



Milk protein complexation by green carob pods extract. Technological properties of obtained coagulum.

Rania Abi Azar

► To cite this version:

Rania Abi Azar. Milk protein complexation by green carob pods extract. Technological properties of obtained coagulum.. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0023 . pastel-00003462

HAL Id: pastel-00003462

<https://pastel.hal.science/pastel-00003462>

Submitted on 28 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROPARISTECH
ECOLE DOCTORALE ABIES

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de AgroParisTech par

Rania ABI AZAR

**Complexation des protéines laitières par les extraits de
gousses vertes de caroubier**
Propriétés technologiques des coagulums obtenus

Soutenue publiquement le 9 juillet 2007 devant la commission d'examen:

M Jean-Claude MEUNIER, Professeur émérite, AgroParisTech (Président)

Mme Joëlle LEONIL, Directeur de recherches, INRA Rennes, (Rapporteur)

Mme Isabel QUEIROZ MACEDO, Universidade de Aveiro, Portugal (Rapporteur)

M Elias EL MAYDA, Professeur, Université Al Baath, Syrie, (Examineur)

Mme Stéphanie BAUMBERGER, MC AgroParisTech (Examineur)

Mme Pascale JOLIVET, Chargée de Recherches, INRA Grignon (Directeur de
Thèse)

Remerciements

J'exprime mes remerciements et ma gratitude à Madame Pascale Jolivet, chargée de recherches à l'INRA Grignon pour m'avoir guidé et encouragé pendant toute la durée de mon travail, ainsi qu'à la confiance qu'elle m'a attribuée tout au long de mon étude.

Je remercie particulièrement Madame Isabelle Sodini pour son assistance et ses compétences si précieuses en rhéologie et pour l'aide qu'elle a apportée à la réalisation de mon travail.

Je remercie également les membres du jury de soutenance : M Jean-Claude Meunier (président du jury), Mme Joëlle Leonil (rapporteur), Mme Isabel Queiroz Macedo (rapporteur), M Elias El Mayda (examineur), Mme Stéphanie Baumberger (examineur).

Je n'oublie pas davantage la direction du Projet de Réhabilitation des Petits Elevages Laitiers pour m'avoir accordé l'autorisation d'utiliser les moyens de l'Unité des Centres de Collecte du Lait et du laboratoire des analyses des fourrages. Je tiens aussi à remercier les employés des centres de collecte de lait et du laboratoire des analyses des fourrages ayant contribué à la réalisation des expériences.

J'adresse enfin mes remerciements à l'Agence Universitaire de la Francophonie pour avoir facilité et financé partiellement les voyages et les séjours que j'ai effectués en France dans le cadre de ma thèse.

Sommaire

	page
Résumé.....	6
Abstract.....	6
Liste des abréviations.....	7
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	13
 Chapitre I : Introduction.....	 16
I.1. Situation du secteur laitier au Liban.....	17
I.2. Caractéristiques du marché libanais.....	19
I.3. Objectifs de ce travail.....	20
 Chapitre II : Revue bibliographique.....	 22
II.1. Généralités sur le lait.....	23
II.1.1. Caractéristiques du lait de vache.....	23
II.1.2. Caractéristiques des laits de chèvre et de brebis.....	29
II.1.3. Caractéristiques du lait de chamelle.....	29
II.1.4. Caractéristiques du lait de soja.....	30
II.2. Techniques de coagulation du lait.....	31
II.2.1. La coagulation acide.....	32
II.2.2. La coagulation par la présure.....	32
II.2.3. La chymosine recombinante.....	34
II.2.4. Les extraits de plantes.....	35
II.3. Le caroubier au Liban.....	37

II.4. Les tannins ou polyphénols.....	40
II.4.1. Caractéristiques générales.....	40
II.4.2. Les différents groupes de polyphénols.....	41
II.4.3. Propriétés biologiques et effet santé des polyphénols.....	44
II.4.4. Les polyphénols du caroube.....	45
II.4.5. Interactions polyphénols protéines.....	48
II.4.5.1. Les caractéristiques des protéines.....	50
II.4.5.2. Les caractéristiques des polyphénols.....	51
II.4.5.3. Nature des liaisons impliquées dans la complexation.....	53
II.4.5.4. Les conditions du milieu.....	54
 Chapitre III : Matériel et Méthodes.....	 58
III.1. Caractéristiques des extraits de caroube employés.....	59
III.1.1. Origine des gousses et obtention du jus de caroube.....	59
III.1.2. Dosage des polyphénols.....	59
III.1.3. Analyse des polyphénols en couplage chromatographie liquide haute performance-spectrométrie de masse.....	60
 III.2. Caractéristiques des laits employés.....	 61
III.2.1. Détermination du pH du lait.....	62
III.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse du lait.....	62
III.2.3. Détermination de la matière sèche totale.....	63
III.2.4. Détermination de la teneur en protéines.....	63
III.2.5. Détermination du rayon hydrodynamique des micelles par diffusion dynamique de la lumière laser.....	65
 III.3. Tests rhéologiques et physicochimiques.....	 66
III.3.1. Tests de coagulation.....	66
III.3.2. Mesure de la synérèse.....	67
III.3.3. Mesure de la viscosité des produits laitiers.....	68
III.3.4. Tests de pénétrométrie.....	69

III.4. Analyse biochimique des complexes protéines laitières-extrait de caroube obtenus.....	70
III.4.1. Analyse des complexes par chromatographie liquide haute performance.....	70
III.4.2. Analyse du devenir des protéines par électrophorèse capillaire.....	71
III.4.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (Phast-system).....	72
III.4.4. Analyse des complexes en spectrométrie de masse.....	73
III.4.5. Analyse des complexes par turbidimétrie.....	74
	75
Chapitre IV : Résultats et discussion.....	76
IV.1. Caractérisation de l'extrait de caroube.....	76
IV.1.1. Préparation des extraits de caroube.....	77
IV.1.2. Teneur en polyphénols des extraits de caroube.....	
IV.1.3. Identification des polyphénols présents dans les extraits de gousses vertes de caroube.....	78
IV.1.4. Conclusion.....	83
	84
IV.2. Etude de la coagulation de différents laits avec l'extrait de caroube..	
IV.2.1. Rendements obtenus en fonction de la quantité d'extrait pour le lait de vache.....	84
IV.2.2. Effet de la température sur la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.....	86
IV.2.3. Cinétique de coagulation.....	88
IV.2.4. Effet du pH sur la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.....	89
IV.2.5. Comparaison de la coagulation de différents laits par l'extrait de caroube.....	90
IV.2.6. Comparaison de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube à la coagulation par la présure ou par fermentation lactique....	93
<i>IV.2.6.1. Effets comparés de la présure, de l'extrait de caroube et de la combinaison présure – extrait de caroube.....</i>	<i>93</i>
<i>IV.2.6.2. Etude de la synérèse dans les cas de traitements du lait de vache par l'extrait de caroube, la présure et les ferments lactiques...</i>	<i>95</i>
	<i>96</i>

IV.2.7. Conclusion.....	
IV.3. Tests rhéologiques des coagulums obtenus par le traitement du lait de vache avec l'extrait de caroube.....	98
IV.3.1. Tests effectués avec le rhéomètre.....	98
IV.3.1.1. Test de coagulation.....	100
IV.3.1.2. Test de visco-écoulement.....	101
IV.3.2. Résultats obtenus avec le pénétromètre (profil de texture).....	
IV.3.3. Conclusion concernant les caractéristiques des coagulums obtenus avec l'extrait de caroube.....	102
	103
IV.4. Mécanisme d'action des polyphénols sur les protéines.....	103
IV.4.1. Effet sur le rayon hydrodynamique des micelles de caséines....	105
IV.4.2. Effet des polyphénols sur la structure de la caséine □.....	108
IV.4.3. Effet de l'extrait de caroube et de la présure sur le comportement des protéines par observation en électrophorèse.....	108
IV.4.3.1. Analyse en électrophorèse capillaire.....	111
IV.4.3.2. Analyse en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Phast-system).....	
IV.4.4. Effet de l'acide gallique et de la catéchine sur le comportement des protéines observé en chromatographie liquide haute performance.....	113
IV.4.5. Etude du complexe protéines laitières-polyphénols en spectrométrie de masse et en conditions dénaturantes ou non dénaturantes.....	116
IV.4.6. Etude des interactions polyphénols de l'extrait-protéines du lait par turbidimétrie.....	118
IV.4.6.1. Comportement de la caséine β et de la β -lactoglobuline en présence d'extrait de caroube, d'acide gallique ou de catéchine.....	118
IV.4.6.2. Effet des polysaccharides sur l'interaction polyphénols de l'extrait-protéines.....	120
IV.4.6.3. Influence de la force ionique sur l'interaction polyphénols	121
	123

<i>de l'extrait–protéines</i>	
IV.4.7. Conclusion.....	124
 Chapitre V : Conclusion générale.....	 127
 Références bibliographiques.....	 142
	145
Annexe1.....	147
Annexe2.....	152
Annexe3.....	
Annexe4.....	

