah *et al.*, 2014). Les auteurs sont en concordance



à imputer ces pertes aux activités non spécifiques et excessives des coagulants d'origine végétale en vis-à-vis les protéines du lait.

**Tableau 12.** Rendements fromagers théoriques sur le lait standard (IDF), des préparations enzymatiques étudiées. ALG1 : fleurs du cardon spontané algérien *C. cardunculus L. var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé algérien *C. cardunculus L. var. atilis* ; POR : fleurs références ;

	Rendement fromager frais (g/100 mL du lait)	Rendement sur base sèche (g/100g du lait)	Volume du lactosérum (mL)
ALG1 Extrait brut	44.5 ± 0.7 <sup>b,A</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>b,A</sup>	57.8 ± 1.1 <sup>a,A</sup>
ALG1 Exclusion mol	45.6 ± 0.4 <sup>b,A</sup>	5.6 ± 0.1 <sup>b,A</sup>	55.8 ± 2.9 <sup>a,A</sup>
ALG1 Cardosine A <sub>0</sub>	45.2 ± 1.2 <sup>b,A</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>ab,A</sup>	53.4 ± 2.1 <sup>ab,A</sup>
ALG1 Cardosine A	50.1 ± 1.0 <sup>a,A</sup>	7.1 ± 0.3 <sup>a,A</sup>	48.9 ± 2.4 <sup>b,A</sup>
ALG1 Cardosine B	48.3 ± 2.2 <sup>ab,A</sup>	8.3 ± 0.4 <sup>a,A</sup>	59.2 ± 1.3 <sup>a,A</sup>
ALG2 Extrait brut	43.3 ± 0.8 <sup>c,A</sup>	5.1 ± 0.7 <sup>b,A</sup>	57.3 ± 1.1 <sup>a,A</sup>
ALG2 Exclusion mol	45.2 ± 1.2 <sup>bc,A</sup>	6.4 ± 1.2 <sup>ab,A</sup>	58.2 ± 0.3 <sup>a,A</sup>
ALG2 Cardosine A <sub>0</sub>	44.7 ± 2.2 <sup>dc,A</sup>	6.2 ± 1.8 <sup>ab,A</sup>	56.1 ± 2.2 <sup>a,A</sup>
ALG2 Cardosine A	53.5 ± 3.1 <sup>a,A</sup>	6.8 ± 0.8 <sup>ab,A</sup>	49.6 ± 2.1 <sup>b,A</sup>
ALG2 Cardosine B	47.0 ± 2.0 <sup>b,A</sup>	8.1 ± 0.6 <sup>a,A</sup>	61.3 ± 1.6 <sup>a,A</sup>
POR Extrait brut	45.4 ± 2.1 <sup>c,A</sup>	6.1 ± 2.3 <sup>a,A</sup>	56.7 ± 1.8 <sup>a,A</sup>
POR Exclusion mol	44.4 ± 2.3 <sup>c,A</sup>	4.6 ± 1.4 <sup>b,B</sup>	56.4 ± 1.3 <sup>a,A</sup>
POR Cardosine A <sub>0</sub>	47.1 ± 1.3 <sup>b,A</sup>	6.2 ± 2.2 <sup>a,A</sup>	52.5 ± 2.2 <sup>ab,A</sup>
POR Cardosine A	50.2 ± 0.5 <sup>a,A</sup>	6.1 ± 1.8 <sup>a,A</sup>	48.4 ± 1.5 <sup>b,A</sup>
POR Cardosine B	44.9 ± 1.2 <sup>c,B</sup>	8.4 ± 2.4 <sup>a,A</sup>	57.6 ± 2.1 <sup>a,A</sup>
Présure	54.91 ± 1.7	8.93 ± 0.1	47.8 ± 2.6

<sup>a,b,c</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres minuscules, indiquent des différences significatives entre les groupes d'enzymes dans la même variété ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres majuscules, indiquent des différences significatives entre les variétés pour le même groupe d'enzyme ( $p < 0.05$ ).

#### II.2.4. Les propriétés coagulantes et comportement des gels estimés par l'Optigraph

La coagulation du lait est la première étape de la fabrication d'un fromage qui peut être considérée comme le résultat d'un processus dans lequel la caséine et les matières grasses sont concentrées après élimination du lactosérum. Le comportement du lait lors de la coagulation joue un rôle important sur le bon déroulement des étapes ultérieures de la fabrication fromagère (Martin *et*

Coulon, 1995 ; Hurtaud *et al.*, 2001). Les caractéristiques rhéologiques du coagulum ont un rôle déterminant sur les pertes de matière sèche dans le sérum et les caractéristiques finales d'un fromage (Kerjean, 1984). De ce fait, elles influent directement les propriétés sensorielles du produit fini et les rendements fromagers obtenus en fin de fabrications (Aleandri *et al.*, 1989 ; Hurtaud *et al.*, 1991 ; Colin *et al.*, 1992).

De nombreux tests pour l'estimation de l'aptitude à la coagulation du lait par les enzymes sont connus. Ils s'attachent à caractériser les phases de coagulation et d'égouttage en définissant les vitesses de coagulation et de raffermissement du coagulum. Ces mesures permettent de caractériser le comportement du lait lors de la formation du gel. Dans cette partie d'étude, l'*Optigraph* a été utilisé comme moyen pour étudier les caractéristiques technologiques des protéases des fleurs de cardon ainsi que l'évolution des propriétés rhéologiques des gels lactiques durant l'étape de coagulation. Comme les essais ont été menés sous les mêmes conditions fixes (température, pH et même lait), nous croyons que les différences seront dues au type de la préparation d'enzyme.

Les résultats des paramètres technologiques étudiés sur le lait standard (IDF) sont rapportés dans le [tableau 13](#). Les 6 paramètres mesurés par l'*Optigraph* sont significativement influencés par le type de la préparation enzymatique utilisée. Le temps de floculation R (ou vitesse de coagulation) était plus court dans le cas des extraits bruts par comparaison aux cardosines pures. La coagulation par l'extrait obtenu à partir de la variété ALG1 était la plus rapide ( $429.5 \pm 3.5$  s). Quant à la cardosine A<sub>0</sub> de la variété POR présentait le temps le plus long ( $1648.5 \pm 46.5$ ). Cependant, ces temps de floculation ne concordent pas avec les résultats des activités coagulantes obtenus précédemment. A priori, les enzymes ayant les activités coagulantes les plus élevées doivent avoir des temps de floculation les plus courts, ce que n'était pas le cas. Ceci est probablement à l'effet des différences des propriétés du lait (pH et température) entre les deux protocoles. Dans leur travail Gomes *et al.*, (2019) ont noté des variations de ce même temps R lors de l'étude de l'aptitude de coagulation du lait par les extraits de fleurs de 13 cultivars de cardon de la région *Alentajo* au Portugal. Les auteurs ont justifié les différences constatées par la probable diversité des profils en cardosines contenues par les extraits bruts.

A son tour, le paramètre vitesse de raffermissement OK20, était significativement impacté par le type de l'enzyme utilisée et varie d'une Cardosine à une autre. Ce paramètre en réalité, ne dépend pas directement de l'enzyme coagulante mais plus de l'environnement et de la composition du lait

après la déstabilisation de la caséine  $k$ , c'est-à-dire, des produits de l'hydrolyse des caséines (Hurtaud *et al.*, 2001). C'est un paramètre qui peut donc, nous renseigner d'une autre manière, sur la spécificité de nos enzymes en vis-à-vis des caséines. En général, nos résultats montrent que les cardosines A et B atteignent la fermeté standard (équivalente à 2.5 volt) plus rapidement que les extraits bruts. Les cardosines A<sub>0</sub> quant à elles, ont les vitesses de raffermissement les plus lentes.

Les cinétiques de la coagulation du lait par les cardosines, représentées par l'évolution de la fermeté des gels lactiques en fonction du temps sont rapportées dans la [Figure 43](#). Ici aussi, des différences significatives ont été constatées, elles sont dues au type de la cardosine utilisée (A<sub>0</sub>, A ou B) mais aussi à son origine (ALG 1, ALG 2 ou POR). L'approche utilisée nous a permis de visualiser les deux phases qui aboutissent à la coagulation par les cardosines : La phase enzymatique et la phase de raffermissement du gel. Une première phase (enzymatique) latente où la fermeté mesurée n'est pas significativement différente de zéro. Elle correspond au temps de floculation (R) et elle est plus ou moins lente selon la fraction enzymatique utilisée. C'est pendant cette phase que se déroule l'hydrolyse de la caséine  $k$  et l'agrégation des micelles de caséines (Noel *et al.*, 1989). L'organisation du réseau et le raffermissement du gel se traduisent ensuite par une augmentation de la fermeté, d'abord assez rapide, puis plus lente. La fermeté tend alors vers un plateau qui matérialise un comportement rhéologique stable du coagulum. Ce plateau est atteint plus ou moins rapidement selon la fraction de Cardosine utilisée. Il est atteint très tôt après utilisation des fractions de cardosines A et B, tandis que dans le cas des extraits bruts et des fractions A<sub>0</sub> il est atteint moins rapidement. Des profils de cinétique similaires ont été présentés par [Gomes \*et al.\*, \(2019\)](#) pour les extraits bruts des fleurs de 13 cultivars de cardon de la région *Alentajo* au Portugal. Egalement, des résultats comparables, utilisant la présure comme agent coagulant, sont présentés par [Noel \*et al.\*, \(1989\)](#). Toutefois, les auteurs ont rapporté des temps plus longs pour atteindre le comportement rhéologique caractéristique du coagulum à l'équilibre.

L'étude des corrélations par l'analyse de la composante principale (ACP) des caractères technologiques des cardosines est illustrée dans la [figure 44](#). Les résultats montrent que les deux premières dimensions du modèle expliquent 81.99% de la variance totale. La première composante principale (PC1) comptabilisant 41.97 % de la variance totale est dominée positivement par l'activité spécifique et les paramètres de fermeté (AR, A2R, A20 et A40) et négativement par la concentration en protéines et la vitesse de raffermissement OK20. La seconde composante

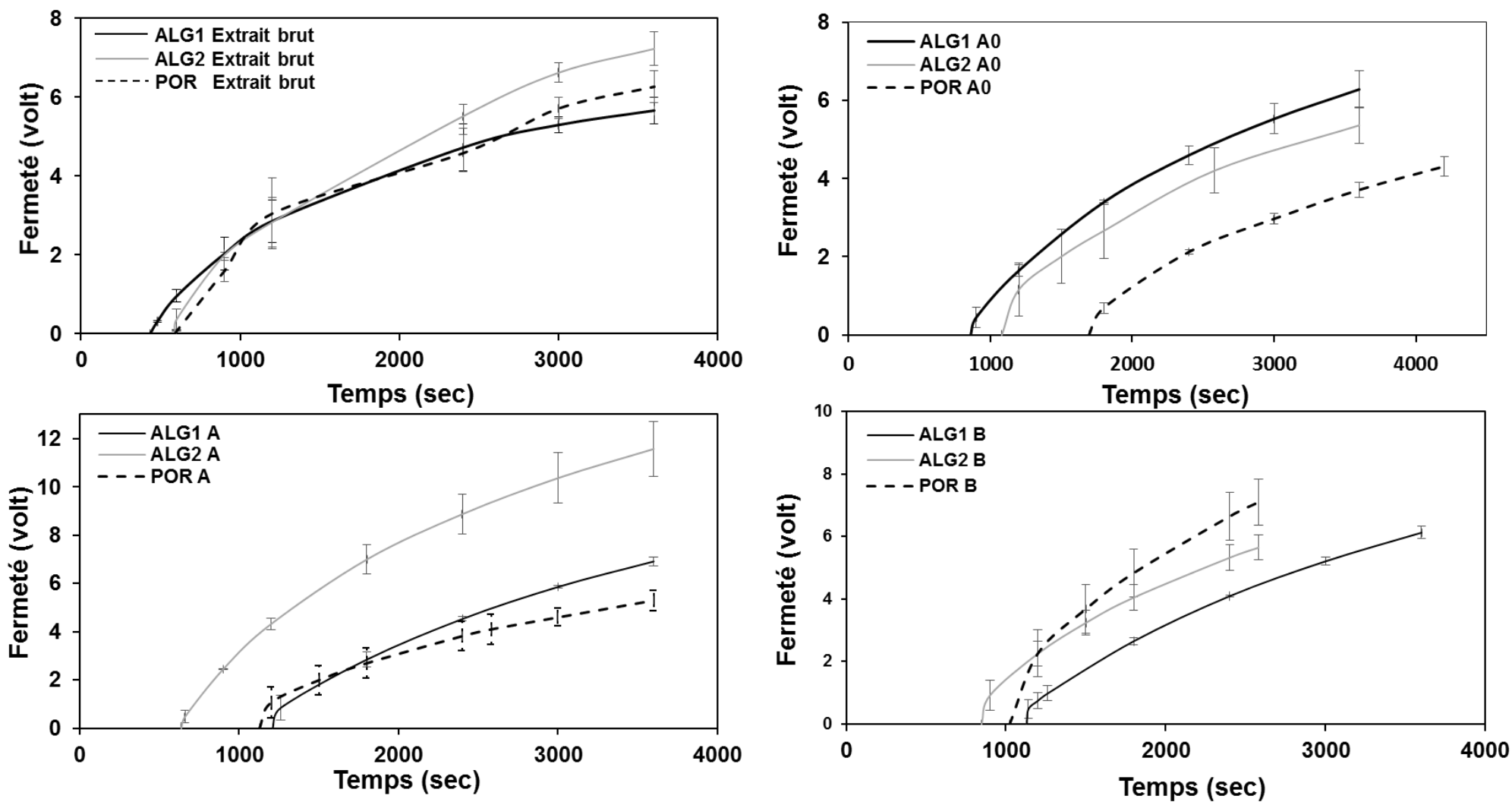
principale (PC2) a compté 40.02 % de la variation totale et est dominée positivement par le temps de floculation (R) et négativement par la concentration des protéines et les paramètres A20 et A40 (Figure 44 a.). La distribution générée par l'analyse a réparti nos Cardosines en deux groupes : I et II (Figure 44 b.). Le groupe I composé des extraits bruts présente un taux élevé des protéines, un temps de floculation (R) rapide et faible activité spécifique. Quant au groupe II il est composé des fractions pures de Cardosines A<sub>0</sub>, A et B de la variété ALG1, des Cardosines A<sub>0</sub> et B de ALG2 et de la fraction A de la variété référence (POR). Ce groupe présente une activité spécifique élevée, une vitesse de raffermissement (OK20) et des paramètres de fermeté moyens. Les fractions POR A<sub>0</sub> POR B et ALG2 A n'appartiennent à aucun groupe. La POR A<sub>0</sub> a montré de pauvres propriétés coagulantes avec un long temps R, une faible vitesse de raffermissement OK 20 et un coagulum de faible fermeté. Contrairement aux fractions POR B et ALG2 A qui engendrent des coagulums trop fermes.

Par ailleurs, nous avons constaté des différences hautement significatives entre les caractéristiques technologiques les protéases des fleurs de cardon étudiées et celles de la présure. En effet, par comparaison à la présure, les Cardosines ont une vitesse de raffermissement (OK 20) trop lente et engendrent des coagulums moins fermes. Ceci peut être expliqué par la faible spécificité des Cardosines en vis-à-vis les caséines du lait comparée à la présure. Ce qui confirme les résultats rapportés par plusieurs travaux (Heimgartner *et al.*, 1990 ; Faro *et al.*, 1992 ; Verissimo *et al.*, 1996 ; Roseiro *et al.*, 2003 ; Gomes *et al.*, 2019).

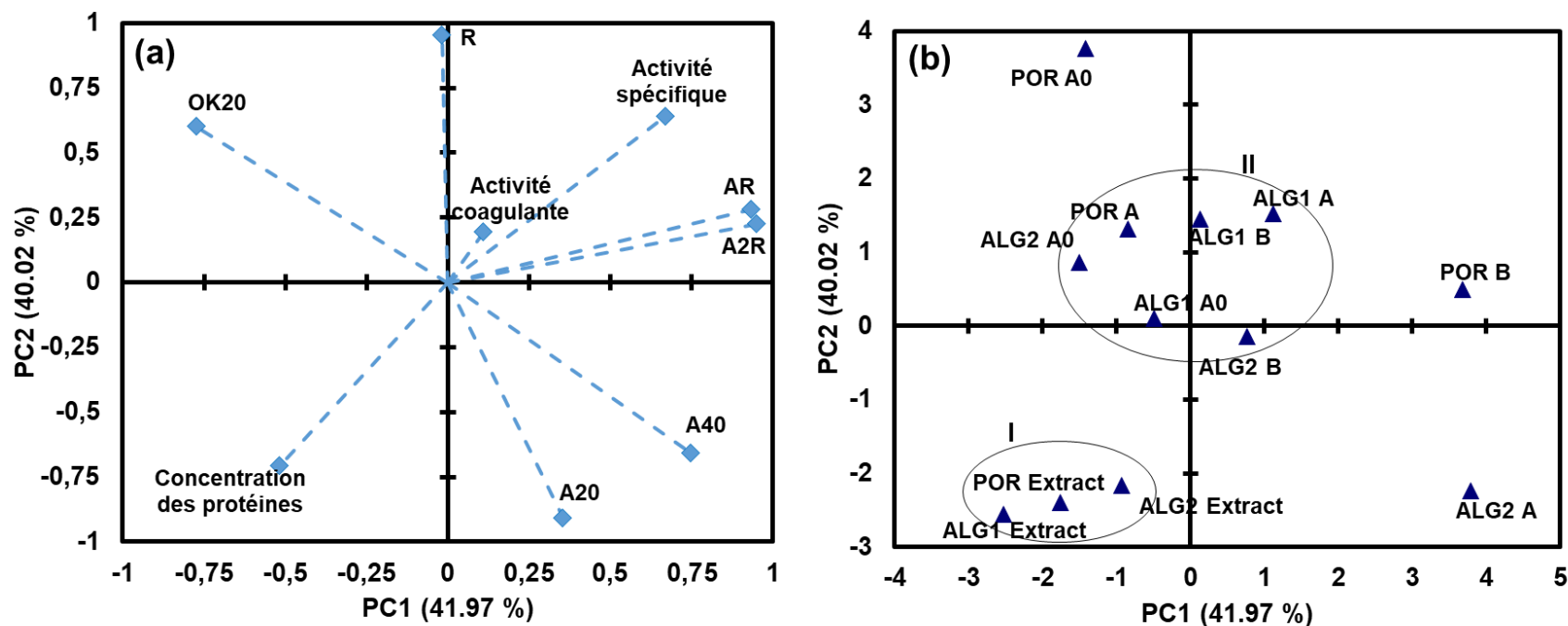
**Tableau 13.** Propriétés coagulantes des protéases des fleurs de cardon mesurées par l'Optigraph sur un lait standard (IDF). ALG1 : fleurs du cardon spontané algérien *C. cardunculus L. var. sylvestris* ; ALG2 : fleurs du cardon cultivé algérien *C. cardunculus L. var. altilis* ; POR : fleurs références ; R : Temps de floculation, AR : Texture après deux fois le temps de floculation R ; A2R : Texture après trois fois le temps de floculation R ; A20 : Texture après 20 minutes de coagulation ; A40 : Texture après 40 minutes de coagulation ; OK 20 : La vitesse de raffermissement, correspond au temps nécessaire pour atteindre une fermeté standard= 2.5 volt.

	<b>R (secondes)</b>	<b>AR (volt)</b>	<b>A2R (volt)</b>	<b>A20 (volt)</b>	<b>A40 (volt)</b>	<b>OK 20 (secondes)</b>
<b>ALG1 Extrait brut</b>	429.5 ± 3.5 <sup>c,B</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>c,A</sup>	3.1 ± 0.6 <sup>c,A</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>a,A</sup>	4.7 ± 1.0 <sup>a,A</sup>	679.0 ± 193.0 <sup>a,A</sup>
<b>Cardosine A0</b>	796.0 ± 56.0 <sup>b,C</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>b,AB</sup>	4.7 ± 0.6 <sup>bc,A</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b,A</sup>	4.6 ± 0.2 <sup>a,A</sup>	662.5 ± 45.5 <sup>a,C</sup>
<b>Cardosine A</b>	1089.5 ± 120.5 <sup>a,A</sup>	4.0 ± 0.5 <sup>a,A</sup>	6.4 ± 0.8 <sup>a,A</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>c,B</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>a,B</sup>	595.5 ± 12.5 <sup>a,B</sup>
<b>Cardosine B</b>	1067.5 ± 63.5 <sup>a,A</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>ab,B</sup>	5.5 ± 0.4 <sup>ab,B</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>c,B</sup>	4.1 ± 0.0 <sup>a,C</sup>	682.5 ± 10.5 <sup>a,A</sup>
<b>ALG2 Extrait brut</b>	589.5 ± 2.5 <sup>c,A</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>b,A</sup>	4.4 ± 1.0 <sup>b,A</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>b,A</sup>	5.5 ± 1.3 <sup>bc,A</sup>	592.5 ± 155.5 <sup>b,A</sup>
<b>Cardosine A0</b>	922.5 ± 182.5 <sup>a,B</sup>	2.7 ± 0.0 <sup>b,B</sup>	4.2 ± 0.0 <sup>b,A</sup>	1.2 ± 0.7 <sup>b,A</sup>	3.7 ± 0.7 <sup>c,A</sup>	830.0 ± 159.0 <sup>a,B</sup>
<b>Cardosine A</b>	608.5 ± 28.5 <sup>bc,B</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>a,A</sup>	7.1 ± 0.9 <sup>a,A</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>a,A</sup>	8.9 ± 0.8 <sup>a,A</sup>	298.5 ± 28.5 <sup>c,C</sup>
<b>Cardosine B</b>	745.5 ± 101.5 <sup>ab,B</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>ab,B</sup>	5.0 ± 0.2 <sup>b,B</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>b,A</sup>	5.3 ± 0.4 <sup>bc,B</sup>	523.5 ± 16.5 <sup>b,A</sup>
<b>POR Extrait brut</b>	587.0 ± 00.0 <sup>c,A</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>b,A</sup>	4.0 ± 0.8 <sup>b,A</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>a,A</sup>	5.0 ± 1.1 <sup>a,A</sup>	609.5 ± 159.5 <sup>b,A</sup>
<b>Cardosine A0</b>	1648.5 ± 46.5 <sup>a,A</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>ab,A</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>b,A</sup>	0.0 <sup>c,B</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>b,B</sup>	1016.0 ± 111.0 <sup>a,A</sup>
<b>Cardosine A</b>	954.0 ± 176.0 <sup>b,A</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>b,B</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>b,B</sup>	1.0 ± 0.6 <sup>b,B</sup>	3.8 ± 0.6 <sup>b,B</sup>	782.0 ± 93.0 <sup>b,A</sup>
<b>Cardosine B</b>	878.5 ± 154.5 <sup>b,B</sup>	4.6 ± 0.3 <sup>a,A</sup>	7.2 ± 0.3 <sup>a,A</sup>	2.3 ± 0.7 <sup>ab,A</sup>	6.6 ± 0.8 <sup>a,A</sup>	373.5 ± 6.5 <sup>c,B</sup>
<b>Présure</b>	752,5±12,5	2,53±0,03	4,43±0,07	4,03±0,01	7,58±0,02	216±44

<sup>a,b,c</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres minuscules, indiquent des différences significatives entre les groupes d'enzymes dans la même variété ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup> dans la même colonne les moyennes avec différentes lettres majuscules, indiquent des différences significatives entre les variétés pour le même groupe d'enzyme ( $p < 0.05$ ).



**Figure 43.** Evolution en fonction du temps, des propriétés rhéologiques des gels lactiques obtenus après coagulation avec l'utilisation des protéases des fleurs de cardon.



**Figure 44.** Analyse en composantes principales (ACP) des caractères technologiques des cardosines. **(a)** : Projection des caractères technologiques des cardosines (évalués sur un lait standard) sur le plan défini par les deux premières composantes principales (PC1 et PC2). **(b)** : Projection des extraits bruts et des cardosines pures sur le plan défini par les deux premières composantes principales (PC1 et PC2), projection basée sur les moyennes des caractères technologiques mesurées sur le lait standard.

## II.2.5. Les interactions impliquées dans la formation des gels obtenus par les cardosines

L'utilisation d'agents dissociant, permet de mettre en évidence la nature des interactions impliquées dans la formation et le maintien de la structure du réseau protéique du coagulum. Le pourcentage des protéines dissociées par rapport aux protéines totales, reflète l'action de l'agent utilisé sur le réseau du gel, et par conséquent la présence d'interactions spécifiques détruites par cet agent. Les liaisons hydrogènes sont détruites par l'urée alors que les liaisons hydrophobes sont sensibles à l'action des détergents tels que le SDS, les liaisons calciques sont détruites par les agents chélateurs tels que l'EDTA (Cheftel *et al.*, 1985 ; Lefebvre-Cases *et al.*, 1998 ; Boughellout, 2007 ; Benyahia-Krid *et al.*, 2010 ; Zikiou, 2013). Durant cette partie du travail, les fleurs de la variété ALG1 sont les seules utilisées. Nous avons étudié les interactions impliquées dans la formation et le maintien des gels lactiques obtenus après coagulation du lait standard, par l'extrait brut et les fractions de Cardosines purifiées à partir des fleurs de cette variété. L'étude était menée par comparaison à la présure et les agents chimiques utilisés sont : l'urée pour identifier les liaisons hydrogène, l'EDTA pour les liaisons calciques et le SDS pour les liaisons hydrophobes.

### II.2.5.1. Importance des liaisons hydrogène

Le dosage des protéines dissociées suite à l'action de l'urée nous permet de faire l'approche des liaisons hydrogène impliquées dans la formation des coagulums. Les taux de dissociation des protéines des gels obtenus par l'extrait brut, les Cardosines purifiées et la présure, en fonction de la concentration de l'urée sont montrés dans la [figure 45 a](#). Nous avons constaté que l'urée joue un rôle dissociant important sur tous les gels obtenus par toutes les préparations enzymatiques étudiées. Pour les concentrations d'urée de 1 M, 2 M, 3 M et 4 M, les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives (seuil de confiance de 5%) entre les gels. Cependant, aux concentrations égales à 5 M et 6 M, des différences significatives sont enregistrées. En effet, les gels obtenus par la Cardosine A et la présure ont des taux de dissociation (respectivement, 58 et 57 % à 5 M et 69 et 67 % à 6M) inférieurs à ceux autres gels. Quant aux coagulums obtenus par l'extrait brut des fleurs et par la Cardosine B ont présenté à ces concentrations, les taux de dissociations les plus élevés (respectivement, 64 et 61 % à 5 M et 79 et 75 % à 6 M). Ces résultats confirment ceux que nous avons déjà rapportés dans un travail précédent (Zikiou, 2013) dans lequel, nous avons obtenus des taux de dissociations par l'urée plus importants pour le gel de l'extrait de fleurs de cardon par comparaison à ceux du gel présure. Dans un travail similaire, Benyahia-krid *et al.* (2010) ont étudié l'effet de l'urée sur la dissociation des protéines d'un gel



obtenu par l'utilisation de la pepsine du poulet comme agent coagulant. Les auteurs ont rapporté pour une concentration de l'urée de 6M, un taux de dissociation des protéines est de 61,6% pour le gel présure et 59,2% pour le gel pepsine. Quant à [Lefebvre-Cases et al. \(1998\)](#), qui ont essayé de comparer l'effet de l'urée sur un gel issu d'une coagulation acide et sur un gel présure, ils ont mentionné pour la même concentration d'urée (6M) des taux de dissociation de 64% et 81% pour respectivement, le cas du gel présure, et du gel acide. Dans la limite de ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait brut des fleurs de cardon et la cardosine B engendrent des gels avec des taux de dissociation des protéines par l'urée comparables à celui d'un gel acide. D'autre part, les taux de dissociations dans le cas du gel obtenu par la cardosine A est plus similaire à ceux des gels présure et pepsine. Ceci implique que les liaisons hydrogène dans les gels de l'extrait brut et cardosine B sont plus importantes que dans ceux obtenus par la cardosine A et la présure.

#### **II.2.5.2. Importance des liaisons calciques**

L'éthylenediamine tetracetic acide (EDTA), est considéré comme étant un agent chélateur de calcium, son effet sur les gels cardosine et présure est montré dans la [figure 45 b](#). Des résultats comparables ont été obtenus et l'analyse de la variance des résultats obtenus ne montre aucune différence significative entre les tous gels étudiés au seuil de probabilité de 5%. Les taux de dissociation obtenus sous l'effet d'une concentration de 2 mM de l'EDTA, varient entre 68 et 75% pour atteindre des taux entre 86 et 94 % à une concentration de 6 mM. Ces résultats sont compatibles à ceux que nous avons rapportés dans notre précédent travail ([Zikiou, 2013](#)). Ils sont aussi similaires à ceux mentionné par [Lefebvre-Cases et al. \(1998\)](#), qui ont rapporté que pour une concentration de 2mM le taux de dissociation des protéines est de 75,9% pour le gel présure mais un taux seulement, de 26,7% pour le gel acide. Cependant, nos résultats sont plus élevés que ceux obtenus par [Benyahia-Krid et al. \(2010\)](#) qui mentionnent à une concentration de 100 mM d'EDTA, le taux de dissociation était seulement de 44,1% pour le gel présure et 41,4% pour le gel pepsine.

#### **II.2.5.3. Importance des liaisons hydrophobes**

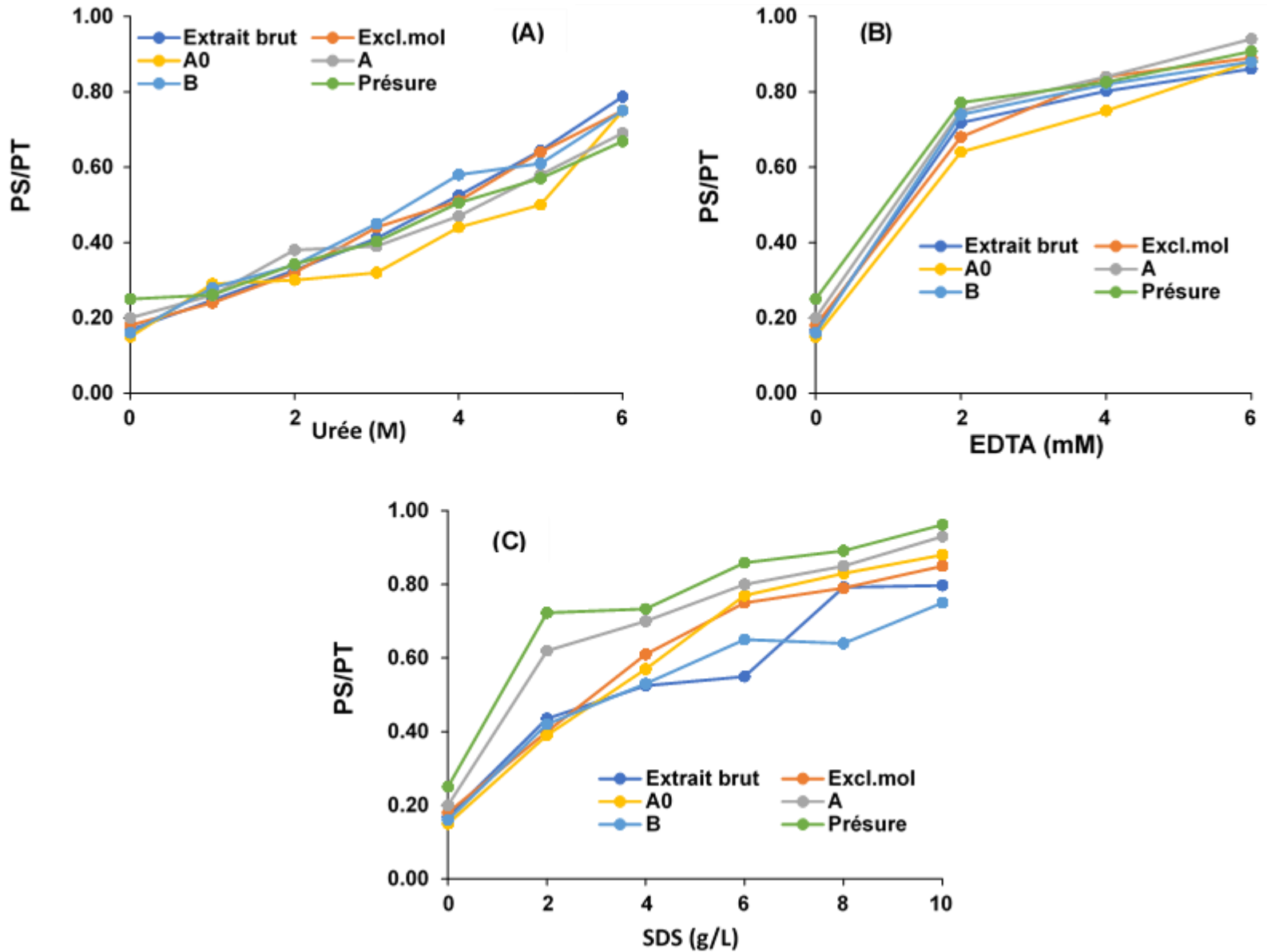
Le sodium dodecyl sulfate (SDS) interagit avec les groupements non-polaires des chaînes protéiques ce qui implique la destruction des liaisons hydrophobes. Les taux de dissociation des protéines des gels obtenus par nos agents coagulants en fonction de la concentration du SDS sont illustrés dans la [figure 45 c](#). Les résultats obtenus montrent que le SDS également, semble avoir un effet important sur les gels étudiés. En effet, à une concentration à peine de 2 g/l de SDS, des taux

de dissociations de protéines compris entre 40 et 62 % sont enregistrés pour les coagulums obtenus par les différentes protéases des fleurs de cardon. A une concentration de 10g/l, des taux entre 75% (le cas de la Cardosine B) et 93% (le cas de la Cardosine A) sont atteints. Néanmoins, l'action du SDS diffère d'une préparation enzymatique à une autre. En effet la dissociation par cet agent chimique est plus importante dans le cas des gels obtenus par la Cardosine A et la présure (respectivement, 93 et 96 % à une concentration de 10g/L). Le gel de la Cardosine B est celui qui engendre les taux de dissociation les moins élevés (seulement 75% à une concentration de SDS de 10g/L). De même, ces résultats concordent avec ceux que nous avons obtenus lors de notre travail précédent (Zikiou, 2013) durant lequel nous avons constaté que le gel obtenu par l'extrait floral de cardon engendre sous effet du SDS, des taux de dissociations de protéines inférieurs à ceux du gel présure. Dans leur travail, Benyahia-krid *et al.* (2010) n'ont constaté aucune différence significative de l'effet du SDS entre les deux gels pepsine de poulet et présure au seuil de probabilité égal à 5%. Quant à Lefebvre-cases *et al.* (1998), ils ont mentionné que le coagulum issu d'une coagulation acide ne libère que 55% de protéines sous l'effet du SDS (6 g/L), contre un taux de contre 90% pour le gel présure. En comparant ces travaux précédant aux résultats que nous avons obtenus, nous pouvons dire que l'effet du SDS sur le gel Cardosine A est plus important par rapport aux autres Cardosines, et comparable à celui remarqué sur le gel présure. Contrairement à au gel de Cardosine B et de l'extrait brut qui présentent des taux de dissociation qui sont plus comparables à ceux du gel acide. Nous pouvons conclure donc, que les liaisons hydrophobes dans le gel de la Cardosine A sont plus importantes que dans le cas des gels d'autres Cardosines et sont comparables à celles des gels présure et pepsine. Quant aux liaisons hydrophobes dans les gels de l'extrait floral brut et de la Cardosine B, elles sont moins importantes et comparables à celles d'un coagulum obtenu par une coagulation acide.

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

- ✓ Les trois types de liaisons (hydrophobes, hydrogène et calciques) jouent un rôle important dans la formation et le maintien des gels obtenus par les différentes protéases des fleurs de cardon ;
- ✓ Les liaisons calciques sont impliquées dans la formation des gels de Cardosines de la même manière que dans le gel présure et elles sont plus importantes que dans le cas du gel acide ;
- ✓ Les liaisons hydrophobes et les liaisons hydrogène dans le gel obtenu par la Cardosine A sont comparables à celles du gel présure ;

✓ L'extrait brut des fleurs de cardon, la fraction Excl.mol et les Cardosines A<sub>0</sub> et B engendrent des coagulums dont les liaisons hydrophobes et les liaisons hydrogène contribuent d'une manière comparable à celle du gel acide.



**Figure 45.** Effets des agents dissociant, (A) : l'urée, (B) : l'EDTA et (C) : l'SDS sur la solubilisation des protéines des gels obtenus après coagulation par les cardosines et par la présure. PS/PT : protéines solubles /protéines totales ; Excl.mol : fraction active obtenue après chromatographie d'exclusion moléculaire.

## II.3. Résultats de l'utilisation des fleurs de cardon algérien dans la fabrication du fromage type *Serra da Estrela*

### II.3.1. Composition physico-chimique du lait utilisé

Les caractéristiques physico-chimiques du lait de brebis utilisé (Tableau 14) sont globalement, similaires à ceux rapportés dans de précédentes études (Barbosa *et al.*, 1990 ; Macedo *et al.*, 1993). Les taux de matière grasse et des protéines totales de ce type de lait, sont directement influencés par la saison de lactation (Kuchtik *et al.*, 2008). Le lait que nous avons utilisé est collecté en mois de Novembre, période dans laquelle ces taux sont relativement faibles. Plusieurs études précédentes montrent que le contenu du lait en matière grasse et protéines a la tendance de croître lors de la saison du printemps (entre les mois de février et mai) (Vesna *et al.*, 2002 ; Albenzio *et al.*, 2004 ; Kuchtik *et al.*, 2008 ; Komprej *et al.*, 2012 ; Konecna *et al.*, 2019 ; Fogueiro *et al.*, 2020). L'échantillon du lait analysé a également, montré une acidité plus élevée que ce qui a été rapporté dans certaines études (Barbosa *et al.*, 1990 ; Fogueiro *et al.*, 2020) mais reste concordante avec les exigences recommandées pour la fabrication du fromage D.O.P. *Serra da Estrela* (Rodrigues *et al.*, 2000).

**Tableau 14.** Caractéristiques physico-chimiques du lait de brebis utilisé (lait collecté en mois de Novembre 2018).

Matière grasse (% sur base sèche)	29.81 ± 0.15
Protéines totales (% sur base sèche)	33.48 ± 0.41
Matière sèche (%)	16.75 ± 0.11
Acidité (cm <sup>3</sup> NaOH/ dm <sup>3</sup> )	29.16 ± 0.22

### II.3.2. Caractéristiques des fromages obtenus

Le fromage *Serra da Estrela* est connu à avoir une texture semi-solide, un attribut très apprécié chez le consommateur (Tavaria *et al.*, 1998 ; Fogueiro *et al.*, 2020). Les résultats obtenus montrent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les deux fromages dans les attributs sensoriels décrivant la texture (Tableau 15). Les fromages fabriqués par les fleurs algériennes ont présenté des valeurs de dureté de la croûte plus élevées que celles du fromage témoin, fabriqué et commercialisé par la fromagerie. Ceci est peut-être expliqué par l'effet de la différence des profils

en cardosines contenues dans les deux échantillons des fleurs de cardon. L'agent coagulant est le principal facteur responsable de la protéolyse primaire, en effet, certaines études précédentes ont montré que le type de l'agent coagulant utilisé a une influence directe sur la texture des fromages principalement, durant les premiers stades de l'affinage (McSweeney *et al.*, 2017 ; Fogueiro *et al.*, 2020). De plus, les variations de texture du fromage influent aussi sur la libération des composés aromatiques lors de la mastication et donc, sur la perception des saveurs (McSweeney *et al.*, 2017 ; Fogueiro *et al.*, 2020).

**Tableau 15.** Attributs sensoriels et physico-chimiques des fromages *Serra da Estrela* fabriqués par les fleurs de la variété ALG1 et du fromage témoin (fabriqué et commercialisé par la fromagerie).

Attributs		Fromage témoin	Fromage fabriqué par les fleurs ALG 1
		(moyenne ± ET)	(moyenne ± ET)
Couleur des fromages (niveau du jaune)	Couleur de la croûte	8.17 ± 1.20	8.13 ± 1.12
	Couleur de la pâte	5.24 ± 0.35	5.18 ± 0.87
Texture des fromages	Dureté	3.25 ± 0.5	5.16 ± 0.13
	Adhésivité	1.82 ± 0.4	2.23 ± 1.9
	Elasticité	1.76 ± 0.3	1.96 ± 0.2
	Cohésion	1.35 ± 0.13	1.75 ± 0.4
Paramètres physico-chimiques	MG (% base sèche)	36.12 ± 0.53	29.62 ± 2.55
	Protéine (% base sèche)	47.13 ± 2.04	55.16 ± 1.17
	Humidité (%)	51.8 ± 1.4	50.2 ± 0.50

Concernant la composition physico-chimique, les fromages fabriqués par les fleurs algériennes présentaient une teneur en protéines plus élevée, néanmoins, les fromages témoins avaient un taux de matière grasse plus élevé. Les protéines et la matière grasse sont des composants déterminants dans le développement des caractéristiques sensorielles finales des fromages. De plus son rôle important dans la texture des fromages, la matière grasse est une source de plusieurs désirables

attributs sensoriels (McSweeney *et al.*, 2017). Des changements dans le contenu en matière grasse peuvent induire des modifications dans la matrice du fromage notamment, lors de sa dégradation dans la bouche pendant la mastication. Ceci peut affecter les taux de libération des composés volatils qui impliqués dans le développement de la saveur (Leksrisonpong *et al.*, 2010 ; McSweeney *et al.*, 2017 ; Fogueiro *et al.*, 2020). Par ailleurs, durant l'affinage, les variations de la protéolyse peuvent modifier considérablement la composition des fromages en protéines. Ce qui influe sur les liaisons avec les composés volatils et donc sur leurs habilités à être libérés dans la bouche (McSweeney *et al.*, 2017 ; Fogueiro *et al.*, 2020).

Aucune différence significative ( $p < 0.05$ ) de couleur n'est signalée et pour la croûte et pour la pâte des fromages.

Par conséquent, l'utilisation des fleurs issues de différentes variétés de cardon comme agent de coagulation, peut engendrer des modifications sur la composition physico-chimique, la texture la saveur et sur le profil aromatique des fromages. Ceci offre une large diversité qui peut être adaptée pour satisfaire le plus possibles les différentes exigences des consommateurs.

#### **II.4. Effet du séchage comme procédé de conservation sur les protéases des fleurs de cardon**

La conservation des fleurs de cardon pour utilisation comme agent coagulant dans la fabrication des fromages, est l'un des problèmes majeurs rencontrés. En effet, la méthode traditionnelle de séchage couramment utilisée par les fermiers, semble avoir une influence significative sur l'activité enzymatique et la stabilité de ces fleurs. Ceci affecte considérablement la qualité finale des fromages fabriqués d'où la nécessité de l'optimisation de ce procédé (Martins *et al.*, 1996 ; Barracosa *et al.*, 2018).

Le présent chapitre est un travail effectué dans le cadre du projet *iCheese* (PDR2020-101-031002) financé par *Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 (PDR2020)* sous Portugal 2020 et à travers *Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural (FEADER)*.

En vue d'optimiser le procédé de conservation des fleurs de cardon par le séchage, nous avons mené une étude pour estimer les effets de différentes températures de séchage sur les Cardosines. Les essais ont été menés sur une variété portugaise *C. cardunculus var atililis* cultivée dans un champ expérimental appelé ESAV.

### II.4.1. Effet du séchage sur les profils enzymatiques des fleurs

Dans cette partie de l'étude, le protocole utilisé pour l'identification des profils en Cardosines des fleurs fraîches et séchées à différentes températures est un protocole optimisé. Pour l'élution des Cardosines, nous avons utilisé une colonne échangeuse d'ions (mono Q QHP) avec une meilleure performance de précision et avons optimisé le gradient de sel NaCl. Ce protocole permet la séparation des Cardosines A et B mais aussi dans la même étape, les différentes fractions de la Cardosine A<sub>0</sub> (les fractions E, F, G, H).

Les résultats obtenus sont présentés dans la [figure 46](#) et le [tableau 16](#). Tel que montré, les profils en Cardosines des fleurs varient selon la température du séchage. Qualitativement, l'effet du procédé de séchage sur les fleurs n'est pas significatif. Même si les temps d'élutions des fractions de Cardosines sont légèrement différents de ceux des fleurs fraîches.

**Tableau 16.** Effet des températures de séchage sur les profils quantitatifs des cardosines. Les résultats sont exprimés par le taux (%) de chaque fraction d'enzyme récupérée. 100% représente les taux contenus dans les fleurs fraîches.

	Extrait brut (%)	cardosine E (%)	cardosine F (%)	cardosine G (%)	cardosine H (%)	cardosine A (%)	cardosine B (%)
<b>Fleurs séchées à 40 °C</b>	85	98	99	65	77	68	42
<b>Fleurs séchées à 45 °C</b>	83	95	95	68	81	87	78
<b>Fleurs séchées à 50 °C</b>	93	100	99	86	98	88	77
<b>Fleurs séchées à 55 °C</b>	89	100	97	74	92	95	92
<b>Fleurs séchées à 60 °C</b>	88	95	100	78	93	92	81

Ces variations sont peut-être dues à des modifications des degrés de glycosylation des cardosines ce qui va se traduire par des modifications dans leurs charges globales. Cependant, le séchage des fleurs de cardon influe significativement sur leurs profils quantitatifs en cardosines. L'utilisation des températures relativement basses (40 et 45 °C) pour le séchage des fleurs, engendre des pertes comprises entre 15 et 17 % des taux de protéines totales contenues dans les extraits bruts. Dans ce cas, les cardosines G, A et B semblent être les plus affectées avec des pertes allant jusqu'à 35% pour la cardosine G, 32 % pour la cardosine A et peuvent atteindre les 58 % dans le cas de la

cardosine B. Le séchage des fleurs par des températures plus élevées (entre 50 et 60 °C) conserve mieux les profils qualitativement et quantitativement. En effet, nos résultats montrent que l'utilisation d'une température de 50 °C mène au profil le plus proche de celui des fleurs fraîches. Les pertes dans ce cas, ne dépassent pas les 7% du taux des protéines totales dans l'extrait brut, et la cardosine G est la cardosine plus affectée avec une perte de 14%. Également, nous avons constaté que les taux des cardosines A et B obtenus après séchage à 55 et 60 °C sont les plus élevés. Les cardosines E, F et H sont les plus stables et les mieux conservées telle qu'elle soit la température du séchage.

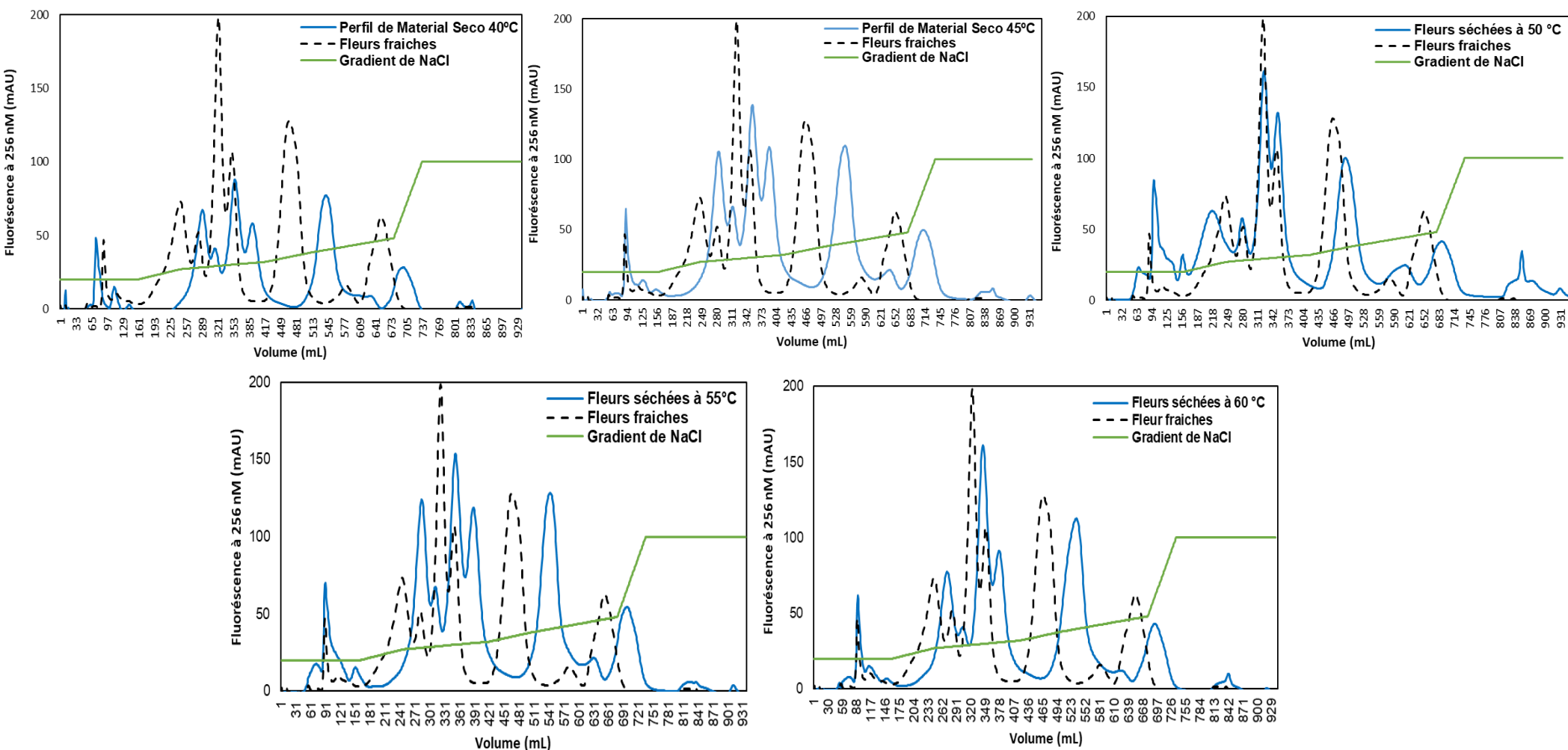
#### **II.4.2. Effet du séchage sur les caractéristiques technologiques des fleurs de cardon**

L'effet de la variation des températures de séchage sur : l'activité coagulante, l'activité protéolytique non spécifique et les propriétés rhéologiques des coagulums obtenus par les extraits bruts des fleurs est rapporté dans le [tableau 17](#). Globalement, d'après les résultats obtenus, des variations significatives dans quasiment tous les paramètres étudiés ont été observées. Ce qui prouve l'effet considérable du procédé de séchage sur les caractéristiques technologiques des fleurs de cardon.

L'activité coagulante des extraits des fleurs, est le paramètre le plus affecté. En effet, des activités comprises entre 28.3 et 49.5 IUMC/g (base sèche) ont été obtenue dans le cas des différents échantillons des fleurs séchées, contre une activité coagulante de 94.5 IUMC/g (base sèche) initialement enregistrée dans le cas des fleurs fraîches. Ce qui veut dire que les pertes en activité coagulante amputées au procédé du séchage, varient selon la température utilisée, entre 47 et 70%. Nos résultats montrent également, que le séchage des fleurs par une température comprise entre 50 et 55 °C conserve le mieux leur activité coagulante (des taux de conservation de 52 et 53 % respectivement pour un séchage à 50 et 55 °C). Ceci peut être expliqué par le fait que les fleurs séchées à ces températures-là présentent les profils enzymatiques les plus proches à celui des fleurs fraîches (comme montré précédemment). D'autre part, le séchage des fleurs à 60 °C a engendré le taux de pertes le plus élevé (70% de l'activité coagulante est perdue).

Aussi, nous avons constaté qu'aux températures 40, 45, 50 et 55 °C, le procédé de séchage n'influe pas significativement ( $p < 0.05$ ) sur l'activité protéolytique non spécifique des fleurs. Néanmoins, l'utilisation d'une température de 60 °C diminue significativement ( $p < 0.05$ ) cette activité. Ceci est peut-être dû à une dégradation d'une grande partie des protéases sous l'effet de la chaleur.





**Figure 46.** Effets des températures de séchage (40, 45, 50, 55 et 60 °C) sur les profils en cardosines (E, F, G, H, A et B) des fleurs de cardon. La variété de cardon utilisée est la variété cultivée de l'ESAV. Le protocole d'analyse utilisé est celui optimisé, utilisant la colonne échangeuse d'ions QHP et un gradient de NaCl. Ce protocole permet la séparation de toutes les Cardosines en une seule chromatographie d'échange d'ions. Les chromatogrammes présentés sont la moyenne de minimum trois essais.

**Tableau 17.** Effet des différentes températures du séchage sur les caractéristiques technologiques des fleurs de cardon. R : Temps de floculation, AR : Texture après deux fois le temps de floculation R ; A2R : Texture après deux trois le temps de floculation R ; A20 : Texture après 20 minutes de coagulation ; A40 : Texture après 40 minutes de coagulation ; OK 20 : La vitesse de raffermissement, correspond au temps nécessaire pour atteindre une fermeté standard= 2.5 volts ; MS : matière sèche ; IUMC : unité coagulante internationale ; v : volt ; s : seconde ; NNP : azote non protéique ; Nt : azote total.

	MS (%)	Activité coagulante (IUMC/gMS)	Activité protéolytique (gNNP / 100g Nt)	R (s)	AR (v)	A2R (v)	A20 (v)	A40 (v)	OK20 (s)
<b>Flours séchées à 40 °C</b>	93.57	48.0± 2.1 <sup>b</sup>	4.16± 1.1 <sup>a</sup>	1148± 72.5 <sup>c</sup>	1.78 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.76 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.0 <sup>bc</sup>	1.95 ± 0.1 <sup>b</sup>	1899 ± 12.5 <sup>c</sup>
<b>Flours séchées à 45 °C</b>	94.12	43.2± 0.2 <sup>c</sup>	4.52± 2.2 <sup>a</sup>	1178± 41.5 <sup>c</sup>	1.85 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.90 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.0 <sup>b</sup>	1877 ± 10.5 <sup>c</sup>
<b>Flours séchées à 50 °C</b>	93..95	49.1± 1.8 <sup>b</sup>	4.21± 0.8 <sup>a</sup>	1098 ± 27.5 <sup>c</sup>	2.00 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.06 ± 1.0 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.32 ± 0.3 <sup>a</sup>	1522 ± 155.5 <sup>d</sup>
<b>Flours séchées à 55 °C</b>	94.46	49.5± 3.7 <sup>b</sup>	4.18± 1.3 <sup>a</sup>	1191 ± 83.5 <sup>c</sup>	1.82 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.75 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.7 <sup>c</sup>	1.86 ± 0.7 <sup>b</sup>	2034 ± 159.0 <sup>b</sup>
<b>Flours séchées à 60 °C</b>	94.30	28.3± 0.0 <sup>d</sup>	3.90± 0.0 <sup>b</sup>	1761 ± 58 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.00	0.94 ± 0.8 <sup>c</sup>	2804 ± 28.5 <sup>a</sup>
<b>Flours fraîches</b>	43.30	94.5± 2.4 <sup>a</sup>	4.17±1.02 <sup>a</sup>	1487 ± 101.5 <sup>b</sup>	3.61 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.49 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.03± 0.0 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.4 <sup>a</sup>	1052 ± 16.5 <sup>e</sup>

Les paramètres rhéologiques des coagulums ont été également, influencées par le procédé du séchage. Dès le début de la coagulation, la fermeté des gels lactiques obtenus par les extraits des fleurs séchées était inférieure à celle du coagulum issu de l'extrait des fleurs fraîches (des valeurs de fermeté après 20 min A20, comprises entre 0 et 0.34 pour les fleurs séchées et 1.03 pour les fleurs fraîches). Cet écart devient plus important plus la coagulation progresse. Ceci est confirmé par le paramètre OK 20 (vitesse de raffermissement) qui est significativement plus court dans le cas des fleurs fraîches (1052 secondes contre des temps compris entre 1522 et 2034 secondes pour les fleurs sèches). Le coagulum dérivé des fleurs de cardon séchées à la température de 50 °C a montré les paramètres rhéologiques les plus proches de celui obtenu par les fleurs sèches.

D'une manière générale, le procédé de séchage des fleurs de cardon engendre des pertes considérables d'activités notamment, l'activité coagulante. Dans un travail précédent, [Martins et al. \(1995\)](#) ont évalué l'activité coagulante des fleurs de cardon à différents taux d'humidité. Les auteurs ont constaté de grandes variabilités entre les activités des fleurs fraîches (non séchées avec un taux d'humidité de 40 %), des fleurs moyennement séchées (fleurs séchées partiellement avec un taux d'humidité de 13 %) et des fleurs séchées (séchées traditionnellement à l'air libre avec le taux d'humidité de 7 %). Les auteurs ont rapporté des pertes d'activité de 26 et 32 % respectivement dans le cas des fleurs partiellement séchées et les fleurs sèches. Les auteurs ont conclu la nécessité de standardiser les taux de l'humidité des fleurs avant leur utilisation comme agent de coagulation de lait du fait que le paramètre humidité initiale des fleurs influe sur les caractéristiques finales des fromages fabriqués.

Dans un autre travail, [Tajeda et al. \(2008\)](#) ont étudié l'effet d'autres méthodes de conservation sur l'activité de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon. En effet, ils ont évalué l'efficacité de la lyophilisation, la réfrigération et la congélation comme moyen de conservation des extraits coagulants obtenus à partir des fleurs fraîches de cardon. Leur objectif était d'identifier le moyen le plus approprié pour standardiser l'extrait en question en termes d'activité coagulante et de qualité microbiologique. Les auteurs ont signalé une meilleure conservation de l'activité coagulante des extraits lyophilisés et congelés, accompagnée d'une destruction d'une grande partie des micro-organismes initialement contenus dans l'extrait frais. Ce qui rend ces deux méthodes souhaitables pour le prolongement de la durée de vie du coagulant. Également, ils ont considéré que la réfrigération est une méthode non adéquate pour la conservation des extraits des fleurs de cardon, vu d'une part, les pertes en activité engendrées et d'autre part, l'augmentation de la charge

microbienne de l'extrait constatée au bout de quelques jours seulement. Les auteurs ont conclu que la lyophilisation est la méthode qui conserve le mieux l'extrait floral de cardon.

En conclusion, d'après les résultats de cette partie du travail, nous croyons que l'utilisation des températures comprises entre 50 et 55 °C pour le séchage des fleurs de cardon. Ceci est justifié par le fait qu'à ces températures-là les profils des fleurs en cardosines, l'activité coagulante des fleurs et les caractéristiques rhéologiques sont les plus proches de ceux des fleurs fraîches. Par ailleurs, vu les pertes qu'engendre ce procédé, il est aussi souhaitable de tester d'autres moyens de conservation qui seront probablement, d'un meilleur apport pour la préservation des caractéristiques technologiques des fleurs en particulier l'activité coagulante.

# *Conclusion*

## Conclusion

Par le présent travail l'objectif de promouvoir les pratiques traditionnelles et la valorisation socio-économique du cardon algérien, spontané (*Cynara cardunculus var. sylvestris*) et cultivé (*Cynara cardunculus var. atililis*) semble largement défendu et argumenté. L'exploration de la possibilité de l'utilisation des protéases de fleurs de cardon comme agents coagulants destinés à la filière lait est sur le plan scientifique bien défendue.