Résumé

La préparation d'une pâte alimentaire artisanale connue sous le nom de mekika, par coagulation du lait à l'aide d'extraits de gousses vertes de caroubier constitue une technologie originale spécifique de certaines régions libanaises.

Notre étude s'inscrit dans le cadre de la préservation du patrimoine culinaire du pays en offrant de combler le manque de données scientifiques sur cette coagulation. L'accent est mis d'une part sur les réactions chimiques impliquées dans le processus et d'autre part sur les propriétés technologiques du produit obtenu.

L'importance de cette technologie est soulignée en la comparant aux techniques classiques faisant intervenir des enzymes protéolytiques (présure, chymotrypsine, protéases fongiques ou microbiennes). L'étude est finalement appliquée à différents laits (vache, chèvre, brebis, chamelle).

Abstract

The preparation of a traditional dairy product named mekika is well known in some specific areas of Lebanon. The mekika is produced by coagulating milk with green carob pods extract. Our study is done in the concept of preservation of the culinary traditions of the country by giving scientific information needed to support this product and allow its manufacture at industrial scale.

Our objective is to study the chemical reactions implied in milk coagulation and the technological characteristics of the dairy product obtained.

The importance of this traditional technology is assessed by its comparison with other practices using classical techniques for milk coagulation as for example proteolytic enzymes such as chymosin. This study is conducted also on different types of milk including cow, ewe, sheep and camel milk.

Liste des abréviations

ACN : acétonitrile

ANP : azote non protéique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BSA : bovine serum albumin

Da : dalton

°C : degré Celcius

E : extrait de caroube

FAO : food and agriculture organization

HPLC : high performance liquid chromatography

L.L.: livre libanaise

Met : méthionine

Phe : phénylalanine

prot : protéine

Ser : sérine

TFA : acide trifluoroacétique

UHT : ultra high temperature

MF : matière fraîche

MFC : masse fraîche du culot

MS : matière sèche

MSC : teneur en matière sèche du coagulum

MST : matière sèche totale

PC : teneur en protéines du coagulum

PT : protéines totales

G' : module conservatif

G'' : module dissipatif

Tangente $\square\square$ tangente de l'angle de déphasage

CMC : seuil de concentration au-delà duquel la caséine β se polymérise

PP : polyphénols

AG : acide gallique

Cat : catéchine

Caséine DP : caséine déphosphorylée

Liste des figures

	page
Figure 2.1: Modèle de WAUGH (1970).....	Verso 26
Figure 2.2: Modèle de structure de la micelle de caséines selon ONO et OBATA (1989) confronté à celui de HOLT (1992).....	Verso 27
Figure 2.3: Modèle de structure ouverte (HORNE et al., 1989).....	Verso 28
Figure 2.4: Principe de fabrication du lait de soja et du tofu (Dacosta, 1990).....	Verso 30
Figure 2.5: Structure nucléaire des flavonoïdes (Heim et al., 2002).....	Verso 40
Figure 2.6: Structure oligomérique des tannins condensés (proanthocyanidines et leurs monomères correspondants (catéchine et gallocatéchine), (Zywicki et al., 2002).....	Verso 40
Figure 2.7: Classification, structure et sources alimentaires des différents flavonoïdes (Heim et al., 2002).....	Verso 41
Figure 2.8: Biosynthèse des flavan-3-ols à partir des dihydroflavonols (Haslam, 1998).....	Verso 42
Figure 2.9: Métabolisme de l'acide gallique (G) dans les tannins hydrolysables: le pentagalloylglucose est le précurseur des gallotannins (GT) et des ellagitannins (ET), (Mueller-Harvey, 2001).....	43
Figure 2.10: Structures des monomères de tannins hydrolysables: acide gallique et acide ellagique d'un gallotannin (1,3,6-trigalloyl-glucose) et d'un ellagitannin (vescalagin/castalagin), (Zywicki et al., 2002).....	43
Figure 2.11: Structure du fucofureckol (Haslam, 1998).....	Verso 43
Figure 2.12: Structure des composés isolés et purifiés de la fibre de caroube (Owen et al., 2003).....	Verso 47
Figure 2.13: Modèle moléculaire proposé pour l'interaction entre les protéines salivaires riches en proline et les polyphénols (Jobstl et al., 2004a).....	Verso 48
Figure 2.14: Représentation schématique de l'encapsulation d'un polyphénol par les polysaccharides, (Haslam, 1998).....	Verso 54
Figure 2.15: Modèle pour l'interaction protéines-polyphénols (Siebert et al., 1996).....	Verso 54

Figure 3.1: Schéma du système en cône plan du rhéomètre qui permet d'analyser la viscosité complexe et la viscosité apparente des coagulums....	Verso 67
Figure 3.2: Profil de texture.....	Verso 68
Figure 4.1: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.....	77
Figure 4.2: Chromatogrammes reconstitués à l'aide du courant ionique dans le cas des extraits obtenus à partir de gousses de caroube fraîches, congelées ou lyophilisées.....	79
Figure 4.3: Chromatogrammes reconstitués à l'aide du courant ionique ou de la détection UV mesurée à 354 nm dans le cas de l'extrait obtenu à partir de gousses de caroube lyophilisées et faisant apparaître les pics identifiés grâce à leur spectre de masse.....	Verso 79
Figure 4.4 : Spectres de masse de trois gallotannins.....	Verso 80
Figure 4.5 : Spectres de masse des glucosides de la quercetine.....	Verso 81
Figure 4.6 : Spectres de masse des glucosides de la myricetine.....	82
Figure 4.7: Etude du rendement de coagulation du lait de vache (masse de matière fraîche, teneur en matière sèche et protéines) en fonction du volume d'extrait de caroube ajouté (extrait laboratoire).....	84
Figure 4.8: Etude du rendement de coagulation du lait de vache (quantité de matière fraîche, teneur en matière sèche et protéines) en fonction du volume en extrait de caroube ajouté (extrait traditionnel).....	86
Figure 4.9 : Evolution de la masse fraîche des coagulums obtenus par l'action de l'extrait de caroube sur différents laits (vache, chèvre, brebis, chamelle et soja).....	91
Figure 4.10 : Evolution des modules G' , G'' et tangente δ au cours du temps lors de la coagulation du lait pasteurisé avec la présure.....	Verso 97
Figure 4.11 : Evolution des modules G' , G'' et tangente δ au cours du temps pour la coagulation du lait pasteurisé avec l'extrait de caroube.....	Verso 97
Figure 4.12 : Evolution des modules G' , G'' et tangente δ au cours du temps pour la coagulation du lait pasteurisé conjointement avec l'extrait de caroube et la présure.....	Verso 98
Figure 4.13: Mesure de la taille des micelles par diffusion de la lumière.....	Verso 102
Figure 4.14 : Variation de la taille des micelles en fonction du volume d'extrait de caroube ajouté. La taille des micelles sans ajout d'extrait est	

fixée à 100.....	Verso 103
Figure 4.15 : Variation du rayon hydrodynamique de la caséine β en fonction des différents ratios polyphénols/protéines. Le rayon hydrodynamique de la caséine β sans ajout d'extrait est fixé à 100.....	Verso 104
Figure 4.16: Electrophorégrammes des protéines laitières en présence de présure. En rouge: lait pasteurisé seul, vert: lait pasteurisé + 60 μ L présure, bleu: lait pasteurisé + 30 μ L présure.....	Verso 108
Figure 4.17: Electrophorégrammes des protéines laitières en présence de l'extrait de caroube. En rouge: lait pasteurisé seul, vert: lait pasteurisé + 50 μ L extrait, bleu: lait pasteurisé + 100 μ L extrait.....	Verso 108
Figure 4.18: Séparation sur gel de polyacrylamide des protéines laitières dans les surnageants obtenus après coagulation par la présure et l'extrait de caroube.....	112
Figure 4.19: Chromatogrammes obtenus sur colonne en phase inverse de la caséine β (A) et de la β -lactoglobuline (B) en présence d'acide gallique. Le tracé du mélange est en fuschia et peut être comparé aux tracés des composés analysés individuellement.....	Verso 112
Figure 4.20: Chromatogrammes obtenus sur colonne d'exclusion stérique de la caséine β avec l'acide gallique (A) et avec la catéchine (B).....	Verso 113
Figure 4.21: Chromatogrammes obtenus sur colonne d'exclusion stérique de la β -lactoglobuline avec l'acide gallique (A) et avec la catéchine (B).....	Verso 114
Figure 4.22: Profil d'ions multichargés obtenus avec la β -lactoglobuline en conditions dénaturantes et spectre de masse obtenu par déconvolution en insert.....	Verso 115
Figure 4.23: Profil d'ions multichargés obtenus avec l' α -lactalbumine en conditions dénaturantes et spectre de masse obtenu par déconvolution en insert.....	Verso 115
Figure 4.24: Profil d'ions multichargés obtenus avec la β -lactoglobuline en milieu acétonitrile ou acétate d'ammonium en présence d'acide gallique ou de catéchine (ratio polyphénol/protéine = 5).....	116
Figure 4.25: Profil d'ions multichargés obtenus avec l' α -lactalbumine en milieu acétonitrile ou acétate d'ammonium en présence d'acide gallique ou de catéchine (ratio polyphénol/protéine = 5).....	Verso 117