L'étude a été menée par comparaison à une variété portugaise prise comme référence « POR » car bien décrite en bibliographie : les protéases des fleurs de cette variété ont déjà été identifiées et répertoriées dans les bases de données numériques de protéomique (Sramento *et al.*, 2009).

Le protocole d'extraction adopté, nous a permis de constater que nos fleurs de cardon sont une source riche d'aspartates protéases. Les taux de cardosines présentes dans les deux variétés algériennes s'élèvent à 70.57% et 62.15% des protéines totales, respectivement pour le spontané (ALG1) et le cultivé (ALG2) contre 42.12% pour la variété portugaise. Ceci serait dû à la différence des modes et/ou durées de conservation des fleurs (congélation après récolte en 2001 pour la POR et lyophilisation après récolte en 2013 et 2014 pour nos variétés).

Grace aux techniques chromatographiques utilisées, les trois groupes de cardosines A<sub>0</sub>, A et B déjà connus ont été séparés et purifiés à partir de nos variétés algériennes. Les cardosines issues d'ALG1 et ALG2 ont montré des temps d'élution plus faibles comparés à ceux de la variété portugaise (POR). L'électrophorèse capillaire confirme que toutes les cardosines étudiées sont des hétéroprotéines dimères constituées de deux chaînes peptidiques (grande et petite). Les cardosines purifiées à partir des variétés algériennes se distinguent de la variété portugaise par des poids moléculaires légèrement plus élevés et des degrés de glycosylation plus faibles. L'identification par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a révélé que nos cardosines purifiées sont constituées de chaînes peptidiques similaires mais pas identiques. L'alignement des séquences des cardosines A avec la procardosine A répertoriée dans la base de donnée *Uniprot*, a révélé une distinction de nos cardosines matures algériennes par la présence de deux segments d'acides aminés similaires l'un à ceux du pro-peptide et l'autre à ceux du peptide spécifique (PSI). Ces deux dits peptides sont habituellement éliminés lors de l'activation de l'enzyme. Ces différences seraient à l'origine des écarts des temps d'élution constatés en chromatographie d'échange d'ions.

L'étude de la spécificité des différentes cardosines vis-à-vis des substrats tels que la caséine kappa et la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée, n'a pas révélé de différences significatives entre variétés : les mêmes groupes de cardosines engendrent les mêmes profils d'hydrolyse. Ceci vient confirmer l'exploitabilité de nos variétés algériennes de cardon et leur offre de larges possibilités d'applications comme celles nettement mieux valorisées dans les pays tels le Portugal.

Au cours de ce travail de thèse, la coagulation du lait par les protéases des fleurs de cardon algérien a été également, profondément étudiées. Ainsi, la mesure des rendements fromagers théoriques et des activités coagulante et protéolytique a révélé une bonne aptitude de nos variétés algériennes à coaguler le lait. Comparés à ceux de la variété de référence, les extraits bruts des deux variétés algériennes ont manifesté des activités coagulante et protéolytique significativement plus élevées. Par ailleurs, en termes de rendement fromager et des propriétés rhéologiques des coagulums, aucune différence significative n'a été constatée entre les trois extraits. L'ensemble de ces résultats nous mènent à affirmer que l'utilisation des fleurs de cardon algérien très prometteuse en fromagerie, mérite d'être encouragée et largement envisagée en vue de limiter la dépendance de l'importation d'agents coagulants coûteux et d'origine et caractéristiques non vérifiées.

A notre connaissance, la présente étude est la première à décrire scientifiquement la coagulation du lait par les différents groupes de cardosines séparément. Par rapport à leurs extraits bruts d'origine, les cardosines issues des trois variétés ont montré individuellement des activités coagulantes plus élevées. Les rendements fromagers mesurés montrent que la cardosine A a de meilleurs rendements comparée à la cardosine A<sub>0</sub> et B. Ces résultats nous mènent à dire que la cardosine A est probablement, plus adaptée pour la fromagerie.

L'évolution de la rhéologie des coagulums évaluée par l'*Optigraphe*, nous renseigne que les édifices installés suite à l'action des cardosines A et B aboutissent à des gels plus fermes que ceux issus des cardosines A<sub>0</sub> et des extraits bruts. Cependant, nous avons enregistré des différences hautement significatives entre les caractéristiques technologiques des cardosines étudiées et celles de la présure. Les cardosines globalement, ont une vitesse de raffermissement (OK 20) trop lente et engendrent ainsi des coagulums moins fermes. À la lumière de ces résultats nous pouvons considérer que les protéases des fleurs de cardon seraient plus adaptées à la fabrication des fromages à pâte molle qu'à ceux à pâte dure.

L'investigation visant à dévoiler l'origine des différences notées entre gels ou coagulums selon le type de cardosine a été envisagée par l'étude des interactions impliquées dans des réseaux tridimensionnels. L'utilisation des agents chimiques dissociants, nous a montré l'importance des liaisons hydrophobes, hydrogènes et des ponts calciques dans la formation et le maintien des gels issus de la coagulation par l'extrait brut et les cardosines purifiées. Les résultats obtenus confirment que l'édification du réseau caséique du coagulum diffère selon le type de cardosine utilisé. Nos résultats montrent que les liaisons du gel obtenu par la cardosine A sont comparables à celles du gel présure. Contrairement aux gels obtenus par l'extrait brut et les cardosines A<sub>0</sub> et B dont les liaisons sont semblables à celles d'un coagulum acide.

Vu les caractéristiques technologiques qu'elles présentent comparées à l'extrait brut, l'utilisation des cardosines séparément pour la coagulation du lait, semble donner des gels rhéologiquement différents pouvant être orientés à une diversité de types de fromage à fabriquer. Néanmoins, l'investissement dans leur séparation et purification risque d'être trop onéreux et à premier abord, peu justifié par rapport au gain attendu.

Nos travaux antérieurs sur la valorisation des pratiques traditionnelles algérienne et l'utilisation des fleurs de cardon local pour la fabrication à l'échelle pilote, de fromages à pâte molle type Brie et type Camembert au sein de deux fromageries algériennes avaient déjà montré avec succès et grande satisfaction l'obtention de produits très appréciés par rapport aux fromages témoins habituels employant des agents coagulants microbiens d'importation (Zikiou, 2013 ; Zikiou et Zidoune 2019). Dans le présent travail, l'utilisation des fleurs de cardon spontané algérien dans la fabrication d'un fromage type *Serra da Estrella* (D.O.P.) selon le même diagramme adopté au sein d'une unité portugaise a de nouveau montré la réussite de l'obtention d'un fromage très similaire avec satisfaction et appréciations positives des fromagers portugais de la fromagerie du dit fromage.

Une fois avoir caractérisé et validé la possibilité de valoriser et mieux exploiter notre cardon algérien dont la biodisponibilité et les pratiques ancestrales relevant du patrimoine algérien méritent d'être bien évalués, compte tenu de la saisonnalité de la production nous nous sommes proposés une approche sur la possibilité de conservation des fleurs de cardon. Notre expérience de séchage comme procédé de conservation a montré qu'il est souhaitable d'appliquer des températures comprises entre 50 et 55 °C pour sécher lesdites fleurs sans affecter leurs profils en



cardosines, leur activité coagulante et les caractéristiques rhéologiques des coagulums qui restaient les plus proches de ceux des fleurs fraîches.

L'apport de cette étude est non négligeable, car, les résultats obtenus mettent en évidence la possibilité d'obtention d'un agent de coagulation du lait, à partir d'une matière première non exploitée jusque-là en Algérie. Ainsi, et pour des impératifs économiques et technologiques, les fleurs de cardon doivent être prises en considération. La vulgarisation des procédés d'application de ces fleurs auprès des intervenants de la filière fromagère devient une sérieuse et très intéressante option pour la conservation et la transformation du lait.

Cette étude ne prétend pas avoir abordé toutes les orientations scientifiques concernant les protéases des fleurs de cardon. Compte tenu de l'ensemble de ces premiers résultats, nous proposons les recommandations suivantes :

- Enquêter rigoureusement en estimant les pratiques traditionnelles utilisant le cardon et ses fleurs en vue d'en décrire leur part dans le patrimoine national ;
- L'élaboration d'une cartographie pouvant révéler la biodiversité et la biodisponibilité du cardon algérien ;
- Créer la filière « Cardon » au service de l'agriculteur, du consommateur et des filières employant les protéases en vue d'une meilleure rentabilisation de la production ;
- Sensibiliser et encourager les services agricoles et acteurs des filières cardon et lait à l'utilisation des fleurs de cardon pour la fabrication d'autres types de fromages ;
- Etudier et assurer différents modes de conservation garantissant leurs impacts sur les caractéristiques biochimiques et technologiques des fleurs ;
- Valoriser économiquement en essayant d'immobiliser les enzymes de fleurs de cardon sur divers supports ;
- Approfondir la caractérisation biochimique des groupes de cardosines ;
- Envisager des recherches d'amélioration génétique en vue de mieux contrôler les proportions des différentes cardosines selon les avantages que pourrait donner chacune d'elles en transformation fromagère.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

Abiazar R., 2007. Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus, thèse AgroParisTech, 142p.

AFNOR (1986). Contrôle de la qualité des produits laitiers, Analyses physiques et chimiques, 3<sup>ed.</sup>, Lavoisier, Paris. 619–699.

Agboola, S. (2002). Cheesmaking from ultrafiltered milk using plant rennet. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 143.

Alais, C. (1984). Science du Lait : Principes des Techniques Laitières. SEPAIC.

Albenzio, M.; Caroprese, M.; Santillo, A.; Marino, R.; Taibi, L.; Sevi, A., (2004). Effects of Somatic Cell Count and Stage of Lactation on the Plasmin Activity and Cheese-Making Properties of Ewe Milk. *J. Dairy Sci.*, 87, 533–542.

Aleandri R, Schneider JC, Butazzoni LG (1989) Evaluation of milk cheese production based Rendement fromager et composition du lait on milk characteristics and formagraph measures. *J Dairy Sci*, (72), 1967-1975.

Amid M, Tan C P, Mirhosseini H, Aziz N A and Ling T C (2011) Optimisation of serine protease extraction from mango peel (*Mangifera Indica Cv. Chokanan*). *Food Chemistry*. 124. 666–671.

Andrade, P., Seabra, R., Valentao, P., & Areias, F. (1998). Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids, and coumarins in seven medicinal species by HPLC/diode-array detector. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 21, 2813-2820.

Andrews, G. L., Simons, B. L., Young, J. B., Hawkrigde, A. M., & Muddiman, D. C. (2011). Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Analytical Chemistry*, 83, 5442-5446.

Anjo, S. I., Santa, C., & Manadas, B. (2015). Short GeLC- SWATH: A fast and reliable quantitative approach for proteomic screenings. *Proteomics*, 15, 757-762.

Anjo, S. I., Santa, C., Saraiva, S. C., Freitas, K., Barah, F., Carreira, B., Araújo, I., & Manadas, B. (2017). Neuroproteomics using short GeLC-SWATH: from the evaluation of proteome changes to

the clarification of protein function. In *Current Proteomic Approaches Applied to Brain Function* (pp. 107-138): Springer.

Aquilanti, L., Babini, V., Santarelli, S., Osimani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. (2011). Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in applied microbiology*, *52*, 651-659.

Archontoulis, S., Struik, P., Vos, J., & Danalatos, N. (2010). Phenological growth stages of *Cynara cardunculus*: codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, *156*, 253-270.

Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K., & Arai, S. (1995). Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *European journal of biochemistry*, *232*, 77-83.

Banks, J., Roa, I., & Muir, D. (1998). Manipulation of the texture of low-fat cheddar using a plant protease extracted from *Cynara cardunculus*. *Australian Journal of Dairy Technology*, *53*, 105.

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

Barbosa, M., (1990). The production and processing of sheep's milk in Portugal: Serra da Estrela cheese. *Options Mediterr.*, *12*, 97–102.

Barbosa, M., Valles, E., Vassal, L., Mocquot, G., Nicolas, M., Pitel, G., & Vachot, J. (1976). L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et à pâte cuite. *Le Lait*, *56*, 1-17.

Barracosa, P., Rosa, N., Barros, M., & Pires, E. (2018). Selected Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) genotypes suitable for PDO cheeses in Mediterranean regions. *Chemistry & biodiversity*, *15*, e1800110.

Ben Amira, A., Bauwens, J., De Pauw, E., Besbes, S., Attia, H., Francis, F., et al. (2017). Identification of proteins from wild cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.) by a proteomic approach. *Journal of Chemical Biology*, *10*, 25-33.

- Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International journal of food properties*, 20, S76-S93.
- Benyahia-Krid, F., Attia, H., & Zidoune, M. (2010). Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: interactions and microstructure. *Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, 3, 75-86.
- Bermejo, J. E. H., Delucchi, G., Charra, G., Pochettino, M. L., & Hurrell, J. A. (2019). “Cardos” of two worlds: Transfer and re-signification of the uses of thistles between the Iberian Peninsula and Argentina. *Ethnobiology and Conservation*, 8.
- Boller, T. (1986). Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms. *Plant proteolytic enzymes*, 1, 67-96.
- Boughellout H., 2007. Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire magister, université Mentouri constantine.
- Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, 26, 185-187.
- Cavalli, S. V., Lufano, D., Colombo, M. L., & Priolo, N. (2013). Properties and applications of phytepsins from thistle flowers. *Phytochemistry*, 92, 16-32.
- Cecchinato, A., Penasa, M., Gotet, C. C., De Marchi, M., & Bittante, G. (2012). Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. *Journal of dairy science*, 95, 1709-1713.
- Cheftel J.C., Cuq J.L. Lorient D., (1985). Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques. Tec et Doc. Lavoisier, 20-35.
- Christen, C., & Virasoro, E. (1935). Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le Lait*, 15, 354-363.
- Claverie-Martín, F., & Vega-Hernández, M. C. (2007). Aspartic proteases used in cheese making. In *Industrial enzymes* (pp. 207-219): Springer.
- Colin, O., Laurent, F., & Vignon, B. (1992). Relations between soft cheese yield variations and milk composition or coagulation parameter variations. *Lait (France)*.

- Cordeiro, M. C., Xue, Z.-T., Pietrzak, M., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1994). Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Molecular Biology*, *24*, 733-741.
- Cotton, F., Lin, C., Fontaine, B., Gulbis, B., Janssens, J., & Vertongen, F. (1999). Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A2 and F. *Clinical chemistry*, *45*, 237-243.
- Cotton, F., Vertongen, F., & Gulbis, B. (2006). Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, *21*, 45-50.
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual review of food science and technology*, *3*, 449-467.
- Dalgleish, D., & Fox, P. (1982). Developments in Dairy Chemistry-1. Proteins. *Applied Science, London*, 157.
- De Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, *171*, 36-52.
- Drøhse, H. B., & Foltmann, B. (1989). Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine  $\kappa$ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *995*, 221-224.
- Duarte, A. S., Pereira, A. O., Cabrita, A., Moir, A. J., Pires, E., & Barros, M. M. (2005). The characterisation of the collagenolytic activity of cardosin A demonstrates its potential application for extracellular matrix degradative processes. *Current drug discovery technologies*, *2*, 37-44.
- Duarte, P., Figueiredo, R., Pereira, S., & Pissarra, J. (2006). Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. *Botany*, *84*, 737-749.
- Elleman, C., & Dickinson, H. (1994). Pollen—stigma interaction during sporophytic self-incompatibility in *Brassica oleracea*. In *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants* (pp. 67-87): Springer.

Faro, C., Moir, A., & Pires, E. (1992). Specificity of a milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: Action on oxidised insulin and k-casein. *Biotechnology letters*, *14*, 841-846.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Pissarra, J., Frazão, C., Costa, J., Lin, X.-L., Tang, J., & Pires, E. (1998). Structural and functional aspects of cardosins. In *Aspartic Proteinases* (pp. 423-433): Springer.

Faro, C., Veríssimo, P., Lin, Y., Tang, J., & Pires, E. (1995). Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. In *Aspartic Proteinases* (pp. 373-377): Springer.

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

Fernández, J., & Curt, M. (2005). State-of-the-art of *Cynara cardunculus* as an energy crop. In *Proceedings of the 2nd World Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection* (pp. 10-14).

Fernández-García, E., Imhof, M., Schlichtherle-Cerny, H., Bosset, J. O., & Nuñez, M. (2008). Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International dairy journal*, *18*, 147-157.

Fogeiro, É., Barracosa, P., Oliveira, J., & Wessel, D. (2020). Influence of Cardoon Flower (*Cynara cardunculus* L.) and Flock Lactation Stage in PDO Serra da Estrela Cheese. *Foods*, *9*, 386.

Fogeiro, É., Barracosa, P., Oliveira, J., & Wessel, D. F. (2020). Influence of Cardoon Flower (*Cynara cardunculus* L.) and Flock Lactation Stage in PDO Serra da Estrela Cheese. *Foods*, *9*(4), 386.

Folgado, A., & Abranches, R. (2020). Plant Aspartic Proteases for Industrial Applications: Thistle Get Better. *Plants*, *9*(2), 147.

Foury, C. (1997). Propos sur l'origine de l'artichaut et du cardon. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, *39*, 133-147.

Fox, P., & McSweeney, P. (1997). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (pp. 1-49): Springer.

- Gomes, S., Belo, A. T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., Pinto-Cruz, C., Brás, T., Duarte, M. F., & Martins, A. P. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *International dairy journal*, *91*, 178-184.
- Gominho, J., Curt, M. D., Lourenço, A., Fernández, J., & Pereira, H. (2018). *Cynara cardunculus* L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30 years of research. *Biomass and bioenergy*, *109*, 257-275.
- Gominho, J., Lourenço, A., Curt, M., Fernández, J., & Pereira, H. (2009). Characterization of hairs and pappi from *Cynara cardunculus* capitula and their suitability for paper production. *Industrial Crops and products*, *29*, 116-125.
- Guerard, V. (2014). *Mise en place de l'électrophorèse capillaire MINICAP®(Sebia) pour le diagnostic des hémoglobinopathies au CHU de Nancy*. Université de Lorraine.
- Gursky, O., Badger, J., Li, Y., & Caspar, D. L. (1992). Conformational changes in cubic insulin crystals in the pH range 7–11. *Biophysical journal*, *63*(5), 1210-1220.
- 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), 1405-1410.
- Hsieh, J.-F., & Pan, P.-H. (2012). Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 2039-2045.
- Hurtaud C, Vérité R, Rulquin H (1991) Détermination de l'aptitude des laits à la transformation fromagère : intérêt et limites des tests de laboratoire. *Journées sur la qualité des laits à la production et aptitude fromagère. Colloque INRA-ENSA Rennes, 23-24 janvier*.
- Hurtaud, C., Buchin, S., Martin, B., Verdier-Metz, I., & Peyraud, J. L. (2001). La qualité des laits et ses conséquences sur la qualité des produits de transformation : quelques techniques de mesure dans les essais zootechniques. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 35-42.
- Hyslop, D. (2003). Enzymatic coagulation of milk. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 839-878): Springer.



Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14-33.

Jakob, E., & Puhan, Z. (1992). Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins—A review. *International dairy journal*, 2, 157-178.

James, M. N. (2012). *Aspartic proteinases: retroviral and cellular enzymes* (Vol. 436): Springer Science & Business Media.

Kerjean JR (1984) Conséquences fromagères des variations de composition du lait. Qualité chimique du lait de fromagerie. In: *La composition chimique du lait et ses incidences technologiques*. Journées INRA ENSAR INAPG, septembre

Kervinen, J., Törmäkangas, K., Runeberg-Roos, P., Guruprasad, K., Blundell, T., & Teeri, T. H. (1995). Structure and possible function of aspartic proteinases in barley and other plants. In *Aspartic Proteinases* (pp. 241-254): Springer.

Komprej, A.; Gorjanc, G.; Kompan, D.; Kovac, M., (2012). Lactation curves for milk yield, fat, and protein content in Slovenian dairy sheep. *Czech J. Anim. Sci.*, 57, 231–239.

Konečná, L.; Kuchtík, J.; Sedláková, M.; Sustova, K.; Filipčík, R (2019). The Effect of the Lactation Stage on Milk Yield, Composition and Renneting Parameters of Milk in Sheep Reared Under Intensive Nutrition. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 67, 85–89.

Kübarssepp, I., Henno, M., Viinalass, H., & Sabre, D. (2005). Effect of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties. *Agr. Res*, 1, 55-64.

Kuchtík, J.; Šustová, K.; Urban, T.; Zapletal, D., (2008). Effect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality of rennet curdling in East Friesian ewes. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 55–63.

Kumosinski, T., Brown, E., & Farrell Jr, H. (1991). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins:  $\kappa$ -casein. *Journal of dairy science*, 74, 2879-2887.

Kumosinski, T., Brown, E., & Farrell Jr, H. (1993). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized  $\beta$ -casein structure. *Journal of dairy science*, 76, 931-945.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.

Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcão, V. M., & Malcata, F. X. (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and microbial technology*, 28, 642-652.

Lefebvre-Cases, E., Gastaldi, E., Vidal, V., Marchessau, S., Lagaude, A., Cuq, J.-L., & De La Fuente, B. T. (1998). Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of dairy science*, 81, 932-938.

Leksrisompong, P.; Barbano, D.; Foegeding, A.; Gerard, P.; Drake, M. (2010). The roles of fat and pH on the detection thresholds and partition coefficients of three compounds: Diacetyl, Decalactone and Furanol. *J. Sens. Stud.*, 25, 347–370.

Llorente, B. E., Obregón, W. D., Avilés, F. X., Caffini, N. O., & Vairo-Cavalli, S. (2014). Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food chemistry*, 159, 55-63.

Lodes, A., Buchberger, J., Krause, I., Aumann, J., & Klostermeyer, H. (1996). The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 2. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. *Milchwissenschaft (Germany)*.

Macedo A., Malcata F.X., Oliveira J.C., (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.

Macedo, I. Q., Faro, C. J., & Pires, E. M. (1996). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine  $\alpha$ s- and  $\beta$ -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 42-47.

Macheboeuf, D., Coulon, J.-B., & D'Hour, P. (1993). Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research*, 60, 43-54.

Martin, B., & Coulon, J. B. (1995). Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux. *Le Lait*, 75(1), 61-80.

- Martins, A. L., de Vasconcelos, M. P., & De Sousa, R. (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*, 76, 473-477.
- Mazorra-Manzano, M. A, Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramirez Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., et al. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141, 1902–1907.
- Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., & Ramírez-Suarez, J. C. (2018). Milk-Clotting Plant Proteases for Cheesemaking. In *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes* (pp. 21-41): Springer.
- McSweeney, P.; Fox, P.F.; Cotter, P.; Everett, D. (2017). Cheese-Chemistry, Physics and Microbiology, 4th ed.; McSweeney, P., Ed.; *Academic Press: Cambridge, MA, USA*; p. 634.
- Mucaji, P., Grancai, D., Nagy, M., Buděšínský, M., & Ubik, K. (2001). Monodesmosidic saponins in *Cynara cardunculus* L. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, 50, 277-279.
- Nair, I. C., & Jayachandran, K. (2019). Aspartic Proteases in Food Industry. In *Green Bioprocesses* (pp. 15-30): Springer.
- Noël, Y., Lehembre, N., Dulac, A., & Clavaud, M. C. (1989). Comparaison des cinétiques de coagulation enzymatique et mixte du lait. Influence du calcium. *Le Lait*, 69(6), 479-490.
- 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. *J. Food Technol.*, 7(1), 20-29.
- Ojala, M., Tyrisevä, A.-M., & Ikonen, T. (2005). Genetic improvement of milk quality traits for cheese production. *Indicators of milk and beef quality*, 307-311.
- Okigbo, L. M., Richardson, G., Brown, R., & Ernstrom, C. (1985). Variation in coagulation properties of milk from individual cows. *Journal of dairy science*, 68, 822-828.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Fernández, M., Casquete, R., & de Guía Córdoba, M. (2014). Influence of the technological properties of vegetable rennet (*C ynara cardunculus*) on the

physicochemical, sensory and rheological characteristics of 'Torta del Casar' cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 402-409.

Ostensen, S., Foldager, J., & HERMANSEN, J. E. (1997). Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 64, 207-219.

Prohens, J., Nuez, F., & Carena, M. J. (2008). *Handbook of plant breeding*: Springer.

Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., & Faro, C. J. (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 203, 204-212.

Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., & Pires, E. (1996). Action on bovine  $\alpha$ 1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297, 83-89.

Ramet, J. P., & Weber, F. (1980). Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60(591-592), 1-13.

Remeuf, F., Lenoir, J., & Duby, C. (1989). Étude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait*, 69, 499-518.

Remeuf, F., Lenoir, J., Duby, C., Letilly, M.-T., & Normand, A. (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Le Lait*, 69, 499-518.

Roa, I., Lopez, M. B., & Mendiola, F. J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, 32, 413-419.

Rodrigues, C.; Pereira, C.; Gomes, D.; Madanelo, P.; Fonseca, L. (2000). Queijo Serra da Estrela- Processos Tradicionais E Inovações Tecnológicas; *Caderno De Divulgação-DRABL; DRABL: Coimbra, Portugal;* Volume 1, p. 135.

- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.
- Rottenberg, A., & Zohary, D. (1996). The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 53-58.
- Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., Duverger-Arfulso, C., & Martel, A. (2016). *Analyse chimique-8e éd.: Méthodes et techniques instrumentales*: Dunod.
- Rougemont, B. (2016). *Quantification de protéines dans des matrices complexes par spectrométrie de masse: nouveaux outils et applications*.
- Runeberg- Roos, P., Törmäkangas, K., & Östman, A. (1991). Primary structure of a barley- grain aspartic proteinase: A plant aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D. *European journal of biochemistry*, 202, 1021-1027.
- Sarmiento, A. C. (2003). Thèse de doctorat. *Universidade de Aveiro*, Portugal.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debyser, G., Van Beeumen, J., Domingues, P., & Amado, F. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, 230, 429-439.
- Sarmiento, A. C., Oliveira, C. S., Pires, E. M., Halling, P. J., & Barros, M. T. (2004). Evaluation of cardosin A as a proteolytic probe in the presence of organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, 137-141.
- Schmidt, D. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5-16.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5-16.
- Shelyuto, V., Al'khimovich, V., & Kruglova, E. (1975). Flavonoids of common thistle flowers. *Fitokhim Izuch Flory BSSR Biofarm Issled Lek Prep*, 95-96.

Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J., Neptuno Rodriguez-Lopez J., 2005. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66, 41-49.

Silva, S. V., & Malcata, F. X. (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food chemistry*, 67, 373-378.

Smith, P. e., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., & Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150, 76-85.

Sonnante, G., Pignone, D., & Hammer, K. (2007). The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. *Annals of Botany*, 100, 1095-1100.

Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82, 151-170.

Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G. n., & Alder, L. (2012). Reduction of matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Analytical Chemistry*, 84, 1474-1482.

Tavaria, F. K., & Malcata, F. X. (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegee region. *Journal of Food Protection*, 61, 601-607.

Tavaria, F.K.; Malcata, F.X (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegee region. *J. Food Prot.*, 61, 601–607.

Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J., Martínez-Cacha, A., & Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International dairy journal*, 18, 139-146.

Tejada, L., Vioque, M., Gómez, R., & Fernández- Salguero, J. (2008). Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1301-1306.

Tökés, Z. A., Woon, W. C., & Chambers, S. M. (1974). Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta*, *119*, 39-46.

Tsouli, J. (1974). Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre *Cynara Cardunculus* L sur la coagulation du lait. *Le Lait*, *54*, 415-421.

Veríssimo, 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*, 762-768.

Vesna, P.; Neven, A.; Mioc, B.; Ivankovic, A.; Havranek, J., (2002). Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech J. Anim. Sci.*, *47*, 80–84.

Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., & Faro, C. (2001). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, *45*, 529-539.

Voet, D., & Voet, J. (2005). Biochimie, 2nd (Ed), Translated version In. De Boeck Université. *Le cycle de l'acide citrique*, 581-768.

Wiklund, A. (1992). The genus *Cynara* L.(*Asteraceae- Cardueae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *109*, 75-123.

Zacharius, R. M. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, *30*, 148-152.

Zikiou, A. (2013). La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

Zikiou, A., & Zidoune, M. N. (2019). 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*, 89-99.

# *Annexes*



## Storage Conditions

Product	Storage
Pro260 chips	Room temperature
Pro260 reagents	4°C (protected from light)

## Essential Practices

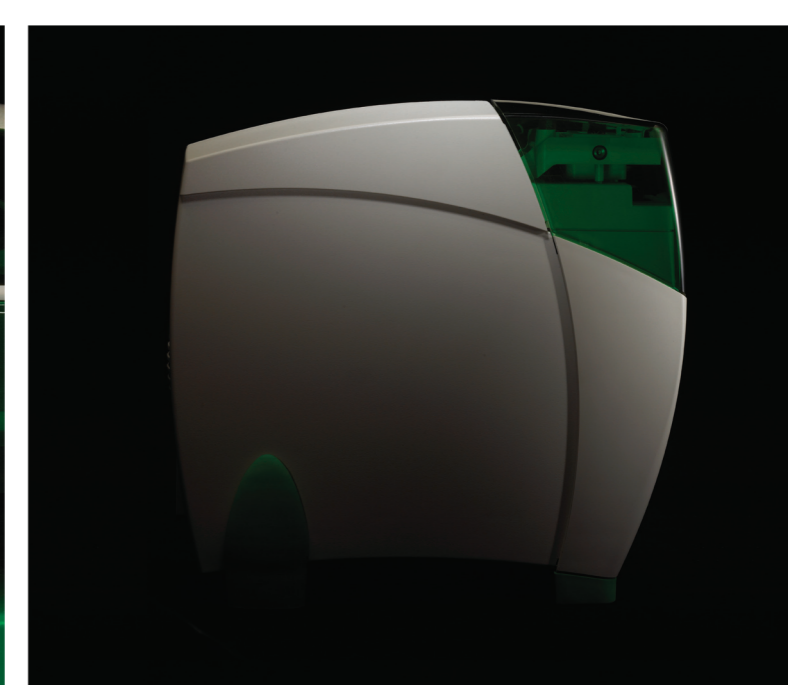
- Always wear gloves when handling reagents and chips
- Handle chips by the edges; do not touch the glass
- Remove chip from packaging only immediately before use
- Avoid sources of dust and contaminants when preparing samples and loading the chip. Foreign particles in reagents, samples, and the wells of the chip can interfere with results
- Deep-clean the electrodes if contamination is suspected or if a chip was left in the instrument overnight
- Use of colored or coated (for example, siliconized polypropylene) tubes when preparing kit reagents or samples is not recommended; such tubes may cause artifacts during the separation
- Refer to the instruction manual for more details

## Ordering Information

Catalog #	Description	Catalog #	Description
700-7000	<b>Experion System</b> , 100–240 V, for protein analysis, includes electrophoresis station, priming station, software, USB2 cable, instructions (analysis kits sold separately)	700-7110 700-7151 700-7152	<b>Experion Pro260 Starter Kit</b> <b>Experion Pro260 Chips</b> , 10 <b>Experion Pro260 Reagents and Supplies</b> , for 10 chips, includes 3 x 520 µl Pro260 gel, 45 µl Pro260 stain, 60 µl Pro260 ladder (10–260 kD), 400 µl Pro260 sample buffer, 3 spin filters
700-7101	<b>Experion Pro260 Analysis Kit for 10 Chips</b> , includes 10 Pro260 chips, Experion Pro260 reagents and supplies for 10 chips	700-7251	<b>Experion Cleaning Chips</b> , 10
700-7102	<b>Experion Pro260 Analysis Kit for 25 Chips</b> , includes 25 Pro260 chips, Experion Pro260 reagents and supplies for 25 chips	700-7254 163-2091 161-0610	<b>Experion Spin Filters</b> , 10 <b>ReadyPrep™ Proteomics Grade Water</b> , 500 ml <b>Dithiothreitol (DTT) reducing agent</b> , 1g
701-7000	<b>Experion System</b> , 100–240 V, for protein analysis (700-7000), Experion Pro260 starter kit (700-7110)	161-0710 700-7256	<b>2-Mercaptoethanol</b> , 25 ml <b>Experion Pro260 Ladder</b>



LabChip and the LabChip logo are trademarks of Caliper Life Sciences, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Caliper Life Sciences, Inc. to sell products using the LabChip technology for research use only. These products are licensed under U.S. Patent Nos. 5,863,753, 5,658,751, 5,436,134, and 5,582,977, and pending patent applications, and related foreign patents, for internal research and development use only in detecting, quantitating, and sizing macromolecules, in combination with microfluidics, where internal research and development use expressly excludes the use of this product for providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis, or screening services, or providing clinical information or clinical analysis, in any event in return for compensation by an unrelated party.



**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

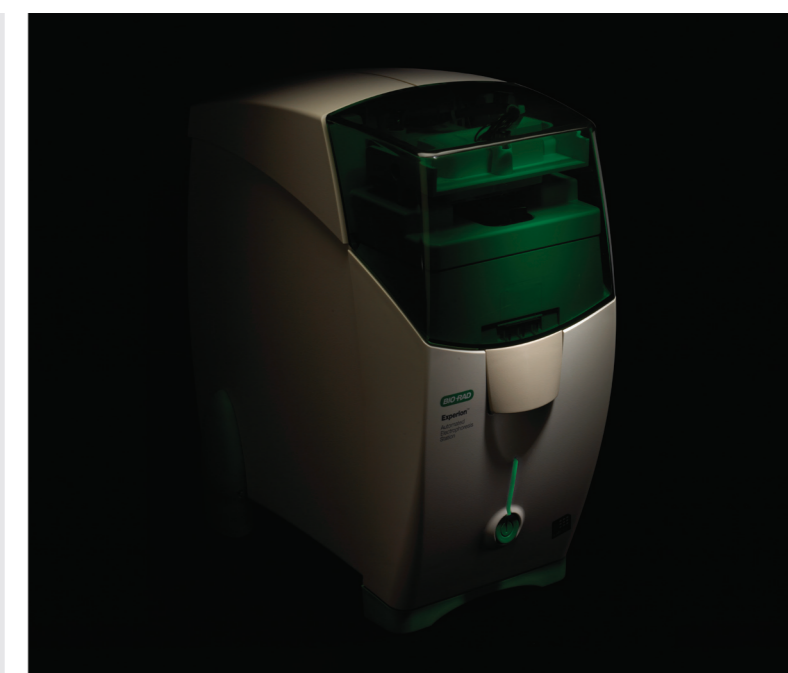
Life Science  
Group

**Web site** [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) **USA** 800 4BIORAD **Australia** 61 02 9914 2800 **Austria** 01 877 89 01 **Belgium** 09 385 55 11 **Brazil** 55 21 3237 9400 **Canada** 905 364 3435 **China** 86 21 6426 0808 **Czech Republic** 420 241 430 532 **Denmark** 44 52 10 00 **Finland** 09 804 22 00 **France** 01 47 95 69 65 **Germany** 089 318 84 0 **Greece** 30 210 777 4396 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 455 8800 **India** 91 124 4029300 **Israel** 03 963 6050 **Italy** 39 02 216091 **Japan** 03 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 0318 540666 **New Zealand** 0508 805 500 **Norway** 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 27 861 246 723 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 08 555 12700 **Switzerland** 061 717 95 55 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **United Kingdom** 020 8328 2000



## Experion™ Pro260 Analysis Kit Quick Guide

**BIO-RAD**



# Experion Pro260 Analysis Kit Quick Guide

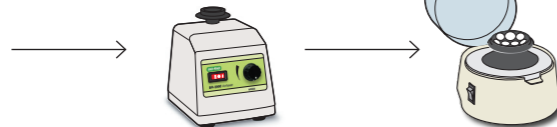
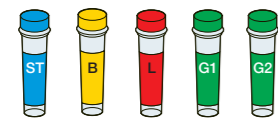
For complete instructions, refer to the Experion Pro260 analysis kit instruction manual. Full manuals are available online at [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) or contact us by phone at 1 800 424 6723 for an electronic copy.

Read the full protocol and essential practices sections if using for the first time.



1

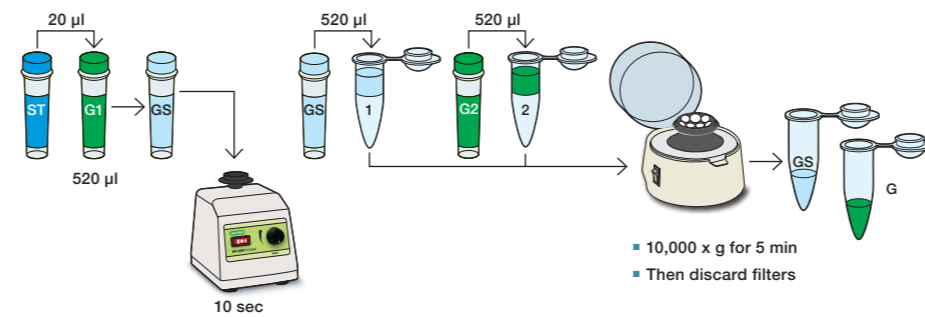
## Equilibrate Kit Reagents (ST = stain, B = sample buffer, L = ladder, G = gel)



- Equilibrate reagents to room temperature (~15 min). Protect them from light
- Briefly vortex and spin down reagents

2

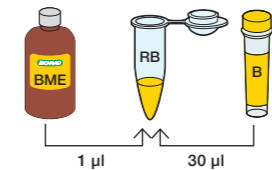
## Prepare the Gel (G) and Gel-Stain (GS) Solution



**Note:** Unused filtered GS solution and filtered G may be stored for up to 30 days at 4°C protected from light; each can be used as is within 30 days. After 30 days, GS solution and G must be refiltered before use. GS solution and G may be stored (4°C protected from light) for another 30 days and refiltered before use. Discard GS solution and G after the second refiltering.

3

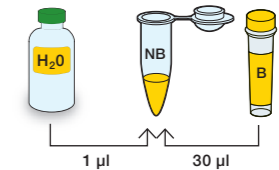
## Prepare the Sample Buffer Reducing Conditions



- Prepare 1 tube of reducing buffer (RB) for each chip to be run
- The ladder must be prepared with RB
- Prepare a fresh solution daily

**Note:** β-mercaptoethanol (BME) or dithiothreitol (DTT) can be used.

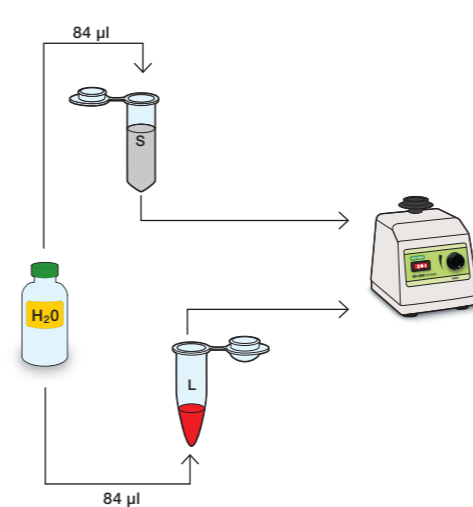
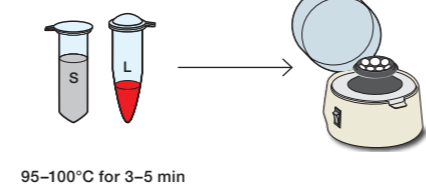
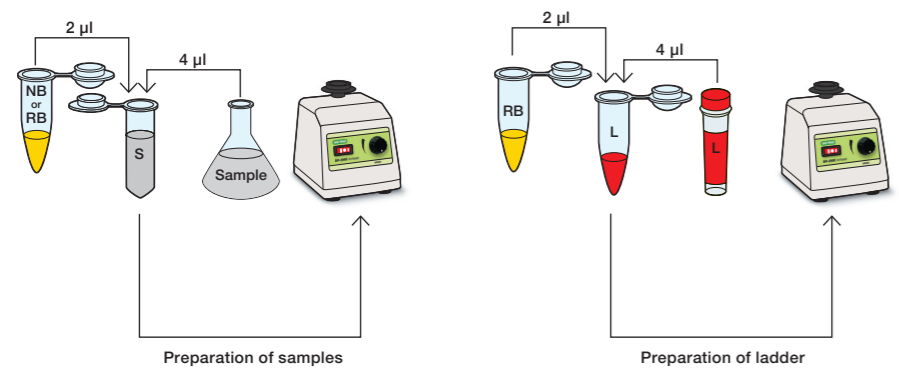
## Nonreducing Conditions



- Prepare 1 tube of nonreducing buffer (NB) for each chip to be run
- Samples prepared with RB and NB can be run on the same chip
- Only use ultrapure water (0.2 µm, filtered)

4

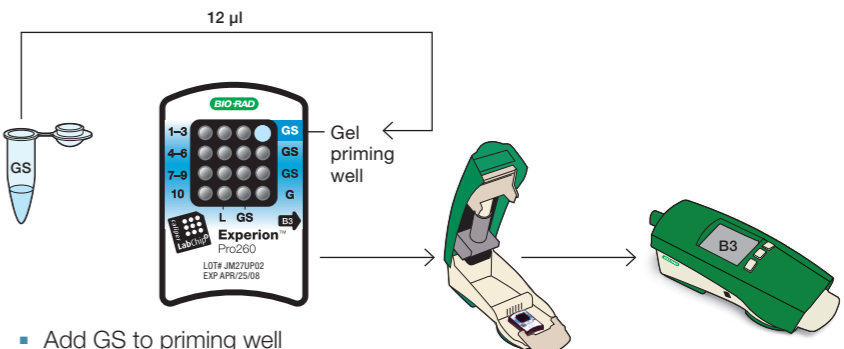
## Prepare the Samples and Pro260 Ladder



**Note:** Use only ultrapure water for the 84 µl dilution step.

5

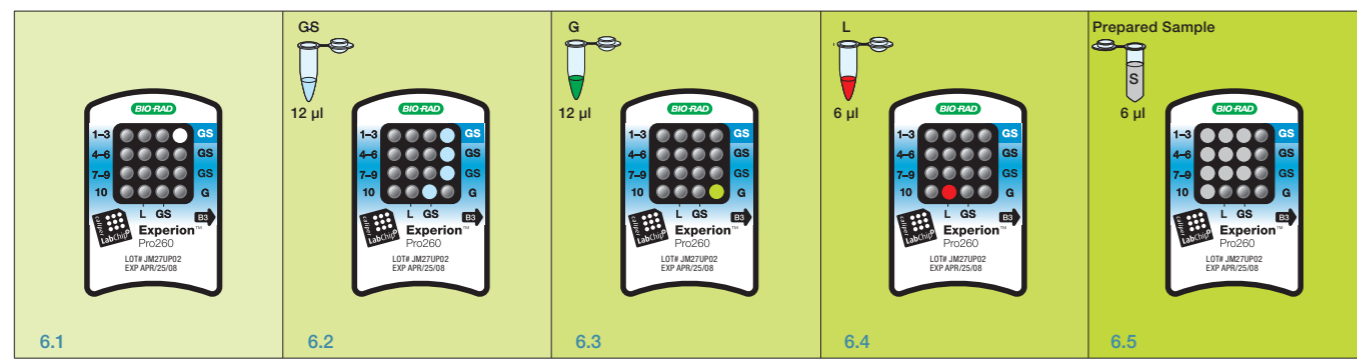
## Prime the Chip



- Add GS to priming well
- Select B3 on priming station
- Place chip in station and press **Start**
- Remove chip after priming is complete
- Flip chip over and visually inspect the microchannels for trapped air bubbles or incomplete priming

6

## Load the Prepared Samples and Pro260 Ladder Onto the Chip



- Remove remaining GS solution from the **GS** well (gel priming well)
- Pipet 12 µl filtered GS solution into all 4 **GS** wells
- Pipet 12 µl filtered **G** into well **G**
- Pipet 6 µl diluted protein ladder into well **L**
- Pipet 6 µl diluted sample into wells 1-10

**Note:** Do not leave any sample well empty. If necessary, pipet a replicate into any empty sample wells; run the chip in the Experion electrophoresis station within 5 min of loading.

7

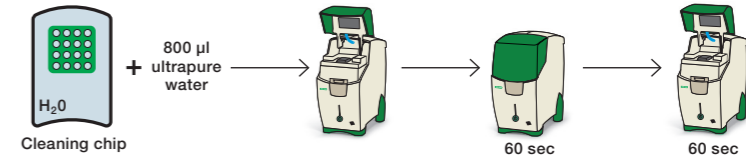
## Run the Pro260 Analysis



- Select **New Run**, then **Protein 260** assay
- Click the **Start** (▶) button onscreen
- Select number of samples to run
- When the run is complete, remove and discard the used chip

8

## Clean the Electrodes



**Note:** If using the instrument for RNA analysis after a protein run, use the deep-cleaning procedure instructions in the RNA analysis kit manual or the software version 3.0 Help section (use search term: electrodes).

## Storage Conditions

Product	Storage
Pro260 chips	Room temperature
Pro260 reagents	4°C (protected from light)

## Essential Practices

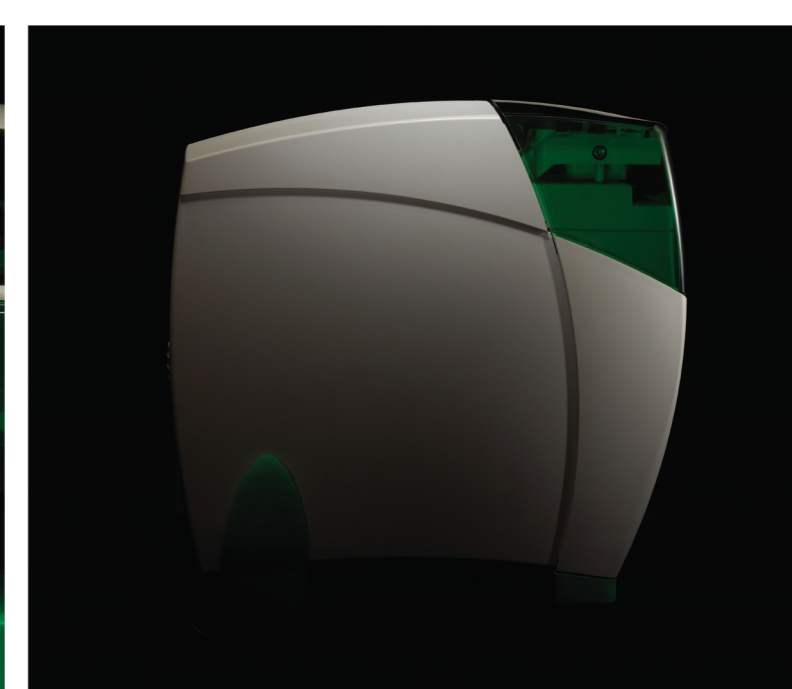
- Always wear gloves when handling reagents and chips
- Handle chips by the edges; do not touch the glass
- Remove chip from packaging only immediately before use
- Avoid sources of dust and contaminants when preparing samples and loading the chip. Foreign particles in reagents, samples, and the wells of the chip can interfere with results
- Deep-clean the electrodes if contamination is suspected or if a chip was left in the instrument overnight
- Use of colored or coated (for example, siliconized polypropylene) tubes when preparing kit reagents or samples is not recommended; such tubes may cause artifacts during the separation
- Refer to the instruction manual for more details

## Ordering Information

Catalog #	Description	Catalog #	Description
700-7000	<b>Experion System</b> , 100–240 V, for protein analysis, includes electrophoresis station, priming station, software, USB2 cable, instructions (analysis kits sold separately)	700-7110 700-7151 700-7152	<b>Experion Pro260 Starter Kit</b> <b>Experion Pro260 Chips</b> , 10 <b>Experion Pro260 Reagents and Supplies</b> , for 10 chips, includes 3 x 520 µl Pro260 gel, 45 µl Pro260 stain, 60 µl Pro260 ladder (10–260 kD), 400 µl Pro260 sample buffer, 3 spin filters
700-7101	<b>Experion Pro260 Analysis Kit for 10 Chips</b> , includes 10 Pro260 chips, Experion Pro260 reagents and supplies for 10 chips	700-7251	<b>Experion Cleaning Chips</b> , 10
700-7102	<b>Experion Pro260 Analysis Kit for 25 Chips</b> , includes 25 Pro260 chips, Experion Pro260 reagents and supplies for 25 chips	700-7254 163-2091 161-0610	<b>Experion Spin Filters</b> , 10 <b>ReadyPrep™ Proteomics Grade Water</b> , 500 ml <b>Dithiothreitol (DTT) reducing agent</b> , 1g
701-7000	<b>Experion System</b> , 100–240 V, for protein analysis (700-7000), Experion Pro260 starter kit (700-7110)	161-0710 700-7256	<b>2-Mercaptoethanol</b> , 25 ml <b>Experion Pro260 Ladder</b>



LabChip and the LabChip logo are trademarks of Caliper Life Sciences, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Caliper Life Sciences, Inc. to sell products using the LabChip technology for research use only. These products are licensed under U.S. Patent Nos. 5,863,753, 5,658,751, 5,436,134, and 5,582,977, and pending patent applications, and related foreign patents, for internal research and development use only in detecting, quantitating, and sizing macromolecules, in combination with microfluidics, where internal research and development use expressly excludes the use of this product for providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis, or screening services, or providing clinical information or clinical analysis, in any event in return for compensation by an unrelated party.



**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

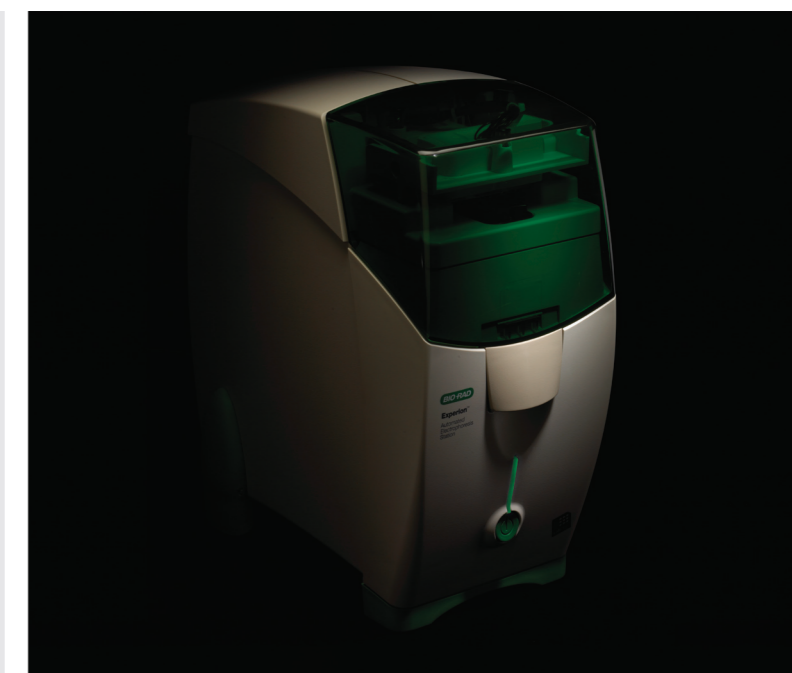
Life Science  
Group

**Web site** [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) **USA** 800 4BIORAD **Australia** 61 02 9914 2800 **Austria** 01 877 89 01 **Belgium** 09 385 55 11 **Brazil** 55 21 3237 9400  
**Canada** 905 364 3435 **China** 86 21 6426 0808 **Czech Republic** 420 241 430 532 **Denmark** 44 52 10 00 **Finland** 09 804 22 00 **France** 01 47 95 69 65  
**Germany** 089 318 84 0 **Greece** 30 210 777 4396 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 455 8800 **India** 91 124 4029300 **Israel** 03 963 6050  
**Italy** 39 02 216091 **Japan** 03 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 0318 540666 **New Zealand** 0508 805 500  
**Norway** 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 27 861 246 723  
**Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 08 555 12700 **Switzerland** 061 717 95 55 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **United Kingdom** 020 8328 2000



## Experion™ Pro260 Analysis Kit Quick Guide

**BIO-RAD**



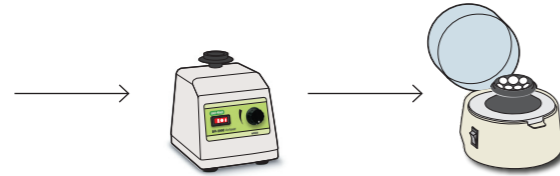
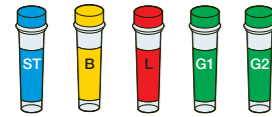
# Experion Pro260 Analysis Kit Quick Guide

For complete instructions, refer to the Experion Pro260 analysis kit instruction manual. Full manuals are available online at [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) or contact us by phone at 1 800 424 6723 for an electronic copy. Read the full protocol and essential practices sections if using for the first time.



1

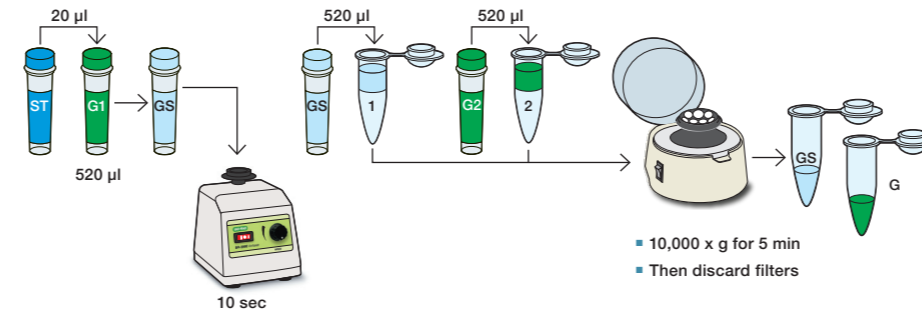
## Equilibrate Kit Reagents (ST = stain, B = sample buffer, L = ladder, G = gel)



- Equilibrate reagents to room temperature (~15 min). Protect them from light
- Briefly vortex and spin down reagents

2

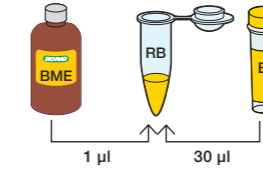
## Prepare the Gel (G) and Gel-Stain (GS) Solution



**Note:** Unused filtered GS solution and filtered G may be stored for up to 30 days at 4°C protected from light; each can be used as is within 30 days. After 30 days, GS solution and G must be refiltered before use. GS solution and G may be stored (4°C protected from light) for another 30 days and refiltered before use. Discard GS solution and G after the second refiltering.

3

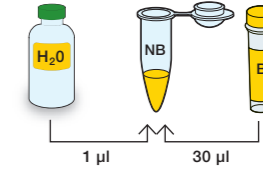
## Prepare the Sample Buffer Reducing Conditions



- Prepare 1 tube of reducing buffer (RB) for each chip to be run
- The ladder must be prepared with RB
- Prepare a fresh solution daily

**Note:** β-mercaptoethanol (BME) or dithiothreitol (DTT) can be used.

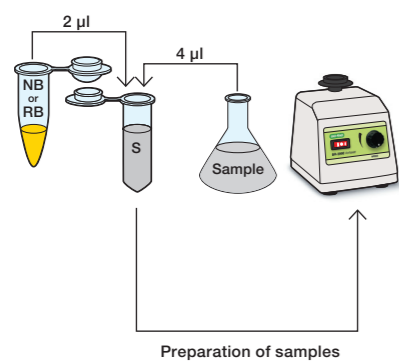
## Nonreducing Conditions



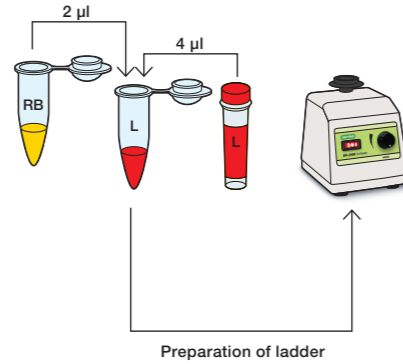
- Prepare 1 tube of nonreducing buffer (NB) for each chip to be run
- Samples prepared with RB and NB can be run on the same chip
- Only use ultrapure water (0.2 µm, filtered)

4

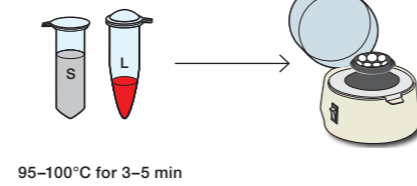
## Prepare the Samples and Pro260 Ladder



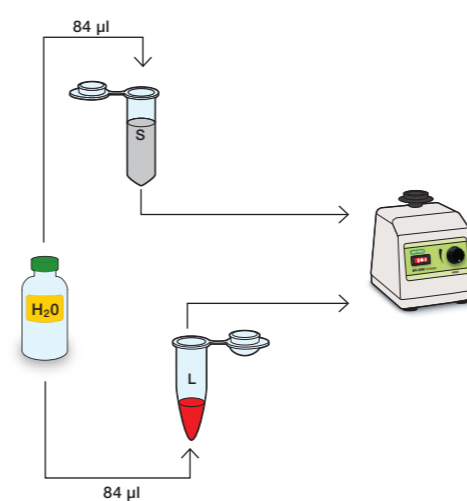
Preparation of samples



Preparation of ladder



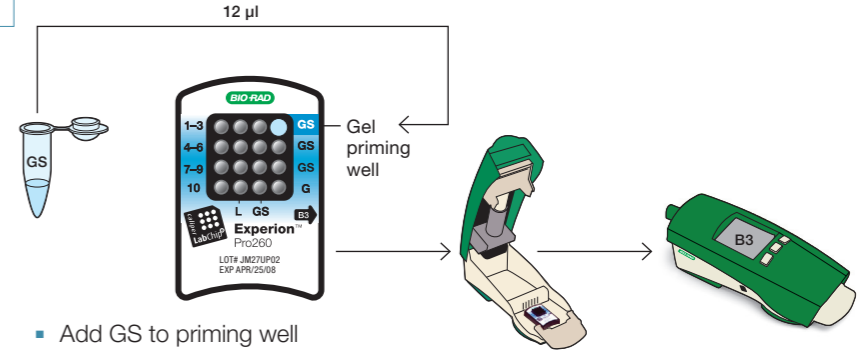
95-100°C for 3-5 min



**Note:** Use only ultrapure water for the 84 µl dilution step.

5

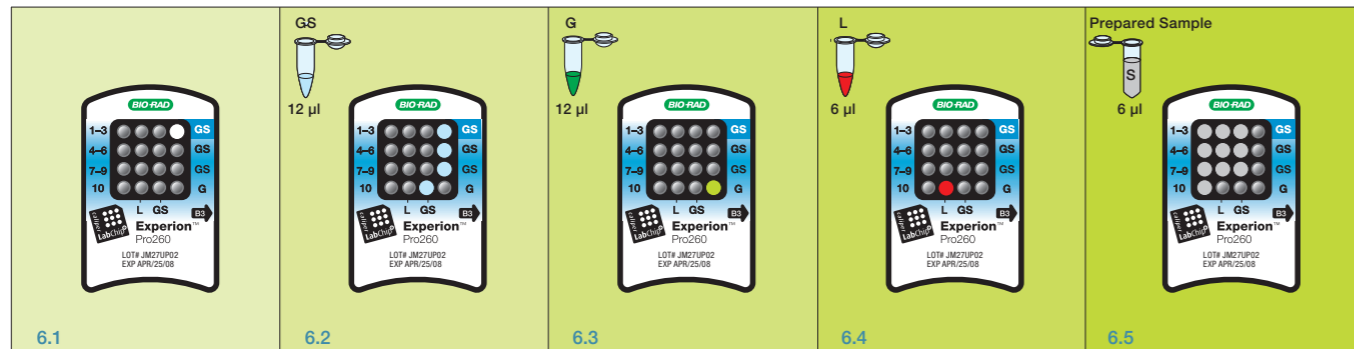
## Prime the Chip



- Add GS to priming well
- Select B3 on priming station
- Place chip in station and press **Start**
- Remove chip after priming is complete
- Flip chip over and visually inspect the microchannels for trapped air bubbles or incomplete priming

6

## Load the Prepared Samples and Pro260 Ladder Onto the Chip



- Remove remaining GS solution from the **GS** well (gel priming well)
- Pipet 12 µl filtered GS solution into all 4 **GS** wells
- Pipet 12 µl filtered G into well **G**
- Pipet 6 µl diluted protein ladder into well **L**
- Pipet 6 µl diluted sample into wells 1-10

**Note:** Do not leave any sample well empty. If necessary, pipet a replicate into any empty sample wells; run the chip in the Experion electrophoresis station within 5 min of loading.