Figure 4.26 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en fonction du rapport polyphénols de l'extrait de caroube/protéines en solution. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions.....	Verso 118
Figure 4.27 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en fonction du rapport acide gallique/protéines en solution. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions.....	Verso 118
Figure 4.28 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en fonction du rapport catéchine/protéines en solution. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions.....	119
Figure 4.29 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en fonction du rapport polyphénols de l'extrait de caroube /protéines en solution (extrait de caroube exempt de polysaccharides). Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions.....	121
Figure 4.30 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en présence d'extrait de caroube, en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions.....	122

Liste des tableaux

	page
<u>Tableau 2.1:</u> Composition moyenne en g.L ⁻¹ des laits de différentes espèces animales (Alais, 1984 ; Luquet, 1985 ; Belitz et Grosch, 1987)....	23
<u>Tableau 2.2 :</u> Teneur des différentes protéines du lait de vache (Walstra et Jenness, 1984).....	Verso 24
<u>Tableau 2.3:</u> Caractéristiques physicochimiques des caséines (Swaigood, 1982).....	Verso 25
<u>Tableau 2.4:</u> Comparaison des compositions nutritionnelles moyennes du lait de vache et de soja (pour cent grammes), (Dacosta, 1990).....	31
<u>Tableau 2.5:</u> Micro-organismes clonés pour le gène induisant l'expression de la prochymosine (Teuber, 1990).....	34
<u>Tableau 2.6 :</u> Production de caroubier et superficie cultivées (Ministère de l'Agriculture, 2001).....	38
<u>Tableau 2.7:</u> Teneur en polyphénols dans quelques aliments et boissons (mg/100 g de matière fraîche ou mg/100 mL), (Scalbert et Williamson, 2000).....	Verso 39
<u>Tableau 3.1:</u> Composition des différents laits utilisés dans les tests de rhéologie et de mesure des tailles des micelles.....	61
<u>Tableau 3.2: :</u> Composition des différents laits utilisés dans les tests de coagulation et de synérèse.....	61
<u>Tableau 4.1 :</u> Composition des jus de caroube obtenus par broyage (en pourcentages par rapport aux gousses fraîches).....	76
<u>Tableau 4.2 :</u> Teneurs en polyphénols des extraits de caroube par rapport au volume total d'extrait.....	78
<u>Tableau 4.3 :</u> Liste des composés phénoliques obtenus dans l'extrait de caroube (gousses lyophilisées).....	80
<u>Tableau 4.4 :</u> Effet de la température sur les rendements de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.....	87
<u>Tableau 4.5 :</u> Effet de l'ébullition sur les rendements de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.....	88
<u>Tableau 4.6 :</u> Cinétique de la coagulation du lait de vache par l'extrait de	

caroube.....	89
<u>Tableau 4.7 :</u> Effet du pH de l'extrait de caroube sur les rendements de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.....	90
<u>Tableau 4.8:</u> Comparaison des rendements (matière fraîche, matière sèche et protéines) des traitements caroube et présure du lait de vache.....	94
<u>Tableau 4.9 :</u> Comparaison des volumes de sérum égoutté, de la synérèse et des rendements du lait de vache (matière fraîche, matière sèche et protéines) des traitements caroube, présure et ferments lactiques.	95
<u>Tableau 4.10 :</u> Test de coagulation réalisé à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée.....	99
<u>Tableau 4.11 :</u> Test de visco-écoulement permettant de mesurer la viscosité apparente et le déphasage de différents coagulums.....	101
<u>Tableau 4.12:</u> Paramètres obtenus à partir des profils de texture des coagulums caroube et présure.....	Verso 101
<u>Tableau 4.13 :</u> Variation du diamètre hydrodynamique en fonction des laits utilisés. Les échantillons sont dilués au 1/10 dans du perméat. Les résultats sont la moyenne d'environ 6 mesures.....	103
<u>Tableau 4.14 :</u> Variation du diamètre hydrodynamique en fonction du volume d'extrait de caroube ajouté. La taille des micelles sans ajout d'extrait est fixée à 100.....	104
<u>Tableau 4.15 :</u> Variation du diamètre hydrodynamique en fonction du volume de présure ajoutée (lait frais pasteurisé).....	105
<u>Tableau 4.16 :</u> Variation du diamètre hydrodynamique de la caséine β en fonction des différents ratios polyphénols/protéines. Le diamètre hydrodynamique de la caséine β sans ajout de polyphénol est fixé à 100...	107
<u>Tableau 4.17 :</u> Composition en protéines sériques et caséines des échantillons analysés par électrophorèse capillaire avec ou sans addition d'agent coagulant. Pour chaque échantillon, on considère la proportion relative de chaque protéine par rapport aux protéines totales puis la variation de concentration de chaque protéine par rapport à sa teneur dans le lait pasteurisé qui est considéré comme ayant une composition témoin..	Verso 109
<u>Tableau 4.18 :</u> Surface (corrigée) correspondant à chaque protéine dans les différents échantillons de lait et variation de concentration de chaque protéine par rapport à sa teneur dans le lait pasteurisé qui est considéré	

comme ayant une composition témoin.....	110
<u>Tableau 4.19</u> : Composition en protéines sériques et caséines des échantillons de laits congelé ou UHT analysés par électrophorèse capillaire avec ou sans addition d'agent coagulant. Pour chaque échantillon, on considère la proportion relative de chaque protéine par rapport aux protéines totales.....	Verso 110

Chapitre I

INTRODUCTION

I.1. Situation du secteur laitier au Liban

Le secteur laitier du Liban est en pleine reconstruction depuis 1996 après 17 ans de guerre destructrice. Plusieurs actions visant à diminuer la dépendance extérieure du pays pour ses approvisionnements en lait et produits laitiers, ont été mises en place depuis cette époque (Araji, 2003).

Le secteur a bénéficié du soutien du gouvernement libanais dans différents domaines : distribution de génisses pleines aux éleveurs avec des facilités de paiement à long terme, installation des centres de collecte du lait dans les régions de production laitière, et amélioration de la qualité des services de vulgarisation. Selon les derniers chiffres publiés par le Ministère de l'Agriculture, 30% de la demande en lait frais est couverte par la production nationale. Le Libanais est un grand consommateur de produits laitiers : près de 14 litres de lait, 24 kilos de fromage et 20 kilos de yaourt par an et par habitant mais les besoins du pays sont couverts à peine à 25% par la production locale (Lemoine, 2002). Si on estime une population globale de 4,3 millions d'habitants, la consommation par habitant approcherait, selon les estimations effectuées par l'Institut de l'Elevage (2003), 189 litres d'équivalent lait par habitant, ce qui est élevé et très voisin des niveaux des pays méditerranéens de l'Union Européenne (par exemple 190 kg /habitant en Espagne en 1999 ou encore 207 kg/habitant en Grèce).

Le cheptel laitier du Liban est diversifié mais inégalement réparti sur le territoire en fonction des contraintes climatiques, des ressources alimentaires et des traditions d'élevage attachées à chaque région (Araji, 2003). Un recensement récent de la FAO (2000) a identifié deux régions à fort potentiel d'élevage : le nord du Liban et la plaine de la Békaa. Dans ces deux zones se trouvent 60% du cheptel bovin national, 85% du cheptel ovin et 61% du cheptel caprin. La majorité des vaches se trouve dans des petits élevages qui comptent en moyenne 3–4 vaches par exploitation. A côté de ces structures traditionnelles d'élevage, il existe quelques grandes fermes laitières, renfermant plusieurs centaines de vaches, orientées vers la production laitière intensive avec des animaux importés à fort potentiel. Ces fermes sont exclusivement attachées à l'approvisionnement spécifique d'usines importantes de transformation, Dairy–Day, Liban Lait, Daliah (Araji, 2003).