7

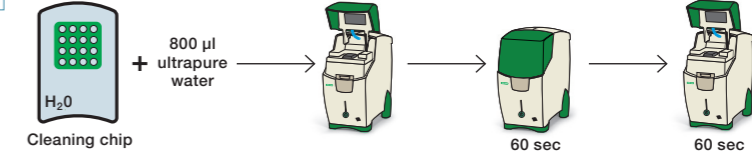
## Run the Pro260 Analysis



- Select **New Run**, then **Protein 260** assay
- Click the **Start** (▶) button onscreen
- Select number of samples to run
- When the run is complete, remove and discard the used chip

8

## Clean the Electrodes



**Note:** If using the instrument for RNA analysis after a protein run, use the deep-cleaning procedure instructions in the RNA analysis kit manual or the software version 3.0 Help section (use search term: electrodes).

## **Annexe 2 : Glycoprotein Staining Kit With Rapidstain™ for Enhanced Glycoprotein & Non Glycoproteins Staining**

### **PREPARATION BEFORE USE:**

1. Washing Solution I (3% acetic acid): Mix 30ml glacial acetic acid in 970ml deionized water.
2. Washing Solution II (50% methanol): Mix 250ml methanol in 250ml deionized water.
3. Glyco-Stain Solution: Before use transfer an appropriate amount of Glyco-Stain to a 15 or 50ml centrifuge tube. If crystal are present then centrifuge at 1000 x g for 5 minutes and use the cleared supernatant for staining. Do not use Glyco-Stain with crystals for staining or warm the solution to dissolve the crystals.
4. Glyco-Oxidizing Reagent: Add 250ml of Washing Solution I directly to the Glyco-Oxidizing Reagent bottle. Mix to dissolve the dry oxidizing agent present in the bottle. Store the solution at room temp.
5. Glyco-Reducing Reagent: Add 250ml of deionized water directly to the Glyco-Reducing Reagent bottle. Mix to dissolve the dry reducing agent present in the bottle. Store the solution at room temp.
6. Glyco-Positive and Negative controls: Before opening the tube, centrifuge the tube at 15,000xg for 5 minutes. Suspend the proteins in 105µl SDS loading buffer; incubate at room temperature for 15 minutes with periodic mixing (vortex). Aliquot the reconstituted control in to 10µl aliquots and store at -20°C. Use 10µl, 1 aliquot, for each control lane.

### **PROTOCOL**

#### **Staining glycoprotein in SDS polyacrylamide gels**

1. After electrophoresis remove the gel from electrophoresis cassette.
2. Fixing: Rinse gel in 100ml Washing Solution II for 30 minutes. Discard the solution.
3. Wash: Wash gel with 100ml of Washing Solution I for 10 minutes. Discard the wash. Repeat this wash step once.
4. Oxidation: Add 25ml of Glyco-Oxidizing Reagent. Gently agitate for 15 minutes.
5. Wash: Wash gel with 100ml of Washing Solution I for 5 minutes. Discard the wash. Repeat this wash step twice.
6. Staining: Add 25ml Glyco-Stain Solution. Agitate gently for 15 minutes. Discard the stain.
7. Reduction: Add 25ml Glyco-Reduction Reagent. Gently agitate for 5 minutes.
8. Wash gel three times with 100ml Washing Solution I for 10 minutes each wash, and then rinse with deionized water.

9. Glycoproteins are seen as magenta bands. Store gel in Washing Solution I or in drying solution (Cat. # 786-685) for drying the gel.

10. Glycoprotein Staining Controls: Appear as a cluster of positive bands or Glycoproteins (magenta bands) around 40-80kD and non-glycoprotein bands that will be visible only (as blue bands) when treated with RAPIDstain™.

### **Visualization of non-glycosylated proteins and enhancement of glycoprotein staining**

1. After staining of the glycoproteins the gel may be stained with RAPIDstain™.

RAPIDstain™ will stain unglycosylated proteins blue and enhance the visualization of the stained glycoprotein.

2. Wash gel three times with deionized water, 10 minutes each wash.

3. Develop the gel with 25ml RAPIDstain™ for 5-40 minutes. Do not stain for >40 minutes.

NOTE: Monitor the development of the stain and remove from the RAPIDstain™ once a suitable level of staining has been achieved.

4. Wash the gel in deionized water for 30 minutes.

5. For long term storage, store in Washing Solution I.

### **Staining glycoproteins on nitrocellulose membranes**

1. Wash: Wash gel with 20ml of Washing Solution I for 10 minutes. Discard the wash. Repeat this wash step once.

2. Oxidation: Add 10ml Glyco-Oxidizing Reagent to the membrane and gently agitate for 15 minutes. Discard the Oxidizing solution.

3. Wash: Wash the membrane with 10ml Wash Solution I for 5 minutes. Discard the wash. Repeat this wash step twice.

4. Staining: Add 10ml Glyco-Stain Solution and gently agitate 15 minutes. Discard the stain.

5. Reduction: Transfer the membrane into 10ml Glyco-Reducing Reagent and gently agitate for 5 minutes.

6. Wash: Wash gel 3-5 times with 50ml Washing Solution I for 10 minutes each wash, and then rinse with deionized water.

7. Glycoproteins are seen as magenta bands. Store membrane in Wash Solution I.

**Annexe 3****FICHE DU TEST HEDONIQUE**

NOM : .....

PRENOM : .....

DATE : .....

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

	<b>A</b>	<b>B</b>
Couleur jaune de la croûte		
Couleur jaune de la pâte		
Dureté		
Adhésivité		
Elasticité		
Cohésion		

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



## Algerian cardoon flowers express a large spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking

Abdellah Zikiou<sup>a, b, \*</sup>, Ana Cristina Esteves<sup>c</sup>, Eduardo Esteves<sup>c</sup>, Nuno Rosa<sup>c</sup>, Sandra Gomes<sup>d</sup>, António Pedro Louro Martins<sup>d</sup>, Mohammed Nasreddine Zidoune<sup>a</sup>, Marlene Barros<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Equipe de Transformation et d'Elaboration des Produits Alimentaires (T.E.P.A.), Laboratoire L.N.T.A., Institut de Nutrition d'Alimentation et de Technologies Agro-Alimentaire (I.N.A.T.A.A.), Université des frères Mentouri Constantine 1, Route Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>b</sup> Equipe Biomolécules à Intérêt Alimentaire, Division de Biotechnologie Alimentaire, Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt), Nouvelle ville Ali Mendjeli, UV03 BP E73, 25000 Constantine, Algeria

<sup>c</sup> Universidade Católica Portuguesa, Center for Interdisciplinary Research in Health (CIIS), Institute of Health Sciences (ICS), Viseu, Portugal

<sup>d</sup> Unidade de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 December 2019

Received in revised form

15 February 2020

Accepted 22 February 2020

Available online 4 March 2020

### ABSTRACT

Proteases from flowers of Algerian cultivated and wild cardoons were purified, characterised and compared with those purified from flowers of a Portuguese variety. Three cardosins (A<sub>0</sub>, A and B) were obtained from each variety. All of them were dimeric and comprised heavy and light chain. Cardosins from Algerian varieties presented higher molecular masses and were less glycosylated than their Portuguese counterparts. Milk coagulation and curd yield parameters revealed a large difference between cardosins A<sub>0</sub>, A and B and among the same cardosin from different origins. The enzymatic specificity of cardosins, studied against β-chain of oxidised insulin and κ-casein, showed no prevalent effect of varieties. However, compared with cardosins A<sub>0</sub> and A, cardosin B was more proteolytic and led to more complex digestion profiles. The present study reports the first description of the diversity of cardosins in Algerian cardoon flowers and sustains their potential use as milk coagulants for cheesemaking.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Several enzymes from various origins (animals, plants and microorganisms) can coagulate milk and are used in cheese making (Hyslop, 2003; Jacob, Jaros, & Rohm, 2011; Yegin & Dekker, 2013). Plant coagulants have a strong coagulant activity and are accessible for farmers. Their use in cheese manufacturing is mainly driven by the chronic shortages in rennet, an enzyme extracted from the stomach of young calves (Hafid et al., 2019; Llorente, Obregón, Avilés, Caffini, & Vairo-Cavalli, 2014; Shah, Mir, & Paray, 2014; Tito, Pepe, Tonon, Daleo, & Guevara, 2020).

Nonetheless, some studies report limitations to the use of plant coagulants, mainly traduced by some defects in texture and in sensorial quality of the produced cheeses (Shah et al., 2014). However, proteases from the cardoon *Cynara cardunculus* L. seem to be an exception (Roseiro, Barbosa, Ames, & Wilbey, 2003; Sousa &

Malcata, 2002). In fact, it was shown that the aqueous extract of the cardoon flowers is a successful substitute of animal rennet used for centuries to produce traditional cheeses along the Mediterranean basin (Roseiro et al., 2003). These cheeses usually have a regional character and are representative of small-scale production in rural areas. They are an important source of income for local communities and have a high impact on the preservation of specific regional breeds of cows, sheep and goat (Folgado & Abranches, 2020). Portugal, Spain and Italy have a large variety of PDO traditional cheeses produced using cardoon flowers as coagulant: Serra da Estrela, Serpa and Azeitão in Portugal; La Serena, Manchego and Torta del Casar in Spain; Fiore sardo and Cacio Fiore in Italy (Aquilanti et al., 2011; Francisco-José, Joaquín, José, Ramírez, & Isidro, 2010; Llorente et al., 2014; Macedo & Malcata, 1997; Ordiales et al., 2016; Prados, Pino, & Fernández-Salguero, 2007; Roseiro et al., 2003).

The milk-clotting activity of *C. cardunculus* flowers extract is due to several aspartic proteases (Aps): cardosins (A, B, E, F, G and H) as well as cyprosins 1, 2 and 3 (Cordeiro, Pais, & Brodelius, 1994;

\* Corresponding author. Tel.: +213 (31) 77.50.37.

E-mail address: [a.zikiou@crbt.dz](mailto:a.zikiou@crbt.dz) (A. Zikiou).



Sarmiento et al., 2009). Cardosins represent around 70% of total proteins content in cardoon flowers (Oliveira et al., 2010). Cardosins A and B are the most studied and characterised. These two proteases are able to cleave the Phe<sub>105</sub>–Met<sub>106</sub> bond of  $\kappa$ -casein: cardosin A acting like chymosin while cardosin B has a pepsin-like activity what gives to the extract of cardoon flowers a good aptitude to coagulate milk (Veríssimo, Esteves, Faro, & Pires, 1995). Recent studies reported a considerable variability in cardosin contents of cardoon flowers (Amira et al., 2017; Barracosa, Rosa, Barros, & Pires, 2018). This variability in enzymes composition, has an influence on the characteristics of the yielded curds and therefore, could have an impact on cheese properties (Gomes et al., 2019).

In Algeria, two varieties of cardoon are known and widely distributed: cultivated cardoon (*C. cardunculus* L. var. *altilis*) and the wild or spontaneous cardoon (*C. cardunculus* L. var. *sylvestris*). Rural population uses cardoon flowers to prepare numerous traditional fresh cheeses, namely Tiklilt or Djben, usually manufactured from cow, goat or sheep milk (Aquilanti et al., 2011; Benheddi & Hellal, 2019). However, in Algeria, cardoon is still somehow an underutilised source. Thereby, the valorisation of milk coagulant enzymes from *C. cardunculus* may be economically beneficial to stimulate the local cheese-making industry: knowing that the Algerian cheese factories import most of their needs (e.g., coagulants), cardoon flowers could be an interesting alternative to the imported rennet. The present study aims to characterise the proteases occurring in the flowers of the two Algerian cardoon varieties and evaluate their milk coagulant properties. Furthermore, a comparison with the enzymes extracted from the Portuguese cardoon variety is made.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

Cardoon flowers used in the present study were collected from two locations (Akbou, 36°29'08.9"N 4°36'35.6"E and Tizi Ouzou, 36°36'17.9"N 3°59'06.6"E) in the region of Kabylia, middle north of Algeria. Flowers collected in Akbou were identified as the wild cardoon *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* (labelled as ALG1) while flowers collected at Tizi Ouzou were from the cultivated cardoon *C. cardunculus* L. var. *altilis* (labelled as ALG2). ALG1 and ALG2 pistils were collected from well-developed open capitula and dried up to a final water content of 7.65% (w/w) and 5.80% (w/w) respectively. Portuguese flowers (labelled as POR) were collected from plants identified as *C. cardunculus* at a location named Ansião (39°54'52.3"N 8°26'23.1"W).

### 2.2. Crude extract preparation

Crude extracts were obtained according to Sarmiento et al. (2009). Cardoon pistils (1 g dried flowers) were ground with a mortar and homogenised in 12 mL of sodium citrate buffer (0.1 M, pH 3.5), centrifuged for 10 min at 14,000×g and filtered through a 0.2 µm cellulose mixed esters filter (Whatman). Filtrates, considered as the crude extracts from this point forward, were used immediately.

### 2.3. Cardosin purification

Cardosins A<sub>0</sub>, A and B were purified as described by Sarmiento et al. (2009) with slight modifications. Extract (8 mL) was loaded into a Hiloal 26/60 Superdex 75 prep grade column (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Sweden) attached to an ÄKTA Basic system (GE Healthcare). The column was equilibrated and eluted with 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, at a flow rate of 4 mL min<sup>-1</sup> and monitored

at 280 nm. Afterwards, 10 mL of the active fraction was applied to a Q-sepharose 26/20 Fast Flow column (QFF26/20, GE Healthcare), equilibrated with 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. Proteins were eluted using a gradient of NaCl (0.2–1 M) at a flow rate of 8 mL min<sup>-1</sup>. NaCl from cardosins' fractions was removed using a G25 HiPrep 26/10 Desalting column (GE Healthcare), equilibrated with ultra-pure water at a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup>. Pure cardosins were lyophilised and stored at –80 °C until further use.

### 2.4. Protein quantification

Protein concentration was determined by the Micro BCA™ protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Also, Nanovue spectrophotometer (GE Healthcare) was used for routine measurements.

### 2.5. Purity assessment and molecular mass determination

Cardosins' purity was evaluated using an automated Experion capillary electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with standard protein chips (Experion Pro260 Analysis Kit, Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 4 µL of sample were mixed with 2 µL of sample reducing buffer (containing 3% β-mercaptoethanol), incubated for 10 min at 95 °C and diluted with 84 µL of ultra-pure water. After priming of the chip with the gel and gel-staining solution, the samples and the ladder were loaded into the wells. The migration times and the concentration of each protein in the sample wells were normalised to the ladder using internal markers. Electropherograms and virtual gels were analysed using the Experion Software, version 3.20 (Bio-Rad).

### 2.6. Glycoprotein detection

Twenty µg of pure cardosins A<sub>0</sub>, A and B were diluted (1:1) with 2 × Laemmli sample buffer (Bio-Rad) and heated at 95 °C for 10 min. Proteins were separated in a lab-casted 15% polyacrylamide gel for 2 h at 100 V according to Laemmli (1970). After electrophoresis cardosins were transferred to a poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) using 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid (CAPS) buffer (Sigma) for 10 min at 400 mA in a Trans-BlotTurbo transfer system (Bio-Rad). After transfer, to detect glycosylated bands, the membrane was stained for glycoprotein staining with the Glycoprotein Staining Kit (G-Biosciences, 786-254, USA), following the manufacturer's instructions. The kit is based on the periodic acid-Schiff (PAS) method that detects glycoproteins separated on nitrocellulose membranes. First, periodic acid oxidises cis-1,2-diol groups to aldehydes and then, the aldehydes will react with the Schiff's reagent (Zacharius, 1969). Finally, after glycoprotein staining, RAPIDstain™, an enhanced Coomassie stain supplied with the kit, was used for total proteins detection. Membrane was digitalised with a FX-710 ChemiDoc (Bio-Rad). The density of the bands was determined using Quantity 1 version 6.0 (Bio-Rad) software.

### 2.7. Milk clotting activity

Clotting activity was determined according to the ISO 23058|IDF 199 (2006). Briefly, 0.5 mL of enzymatic solution (0.28 mg mL<sup>-1</sup> for crude extracts and 0.12 mg mL<sup>-1</sup> for pure cardosins) was added to 25 mL of spray-dried milk [11% (w/v) in 10 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6.5]. The mixture was incubated at 32 °C under mild agitation. The time from the addition of the enzymatic solution to the first appearance of solid material (in seconds) is the clotting time and it was compared with that of an adult bovine rennet reference standard powder (Chr. Hansen, Denmark) with a milk-clotting activity of 1000

International Milk-Clotting Units per gram (IMCU g<sup>-1</sup>). Total milk clotting activity of enzymatic solutions ( $a_t$ ) expressed in IMCU mL<sup>-1</sup> was calculated using the following equation:

$$a_t = t_{\text{ref}} * 0.003 * d * a_{\text{ref}} / t_t$$

where,  $t_{\text{ref}}$  is the reference rennet clotting time,  $d$  is the dilution factor of the tested enzymatic solution,  $a_{\text{ref}}$  is the coagulant activity of calf rennet reference and  $t_t$  is the clotting time of tested enzymatic solution. All assays were carried out in triplicates.

### 2.8. Analysis of milk coagulation properties

Milk clotting properties of crude extracts and of pure cardosins were determined with an Optigraph (Ysebaert/Alliance Instruments, AMS France). The equipment was developed to define coagulation characteristics in the laboratory, and it's based on the measurement of near infrared region (NIR) signal attenuation due to the micellar aggregation of caseins (Gomes et al., 2019). Ten mL of reconstituted milk (11%, w/v, in 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.6), were added to 1 mL of enzymatic solution (0.28 mg mL<sup>-1</sup> for crude extracts and 0.12 mg mL<sup>-1</sup> for pure cardosins) and coagulation was monitored at 32 °C. The intensity of the emitted signal was set to 7 V. The parameters determined were: the coagulation time (R, in seconds) elapsed from the moment when the enzyme solution was added to the point when a gel starts to form; OK20 parameter (rate of curd firming): the time (in seconds) to reach a standard curd firmness related with a firmness suitable for cutting, equivalent to 2.5 V. Curd firmness evolution was followed by the measurement of the voltage during the coagulation process (A20 and A40: curd firmness after 20 and 40 min, respectively; AR and A2R: curd firmness after 2 and 3 times R value, respectively). All analysis were performed in duplicate.

### 2.9. Enzymatic hydrolysis of $\kappa$ -caseins and of $\beta$ -chain of oxidised insulin

Pure cardosins were added to  $\kappa$ -casein in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.2 (enzyme/substrate ratio of 1/250, w/w) and the reaction allowed to proceed for 40 min, at 30 °C. Reaction was stopped by heating the samples at 105 °C. Samples were analysed using the automated Experion capillary electrophoresis system as described in "capillary chip electrophoresis" section.

Specificity of pure cardosins against  $\beta$ -chain of oxidised insulin was studied following the protocol described by Sarmiento, Oliveira, Pires, Halling, and Barros (2004) with slight modifications.  $\beta$ -Chain of oxidised insulin (Sigma, 1 mg mL<sup>-1</sup>) was incubated with the enzyme (0.04 mg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C, in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 6.5). The reaction was stopped after 3 h by adding an equal volume of trifluoroacetic acid (TFA, 1.2%, v/v). Samples were analysed by HPLC (Shimadzu, Columbia, MD, USA) equipped with a photodiode array detector, set to at a wavelength of 215 nm, and a C18 column (250 × 4.6 mm LiChroCART™ 100 RP-18, 5 mm, Merck). Mobile phase consisted of water containing 0.1% (v/v) TFA and elution was achieved through a gradient to 100% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>.

### 2.10. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Data are expressed as mean ± SD. For protein content and milk clotting activity one-way ANOVA test was performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Coagulation properties were analysed by principal component analysis (PCA) using ClustVis (Nipals PCA, no row scaling).

## 3. Results

### 3.1. Chromatographic profiles protein recovery and electrophoretic patterns

Cardosins A<sub>0</sub>, A and B were purified from three varieties of *C. cardunculus* (ALG1, ALG2 and POR). The purification of cardosins was based the protocol of Sarmiento et al. (2009) that includes two successive chromatographic steps. First, crude extracts were fractionated by size exclusion chromatography. For the three varieties, the proteolytic activity was recovered as a single peak (Fig. 1a), but with different elution times; ALG1 active fraction was eluted after 43 min, while those from ALG2 and POR were eluted after 48 min.

Each active fraction was applied to a Q-Sepharose Fast Flow (QFF) column and fractionated into three active peaks: cardosins A<sub>0</sub>, A and B (Fig. 1b). Cardosins A<sub>0</sub> (ALG1 A<sub>0</sub>, ALG2 A<sub>0</sub> and POR A<sub>0</sub>) were eluted at 0.27–0.30 M NaCl. Cardosins A (ALG1 A, ALG2 A and POR A) were eluted at 0.34–0.38 M NaCl and cardosins B (ALG1 B, ALG2 B and POR B) were eluted at 0.40–0.46 M NaCl.

The crude extract from the Portuguese variety had the highest in protein content (29.42 mg g<sup>-1</sup> of pistils, Table 2). Cardosin A was the dominant fraction in all cardoon varieties (with 38.5%, 30.7% and 31.4% of total protein for ALG1, ALG2 and POR, respectively), and cardosin B was the least abundant (with 4.87%, 4.82% and 3.12% of total proteins for, respectively, ALG1, ALG2 and POR). Cardosin A<sub>0</sub> is more abundant in the Algerian cardoons (ALG1 and ALG2: 23.88% and 17.54%, respectively) than in the Portuguese variety (7.16% of total protein).

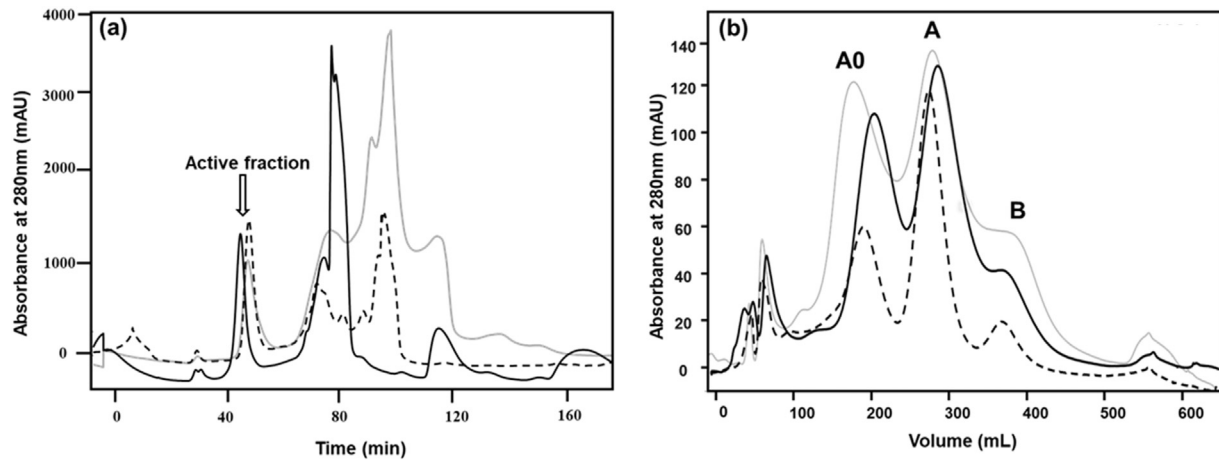
Electrophoretic patterns of active fractions from size exclusion chromatography show similar profiles. Capillary electrophoresis of the purified cardosins revealed that the purification degree of each fraction was 100% except in the case of cardosin B. In this case a slight contamination with cardosin A was detected. As expected, each pure enzyme comprised a heavy and a light chain (Fig. 2). Cardosins obtained from Algerian cardoons have slightly heavier sub-units (Table 1) and simultaneously are less glycosylated than the Portuguese counterparts (Fig. 3). Cardosin B is the most glycosylated one, regardless of its origin.

### 3.2. Coagulant activity and milk clotting properties of cardosins

Total milk clotting activity of crude extracts and pure of cardosins are reported in Table 2. ALG1 and ALG2 extracts have total milk clotting activities significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of the Portuguese flowers extract, which can be explained by the lower amount of cardosins present in the Portuguese extract (42.12% of total proteins). Cardosin A is the responsible for most of the activity measured in all extracts tested. On the other hand, cardosin B specific activity was the highest regardless its origin.

The milk clotting time R, of ALG1 crude extract (429.5 ± 3.5 s) was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than those of ALG2 and POR (589.5 ± 2.5 and 587 ± 0.0 s, respectively) (Table 3). However, no significant differences were observed between the three extracts for the curd firmness of coagulated milk after 20 and 40 min (A20 and A40), or for the rate of curd firmness (OK20).

Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the clotting time of pure cardosins A<sub>0</sub>, A and B within the same variety, as well as between the same cardosin obtained from different cardoon varieties (ALG1, ALG2 or POR): ALG1 cardosin A<sub>0</sub> leads to the lowest clotting time (R) (796 ± 56 s) compared with cardosin A<sub>0</sub> from ALG2 and POR (respectively 922.5 ± 182.5 and 1648.5 ± 46.5). However, for cardosins A and B the lowest values of R were presented by cardosins from ALG2 (608.5 ± 28.5 and 745.5 ± 101.5 s respectively). Our data show (Table 3) that enzymes inducing lower clotting times also lead to higher rates of curd firmness (lower



**Fig. 1.** Size exclusion chromatography (a) of cardoon pistils from Algerian flowers (—, ALG1; ---, ALG2) and Portuguese flowers (.....) with the active fraction indicated by an arrow and (b) purification of cardosins A<sub>0</sub>, A and B by ion exchange of the active fraction.

**Table 1**

Molecular masses of pure cardosin light and heavy chains estimated by capillary electrophoresis.<sup>a</sup>

Cardosin	Light chain (kDa)	Heavy chain (kDa)
ALG1 A <sub>0</sub>	16.2 ± 00.0 <sup>a,A</sup>	33.1 ± 00.0 <sup>b,A</sup>
ALG1 A	16.2 ± 00.1 <sup>a,A</sup>	33.3 ± 00.1 <sup>b,A</sup>
ALG1 B	14.4 ± 00.1 <sup>b,A</sup>	42.3 ± 00.1 <sup>a,A</sup>
ALG2 A <sub>0</sub>	16.4 ± 00.1 <sup>a,A</sup>	33.1 ± 00.0 <sup>b,A</sup>
ALG2 A	16.1 ± 00.0 <sup>a,A</sup>	33.2 ± 00.0 <sup>b,A</sup>
ALG2 B	14.6 ± 00.1 <sup>b,A</sup>	40.1 ± 00.2 <sup>a,AB</sup>
POR A <sub>0</sub>	16.2 ± 00.0 <sup>a,A</sup>	31.3 ± 00.1 <sup>b,B</sup>
POR A	16.2 ± 00.1 <sup>a,A</sup>	31.1 ± 00.0 <sup>b,B</sup>
POR B	13.1 ± 00.0 <sup>b,B</sup>	40.2 ± 00.0 <sup>a,B</sup>

<sup>a</sup> Abbreviations are: ALG1, flowers from Algerian wild cardoon *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*; ALG2, flowers from Algerian cultivated cardoon *C. cardunculus* L. var. *altilis*; POR, Portuguese cardoon flowers. Different lowercase and uppercase superscript letters show significant differences among enzymes groups within the same variety and among varieties for the same enzyme group, respectively ( $p < 0.05$ ).

values of OK20) and therefore, with higher values of A20 and A40 (firmness of coagulated milk respectively, after 20 and 40 min). By comparison with animal rennet (data not shown in the manuscript), cardosin groups generate coagulums presenting overall, lower firmness proprieties and simultaneously higher values OK20. This could be explained by the low specificity of cardosins compared with the animal rennet.