Le prix de revient moyen du litre de lait se situe en moyenne à 595 L.L. (0,35 Euro) (Pflug et al., 2001). Ce coût élevé résulte de l'incidence de l'alimentation et de

l'amortissement du prix d'achat des animaux sur une courte période. Le prix payé au producteur est lui, sujet à d'importantes fluctuations (250 à 850 L.L.) en fonction de la loi de l'offre et de la demande (Araji, 2003). Il convient de remarquer que le prix du lait frais est, en moyenne, plus élevé que celui des 2 autres sources potentielles de matière première : le lait recombinaison à partir de poudres importées et le lait frais importé de Syrie (Araji, 2003).

Les fabrications laitières au Liban en équivalent litres de lait se répartissent comme suit : 15 à 18% pour le Laban, 40 à 45% pour le Labneh, 40% pour les différents Gibneh (fromages) et environ 5% pour le lait frais et yaourts aromatisés ou aux fruits. Cela souligne bien la place privilégiée des laits fermentés dans les fabrications tant familiales qu'artisanales ou industrielles. Ce sont des produits à consommer frais, qui ne se gardent pas longtemps (10 jours au réfrigérateur) (Institut de l'Élevage, 2003). À côté de cela, les fromages sont d'une grande diversité (Annexe 1), mais l'essentiel des fabrications en volume concerne les fromages pasteurisés et emprésurés : Halloum et Akkawi, plus leur sous-produit fabriqué à partir du sérum : le double-crème. Ces fromages peuvent être fabriqués à partir de lait de vache, de brebis ou de chèvre (Institut de l'Élevage, 2003).

Il semble que les principaux critères d'appréciation de la qualité de ces produits soient la couleur (qui doit être très blanche), la consistance (assez élastique), et l'absence de goût marqué (Institut de l'élevage, 2003). Les fromages sont rarement affinés. L'affinage consiste parfois à un séchage à l'air ou à un affinage en saumure (Araji, 2003).

Au plan technique, il convient de remarquer que ces produits libanais traditionnels sont à faible degré de technicité. Leur processus d'élaboration est simple et ne demande pas d'équipements sophistiqués. Ceci explique la multiplicité des petits opérateurs (500 environ) présents sur le marché (Araji, 2003). D'après plusieurs experts, seule une poignée d'opérateurs serait détentrices d'une licence d'exploitation en bonne et due forme et seule une demi-douzaine possède une installation qui pourrait être qualifiée de laiterie industrielle. Le reste est une kyrielle de laiteries semi artisanales traditionnelles dont quelques unes se distinguent par des stratégies particulières et innovantes. À côté de ce système existe une fabrication fermière qui ne rentre pas en totalité dans les circuits marchands. Les ventes au voisinage dominent très largement pour les produits transformés à la ferme, avec plus de 80%, le reste étant essentiellement livré directement aux épiceries des villages alentour (Frem,

2002). Il faut souligner la très bonne image de ces fabrications fermières, qui, si elles se retrouvent très peu sur les étals des épiceries des villes, et encore moins sur les linéaires des grandes surfaces, attirent fortement les consommateurs urbains de passage ou en vacances dans leurs villages d'origine (Institut de l'Elevage, 2003).

Selon Abou Lahoud (2003), il faut faire la différence entre les différentes niches du marché, car le Liban n'a pas les moyens d'être compétitif pour une production de masse, par manque de gros investissements : « le salut de l'agriculture passe par une production aux normes internationales, pour pouvoir pénétrer les marchés étrangers » ou bien comme l'envisage l'Institut de l'Elevage, il faudrait fabriquer et commercialiser des produits particuliers à bonne valeur ajoutée, pour se distinguer radicalement.

I.2. Caractéristiques du marché libanais

Le marché libanais des produits laitiers est caractérisé par plusieurs points (Araji, 2003) :

- son volume réduit lié à la faible importance de la population locale (4,3 millions d'habitants).
- l'existence d'une population et d'une demande principalement (60%) concentrées sur les régions de Beyrouth et du Mont Liban.
- une forte demande, environ 70% du marché des produits laitiers, orientée vers les produits traditionnels, à image identitaire des pays du Proche Orient, tels que les laits fermentés de type Laban et Labneh, et fromages de types Halloumi, Baladi, Kachkaval, Akkawi, etc.
- une évolution croissante de la demande en fromages fondus.
- une demande de lait en poudre soutenue, bien qu'en diminution de 8% au cours des dernières années. Les laits de boissons ont un taux de pénétration faible, malgré les efforts de deux industriels pour accroître les ventes de lait pasteurisé (Dairy-Day) et de lait stérilisé (Liban Lait). Cette difficulté apparaît liée à la faible attirance du consommateur pour la saveur sucrée et à la fréquence de l'intolérance au lactose, qui entraîne un choix préférentiel d'une frange de la population locale, vers les produits laitiers acidifiés (laits fermentés, fromages) dont la teneur en lactose est réduite.

- un niveau élevé (20 000 T) des importations de fromages, dont principalement le Kachkaval, le Halloumi, la Feta, l'Akkawi, en provenance de Tchéquie, de Bulgarie et de Chypre.
- une importation massive de poudre de lait en vrac (4 500 T) et en boîte (12 600 T), de beurre (5 000 T), de crème (4 100 T), de lait concentré sucré (1 450 T) en provenance principalement des pays de l'Union Européenne. L'ensemble de ces produits importés est soumis à des droits de douanes spécifiques, dont le montant tend à diminuer en raison des accords récents de libéralisation des échanges avec les pays arabes et l'Union Européenne pour harmoniser les échanges avec le Liban.
- une faiblesse de la réglementation et des normes relatives à la composition, à l'emballage et à l'étiquetage des produits. Ce libéralisme excessif se traduit ponctuellement par des opérations contraires aux bonnes pratiques (reconditionnement de produits, absence de mention d'origine et de composition de produits, utilisation de conservateurs chimiques, etc) qui nuisent à la qualité intrinsèque des produits, au bon suivi de leur traçabilité et altèrent leur crédibilité pour l'exportation par manque de conformité aux règles du commerce international (ouverture au marché européen).

I.3. Objectifs de ce travail

Le sujet de ce travail s'inscrit dans un contexte de mutation rapide caractérisé par une intégration à terme du marché intérieur européen et la recherche de la liberté de circulation des biens, et par certains efforts du secteur privé (surtout agroalimentaire) pour relancer sa capacité productive et son innovation (Hamouche, 2003).

En fait, la préparation d'une pâte alimentaire artisanale connue sous le nom de « Mekika » par coagulation du lait à l'aide d'extraits de gousses vertes de caroubier constitue une technologie originale spécifique de certaines régions libanaises. Or cette pratique traditionnelle faisant partie du patrimoine culinaire du pays est en train de se perdre et mériterait d'être étudiée en vue d'une meilleure adaptation au marché et au consommateur d'aujourd'hui.

Une étude préalablement effectuée (Abou Zeidan, 2002) a montré que les polyphénols contenus dans l'extrait traditionnel obtenu par macération des gousses de

caroubier dans l'eau semblaient être le candidat de choix permettant d'expliquer la coagulation du lait. Dans notre étude l'accent sera mis d'une part sur l'analyse fine des polyphénols de l'extrait de caroube et la nature des protéines laitières complexées, et d'autre part sur les propriétés technologiques du produit obtenu.

L'importance de cette technologie peut être soulignée en la mettant en parallèle avec d'autres pratiques rencontrées dans les pays laitiers, adaptées aux situations locales et faisant appel à des extraits végétaux, ainsi qu'en la comparant aux techniques classiques faisant intervenir des enzymes protéolytiques (présure, chymotrypsine, protéases fongiques ou microbiennes). Le remplacement de ces enzymes, essentiellement d'origine animale ou obtenues par génie génétique, par un extrait végétal permettrait éventuellement de répondre en partie aux questions soulevées pour des raisons éthiques.

L'étude est finalement appliquée à différents laits (vache, chèvre, brebis, chamelle), car il est connu que la coagulation par la présure ou par des protéases végétales (de type cardosine) ne peut pas être réalisée de la même façon sur ces différents laits du fait d'une trop faible concentration en caséine kappa ou du fait d'une production trop importante de peptides amers indésirables. L'utilisation de l'extrait de caroube pourrait être une voie alternative grandement appréciée.

Chapitre II

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Généralités sur le lait

Le lait est le produit intégral de la traite totale d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (définition adoptée par le premier congrès international pour la répression des fraudes alimentaires, Genève, 1908). C'est une matière première complexe, hétérogène, vivante et de conservation difficile.

De très nombreux facteurs peuvent intervenir sur la composition du lait dont l'espèce, la race, le stade de lactation, la saison, l'état sanitaire, l'alimentation (Mahaut et al., 2000a). Le tableau 2.1 présente la composition moyenne du lait de quelques espèces. Le lait de chèvre a une composition voisine du lait de vache, alors que celle du lait de brebis est nettement différente (Mahaut et al., 2000a).

Tableau 2.1: Composition moyenne en g.L⁻¹ des laits de différentes espèces animales (Alais, 1984 ; Luquet, 1985 ; Belitz et Grosch, 1987).

Lait de	Protéines totales	Caséines	Lactose	Matières grasses	Minéraux totaux
Vache	32	28	40-60	39	9
Brebis	55	45	47	71,9	9
Chèvre	28	23	44-47	33,8	5-8
Chamelle	30	28	33	53,8	7

II.1.1. Caractéristiques du lait de vache

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

1- Le lactose

Le lactose est le constituant majeur de la matière sèche du lait (Veisseyre, 1975). Présent à une dose de 47 à 52 g.kg⁻¹, il joue un rôle important, lié notamment à

Tableau 2.2 : Teneur en différentes protéines du lait de vache (Walstra et Jenness, 1984).

	Concentration (g. kg ⁻¹)	Pourcentage des protéines totales
Protéines totales	33,0	100,0
Caséines totales	26,0	79,5
Protéines solubles	6,3	19,3
Protéines de la membrane du globule gras	0,4	1,2
Caséine α_{s1}	10,0	30,6
Caséine α_{s2}	2,6	8,0
Caséine β	9,3	28,4
Caséine γ	0,8	2,4
Caséine κ	3,3	10,1
κ lactalbumine	1,2	3,7
β lactoglobuline	3,2	10,1
BSA	0,4	1,2
Immunoglobulines	0,7	2,1
Divers (incluant les protéoses peptones)	0,8	2,4

sa fermentescibilité qui intervient lors de l'élaboration de divers produits laitiers (Mahaut et al., 2000a).

2- Les matières salines

Le lait apporte de nombreux minéraux. Les plus importants sont: (Mahaut et al., 2000).

le calcium : $1,25 \text{ g.L}^{-1}$

le potassium : $1,5 \text{ g.L}^{-1}$

le chlore : $1,2 \text{ g.L}^{-1}$

le phosphore : $0,95 \text{ g.L}^{-1}$

le sodium : $0,5 \text{ g.L}^{-1}$

le magnésium : $0,13 \text{ g.L}^{-1}$

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

3- La matière grasse

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

4- Les matières azotées.

Le lait de vache contient environ 5,3 g d'azote par kg dont 95% sous forme de protéines, soit approximativement $32 - 34 \text{ g.kg}^{-1}$ (Tableau 2.2).

Tableau 2.3: Caractéristiques physicochimiques des caséines (Swaisgood, 1982).

Caractéristiques	Caséines			
	α_{s1}	α_{s2}	β	κ
Nb total d'acides aminés	199	207	209	169
Masse molaire (Da)	23612	25388	23980	19037
Résidu cystéine	0	2	0	2
Résidu proline	17	10	35	20
Phosphorylation (mole de P/mole de caséine)	8 à 9	10 à 13	5	1 à 2
Région de phosphorylation	41-77	7-31;55-66 129-143	1-35	149
Glycosylation (mole d'unité osidique/mole de caséine)	0	0	0	0 à 5
Charge à pH 6,6 (mV)	-20,9	-18 à -13,2	-12,3	-3,9
pHi	4,6	5,39 à 5,19	5,19	5,43
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	+++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-
Sensibilité au froid			+++	
Hydrophobie en kJ/résidu	4,9	4,65	5,6	5,1
Partie N-terminale	+	-	-	+
Partie centrale	-	+	+	+
Partie C-terminale	+	-	+	-
Formation de micelles	NON	NON	OUI	OUI

4.1- L'azote non protéique (ANP)

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

4.2- Les caséines bovines

4.2.1- Composition et structure chimique.

Les caséines représentent 80% des protéines totales du lait et se composent de quatre protéines majeures, les caséines α_{s1} , α_{s2} , β , et κ dont les proportions relatives sont 33, 11, 33, 11 % selon Brulé et al. (1997).

Il existe plusieurs variants génétiques pour les caséines (Grosclaude, 1988) et leur fréquence est plus ou moins importante selon les espèces. Grosclaude (1988) a montré que la présence de ces variants n'est pas sans incidence sur les aptitudes fromagères du lait.

Les différentes caractéristiques physico-chimiques et d'hydrophobie de ces phosphoprotéines sont présentées dans le tableau 2.3.

Ces protéines possèdent un certain nombre de caractères communs : la présence de phosphore sous forme de groupements phosphoséryles, leur richesse en certains acides aminés (glu, leu, pro) et la forte proportion de résidus apolaires (Mahaut et al., 2000a).

Plusieurs caractéristiques les différencient. On constate d'après le tableau 2.3 que seules les caséines α_{s2} et κ possèdent chacune deux cystéines. Les caséines présentent aussi une hétérogénéité par rapport au taux de phosphorylation : 1 mole P/mole de caséine κ , 5 moles P/mole de caséine β , 8 ou 9 moles P/mole de caséine α_{s1} et 10 à 13 moles P/mole de caséine α_{s2} .

Seules les sérine et thréonine sont phosphorylées et ce dans des séquences spécifiques (Mercier, 1981). Malgré la présence de groupements phosphoséryle ou phosphothréonine, ces caséines possèdent un haut degré d'hydrophobie ($\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$). La caséine κ est la seule à présenter des résidus glycosylés, liés essentiellement au niveau des résidus thréonine situés dans la partie C- terminale de la protéine. Cette

partie C-terminale forme une chevelure hydrophile, chargée négativement, à la surface de la micelle dont il augmente la stabilité stérique (Walstra, 1990). De plus la caséine κ présente une très grande sensibilité à l'action de la chymosine au niveau de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ conduisant à la libération du glycomacropeptide et de paracaséine κ (Mahaut et al., 2000a).

La répartition des acides aminés au sein de la structure primaire des caséines aboutit à des zones polaires et apolaires, ce qui leur confère, d'une part une forte propension à s'associer, et d'autre part un caractère amphiphile (Gagnaire, 1994). Ce caractère amphiphile concerne particulièrement les caséines β et κ . Les caséines présentent une structure ouverte et sont hydratées malgré leur contenu élevé en acides aminés hydrophobes (Alaimo et al., 1999).

Les caséines ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis du calcium (Tableau 2.3) : les caséines α_{s1} , α_{s2} et β s'agrègent en présence de calcium jusqu'à une valeur limite de concentration au delà de laquelle elles précipitent. Seule la caséine κ ne précipite pas en présence de calcium. Le calcium se lie aux caséines par l'intermédiaire des acides aminés phosphorylés : ainsi deux charges négatives sur les molécules de caséine sont neutralisées par chaque ion calcium lié, ce qui entraîne une diminution des répulsions électrostatiques entre les caséines (chargées négativement à pH 6,6) et les conduit à s'agréger (Dalgleish, 1982).

La présence à la fois d'interactions électrostatiques et hydrophobes permet aux caséines de former des agrégats colloïdaux (Schmidt, 1982; Holt, 1992) qui retiennent le calcium et le phosphate inorganiques.