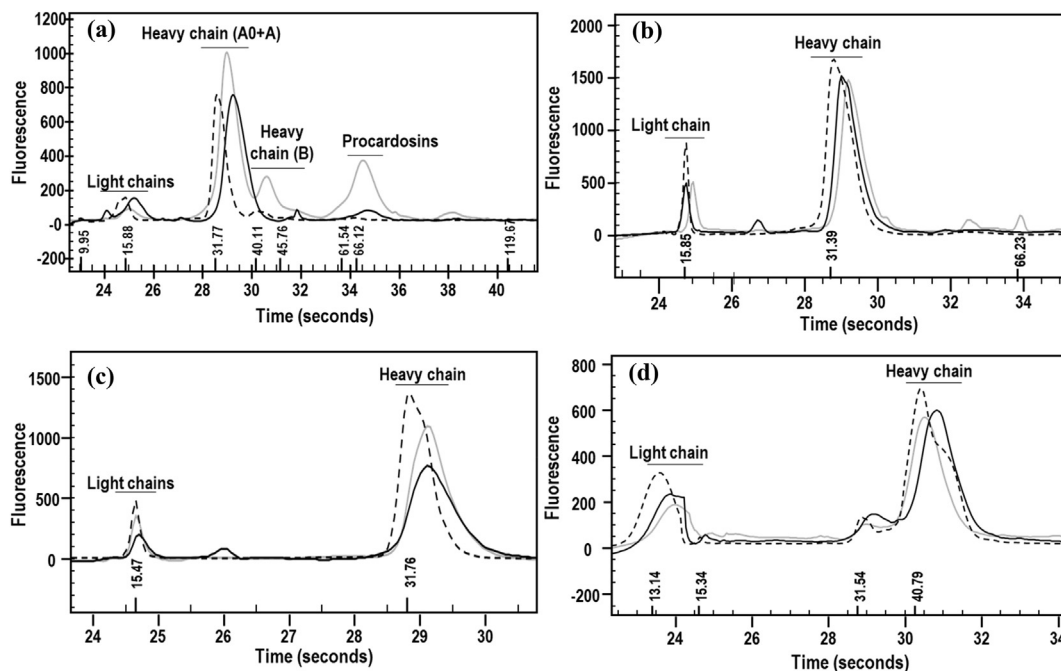
The principal component analysis (PCA) of the milk clotting properties (Fig. 4) shows that the first two dimensions of the model explain 81.99% of the total variance. The first principal component (PC1) accounting for 41.97% of the total variation was dominated positively by the specific activity and firmness parameters (AR, A2R, A20 and A40) and negatively by protein content and OK20. The second principal component (PC2) accounted for 40.02% of the total variation was positively dominated by R and negatively by the protein content and firmness parameters: A20 and A40 (Fig. 4a). The distribution generated by the analysis, grouped cardosins into clusters I and II (Fig. 4b). Cluster I contains the three crude extracts,

**Table 2**

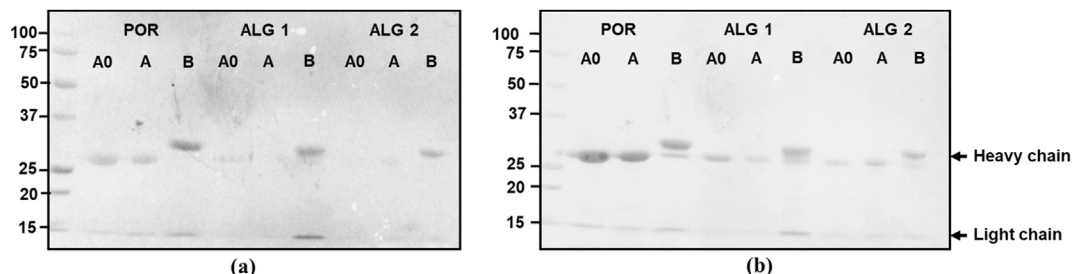
Recovery profiles of cardosins from 1 g of dried pistils.<sup>a</sup>

Cardosin	Protein concentration (mg g <sup>-1</sup> ± SD)	Protein recovery rate (%)	Total activity (IUMC ± SD)	Activity recovery rate (%)	Specific activity (IUMC mg <sup>-1</sup> )	
ALG1	Crude extract	26.1 ± 0.8 <sup>a,B</sup>	100.0	6.8 ± 0.1 <sup>cd,A</sup>	100.0	0.3
	Size exclusion	18.4 ± 0.4 <sup>b,A</sup>	70.6	33.0 ± 1.2 <sup>a,A</sup>	486.4	1.8
	Cardosin A <sub>0</sub>	6.2 ± 0.0 <sup>d,A</sup>	23.9	8.3 ± 1.1 <sup>c,A</sup>	123.0	1.3
	Cardosin A	10.0 ± 0.0 <sup>c,A</sup>	38.5	22.9 ± 1.4 <sup>b,A</sup>	337.2	2.3
	Cardosin B	1.3 ± 0.1 <sup>e,A</sup>	4.9	4.2 ± 0.5 <sup>d,A</sup>	61.8	3.3
ALG2	Crude extract	21.3 ± 0.4 <sup>a,C</sup>	100.0	6.3 ± 0.9 <sup>c,A</sup>	100.0	0.3
	Size exclusion	13.2 ± 0.3 <sup>b,B</sup>	62.1	22.9 ± 2.0 <sup>a,B</sup>	364.2	1.7
	Cardosin A <sub>0</sub>	3.7 ± 0.1 <sup>d,BC</sup>	17.5	5.2 ± 1.8 <sup>c,B</sup>	82.1	1.4
	Cardosin A	6.5 ± 0.1 <sup>c,B</sup>	30.7	11.6 ± 0.7 <sup>b,B</sup>	183.9	1.8
	Cardosin B	1.0 ± 0.1 <sup>e,A</sup>	4.8	2.6 ± 0.7 <sup>d,B</sup>	40.8	2.5
POR	Crude extract	29.4 ± 1.8 <sup>a,A</sup>	100.0	3.7 ± 0.9 <sup>c,B</sup>	100.0	0.1
	Size exclusion	12.4 ± 0.2 <sup>b,B</sup>	42.1	13.4 ± 0.1 <sup>b,C</sup>	365.6	1.1
	Cardosin A <sub>0</sub>	2.1 ± 0.1 <sup>d,C</sup>	7.2	5.1 ± 0.2 <sup>c,B</sup>	140.6	2.4
	Cardosin A	9.2 ± 0.1 <sup>c,A</sup>	31.4	21.0 ± 0.4 <sup>a,A</sup>	574.1	2.3
	Cardosin B	0.9 ± 0.0 <sup>e,A</sup>	3.1	3.6 ± 0.4 <sup>c,AB</sup>	98.5	3.9

<sup>a</sup> Abbreviations are: ALG1, flowers from Algerian wild cardoon *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*; ALG2, flowers from Algerian cultivated cardoon *C. cardunculus* L. var. *altilis*; POR, Portuguese cardoon flowers; IUMC, International milk clotting unit. Specific activity is the ratio: milk clotting activity on protein concentration. Different lowercase and uppercase superscript letters show significant differences among enzymes groups within the same variety and among varieties for the same enzyme group, respectively ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Capillary electrophoresis profiles of (a) the active fractions eluted by size exclusion chromatography, (b) cardosins A<sub>0</sub>, (c) cardosins A and (d) cardosins B: —, ALG1; —, ALG2; ----, POP. The migration times of enzymes were normalised to the ladder using internal markers and electropherograms were analysed using the Experion Software, v. 3.20 (Bio-Rad).



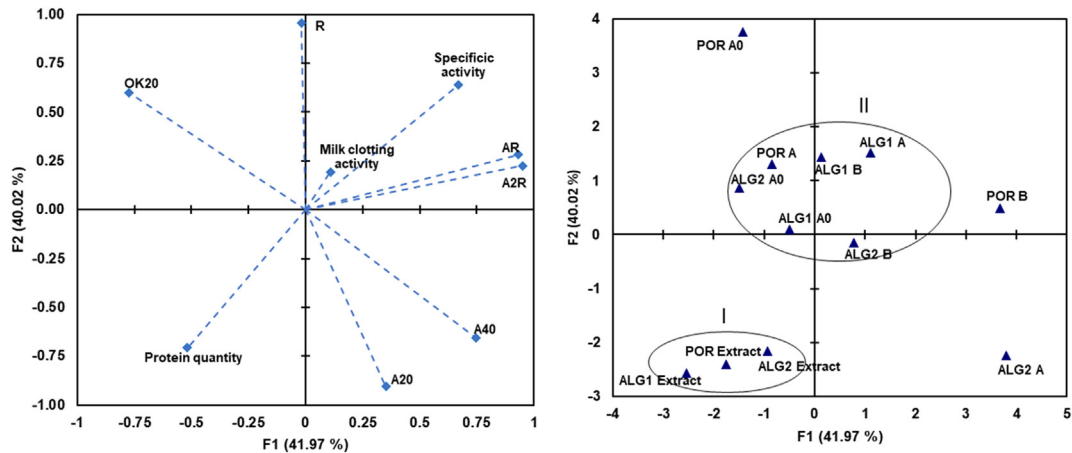
**Fig. 3.** Cardosin glycosylation: pure cardosins were separated by SDS-PAGE and stained with (a) glycoprotein staining kit or (b) with Coomassie blue.

**Table 3**

Technological parameters of cardosins obtained from flowers of 3 varieties of the cardoon *Cynara cardunculus* (ALG1, ALG2 and POR) evaluated by Optigraph.<sup>a</sup>

Cardosin		R (s)	AR (V)	A2R (V)	A20 (V)	A40 (V)	OK20 (s)
ALG1	Crude extract	429.5 ± 3.5 <sup>cB</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>cA</sup>	3.1 ± 0.6 <sup>cA</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>aA</sup>	4.7 ± 1.1 <sup>aA</sup>	679.0 ± 193.0 <sup>aA</sup>
	Cardosin A <sub>0</sub>	796.0 ± 56.0 <sup>b,c</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>b,AB</sup>	4.7 ± 0.6 <sup>b,cA</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b,A</sup>	4.6 ± 0.2 <sup>a,A</sup>	662.5 ± 45.5 <sup>a,c</sup>
	Cardosin A	1089.5 ± 120.5 <sup>aA</sup>	4.0 ± 0.5 <sup>aA</sup>	6.4 ± 0.8 <sup>aA</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>c,B</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>a,B</sup>	595.5 ± 12.5 <sup>a,B</sup>
	Cardosin B	1067.5 ± 63.5 <sup>aA</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>ab,B</sup>	5.5 ± 0.4 <sup>ab,B</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>c,B</sup>	4.1 ± 0.0 <sup>a,C</sup>	682.5 ± 10.5 <sup>a,A</sup>
ALG2	Crude extract	589.5 ± 2.5 <sup>cA</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>bA</sup>	4.4 ± 1.0 <sup>b,A</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>b,A</sup>	5.5 ± 1.3 <sup>bc,A</sup>	592.5 ± 155.5 <sup>b,A</sup>
	Cardosin A <sub>0</sub>	922.5 ± 182.5 <sup>aB</sup>	2.7 ± 0.0 <sup>b,B</sup>	4.2 ± 0.0 <sup>b,A</sup>	1.2 ± 0.7 <sup>b,A</sup>	3.7 ± 0.7 <sup>cA</sup>	830.0 ± 159.0 <sup>b,B</sup>
	Cardosin A	608.5 ± 28.5 <sup>bc,B</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>aA</sup>	7.1 ± 0.9 <sup>aA</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>aA</sup>	8.9 ± 0.8 <sup>aA</sup>	298.5 ± 28.5 <sup>c,C</sup>
	Cardosin B	745.5 ± 101.5 <sup>ab,B</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>ab,B</sup>	5.0 ± 0.2 <sup>b,B</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>b,A</sup>	5.3 ± 0.4 <sup>bc,B</sup>	523.5 ± 16.5 <sup>b,A</sup>
POR	Crude extract	587.0 ± 00.0 <sup>cA</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>bA</sup>	4.0 ± 0.8 <sup>b,A</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>aA</sup>	5.0 ± 1.1 <sup>aA</sup>	609.5 ± 159.5 <sup>b,A</sup>
	Cardosin A <sub>0</sub>	1648.5 ± 46.5 <sup>aA</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>ab,A</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>b,A</sup>	0.0	2.1 ± 0.1 <sup>b,B</sup>	1016.0 ± 111.0 <sup>aA</sup>
	Cardosin A	954.0 ± 176.0 <sup>b,A</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>b,B</sup>	4.4 ± 0.1 <sup>b,B</sup>	1.0 ± 0.6 <sup>b,B</sup>	3.8 ± 0.6 <sup>b,B</sup>	782.0 ± 93.0 <sup>b,A</sup>
	Cardosin B	878.5 ± 154.5 <sup>b,B</sup>	4.6 ± 0.3 <sup>aA</sup>	7.2 ± 0.3 <sup>aA</sup>	2.3 ± 0.7 <sup>ab,A</sup>	6.6 ± 0.8 <sup>aA</sup>	373.5 ± 6.5 <sup>cB</sup>

<sup>a</sup> Abbreviations are: ALG1, flowers from Algerian wild cardoon *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*; ALG2, flowers from Algerian cultivated cardoon *C. cardunculus* L. var. *atilis*; POR, Portuguese cardoon flowers; R, coagulation time (s); OK20, rate of curd firming time (s) to reach a standard curd firmness (2.5 V); AR, curd firmness after 2 times R value; A2R, curd firmness after 3 times R value; A20, curd firmness after 20 min; A40, curd firmness after 40 min. Different lowercase and uppercase superscript letters show significant differences among enzymes groups within the same variety and among varieties for the same enzyme group, respectively ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Multifactor analysis (a) of the milk clotting properties evaluated among the cardosins in the plan defined by the two first principal components (PC1 and PC2) and (b) projection of crude extract, animal rennet and pure cardosins in the plan defined by the two first principal components (PC1 and PC2) based on the average of the technological characters previously measured.

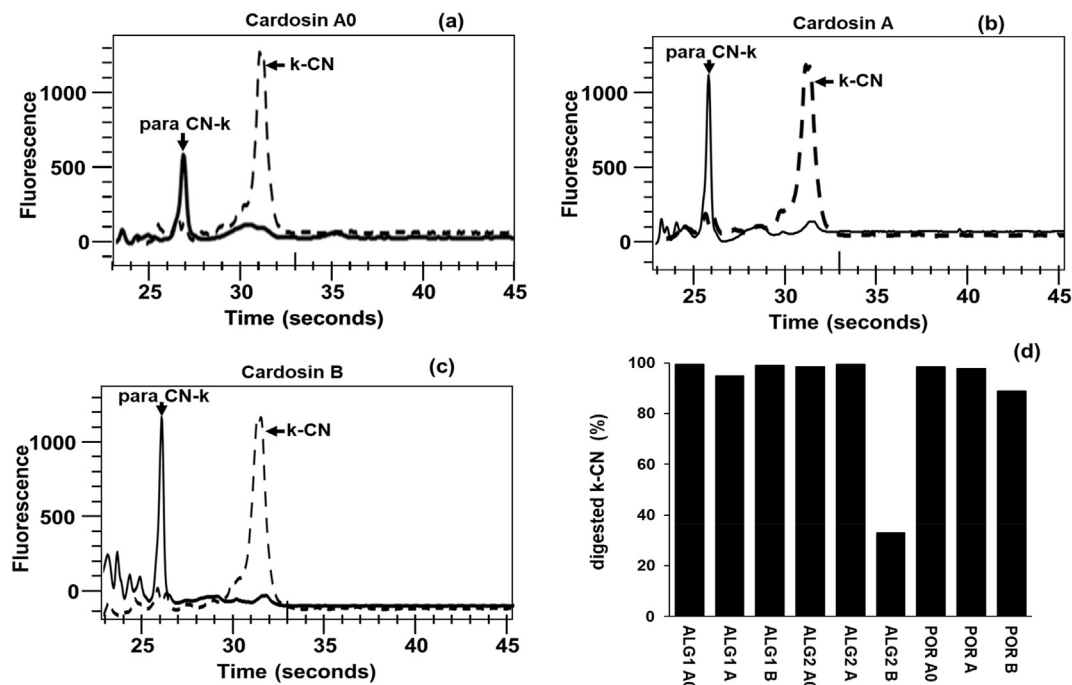
presented high amount of proteins, low milk clotting time (R), and high micellar aggregation rate as well as low milk clotting activity and a low specific activity. Cluster II was composed of cardosins A<sub>0</sub>, A and B of ALG1, A<sub>0</sub> and B of ALG2 and POR A, presented high specific activity, an average micellar aggregation rate, and middle curd firmness parameters. POR A<sub>0</sub> showed poor milk clotting properties with high R, low micellar aggregation rate and low curd firmness. In the other hand POR B and ALG2 A yielded curds with high firmness.

### 3.3. Hydrolysis of $\kappa$ -casein and of $\beta$ -chain of oxidised insulin

Typical electrophoretic profiles of the enzymatic digestion of  $\kappa$ -casein ( $\kappa$ -CN) by cardosins are shown in Fig. 5. All cardosins were

able to digest  $\kappa$ -CN translated by the disappearance of  $\kappa$ -CN after 40 min of reaction. In general, independently of the cardoon varieties, cardosin A<sub>0</sub> (Fig. 5a) and cardosin A (Fig. 5b) shown similar profiles of  $\kappa$ -CN digestion. Cardosin B leads to different profiles with more products (Fig. 5c). Cardosin B from ALG2 variety was the less active fraction with only 33% of  $\kappa$ -CN being digested after 40 min.

Fig. 6 shows the typical HPLC profiles of  $\beta$ -chain of oxidised insulin digested by cardosins. Peak areas of the main reaction products are presented in Table 4. After 3 h of reaction, no prevalent effect of varieties was observed, however, differences were noted between the digestion profiles by the different cardosins. In fact, in addition of the main peaks (a, b and c), cardosin B leads to other products (peaks d, e,  $\alpha$  and  $\beta$ ).



**Fig. 5.**  $\kappa$ -Casein digestion by cardosin fractions showing typical capillary electrophoresis profiles at time zero (-----) and after 40 min (—) for (a) cardosin A<sub>0</sub>, (b) cardosin A and (c) cardosin B, with (d) the amount of digested  $\kappa$ -CN (%).

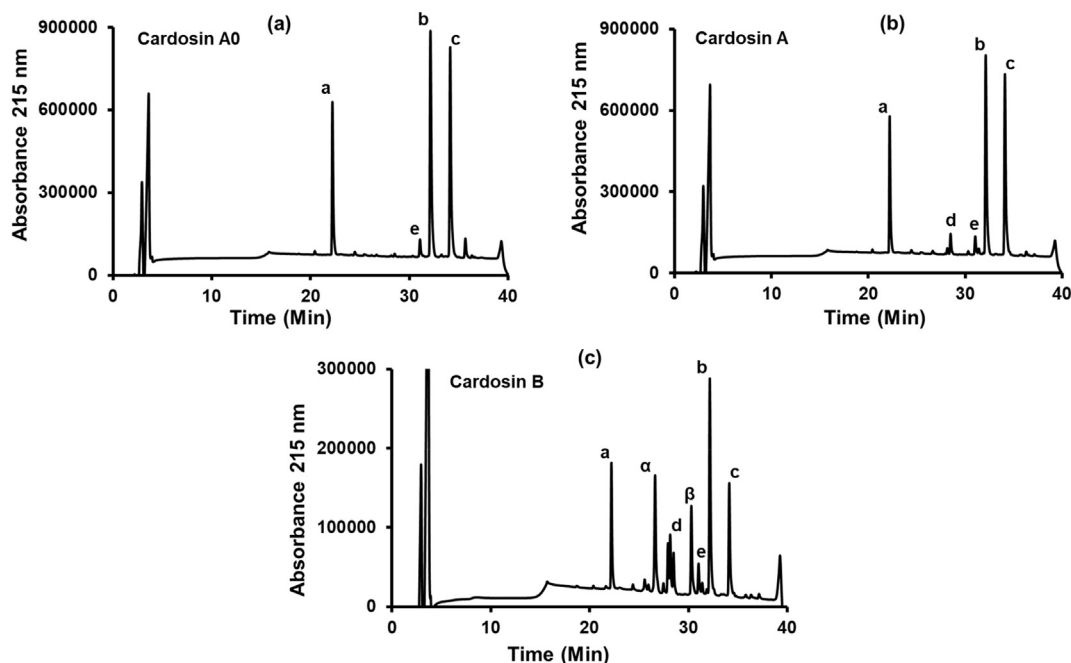


Fig. 6. Typical HPLC profiles of  $\beta$ -chain of oxidised insulin digested by (a) cardosin A<sub>0</sub>, (b) cardosin A, (c) cardosin B.

Table 4

Relative amount (%) of major products produced by hydrolysis of  $\beta$ -chain of oxidised insulin by cardosins purified from flowers of the three studied cardoon varieties.<sup>a</sup>

Cardosin		Peak a	Peak b	Peak c	Peak d	Peak e	Peak $\alpha$	Peak $\beta$
ALG1	Cardosin A <sub>0</sub>	96	98	96	0	86	0	0
	Cardosin A	87	88	84	60	91	0	0
	Cardosin B	87	92	78	95	56	100	94
ALG2	Cardosin A <sub>0</sub>	0	98	97	0	71	0	0
	Cardosin A	100	100	100	0	100	0	0
	Cardosin B	95	98	98	0	61	53	95
POR	Cardosin A <sub>0</sub>	78	21	49	0	20	0	0
	Cardosin A	55	58	50	7	84	0	0
	Cardosin B	27	32	18	100	69	59	100

<sup>a</sup> Abbreviations are: ALG1, flowers from Algerian wild cardoon *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*; ALG2, flowers from Algerian cultivated cardoon *C. cardunculus* L. var. *atilis*; POR, Portuguese cardoon flowers. 100% was set to the highest amount of each product (peak), produced after 3 h of reaction.

#### 4. Discussion

To reach self-sufficiency, Algeria made the promotion of the dairy sector among its main priorities. Finding local sources of coagulant enzymes to support the needs of cheese factories could reduce the heavy reliance to imports. In our previous work (Zikiou & Zidoune, 2019), the aqueous extract of wild cardoon flowers (*C. cardunculus* var. *sylvestris*) was partially characterised and used in cheesemaking as a substitute of the imported rennet to manufacture a Camembert type cheese. The present study aimed to purify and make a deeper characterisation of the cardoon flowers' proteases namely in what concerns milk coagulation. Cardosins extracted and purified from flowers of two Algerian cardoon varieties (wild and cultivated cardoon, respectively ALG1 and ALG2) were characterised and compared with cardosins from a Portuguese variety (POR).

Cardosins A<sub>0</sub>, A and B were purified from all cardoon varieties with a clear dominance of cardosin A, in agreement to previous reports (Ramalho-Santos, Veríssimo, Faro, & Pires, 1996; Veríssimo et al., 1996). However, physico-chemical properties of the enzymes vary with its origin. This was reflected by the different interactions with the ion-exchange chromatography, which can be related to the different glycosylation levels of the enzymes. Algerian

cardosins A<sub>0</sub> and A are less glycosylated than Portuguese cardosins. Glycosylation of cardosin B was similar between the varieties and was more pronounced than other enzymes. This different glycosylation levels may contribute for the different charges and also may contribute to different enzymatic specificity and activity. In a previous work, Barracosa et al. (2018) highlighted a wide diversity of cardosins' biochemical profiles among 6 Portuguese cardoon genotypes. According to Ordiales et al. (2014) many factors could be responsible of the variability of cardosin contents such as location, seasonal climatic variations, harvest year and ripening stages of flowers.

All the cardosins purified comprised a heavy and a light chain as described before (Cordeiro et al., 1994; Heimgartner et al., 1990; Sarmiento et al., 2009; Veríssimo et al., 1996). Nevertheless, capillary electrophoresis profiles show differences in cardosin's mobilities. In fact, cardosins obtained from Algerian varieties present higher molecular masses than the Portuguese ones mostly of their heavy chains.

Milk coagulation is a key step in the processing of milk into cheese, involving the use of coagulants and depends on several parameters (milk composition, coagulant enzyme, calcium composition, pH and temperature). The measure of milk coagulation activity and curd parameters, revealed a large difference

between cardosins (A<sub>0</sub>, A and B) and among the same cardosin from different origins (ALG1, ALG2 and POR). Several studies have described the coagulant activity of cardosins A and B (Roa, López, & Mendiola, 1999; Veríssimo et al., 1995). To our knowledge this is the first study to show the milk clotting properties of cardosin A<sub>0</sub>. Cardosin A<sub>0</sub> is in fact, as shown previously (Sarmiento et al., 2009), constituted by a group of very similar enzymes (cardosins E, F, G and H) similar, but not identical, to cardosin A.

## 5. Conclusion

Overall, our findings confirm the possibility of using flowers from wild or cultivated cardoon as a coagulant in cheese production. The use of crude extracts or of pure cardosins could yield cheeses with different proprieties; Algerian cardoon flowers offer a spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking. The valorisation of this crop by the production of coagulants may be economically beneficial and could be a good alternative to support the needs of the national market.

## Acknowledgements

Abdellah Zikiou was supported by the Algerian DGRSDT “Projet à intérêt socio-économique contrat N° 240”. The authors wish to thank Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020 (PDR2020) under Portugal 2020 and through Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural (FEADER) for the financial support of iCheese Project (PDR2020-101-031002).

## References

- Amira, A. B., Bauwens, J., De Pauw, E., Besbes, S., Attia, H., Francis, F., et al. (2017). Identification of proteins from wild cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.) by a proteomic approach. *Journal of Chemical Biology*, 10, 25–33.
- Aquilanti, L., Babini, V., Santarelli, S., Osmani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. (2011). Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 651–659.
- Barracosa, P., Rosa, N., Barros, M., & Pires, E. (2018). Selected cardoon (*Cynara cardunculus* L.) genotypes suitable for PDO cheeses in Mediterranean regions. *Chemistry and Biodiversity*, 15, Article e1800110.
- Benheddi, W., & Hellal, A. (2019). Technological characterization and sensory evaluation of a traditional Algerian fresh cheese clotted with *Cynara cardunculus* L. flowers and lactic acid bacteria. *Journal of Food Science & Technology*, 56, 3431–3438.
- Cordeiro, M. C., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1994). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, 92, 645–653.
- Folgado, A., & Abranches, R. (2020). Plant aspartic proteases for industrial applications: Thistle get better. *Plants*, 9, Article 147.
- Francisco-José, D., Joaquín, R. P., José, G. C., Ramírez, R., & Isidro, R. (2010). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese (“Torta del Casar”) manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 512–519.
- Gomes, S., Belo, A. T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., et al. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *International Dairy Journal*, 91, 178–184.
- Hafid, K., John, J., Sayah, T. M., Domínguez, R., Becila, S., Lamri, M., et al. (2019). One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 798–810.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A., & Pais, M. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1410.
- Hyslop, D. (2003). Enzymatic coagulation of milk. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Proteins: Vol. 1. Advanced dairy chemistry* (pp. 839–878). Geneva, Switzerland: Springer Nature.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14–33.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Llorente, B. E., Obregón, W. D., Avilés, F. X., Caffini, N. O., & Vairo-Cavalli, S. (2014). Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, 159, 55–63.
- Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (1997). Technological optimization of the manufacture of Serra cheese. *Journal of Food Engineering*, 31, 433–447.
- Oliveira, A., Pereira, C., da Costa, D. S., Teixeira, J., Fidalgo, F., Pereira, S., et al. (2010). Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Science*, 178, 140–146.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Fernández, M., Casquete, R., & de Guía Córdoba, M. (2014). Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of ‘Torta del Casar’ cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 402–409.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Ruiz-Moyano, S., Gallardo, G., & Córdoba, M. d. G. (2016). Characterisation of the vegetable rennets used for ‘Torta del Casar’ cheesemaking by a protein profile method. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 272–281.
- Prados, F., Pino, A., & Fernández-Salguero, J. (2007). Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* on the accelerated ripening of Manchego cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 556–561.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., & Pires, E. (1996). Action on bovine  $\alpha_{51}$ -casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297, 83–89.
- Roa, I., López, M. B., & Mendiola, F. J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, 32, 413–419.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76–85.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., et al. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230, 429–439.
- Sarmiento, A. C., Oliveira, C. S., Pires, E. M., Halling, P. J., & Barros, M. T. (2004). Evaluation of cardosin A as a proteolytic probe in the presence of organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, 137–141.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5–16.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82, 151–170.
- Tito, F. R., Pepe, A., Tonon, C. V., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2020). Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases (StAPs). *International Dairy Journal*, 104, 104645.
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, 17, 621–626.
- Veríssimo, 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, 762–768.
- Yegin, S., & Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science & Technology*, 93, 565–594.
- Zacharius, R. M. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 30, 148–152.
- Zikiou, A., & Zidoune, M. N. (2019). 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, 89–99.

# Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese

ABDELLAH ZIKIOU<sup>1,2\*</sup>  and MOHAMMED NASREDDINE ZIDOUNE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe de Transformation et d'Elaboration des Produits Alimentaires (T.E.P.A.), Laboratoire de Nutrition et des Technologies Alimentaires (L.N.T.A.), Institut de Nutrition d'Alimentation et de Technologie Agro-Alimentaire (I.N.A.T.A.A.), Université des Frères Mentouri Constantine 1, Route Ain El Bey, and <sup>2</sup>Division de Biotechnologie Alimentaire, Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt), Nouvelle ville Ali Mendjeli, UV03 BP E73, 25000 Constantine, Algeria

*The aim of this study was to assess the coagulant properties of crude extract from cardoon flowers (CECF) as a replacement for the imported coagulants used in the local Algerian cheese factories. Optimal coagulation activity of the extract was observed at pH 5 and 60 °C with a CaCl<sub>2</sub> concentration of 0.02 M. The electrophoretic pattern revealed that the crude extract contains mainly cardosins A and B. The study of interactions involved in the formation of milk gel coagulated by CECF showed that hydrogen forces, hydrophobic interactions and calcium bridges contributed highly to the formation of milk gel. Camembert-type cheese obtained by CECF was judged by trained panellists and was found to be in agreement with standard specifications. The present study highlights the possibility of using Algerian CECF as a promising plant coagulant in cheesemaking for the dairy industry.*

**Keywords** Cardoon flowers, Coagulant, Camembert-type cheese.

## INTRODUCTION

Proteases are a class of enzymes that are mainly derived from animal, plant and microbial sources where they act as catalysts and perform diverse vital functions (Amid *et al.* 2011). They represent one of the largest groups of industrial enzymes and account for nearly 60% of the total enzyme sales in the world (Rao *et al.* 1998). Animal proteases with milk-clotting activities are the major enzymes used in cheesemaking. Among these proteases, rennet is extracted from the stomach of young ruminants, especially calves. Rennet has been used in cheesemaking for thousands of years, which is the oldest known application (Shah *et al.* 2014). The coagulating properties of calf rennet are due to chymosin, an aspartic protease considered to be the best coagulating agent because of its high specificity for cleaving the k-casein Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> bond (Jacob *et al.* 2011). The worldwide increase in cheese production and consumption,

together with an increase in calf rennet price as well as religious and/or dietary constraints (e.g. Islam, Judaism and vegetarianism), has led to a rising demand for novel rennet substitutes and a search for new sources (plant or microbial) of proteases with coagulant properties (Jacob *et al.* 2011).