4.2.2- Micelle de caséine

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

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

κ (Schmidt, 1982 ; Lovisi et al., 2003). Selon Dalgleish et al. (1989), la répartition des caséines s'effectuerait de la façon suivante : la surface des micelles serait composée de

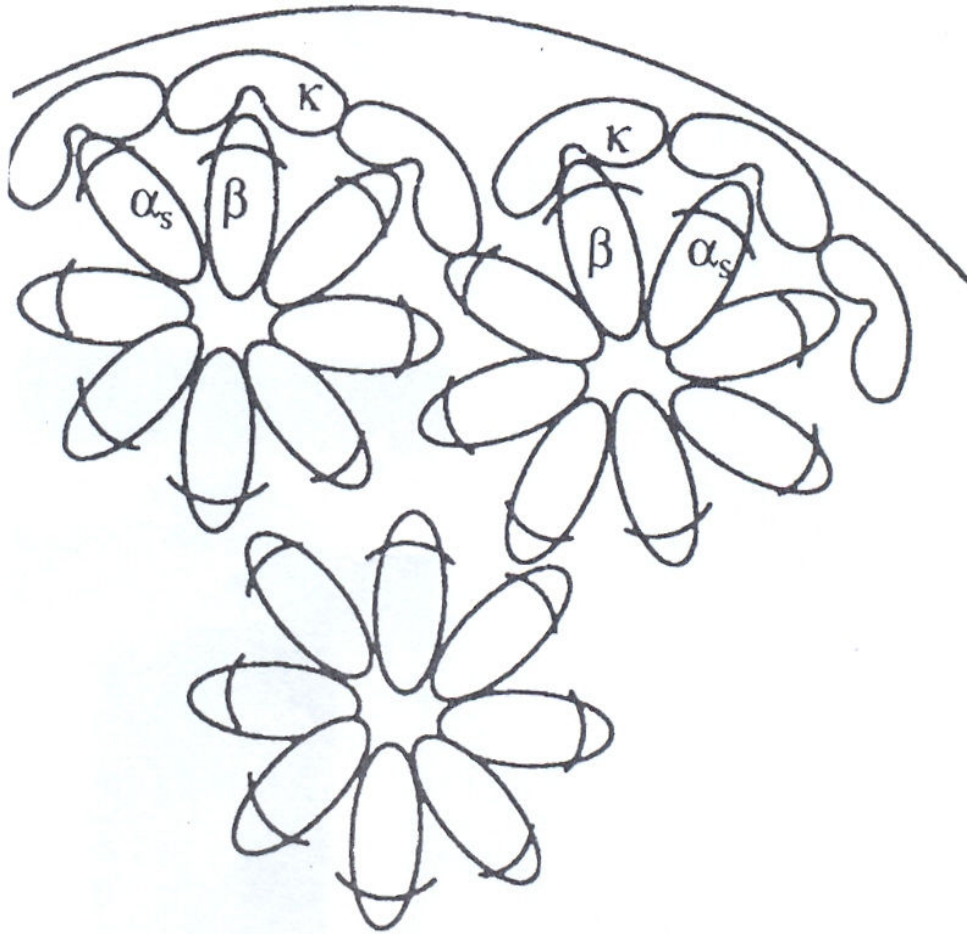


Figure 2.1: Modèle de WAUGH (1970).

39 à 47% de caséine κ , de 0 à 10 % de caséine β et de 47 % de caséine α et l'intérieur serait constitué majoritairement des caséines α et β avec des proportions d'environ 47% chacune et seulement de 1% de caséine κ .

Les minéraux contenus dans les micelles de caséine sont qualifiés de colloïdaux. Ils sont constitués de calcium, de phosphore, de magnésium. Le phosphore est présent sous forme de phosphate dont une partie est liée aux caséines par estérification des fonctions hydroxyles des résidus d'acides aminés séryle et thréonyle (Walstra et Jenness, 1984).

L'agrégation entre les submicelles est favorisée par la présence de sites phosphoséryles qui ont une affinité pour le calcium (Schmidt, 1980).

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

4.2.3- Les différents modèles structuraux des micelles.

De nombreux modèles ont été proposés au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur les caractéristiques physico-chimiques des micelles de caséine. Ces modèles reposent sur des méthodologies différentes et peuvent se classer en trois catégories : les modèles cœur enveloppe, les modèles à sous unités et les modèles à structure ouverte (ou structure interne uniforme).

4.2.3.1- Modèle cœur enveloppe

Cette modélisation (Waugh et al., 1970) est basée d'une part, sur la présence de complexes constitués de caséines α_s et β au cœur de la micelle, capables de fixer le

calcium et d'autre part, sur la capacité de la caséine κ à stabiliser les caséines sensibles

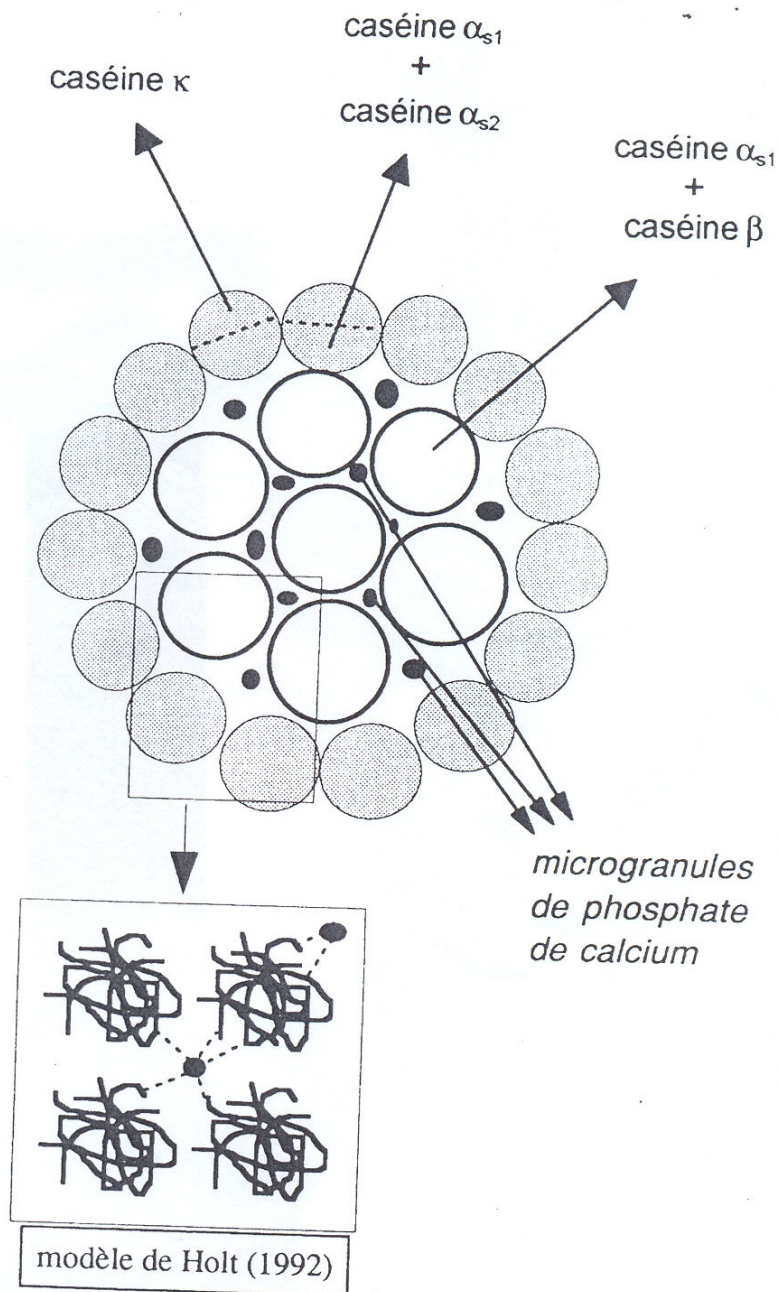


Figure 2.2: Modèle de structure de la micelle de caséines selon ONO et OBATA (1989) confronté à celui de HOLT (1992).

au calcium. En effet, en présence de calcium, la précipitation des complexes $\alpha_s - \beta$ est évitée par la formation de complexes $\alpha_{s1}-\kappa$ situés en monocouche en surface de la micelle (Figure 2.1).

4.2.3.2- Modèle à sous unités (submicelles)

La micelle serait composée de sous unités, appelées submicelles de 10 à 20 nm de diamètre qui seraient l'unité de base de la macrostructure. Ces submicelles sont structurées comme dans le modèle de WAUGH mais elles sont reliées entre elles par du phosphate de calcium colloïdal selon la séquence suivante: $\text{Prot1} > \text{serP}-\text{Ca} - \text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 - \text{Ca}-\text{serP} < \text{Prot2}$ (Schmidt, 1982). Les submicelles sont donc cimentées par du calcium amorphe ($\text{Ca}_9 (\text{PO}_4)_6$) (Figure 2.2).

Ono et Obata (1989) proposent un modèle de micelle constitué d'un cœur composé de submicelles formées de complexes $\alpha_s - \beta$, alors que l'enveloppe est composée de submicelles, formées de quantités équimolaires de α_s et κ . Les 2 types de sous-unités coexistent et elles sont reliées entre elles par des ponts phosphocalciques. A la surface de l'enveloppe, on trouve des caséines κ alors que les caséines α_s sont orientées vers l'intérieur pour permettre les liaisons avec les submicelles constituant le cœur.

4.2.3.3- Modèle à structure ouverte

Le modèle de structure ouverte est basé sur l'existence d'interactions spécifiques entre les caséines individuelles, conduisant à la formation d'un gel protéique poreux, dont le phosphate de calcium ferait partie intégrante et ne serait plus un simple agent de pontage (Holt, 1992). Cette modélisation (Figure 2.3) rétablit la notion d'une répartition plus homogène des caséines au sein de la micelle avec non seulement la présence de la caséine κ à la surface des micelles, mais aussi celle de caséines α et β .



Figure 2.3: *Modèle de structure ouverte (HORNE et al., 1989).*

Horne et al. (1989) ont réalisé une modélisation des micelles sans avoir recours à la présence de submicelles, par simulation informatique. Cette simulation permet d'obtenir :

- une structure poreuse.
- une large distribution des tailles.
- une structure interne hétérogène qui évite le recours aux submicelles.
- une localisation en surface des caséines κ avec un pourcentage variable selon la taille des micelles, mais également une proportion non négligeable présente à l'intérieur de l'édifice (environ 38%).

II.1.2. Caractéristiques des laits de chèvre et de brebis

Les laits de chèvres et de brebis ont une composition et des caractères physico-chimiques particuliers qui les différencient nettement du lait de vache (Lenoir et al., 1997)

Le lait de chèvre est caractérisé par des teneurs en caséines totales plutôt faibles, des proportions relatives de caséines différentes de celles du lait de vache et des teneurs en Ca^{++} assez élevées. Le lait de chèvre se distingue en transformation fromagère par un temps de floculation relativement court, une vitesse de raffermissement du gel élevée et une fermeté maximale du gel faible.

Le lait de brebis est particulièrement riche en caséines et en calcium micellaire et se singularise par un temps de prise comparable à celui du lait de chèvre, une vitesse de raffermissement nettement plus élevée et une fermeté de gel plus de deux fois supérieure à celle du lait de vache.

II.1.3. Caractéristiques du lait de chamelle

Le lait de chamelle présente une composition générale similaire à celle du lait de vache (Sawaya et al., 1984 ; Bayoumi, 1990 ; Attia et al., 2001). Cependant le lait camelin est caractérisé par une composition en caséines qui diffère quantitativement et qualitativement du lait bovin (Farah, 1993). Il a été récemment mis en évidence que le lait de chamelle présente une taille moyenne de micelles double de celle mesurée pour le lait de vache (Ramet, 2001). La teneur en caséines est moindre (Attia et al., 2001), notamment la caséine κ qui présente un taux trois fois plus faible que dans le lait de

vache (Kappeler et al., 1998). Les équilibres minéraux du sodium et du calcium, dont on connaît respectivement le rôle inhibiteur et l'effet activateur sur la coagulation interviennent également probablement de manière déterminante. La répartition des minéraux entre formes solubles et colloïdales est similaire à celle du lait de vache pour le calcium mais différente pour le magnésium, le phosphore et le citrate. En effet, la micelle du lait camelin présente une charge en citrate relativement plus importante ($\approx 98 \text{ mg.g}^{-1}$ caséines). Les proportions en Mg, P et citrate micellaires sont plus élevées (respectivement 2/3, 2/3, 1/3), (Attia et al., 2000).

En conséquence, l'aptitude à la coagulation est moins bonne comparativement aux autres types de laits habituellement utilisés. La fabrication de fromage est uniquement possible en mélangeant le lait de chamelle à du lait de chèvre et de brebis ou en employant la présure à une concentration très élevée (environ quatre fois la concentration en enzyme habituelle). L'apport d'un sel de calcium est aussi indispensable (Ramet, 2001).

Les coagulums formés se caractérisent par une grande friabilité et des rendements fromagers faibles dus à d'importantes pertes en matière sèche et surtout en matière grasse dans le lactosérum.

II.1.4. Caractéristiques du lait de soja

On appelle improprement « lait de soja » le produit obtenu par extraction à l'eau des graines, éventuellement après gonflement dans l'eau. On devrait parler de préparation liquide à base de soja (Liu et al., 2002). L'Europe découvre à peine le « lait de soja », mais en Extrême-Orient c'est une boisson très ancienne, déjà connue des chinois au troisième siècle avant notre ère et dénommée « tou-chiang ». C'est un extrait aqueux de couleur blanchâtre de graines de soja broyées. (Wang et Cavins, 1989).

Le lait de soja ne contient pas de lactose d'où son intérêt pour les populations dépourvues de lactase. Il ne possède pas de cholestérol et ses lipides sont composés principalement d'acides gras polyinsaturés d'où son intérêt diététique (Liu et al., 2002).

Par rapport au lait de vache, il ne contient pas de vitamines liposolubles et presque pas de sels minéraux (calcium, potassium). Le tableau 2.4 indique les compositions nutritionnelles moyennes du lait de vache et de soja.

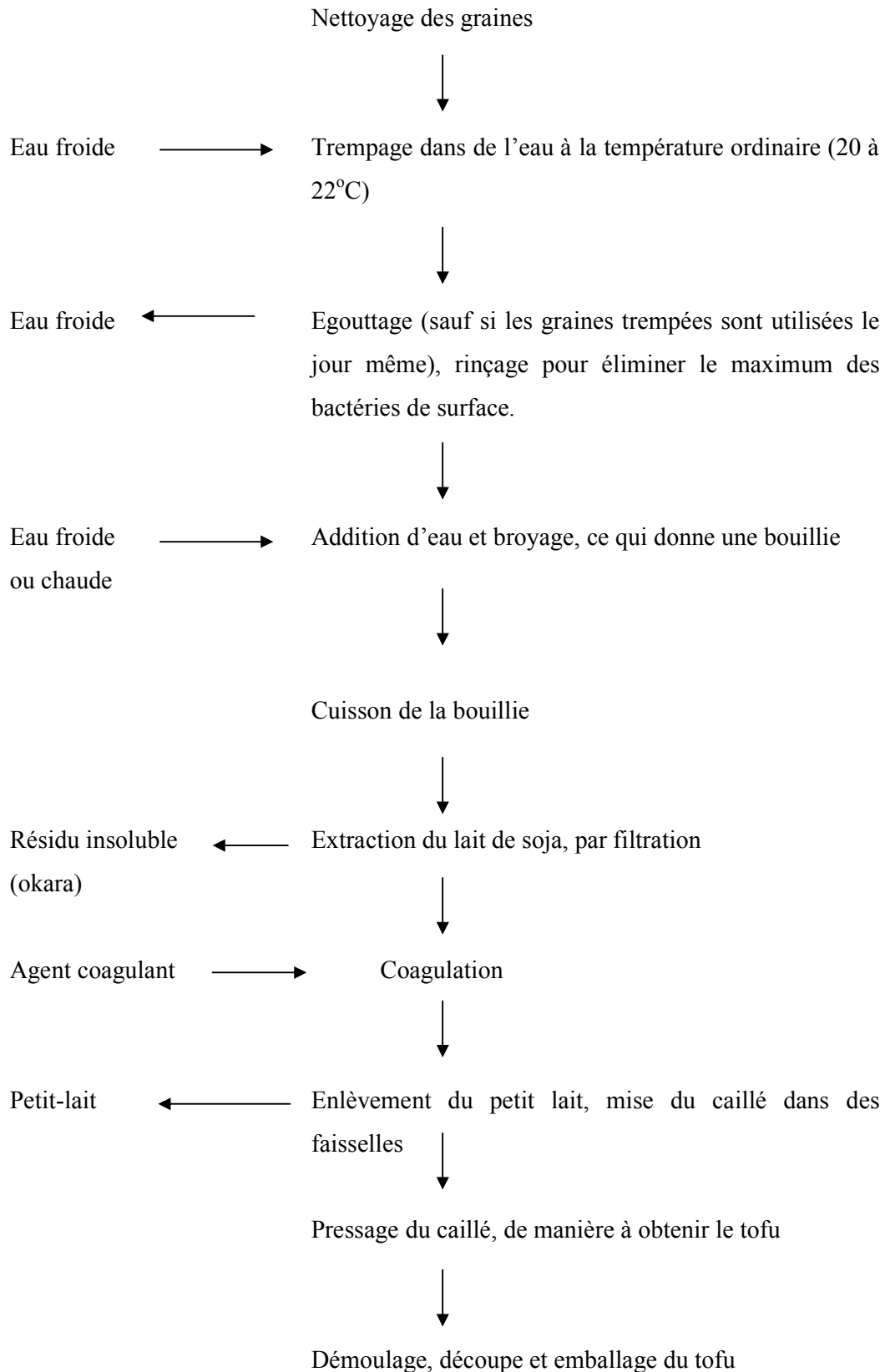


Figure 2.4: Principe de fabrication du lait de soja et du tofu (Dacosta, 1990).