Proteases derived from plants have high potential for use as coagulants in cheesemaking. They are present from different plant parts. They can be extracted from seeds, rhizomes, latex, leaves, fruits and flowers (Shah *et al.* 2014). Among the flowers sources, cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.) are commonly used. The aqueous extracts of this thistle flower have been used for centuries in artisanal cheesemaking, mainly in the Mediterranean region (Roseiro *et al.* 2003).

The milk-clotting activity of *C. cardunculus* flower extracts is due to several aspartic proteases (Aps): cardosins A, B, E, F, G and H as well as cyprosins 1, 2 and 3 (Sarmiento *et al.* 2009). Cardosins A and B are the most studied

\*Author for correspondence. E-mails: a.zikiou@crbt.dz; abdellah.zikiou1@gmail.com



and characterised. These two proteases act in a similar manner by cleaving the Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> bond of k-casein (Macedo *et al.* 1996).

In Algeria, namely the Kabylia region, the spontaneous cardoon (*C. cardunculus* L. var. *sylvestris*) is widely distributed. However, this plant remains an underutilised source. It is used by the rural population to prepare numerous traditional fresh cheeses, namely Tiklilt or Djben using cow' or, ewe' milk. The validation of this spontaneous plant for the extraction of milk coagulant enzymes would be an interesting alternative that would stimulate the local cheesemaking industry. The use of the spontaneous cardoon may be economically beneficial, bearing in mind that most of the rennet used by Algerian cheesemaking factories is imported. Therefore, the aim of the present study was to partially characterise the proteases present in the aqueous extract of Algerian cardoon flowers (*C. cardunculus* L. var. *sylvestris*) and evaluate their stability and use as milk-clotting enzymes. A Camembert-type cheese was formulated, manufactured and partially characterised. This work has the merit of being the first report on the characterisation and use of crude extract from Algerian dried cardoon flowers in the manufacture of a Camembert-type cheese in a local cheese factory.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and reagents

The cardoon flowers used in this study were collected from fresh and developed spontaneous capitula growing in Kabylia region (a part of the Tell Atlas Mountains located at the edge of the Mediterranean Sea). They were harvested during the period of July from a campaign field located in the province of Akbou, Bejaia, Algeria. The flowers were authenticated by a botanist as being *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*. The fresh flowers were then immediately freeze-dried by lyophilisation using a laboratory freeze dryer Alpha 1–4 LD plus (Martin Christ, Osterode, Germany) at  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h at 0.07 bar and then stored in a freezer at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Reagents used in this research were of analytical grade and supplied by Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) unless otherwise stated. The commercial rennet (Rhodia food, Marshall TM, France) was a donation from Safilait food industry (Constantine, Algeria). Its characteristics were Soxhlet units (SU) = 1/100.000 and 520 mg of chymosin in 1 g of powder.

### Enzymatic crude extract preparation

The enzymatic extracts were prepared using the protocol described by Nouani *et al.* (2009) with slight modifications. Briefly, duplicate samples of 10 g of the freeze-dried flowers were ground and macerated for 24 h in 100 mL of 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.2% (w/v) boric acid and left at room temperature for 1 h with continuous stirring. The mixtures were subjected to a cycle

of freezing ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and thawing (room temperature) to improve the extraction process. After that, the green extracts were then centrifuged at 4500 g for 10 min and the supernatants were then filtered twice through Whatman No 1 filter papers. The filtrate, considered as the crude extract of cardoon flowers (CECF), was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use in further experiments.

### Protein content determination

Protein concentration was determined using the Lowry protein procedure, which is based on Folin–Ciocalteu's phenol reagent (Lowry *et al.* 1951). A calibration curve was constructed using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The standard solutions of BSA were in the following concentrations: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg/mL.

### Milk-clotting activity and Soxhlet units' measurements

Clotting activity was determined according to the method of Berridge (1952) based on the visual evaluation of the first clotting flakes appearance. Briefly, 1 mL of crude extract or rennet was added to 10 mL of Berridge's substrate. The latter was prepared by dissolving 12 g of skimmed milk in 100 mL of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 6.5. The mixture was then incubated at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The time from the addition of enzyme to the first appearance of solid material was measured in seconds, as clotting time. One unit is defined as the amount of enzyme that clots 1 mL of substrate in 1 min at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The specific activity was calculated as the number of milk-clotting units per mg of protein.

The Soxhlet units (SU) were also determined as required. The SU represent the volume of milk that can be clotted by one unit volume of the enzymatic extract within 40 min at  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  and pH of 6.4 (Harboe *et al.* 2010). SU were measured using the formula:

$$\text{SU} = \frac{2400 \times V}{t \times v}$$

where  $V$  is the volume of milk (mL);  $v$ , the volume of the enzyme (mL); and  $t$ , the clotting time in seconds. The SU were determined using 12% reconstituted skim milk powder in 10 mM of  $\text{CaCl}_2$  and incubating temperature of  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Proteolytic activity

The global proteolytic activity was measured as described by Drapeau (1976), with slight modifications. Briefly, 1 mL of enzyme was mixed with 2 mL of casein solution (1 g of casein diluted in 100 mL of acetate sodium buffer 100 mM and pH 5.2). Then the mixture was incubated for 1 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the reaction was stopped by adding 5 mL of 12% trichloroacetic acid (TCA). For the blank assay, the substrate was added after the inactivation of the enzyme by TCA. The resulting precipitate was removed by centrifugation at 4500 rpm for 10 min, and the absorbance of TCA-soluble peptides in the supernatant was measured at 280 nm. One unit of activity was defined as the amount of

enzyme that increases the absorbance by  $0.01 \text{ min}^{-1}$  under given assay conditions.

### SDS-PAGE analysis

The protein profiles of the sample aliquots of crude extracts of cardoon flowers were performed by Tricine-SDS-PAGE, according to the Gagaoua *et al.* (2014) protocol. Before separation, the samples were mixed at a ratio of 1:1 with the sample buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 0.75% DTT, 0.02% Coomassie Brilliant Blue R250 and 20% glycerol, and then heated for 10 min in a water bath at 75 °C. Ten micrograms of protein was loaded using 12% separating and 4% stacking gels, and then subjected to separation for 4 h at 135 V. A standard mixture of proteins with known molecular weights, precision plus protein dual colour, #161-0374, (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,) was used. The molecular weights and densitometry of the protein bands were calculated using the UN-SCAN-IT gel 6.1 analysis program (Silk Scientific, Orem, UT).

### Effects of pH, temperature and $\text{CaCl}_2$ concentration on milk-clotting activity

The effect of pH on milk-clotting activity (MCA) of the proteases was assayed at 30 °C in the pH range of 5.0–7.0. The pH solution was adjusted with either 0.1N HCl or 0.1 N NaOH.

The effect of temperature on the MCA of the proteases was determined following the standard assay procedure in the temperature range of 20–70 °C at intervals of 10 °C.

To determine the effect of  $\text{CaCl}_2$  concentration on MCA of the proteases, the concentration of the  $\text{CaCl}_2$  was increased at intervals of 5 mM from 5 to 35 mM and MCA was measured at pH 6.5 and temperature of 30 °C.

### Effect of dissociating agents

The main interactions involved in the formation of casein gels obtained by CECF or commercial rennet, using dissociating chemical agents, were investigated according to Lefebvre-Cases *et al.* (1998). Samples of CECF or commercial rennet milk gels (obtained after a clotting time of 30 min) were dispersed in dissociating solutions (ratio of 1/5: 4 mL of gel in 16 mL of dissociating solution) containing concentrations from 0 to 10 g/L of SDS, 0 to 6 M of urea or 0 to 6 mM of EDTA. The mixtures were homogenised using a Polytron homogeniser at 10 000 rpm during 90 seconds. The mixtures were then centrifuged at 3395 g during 90 min and the soluble proteins in the supernatants were quantified following (Lowry *et al.* 1951) protocol, as described above.

### Camembert-type cheese manufacture

The Camembert-type cheese was produced following the protocol of Camembert-type cheese manufacture using pasteurised cow' milk. After standardisation of proteins (3%, w/v) and fat (3.5%, w/v), the milk was pasteurised (72 °C

for 20 seconds), inoculated with a mixture of mesophilic/thermophilic starter cultures (DI-PROX M 270, BIOPROX, Paris, France/CHOOZIT™ TA 52 LYO 125 DCU, DANISCO, Denmark) and kept at 34 °C. Once the pH reached a value of 5.5, coagulation occurred in 30 min, using CECF or commercial rennet (control). The resulting coagulum was cut manually using a knife cutter and placed in plastic moulds (15 cm in diameter and 8 cm in high). After 24 h draining at room temperature, the cheese pieces were removed from the moulds and brined for 40 min in a salt solution 20% (w/v) and then transferred to a ripening room (11–13 °C and 95% of relative moisture) for 12 days. Finally, the cheeses were packed and stored at 4 °C for further analyses. Three batches of cheese were prepared with two independent replications for both treatments. All preparations were processed under the same conditions, with a subsequent maturation for 30 days.

### Physico-chemical analysis of cheeses

The cheeses were analysed for total solids, pH and lactic acid content using the standard methods of AFNOR (1986). First, a slurry was prepared by blending 10 g of grated cheese with 10 mL of distilled water, and then the pH was measured. Fat and protein contents were measured following Gerber James (1995) and Lowry (1951) methods, respectively. Cheese yield was also expressed. All experiments were carried out in triplicate.

### Proteolytic activity in cheeses

The cheese nitrogen was fractionated at pH 4.6 according to the method described by Fallico *et al.* (2004). Briefly, 5 g of Camembert cheese was homogenised in 10 mL of water using a stomacher at room temperature for 10 min. The pH was adjusted to 4.6, and the homogenate was heated to 40 °C for 1 h before centrifugation at 11 000 g for 30 min. The cheese samples were fractionated after 1, 6, 13, 20 and 30 days. The insoluble fractions were analysed by Urea-PAGE, the supernatants were filtered through Whatman paper No 1, and then the soluble proteins were quantified as previously described.

To monitor casein degradation during cheese ripening in the pH 4.6-insoluble fraction, the Andrews (1983) protocol was followed. Electrophoresis was performed on a vertical slab unit using a stacking gel of 5.7% T, 3.8% C (with a buffer containing 8 M urea and 60 mM of Tris-HCl, pH 7.6); and a separating gel of 12% T; 3.8% C (with a buffer containing 4.5 M urea and 380 mM Tris-HCl, pH 8.9). % T is the weight percentage of total monomer (acrylamide + bis-acrylamide) in g/100 mL, and % C is the proportion of bis-acrylamide as a percentage of total monomer.

### Penetrometry

The penetration depths on the Camembert-type cheese were determined using a penetrometer PNR 10 (Petrotest

Instruments, Sommer & Runge KG, Germany). Briefly, the cheese was cut into pieces of cylindrical shape (4 cm × 2 cm × 1.5 cm) and the penetration depth during cheese ripening was measured in mm, at 20 °C for 5 seconds using a 30° cone of 150 g total weight. The cone penetrates the sample in free fall under its own weight. Depth was expressed as the mean of five measurements from different points for each piece.

### Sensory evaluation

The descriptive sensory analysis test was used in order to identify and evaluate the specific sensory attributes of the prepared Camembert-type cheeses. The sensory evaluation was carried out after 1, 6, 13, 20 and 30 days of ripening. Sensory attributes of produced cheeses (colour, texture, odour and taste) were assessed by 12 trained panellists on a 0- to 9-point scale, where the lowest and highest intensities were represented by 0 and 9, respectively. For each cheese sample, a piece of 10 g was presented in a plastic dish and coded with three numbers. Scores for each sample were obtained by averaging scores of 12 panellists.

### Statistical analysis

Data were expressed as mean values ± SD. XLSTAT statistical software (version 2009) was used for data processing (Addinsoft, Paris, France). A comparison among mean variables was performed by Fisher's multiple range tests (one-way ANOVA), and differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Factorial ANOVA was performed for the sensory attributes, and data are expressed as mean ± SD ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Enzymatic activity of crude extract

The crude extract (CECF) was obtained from the Algerian cardoons by grinding and macerating the freeze-dried flowers in sodium acetate buffer (0.1 mM and pH 5.0) as previously described. As shown in Table 1, CECF exhibited lower clotting activity and stronger proteolytic activity than commercial rennet. The crude extract had a milk-clotting activity of 0.7 (U/mg), and its proteolytic activity was 4.83 (U/mg), whereas the commercial rennet had a milk-clotting activity of 1.44 (U/mg) and a proteolytic activity of 2.4 (U/mg). The ratios of milk-clotting activity/proteolytic activity were, therefore, 0.14 and 0.6 for CECF and commercial rennet, respectively. Similarly, Campos *et al.* (1990) reported a higher proteolytic activity of cardoon crude extract and a less milk-clotting activity than calf rennet. According to Roseiro *et al.* (2003), clotting activity relates to the enzyme's ability to cut the peptide bond Phe (105)-Met (106) of k-casein, which is considered as specific for cheesemaking, and the excessive proteolytic activity of extracts from *Cynara* species is due to their broader specificity for caseins. Also, they reported that

**Table 1** Some characteristic parameters assessed for CECF and commercial rennet.

Variables	CECF*	Commercial rennet	Significance <sup>a</sup>
pH	5.90	5.40	*
Protein content (mg/mL)	4.63	4.81	ns
Milk-clotting activity (U)	3.23	6.96	**
Soxhlet units	1/888	1/1000	*
Specific activity (U/mg)	0.70	1.44	***
Proteolytic activity (U)	22.37	11.57	***

CECF, crude extract of cardoon flowers.

<sup>a</sup>ns, not significant. \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P < 0.001$ .

this can lead to losses in cheese yield as well as it can defect some sensory attributes of cheeses.

### Effect of temperature

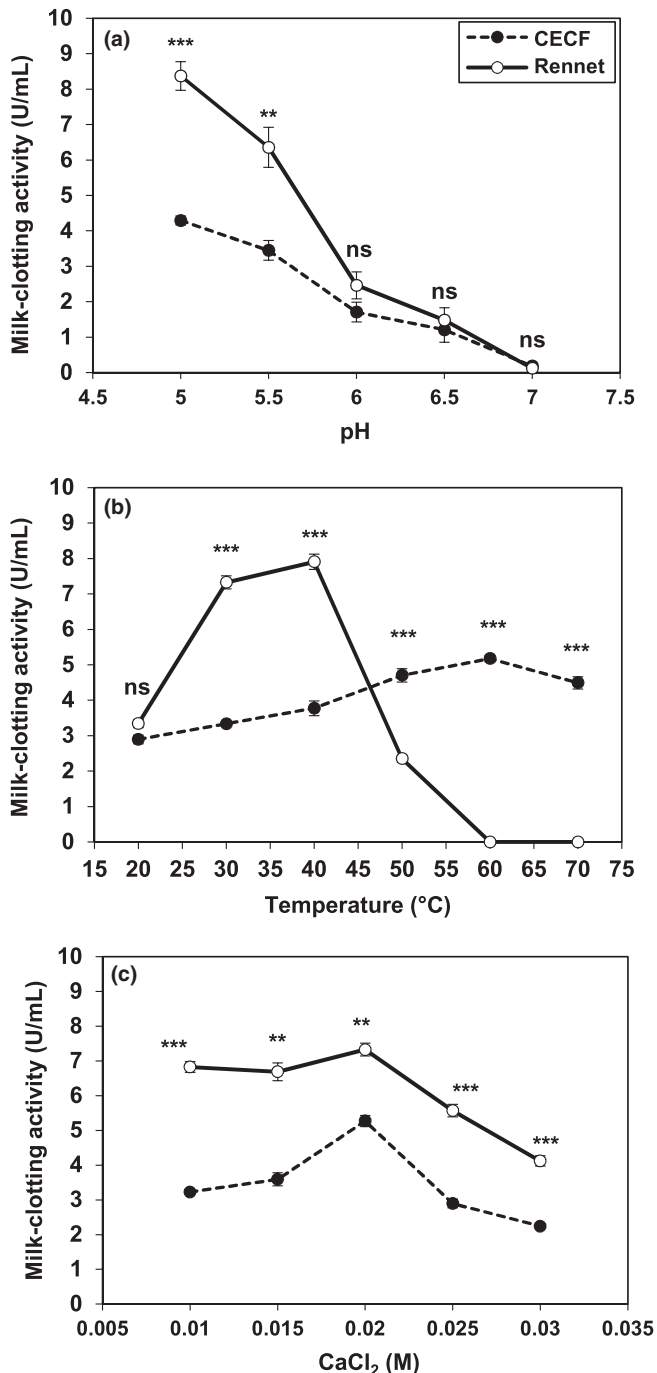
The effect of temperature on milk-clotting activity of CECF compared to the commercial rennet was assessed in temperatures ranging from 20 to 70 °C (Figure 1a). The findings of the present study demonstrated that CECF is stable at high temperatures. Interestingly, milk-clotting activity increased with increasing temperature with a peak at 60 °C; however, above this temperature, the activity fell, indicating enzyme denaturation. In contrast, for commercial rennet, the optimum clotting activity was observed at 40 °C; however, at temperatures over 60 °C, the activity disappeared. Similarly, previous studies have reported an optimum activity of enzymatic extracts from *C. cardunculus* between 60 and 70 °C (Campos *et al.* 1990).

### Effect of substrate pH

The pH dependence of the milk-clotting activity of CECF and commercial rennet is shown in Figure 1b. Our results indicate a similar effect of pH on both the CECF and commercial rennet. The two enzymatic preparations showed a maximum activity at pH 5 (4.16 U and 8.33 U for CECF and commercial rennet, respectively). An increase in pH was accompanied by a gradual loss of milk-clotting activity. Additionally, total enzymatic activity was lost at pH 7. Claverie-Martin and Vega-Hernández (2007) reported similar results confirming that extracts from cardoon flowers and rennet are more active at acidic pH.

### Effect of CaCl<sub>2</sub> concentration

Calcium chloride supplementation in milk, a current practice in cheesemaking, has been reported to affect the milk-clotting activity of enzymes. It has been suggested that the main effect of CaCl<sub>2</sub> occurs during the second phase of the clotting process, where Ca<sup>2+</sup> combines with para-casein forming firm clots (Chazarra *et al.* 2007). In the present study, experiments using concentrations from 0.01 M to 0.03 M of



**Figure 1** Effects of (a): temperature; (b): pH; and (c): CaCl<sub>2</sub> on milk-clotting activities of the CECF in comparison with those of commercial rennet. CECF, crude extract of dried cardoon flowers. ns, not significant; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

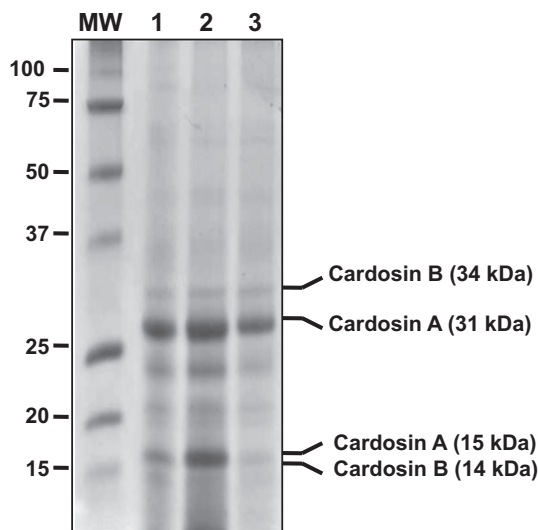
CaCl<sub>2</sub> were conducted. Results showed an increase in milk-clotting activity with CaCl<sub>2</sub> concentration up to 0.2 M for both CECF and commercial rennet (Figure 1c). However, milk-clotting activity decreased when concentrations of CaCl<sub>2</sub> were higher than 0.2 M.

### Electrophoretic pattern of CECF

Tricine-SDS-PAGE analysis was performed to visualise and detect proteins present in the flower's crude extracts. This protocol was chosen for its high resolution and good protein separation (Gagaoua *et al.* 2014). As shown in Figure 2, the electrophoretic pattern yielded two intense bands with apparent molecular weights of 31 kDa and 15 kDa. According to Veríssimo *et al.* (1995), the results correspond to the two subunits of cardosin A. Additionally, two other bands of lower intensity with an apparent molecular weight of 34 kDa and 14 kDa were detected. These two bands correspond to the two polypeptides of cardosin B (Veríssimo *et al.* 1995). Our findings are in agreement with previous studies reporting cardoon proteases, namely, cardosin A and B, as heterodimeric proteins composed of two dissimilar polypeptide subunits (Roseiro *et al.* 2003; Sarmiento *et al.* 2009). The two extra bands (Figure 2) with a molecular weight of approximately 25 and 20 kDa were thought to be contaminants without any proteolytic activity.

### Effect of dissociating agents on the casein's gel

The objective of studying the dissociating agents' effect on the casein's gel was to provide information about the interactions responsible for the formation of clots and the rheological behaviour of the casein gel obtained after milk coagulation by CECF compared to that produced using the commercial rennet. The nature of internal bonds created in milk gelation was determined using chemical dissociating agents: urea, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or sodium dodecyl sulphate (SDS). Urea denatures proteins by breaking their intramolecular hydrogen bonds, while SDS breaks hydrophobic interactions and EDTA is considered to be a calcium chelator (Lefebvre-Cases *et al.* 1998). Our results showed a strong effect of the three chemical agents on the protein dissociation of milk gels obtained either by CECF or rennet (Figure 3), indicating the important contribution of the hydrogen forces, the hydrophobic interactions and the calcium bridges bonds in the formation and stabilisation of milk gels obtained by CECF or commercial rennet. No significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed in the action of urea and EDTA on the protein dissociation of the two milk gels. However, the effect of SDS was significantly different (Figure 3a). In fact,  $44 \pm 0.05\%$  of total proteins were dissociated with a solution of 2 M SDS in gels obtained by CECF, while the same concentration of SDS was sufficient to dissociate  $72 \pm 0.01\%$  of total proteins in the case of rennet gels. Additionally, a concentration of 10 M SDS enabled the dissociation of  $80 \pm 0.04\%$  and  $96 \pm 0.01\%$  of total proteins in CECF and commercial rennet coagulation, respectively. In conclusion, these results indicate that the contribution of hydrophobic interactions in CECF milk gel was lower than that obtained by rennet.



**Figure 2** Tricine-SDS-PAGE of crude extracts. 1: Extract from the whole flower (stylet + stigma); 2: extract from the violet part of flower (stigma); 3: extract from the white part of flower (stylet); MW, molecular weight standard.

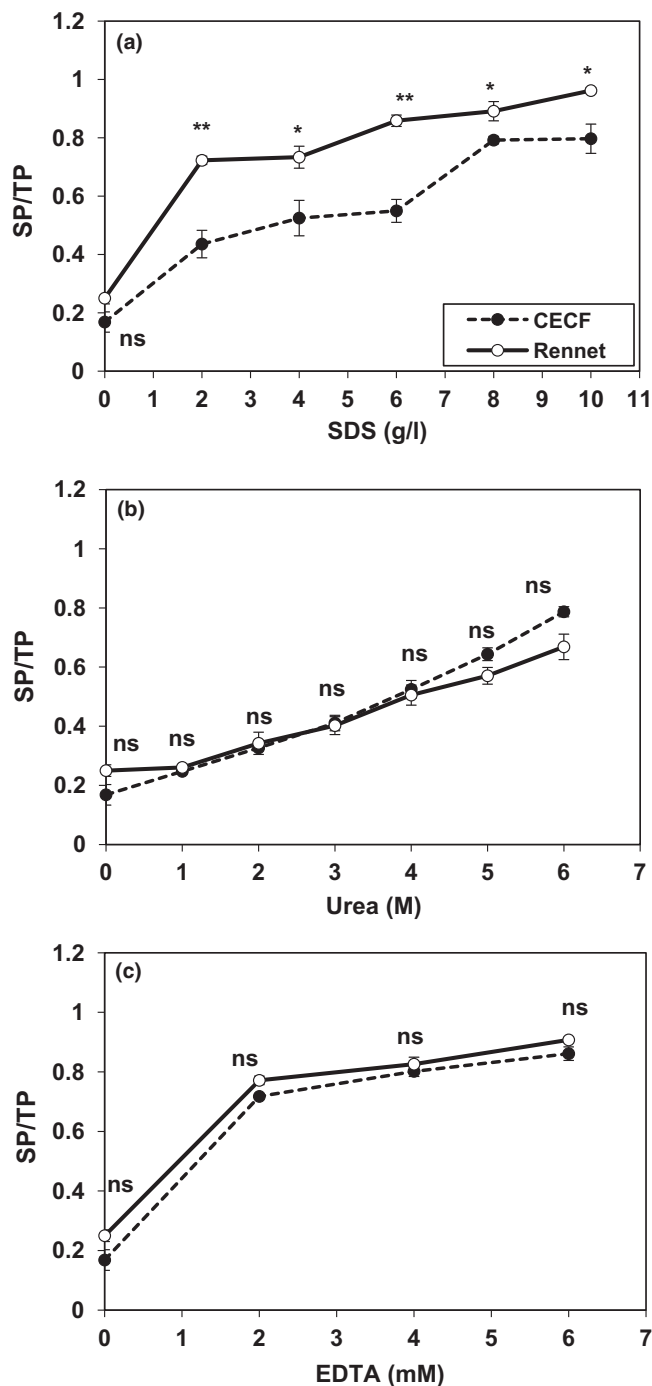
### Camembert-type cheese

#### Physico-chemical characteristics of the cheese

The main objective of the present work was to study the use feasibility of the crude extract of cardoon flowers (CECF) as an alternative to the imported coagulants used by the Algerian cheese factories. Thus, small-scale productions in a local cheese factory were carried out to produce Camembert-type cheese using the CECF as a coagulant (Figure 4). Table 2 shows the physico-chemical characteristics of cheese produced with the CECF and cheese made using commercial rennet (the marketed cheese). No significant ( $P < 0.05$ ) differences were detected between the CECF and commercial cheeses in terms of pH, acidity and fat content; however, for the total solids, significant differences ( $P < 0.05$ ) were detected in cheese made with CECF compared to rennet cheese ( $48.00 \pm 4.10$  and  $42.00 \pm 2.48$ , respectively). Nuñez *et al.* (1991) reported similar results when they observed higher moisture content in a La Serena cheese made with animal rennet compared to one made with *C. cardunculus* extract. In addition, lower yield (expressed as kg cheese total solids per 100 L of milk) was observed with CECF cheese. In fact, the loss attributed to the use of the CECF was 1.56 Kg (as mean value) of cheese for each 100 L of milk used. In general, lower yields of cheese made with extract from *C. cardunculus* and plant coagulants compared to animal rennet have been reported in previous studies (Roseiro *et al.* 2003; Shah *et al.* 2014).

#### Evolution of proteolysis during cheese ripening

Proteolysis during cheese ripening is a complex biochemical phenomenon that leads to the development of the



**Figure 3** Effect of (a): SDS; (b): urea; and (c): EDTA on the protein solubilisation in CECF milk gel and rennet milk gel. CECF, crude extract of dried cardoon flowers. SP/TP, soluble proteins/total proteins. ns: not significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

characteristic taste, aroma, as well as the texture of cheese. It is known that the coagulant is one of the main causes of proteolysis and is considered to be the initiator of casein hydrolysis, playing an important role in the degradation of the



**Figure 4** Camembert-type cheese obtained after 20 days of ripening. (a): Cheese obtained using CECF as coagulant agent. (b): Cheese obtained using commercial Rennet. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

**Table 2** Physico-chemical characteristics of Camembert-type cheeses obtained with CECF and rennet as coagulant agents.

Variables	CECF cheese (Mean $\pm$ SD)	Rennet cheese (Mean $\pm$ SD)	Significance <sup>a</sup>
pH	4.89 $\pm$ 0.12	4.65 $\pm$ 0.15	ns
Acidity ( $^{\circ}$ D)	60.63 $\pm$ 2.23	60.59 $\pm$ 3.87	ns
Total solids (% w/w)	48.00 $\pm$ 4.10	42.00 $\pm$ 2.48	*
Fat (% w/w)	21.00 $\pm$ 0.98	22.00 $\pm$ 1.21	ns
Defatted solids (%)	27.00 $\pm$ 1.11	20.00 $\pm$ 0.87	*
Fat/total solids	0.44 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.08	**
Cheese yield (Kg/100 L)	7.02 $\pm$ 1.10	8.58 $\pm$ 0.93	**

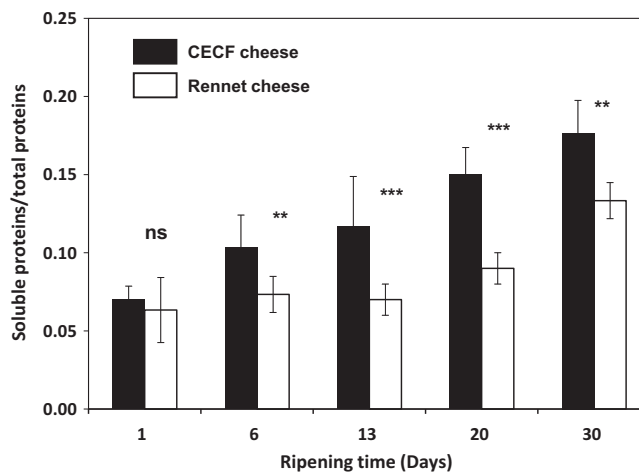
CECF, crude extract of cardoon flowers.

<sup>a</sup>ns, not significant. \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ .

resulting water-insoluble peptides (Fox and McSweeney 1996).

In the present study, we investigated the effect of the CECF on proteolysis in our manufactured Camembert-type cheese by following its progression during ripening (1, 6, 13, 20 and 30 days). The degree of proteolysis was estimated by measuring the amount of water-soluble peptides at pH 4.6 (as per cent of total proteins). In parallel, proteolysis progression was examined in cheese made using a commercial rennet. Furthermore, Urea-PAGE electrophoresis was performed to follow the evolution of the pH 4.6 insoluble proteins.

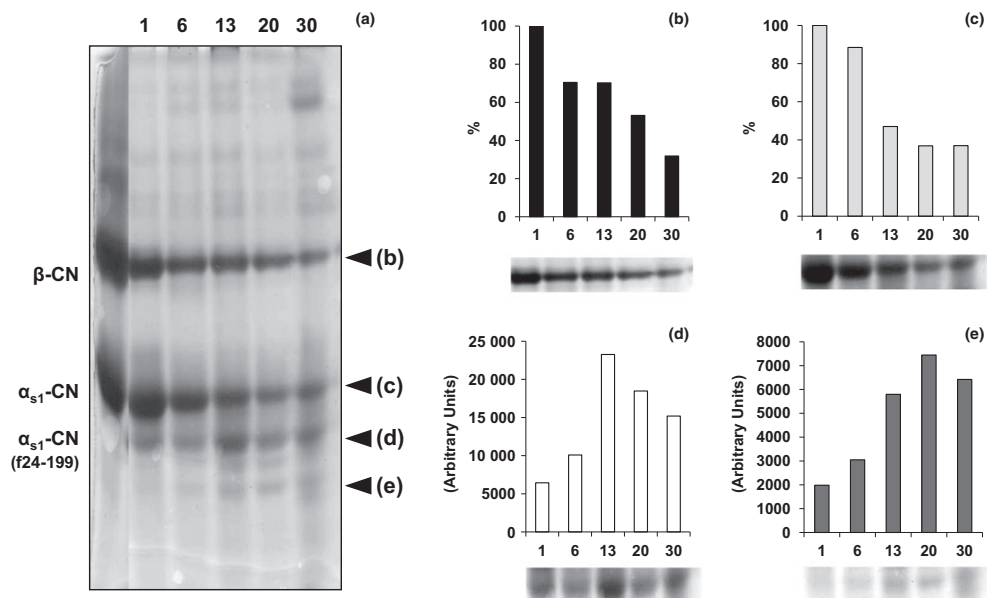
Our results showed a significant increase in the water-soluble protein (WSP) fraction ( $P < 0.05$ ) throughout the 30 days of the ripening period. This increase was faster and



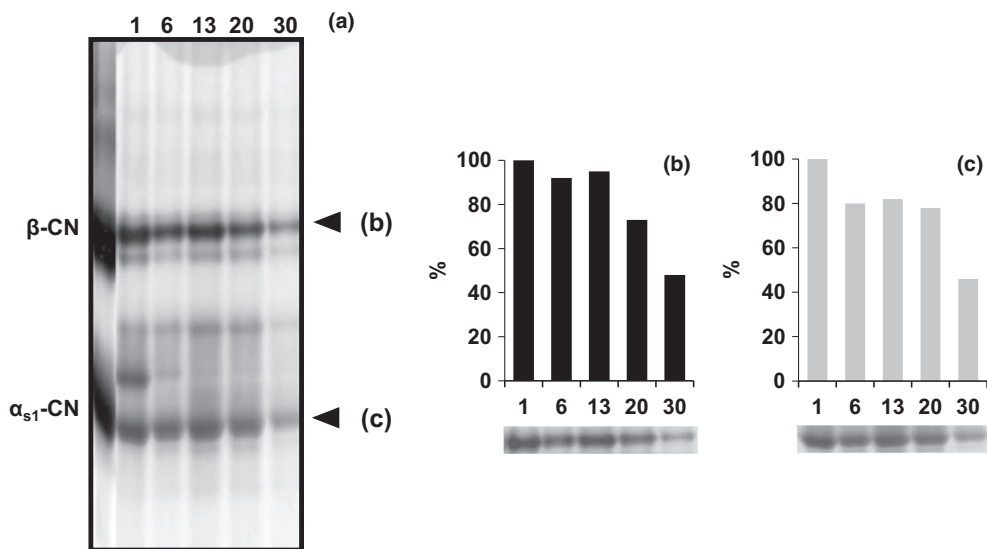
**Figure 5** Evolution of the amount of soluble proteins at pH 4.6 during Camembert-type cheese ripening. Camembert-type cheese was obtained using crude extract of cardoon flowers or commercial rennet. ns, not significant; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

more pronounced with CECF compared to the commercial rennet (Figure 5). In fact, with CECF as a coagulant, the WSP/TP ratio increased from 7% on day 1 to 12% on day 13, and reached 18% at the end of ripening (day 30). In contrast, when using the commercial rennet, the WSP/TP ratio was 6% on day 1, 7% in day 13 and reached only 13% by the end of ripening. Our results are similar to those obtained by Michalski *et al.* (2003) who reported Camembert cheese WSP/TP ratios ranging between 15 and 17% after 30 days of ripening. Additionally, our findings confirm those reported in previous studies on other types of cheese and various coagulants and milk sources (cow, goat, etc.). For example, higher amounts of WSP have been reported in cheeses made with plant coagulants compared to those made with calf rennet (Sousa and Malcata 2002; Roseiro *et al.* 2003).

Urea-PAGE electrophoregrams of the pH 4.6 insoluble protein fraction (Figure 6) showed the degradation of both of  $\alpha_{s1}$ -casein and  $\beta$ -casein. In fact, bands of  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$  caseins tended to disappear throughout ripening while other bands with higher electrophoretic mobility appeared. Moreover,  $\alpha_{s1}$ -casein was hydrolysed faster, with 63% of degradation after 20 days and 68% on the 30th day (Figure 6c), while only 42% of  $\beta$ -casein was degraded after 20 days of maturation (Figure 6b). According to Sousa and Malcata (1997), the fragment  $\alpha_{s1}$ -CN (f24-199), which appeared in our study at day 1 (Figure 6d), results from  $\alpha_{s1}$ -casein after the hydrolysis of the bond Phe23-Phe24. This last fragment accumulated as the ripening time elapsed until day 20, after which it released other fragments. Additional small electrophoretic bands appeared and became intense with the progression of ripening time. Similar electrophoretic bands were reported by Del Pozo *et al.* (1988) in La Serena, a ewe's milk cheese manufactured with extracts from *C. cardunculus* flowers.



**Figure 6** (a) Urea-polyacrylamide gel electrophoregram of the pH 4.6-insoluble fractions of cheese made using CECF at 1, 6, 13, 20 and 30 days of ripening. (b): Amount of residual  $\beta$ -casein; (c): amount of residual  $\alpha_{s1}$ -casein; (d, e): densitometry of peptides yielded from degradation of  $\alpha_{s1}$ -casein.



**Figure 7** (a) Urea-polyacrylamide gel electrophoregram of the pH 4.6-insoluble fractions of cheese made using commercial rennet at 1, 6, 13, 20 and 30 days of ripening. (b): Amount of residual  $\beta$ -casein; (c): amount of residual  $\alpha_{s1}$ -casein.

Cheese made with the industrial/commercial rennet presented a different proteolysis profile, mainly for  $\alpha_{s1}$ -casein (Figure 7a). Our results showed that  $\alpha_{s1}$ -casein was stable during the first 20 days of ripening; however, upon reaching the 30th day, 54% of  $\alpha_{s1}$ -casein was degraded (Figure 7c). Moreover,  $\alpha_{s1}$ -casein degradation resulted in the appearance of lesser bands. Similarly,  $\beta$ -casein was more stable over the first 20 days of ripening and less than 30% was degraded (Figure 7b).

*Evolution of sensory and textural properties*

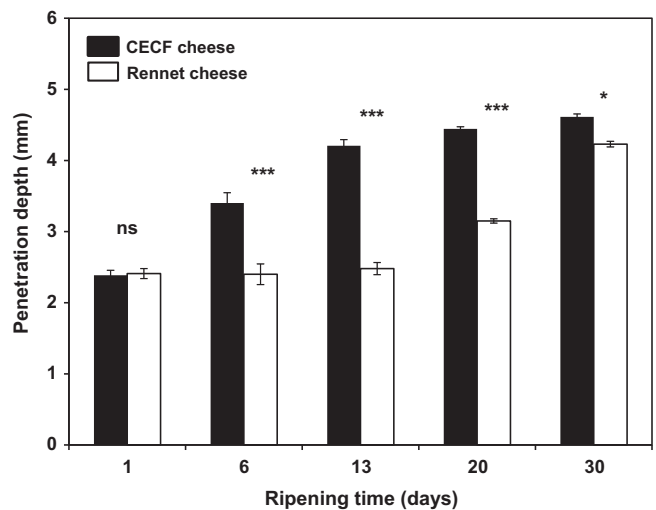
A group of 12 trained panellists evaluated the sensory characteristics of the Camembert-type cheese made with the CECF after 1, 6, 13, 20 and 30 days of ripening. Results were compared to the cheese manufactured using commercial rennet. Table 3 shows the means and standard deviation for the scores given. The superscripts indicate the statistical significance ( $P < 0.05$ ) between average values for each attribute. For the two samples, the mean values of the

**Table 3** Evolution of sensory attributes of industrial rennet cheese and crude extract cardoon flower (CECF) cheese after 1, 6, 13, 20 and 30 days of ripening.

	Yellow colour			Creamy			Animal odour			Milky			Rancid			Ammoniac			Sour			Salty			Bitter		
	Intensity	Grainy	Softness	Creamy	Animal odour	Milky	Rancid	Ammoniac	Sour	Salty	Bitter																
CECF cheese	Day 1	2.13 ± 0.91 <sup>fg</sup>	3.75 ± 1.50 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.81 <sup>de</sup>	2.50 ± 1.25 <sup>d</sup>	2.25 ± 0.38 <sup>b</sup>	5.63 ± 1.53 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.44 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.47 <sup>c</sup>	4.50 ± 0.88 <sup>b,c</sup>	0.63 ± 0.34 <sup>b,c</sup>															
	Day 6	3.25 ± 0.81 <sup>de</sup>	3.38 ± 0.47 <sup>b,c</sup>	5.00 ± 1.00 <sup>c,d</sup>	2.75 ± 1.06 <sup>c,d</sup>	1.53 ± 0.36 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.63 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.38 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.66 <sup>a</sup>	5.50 ± 0.75 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.30 <sup>c</sup>															
	Day 13	4.38 ± 0.65 <sup>b,c</sup>	3.13 ± 0.91 <sup>b,c</sup>	5.88 ± 1.16 <sup>a,b,c</sup>	5.50 ± 1.25 <sup>b</sup>	1.75 ± 0.56 <sup>b</sup>	4.88 ± 0.88 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.20 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.69 <sup>a</sup>	3.13 ± 1.13 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.81 <sup>c</sup>	1.13 ± 0.88 <sup>b</sup>															
	Day 20	5.13 ± 0.44 <sup>ab</sup>	2.38 ± 0.47 <sup>c</sup>	6.38 ± 0.56 <sup>ab</sup>	6.38 ± 0.88 <sup>ab</sup>	2.13 ± 0.66 <sup>b</sup>	5.50 ± 0.50 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.63 <sup>b</sup>	1.13 ± 0.66 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.44 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.56 <sup>ab</sup>	1.13 ± 0.66 <sup>b</sup>															
	Day 30	5.50 ± 0.75 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.72 <sup>c</sup>	7.00 ± 0.75 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.56 <sup>b</sup>	3.63 ± 0.78 <sup>a</sup>	5.63 ± 0.63 <sup>a</sup>	3.63 ± 0.47 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.63 ± 0.63 <sup>a</sup>	4.88 ± 0.66 <sup>ab,c</sup>	3.50 ± 0.63 <sup>a</sup>															
Rennet cheese	Day 1	1.75 ± 0.38 <sup>g</sup>	5.63 ± 0.97 <sup>a</sup>	3.63 ± 1.13 <sup>e</sup>	2.38 ± 1.38 <sup>d</sup>	2.13 ± 0.44 <sup>b</sup>	5.38 ± 0.63 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.63 <sup>c</sup>	4.75 ± 1.00 <sup>a,b,c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>															
	Day 6	2.75 ± 0.56 <sup>ef</sup>	6.25 ± 0.81 <sup>a</sup>	3.75 ± 1.25 <sup>e</sup>	2.00 ± 1.00 <sup>d</sup>	1.75 ± 0.81 <sup>b</sup>	5.38 ± 0.72 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	4.38 ± 0.47 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.72 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>															
	Day 13	3.75 ± 0.81 <sup>cd</sup>	5.63 ± 0.56 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.88 <sup>de</sup>	2.88 ± 0.47 <sup>cd</sup>	2.00 ± 0.25 <sup>b</sup>	5.50 ± 1.38 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.75 ± 1.31 <sup>b</sup>	4.50 ± 0.75 <sup>b,c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>															
	Day 20	3.88 ± 0.66 <sup>cd</sup>	5.25 ± 0.75 <sup>a</sup>	4.75 ± 1.25 <sup>cd,e</sup>	3.75 ± 0.56 <sup>c</sup>	2.00 ± 0.50 <sup>b</sup>	5.50 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	4.38 ± 0.63 <sup>a</sup>	5.13 ± 0.69 <sup>a,b,c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>															
	Day 30	4.50 ± 0.50 <sup>b,c</sup>	3.88 ± 0.66 <sup>b</sup>	5.75 ± 0.56 <sup>b,c</sup>	5.63 ± 0.63 <sup>ab</sup>	4.13 ± 0.69 <sup>a</sup>	4.63 ± 1.13 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	4.75 ± 0.56 <sup>a</sup>	4.63 ± 0.88 <sup>ab,c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>															

Results are expressed as mean ± SD. Values sharing the same letter in each column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

colour intensity and odour attributes increased significantly ( $P < 0.05$ ) as a function of the age of cheese; however, this increase was more pronounced in the case of CECF cheese, which is a sign of a more rapid evolution of the cheese. Similar results were reported in other cheese varieties made using extracts from *Cynara* species or other plant coagulants (Roseiro *et al.* 2003; Prados *et al.* 2006; Tejada *et al.* 2008). Similarly, an intense sour taste increased as ripening time increased. Moreover, a slight aftertaste of bitterness was detected in the cheese made using CECF after 30 days of ripening, similar to findings reported by Prados *et al.* (2006), who attributed the bitterness to the excessive proteolytic activity of the crude extract of cardoon flowers, which generates compounds responsible for the bitter taste. For the textural attributes (softness and creaminess), the scores attributed by the panel of tasters showed that the CECF cheese was significantly ( $P < 0.05$ ) softer and creamier. This difference became more pronounced with increase in ripening time. The results were confirmed by penetrometry (Figure 8). For the CECF cheese, the penetration depth ranged from  $2.39 \pm 0.07$  mm on the 1st day, to  $4.21 \pm 0.09$  mm on the 13th day, and reached  $4.61 \pm 0.02$  mm after 30 days of ripening. In contrast, the penetration depth in the commercial rennet cheese increased from  $2.37 \pm 0.13$  mm on the 1st day, to  $2.51 \pm 0.08$  mm on the 13th day, and reached  $4.23 \pm 0.08$  mm on the 30th day of ripening. According to Nuñez *et al.* (1991), the texture of cheese is related to the degree of proteolysis of  $\alpha_{s1}$  casein, where softness negatively correlates with the content of intact  $\alpha_{s1}$  casein. Moreover, Tejada *et al.* (2008) concluded that creaminess and softening of cheese made with



**Figure 8** Evolution of the penetration depth during Camembert-type cheese ripening. Camembert-type cheese was obtained using crude extract of cardoon flowers or commercial rennet. ns: not significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



plant coagulants is prompted by the intense proteolysis, which breaks up the casein network, giving rise to a more homogeneous structure.

The sensory characteristics of colour, texture, odour and taste were appreciated by the panellists and were in agreement with Camembert-type cheese requirements.

## CONCLUSION

Spontaneous cardoon (*C. cardunculus* L.) is an important Mediterranean multipurpose and versatile crop with a wide spectrum of potential applications. Its most ancient application is the use of the flowers as a coagulant for cheese production. In Algeria, in spite of the existence of cardoon and its use in traditional cheesemaking, this local know-how is about to disappear. In this context, this study aimed to promote the economic validation of *C. cardunculus* by the production of a food-grade plant coagulant intended for the national market, in order to support the needs of Algerian cheese factories.

The crude extract obtained from Cardoon dried flowers exhibited the highest activity at pH 5 and a temperature of 60 °C. Compared to animal rennet, the ratio MCA/PA of the crude extract was lower. The analysis of the interactions involved in formation of casein's gels obtained by CECF and rennet, showed there was an important contribution of important hydrogen forces, the hydrophobic interactions and the calcium bridges bonds in the formation milk gels obtained by the two coagulants. Manufacturing tests of Camembert-type cheese production performed using CECF resulted in the production of cheeses similar to those produced and marketed by the local dairy industry.

The results presented in this paper highlight the possible application of the proteases of the Algerian spontaneous cardoon flowers as alternatives to commercial rennet for cheese production.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would thank 'Le Fermier' and 'Safilait' for their heavy support to achieve this work. Also, authors would like to thank Anis Chikhoune, Mohammed Gagaoua and Hadjer Namous for their valuable contribution.

This work is dedicated in loving memory of Ms. ZIKIOU Yasmine. May she find peace.

## REFERENCES

- AFNOR (1986) *Contrôle de La qualité des produits Laitiers, Analyses physiques et chimiques*, 3 ed, pp 619–699. Paris: Lavoisier.
- Amid M, Tan C P, Mirhosseini H, Aziz N A and Ling T C (2011) Optimisation of serine protease extraction from mango peel (*Mangifera Indica* Cv. *Chokanan*). *Food Chemistry* **124** 666–671.
- Andrews A T (1983) Protease in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* **50** 45–55.
- Berridge N (1952) Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst* **77** 57b–62.
- Campos R, Guerra R, Aguilar M, Ventura O and Camacho L (1990) Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chemistry* **35** 89–97.
- Chazarra S, Sidrach L, Lopez-Molina D and Rodríguez-López J N (2007) Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal* **17** 1393–1400.
- Claverie-Martin F and Vega-Hernández M C (2007) Aspartic proteases used in cheese making. In *Industrial enzymes*, pp 207–219. Polaina J and MacCabe A P, eds. Dordrecht: Springer, Netherlands.
- Del Pozo B F, Gaya P, Medina M, Rodríguez-Marín M A and Nuñez M (1988) Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research* **55** 457–464.
- Drapeau G R (1976) Protease from *Staphylococcus aureus*. *Methods in Enzymology* **45** 469–475.
- Fallico V, McSweeney P, Siebert K, Horne J, Carpino S and Licitra G (2004) Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science* **87** 3138–3152.
- Fox P and McSweeney P (1996) Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International* **12** 457–509.
- Gagaoua M, Boucherba N, Bouanane-Darenfed A, Ziane F, Nait-Rabah S, Hafid K and Boudechicha H R (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology* **132** 461–467.
- Harboe M, Broe M and Qvist K (2010) The production, action and application of rennet and coagulants. In *Technology of Cheesemaking*, pp 98–129. Law B A and Tamime A Y, eds. Singapore: Wiley-Blackwell Society of Dairy Technology.
- Jacob M, Jaros D and Rohm H (2011) Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology* **64** 14–33.
- James C S (1995) Determination of the fat content of dairy products by the Gerber Method. In *Analytical Chemistry of Food*, pp: 93–95. Blackie Academic and Professionals, eds. Glasgow, UK: Chapman and Hall.
- Lefebvre-Cases E, Gastaldi E, Vidal V, Marchessau S, Lagaude A, Cuq J L and De La Fuente B T (1998) Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of Dairy Science* **81** 932–938.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L and Randall R J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193** 265–275.
- Macedo I Q, Faro C J and Pires E M (1996) Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine  $\alpha$ s- and  $\beta$ -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44** 42–47.
- Michalski M C, Gassi J Y, Famelart M H, Leconte N, Camier B, Michel F and Briard V (2003) The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Le Lait* **83** 131–143.
- Nouani A, Dako E, Morsli A, Belhamiche N, Belbraouet S, Bellal M and 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** 20–29.
- Núñez M, Del Pozo B F, Rodríguez-Marin M A, Gaya P and Medina M (1991) Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research* **58** 511–519.
- Prados F, Pino A, Rincón F, Vioque M and Fernández-Salguero J (2006) Influence of the frozen storage on some characteristics of ripened Manchego-type cheese manufactured with a powdered vegetable coagulant and rennet. *Food Chemistry* **95** 677–682.
- Rao M B, Tanksale A M, Ghatge M S and Deshpande V V (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62** 597–635.
- Roseiro L B, Barbosa M, Ames J M and Wilbey R A (2003) Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology* **56** 76–85.
- Sarmiento A C, Lopes H, Oliveira C S, Vitorino R, Samyn B, Sergeant K, Debyser G, Van Beeumen J, Domingues P and Amado F (2009) Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L. Planta* **230** 429–439.
- Shah M A, Mir S A and Paray M A (2014) Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology* **94** 5–16.
- Sousa M J and Malcata F X (1997) Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis. *Food Chemistry* **59** 427–432.
- Sousa M J and Malcata F X (2002) Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) *in vitro* and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait* **82** 151–170.
- Tejada L, Abellán A, Cayuela J, Martínez-Cacha A and Fernández-Salguero J (2008) Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal* **18** 139–146.
- Veríssimo P, Esteves C, Faro C and Pires E (1995) The vegetable rennet of *Cynara cardunculus L.* contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters* **17** 621–626.

## Résumé

Cette étude vise la promotion des pratiques traditionnelles algériennes et la valorisation socio-économique du cardon algérien, spontané (*Cynara cardunculus var sylvestris*) et cultivé (*Cynara cardunculus var atilis*), par l'exploration de l'utilisation des protéases extraites à partir de leurs fleurs, comme agents coagulants destinés à la filière lait. Le travail a été mené par comparaison à une variété témoin portugaise et a été subdivisé en quatre volets principaux : la purification et la caractérisation biochimique des cardosines, l'étude de la coagulation du lait et des caractéristiques biochimiques des coagulums obtenus, la fabrication artisanale d'un fromage portugais avec suivi de l'évolution de ses qualités et une étude sur la possibilité de conservation des fleurs de cardon par séchage.

Les extraits bruts obtenus des deux variétés algériennes ont présenté des taux de cardosines qui s'élèvent à 70.57% et 62.15% des protéines totales pour respectivement, le cardon spontané et cultivé contre un taux de 42.12 % pour la variété témoin. Le protocole de purification adopté a permis de séparer à partir de nos variétés algériennes les trois types de cardosines A<sub>0</sub>, A et B déjà connues. Toutes les cardosines étudiées sont des hétéroprotéines dimères constituées de deux chaînes grande et petite. Les cardosines issus des deux variétés algériennes se distinguent de celles de la variété portugaise par des temps d'élutions plus courts, des poids moléculaires plus élevés, des degrés de glycosylation plus faibles et des chaînes d'acides aminés non identiques. L'étude de la spécificité en vis-à-vis de la caséine kappa et de la chaîne  $\beta$  de l'insuline oxydée n'a pas révélé de différences significatives entre variétés. La mesure des propriétés coagulantes et des rendements fromagers théoriques ont révélé une bonne aptitude de nos cardosines algériennes à coaguler le lait. Les coagulums obtenus par nos cardosines ont manifesté des comportements rhéologiques variés offrant ainsi, une large possibilité de leur application pour la fabrication de différents types de fromages. L'utilisation des fleurs de cardon spontané algérien dans la fabrication du fromage portugais DOP type *Serra Da Estrella* a permis l'obtention d'un fromage très similaire au témoin. Les essais de séchage des fleurs ont montré que l'application des températures comprise entre 50 et 55 °C mène aux profils enzymatiques et technologiques les plus proches de ceux des fleurs fraîches.

L'ensemble de nos résultats obtenus, nous mènent à affirmer que l'utilisation des fleurs de cardon algérien en fromagerie, est très prometteuse et mérite d'être encouragée et largement envisagée afin de limiter la dépendance de l'importation d'agents coagulants coûteux et d'origines et caractéristiques non vérifiées.

**Mots clés :** Valorisation, fleurs de cardon algérien, cardosines, caractérisation biochimique, agents coagulants, coagulation du lait, fromage, séchage.

## Abstract

This study aims to promote traditional Algerian practices and the socio-economic valorization of spontaneous the Algerian cardoon (*Cynara cardunculus var sylvestris*) and the cultivated one (*Cynara cardunculus var atililis*), exploring the use of proteases contained in their flowers as coagulants intended for the dairy industry. The work was carried out by comparison to a Portuguese control variety and subdivided into four main parts: 1) the purification and biochemical characterization of cardosins, 2) the study of milk clotting and biochemical characteristics of the coagulums obtained, 3) the artisanal manufacture of a Portuguese cheese monitoring the evolution of its qualities and a study on the possibility of preservation of cardoon flowers by drying.

The raw extracts obtained from the two Algerian varieties (*Cynara cardunculus var sylvestris* et *Cynara cardunculus var atililis*) showed contents of cardosins up to 70.57% and 62.15% of the total proteins for spontaneous and cultivated cardoon while a content of 42.12% was obtained for the control variety. The purification protocol carried out allowed separation of three types of cardosins (A0, A and B) from the Algerian varieties, that have been documented. All the cardosins studied are dimer heteroproteins consisting of two large and small chains. Cardosins from the two Algerian varieties differ from those of the Portuguese variety by shorter elution times, higher molecular weights, lower glycosylation levels and non-identical amino acid chains. The study of specificity with respect to kappa casein and the  $\beta$  chain of oxidized insulin did not reveal significant differences between varieties. Measuring coagulating properties and theoretical cheese yields revealed a good ability of our Algerian cardosins to coagulate milk. The coagulums obtained by our cardosins depicted various rheological behaviors offering a wide possibility of their application for the manufacture of different types of cheeses. The use of Algerian spontaneous cardoon flowers in the manufacture of Portuguese DOP cheese type Serra Da Estrella has allowed the production of a cheese very similar to the control. Flower drying tests have shown that the application of temperatures between 50 and 55 degrees Celsius leads to enzymatic and technological profiles closest to those of fresh flowers.

Overall, our findings confirm the possibility of using flowers from spontaneous or cultivated Algerian cardoons as a coagulant in cheese making. The valorization of this crop by the production of its coagulants may be economically beneficial and could be a good alternative to reduce importations and support the national market.

**Key words:** valorization, Algerian cardoon flowers, cardosins, biochemical characterization, coagulants, milk coagulation, cheese, drying.

## الملخص

هذه الدراسة تستهدف تطوير الممارسات التقليدية الجزائرية وتثمين فصائل الخرشوف الجزائري البرية والمزروعة عن طريق بحث استعمال أنزيمات البروتياز المستخلصة من الأزهار كعامل تخثير (أنفحة) موجه لشعبة الحليب ومشتقاته.

منهجية العمل كانت عبر مقارنة فصيلتين محليتين مع فصيلة مرجعية من أصل برتغالي وشملت أربع محاور أساسية: عزل الكاردوزينات ودراسة خصائصها البيو كيميائية، دراسة تخثر الحليب باستعمال الكاردوزينات وخصائص الرائب الناتج، الصنع التقليدي لجبن برتغالي مع تتبع تطور جودته وأخيرا دراسة حفظ أزهار الخرشوف عبر عملية تجفيف.

المستخلصات الخامة الناتجة عن أزهار الفصيلتين المحليتين احتوت على نسب كاردوزينات تقدر ب 70.57% و 62.15% من البروتينات الكلية تواليا لكل من الخرشوف البري والمزروع فيما احتوت الفصيلة المرجعية على نسبة تقدر ب 42.12%. بروتوكول العزل المطبق سمح لنا بالحصول على الثلاث كاردوزينات المعروفة مسبقا (أ، ب، ج) من الفصيلتين الجزائريتين. كل الكاردوزينات المدروسة كانت بروتينات ثنائية غير متجانسة مكونة من سلسلتين بيبتيديتين كبيرة وصغيرة. الكاردوزينات الناتجة عن الفصيلتين الجزائريتين تميزت عن نظيراتها المرجعية ب: أوقات شطف أقل، أوزان جزئية أكبر، درجات ارتباط بالجليكوز أقل وسلاسل أحماض أمينية مختلفة. دراسة التحديد ضد المواد المتفاعلة مثل الكازيين  $\alpha$  و  $\beta$  للسلسلة  $\beta$  للأنسولين المؤكسد لم يظهر فارق معتبر بين الفصائل. قياس خصائص التخثير والمردودية النظرية لصنع الجبن أظهر فعالية جيدة للكاردوزينات الجزائرية لتخثير الحليب. الروائب الناتجة من استعمال كاردوزيناتنا أسفرت عن سلوكيات ريولوجية متنوعة ما يمنحها مجالات استعمال واسعة لإنتاج أجبان مختلفة. استعمال أزهار الخرشوف البري الجزائري في صنع الجبن البرتغالي سمح بالحصول على أجبان مماثلة جدا للجبن المرجعي. تجارب تجفيف الأزهار أظهرت لنا أن استعمال درجات حرارة بين 50 و 55° مئوية ينتج البروفيلات الأنزيمية و التكنولوجيا الأقرب الى الأزهار الطازجة.

مجموع النتائج المتحصل عليها تقودنا للتأكيد على أن استعمال أزهار الخرشوف الجزائري في صناعة الأجبان تمنح افاق جد واعدة وتستحق التشجيع والاعتماد عليها لتخفيض فاتورة استيراد الأنفحة المكلفة وغالبا من أصل وخصائص غير مثبتة.

**الكلمات المفتاحية:** تثمين، أزهار الخرشوف الجزائري، كارد وزينات، خصائص بيو كيميائية، أنفحة، تخثير الحليب، جبن، تجفيف.