Il est à noter que le lait de soja ne contient pas de caséine. Les techniques de fabrication de lait de soja et sa coagulation en tofu sont multiples mais s'articulent autour d'un principe général comme indiqué dans la figure 2.4. Les principaux agents coagulants sont les chlorures de magnésium et de calcium, les sulfates de calcium et de magnésium et récemment la gluconodeltalactone (GDL), (Guo et Ono, 2005). La quantité de coagulant nécessaire dépend du contenu du lait de soja en phytate, du pH, de la teneur protéique et de la teneur en calcium du lait de soja (Liu et Chang, 2004).

Tableau 2.4: Comparaison des compositions nutritionnelles moyennes du lait de vache et de soja (pour cent grammes), (Dacosta, 1990).

	Lait de vache entier	Lait de soja
Protides	3,2 g	2,8 à 3,4 g
Lipides	3,6 g (1,5 g lait ½ écrémé)	1,5 g
Glucides	5 g	2,1 à 3,6 g
Calcium	125 mg	12 à 21 mg
Phosphore	95 mg	36 à 49 mg
Potassium	140 à 175 mg	environ 50 mg
Sodium	40 à 60 mg	15 mg
Fer	0,02 à 0,05 mg	0,7 à 1,2 mg

II.2. Techniques de coagulation du lait

La coagulation du lait constitue une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe. Le fromage résulte de la concentration des éléments majeurs du lait (protéines, matière grasse) sous l'action de l'acidification et/ou d'une enzyme (le plus souvent la présure extraite de la caillette des jeunes bovins avant sevrage).

Il est probable que les fromages aient été la première fois faits accidentellement en transportant du lait dans des estomacs de mammifères. Il s'agissait en effet d'une pratique courante dans les temps anciens, en Europe de l'Est et en Asie de l'Ouest, pour transporter le lait. Certains facteurs ont été certainement

nécessaires à la transformation du lait en fromage comme la chaleur, l'acidité et les sucs de l'estomac. Ainsi, des extraits d'estomac de plusieurs types d'animaux (moutons, chèvres, vaches), mais également des extraits de plantes (comme le chardon) ont été utilisés pour la préparation de fromages.

II.2.1. La coagulation acide

La coagulation acide consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i = 4,6$) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de CO_2 ou addition de gluconodeltalactone), (Dalglish, 1982 ; Mahaut et al., 2000a).

L'apport de protons H^+ par fermentation lactique, entraîne une diminution du nombre des charges négatives des micelles et donc une diminution de la couche d'hydratation et des répulsions électrostatiques. Simultanément, on a une solubilisation progressive du calcium et du phosphate inorganique de la micelle vers la phase aqueuse avec désintégration en sous-unités micellaires (Mahaut et al., 2000a). Le calcium solubilisé se combine à l'acide lactique pour former le lactate de calcium (Kurmman et al., 1978).

On a la formation d'un gel à pH 4,6. C'est un gel qui présente une perméabilité satisfaisante mais une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. Les liaisons sont de faible énergie de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques (Mahaut et al., 2000a).

II.2.2. La coagulation par la présure

La présure (mélange de chymosine et de pepsine) est un extrait liquide ou pâteux provenant de la macération des caillottes des jeunes ruminants dans une saumure à 10% de NaCl (Scott, 1981). La chymosine (EC 3.4.23.4) est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure. C'est une protéase acide, sécrétée sous forme de proenzyme inactive appelée prochymosine. L'activation de la proenzyme en chymosine se fait spontanément dans la caillotte aux pH inférieurs à 5,0 par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule (Mahaut et al., 2000a).

Il existe plusieurs formes de chymosine dans la présure. Les deux formes prédominantes sont la chymosine A et la chymosine B, isozymes qui diffèrent par un

unique acide aminé dans la position 302 (Foltmann et al., 1979). La chymosine C apparaît comme étant un produit de dégradation de la chymosine A (Danley et Georghegan, 1988).

En tant qu'enzyme protéolytique, la chymosine a une double action : une action coagulante par hydrolyse de la caséine κ d'une part, et une action protéolytique générale capable de se manifester sur toutes les protéines au cours de l'affinage du fromage d'autre part (Mahaut et al., 2000a).

La coagulation du lait par la présure peut se décomposer en trois étapes : hydrolyse enzymatique de la caséine κ , agrégation des micelles de caséines déstabilisées, développement d'un réseau par réticulation et formation de gel (Eck et Gillis, 1997). La phase primaire ou enzymatique déclenche la coagulation par hydrolyse de la caséine κ au niveau de la liaison phénylalanine (105) et méthionine (106). Il y a libération du caséinomacropeptide (CMP 106-169) et diminution des répulsions électrostatiques qui, à l'état initial, contribuent à la stabilité du système colloïdal (Eck et Gillis, 1997).

La phase secondaire correspond à la coagulation proprement dite ; elle commence lorsque, à pH 6,6, 80 à 90% de la caséine κ est hydrolysée. La chaîne peptidique de la caséine κ est ainsi coupée en 2 segments de caractéristiques différentes. Le segment 1-105 ou paracaséine κ est hydrophobe, basique et reste intégré à la micelle, le segment 106-169 ou caséinomacropeptide est très hydrophile, acide et passe dans le lactosérum. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent alors entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel (Mahaut et al., 2000a). Durant la phase tertiaire, les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut-être de ponts disulfures entre les paracaséines (Mahaut et al., 2000a).

La chymosine est toujours considérée comme étant la meilleure enzyme pour coaguler le lait pour la production fromagère. Les présures de remplacement sont moins coûteuses mais très protéolytiques et conduisent à des fromages présentant de l'amertume avec diminution du rendement (Mahaut et al., 2000a). Parmi ces enzymes on cite les pepsines bovine et porcine, les enzymes d'origine microbienne : enzymes de certaines moisissures (*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) ou de bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) (Mahaut et al., 2000a).

II.2.3. La chymosine recombinante

Depuis les années 80, les techniques d'ingénierie génétique ont été utilisées pour produire de la chymosine bovine recombinante. De nos jours, trois compagnies produisent de la chymosine recombinante à partir de trois micro-organismes différents (Tableau 2.5).

Tableau 2.5: Micro-organismes clonés pour le gène induisant l'expression de la prochymosine (Teuber, 1990).

Micro-organismes recombinés	Société productrice	Nom de la préparation
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Gist brocades n. v. (NL)	Maxiren®
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Pfizer Inc. (USA)	Chymax®
<i>Aspergillus awamori</i>	Ch. Hansen Lab. (DK)	Chymogen®

L'isolement de l'ARNm de la prochymosine a été rapporté pour la première fois par le groupe de BEPPU en 1980 (Uchiyama et al., 1980). De ce laboratoire proviennent les premières publications sur la production de la chymosine recombinante chez *E. coli* (Nishimori et al., 1982 ; 1984), technique par la suite adoptée par d'autres groupes utilisant *E. coli* (Emtage et al., 1983; Marston et al., 1984) mais aussi divers micro-organismes dont *Saccharomyces cerevisiae* (Mellor et al., 1983 ; Goff et al., 1984), *Aspergillus* spp (Cullen et al., 1987 ; Ward et al., 1990 ; Dunn-Coleman et al., 1991 ; Tsuchiya et al., 1993), *Yarrowia lipolytica* (Franke et al., 1988), *Proteus mirabilis* (Klessen et al., 1989), *Kluyveromyces lactis* (Van den Berg et al., 1990), *Trichoderma reesei* (Harkki et al., 1989 ; Uusitalo et al., 1991), *Bacillus subtilis* (Parente et al., 1991) et chez des cellules de mammifères (Kolmer et al., 1991).

La chymosine produite par les micro-organismes est identique en masse molaire, séquence d'acides aminés, propriétés immunologiques et profil chromatographique à la chymosine naturelle (Teuber, 1990). De nombreuses études ont montré que dans la production fromagère, le rendement et la qualité du produit fini est le même quelle que soit la chymosine utilisée (Bines et al., 1989 ; Broome et

Hickey, 1990 ; Barbano et Rasmussen, 1992). La chymosine recombinante est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine authentique.

II.2.4. Les extraits de plantes

La coagulation du lait peut venir de pratiques que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux (Froc, 2001). Il existe, dans divers pays, des plantes susceptibles de fournir des enzymes ayant la propriété de coaguler le lait. On connaît de nombreux travaux anciens, datant du début du siècle, signalant l'emploi d'enzymes végétales.

Certains extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales. Chodat et Rougé (1906) avaient signalé l'emploi d'enzymes provenant du figuier et en 1908, Gerber en avait extrait la ficine du latex de *Ficus carica*. Le jus d'ananas (*Ananas comosus*) renferme une enzyme capable de digérer les viandes, la broméline, dont un usage domestique marginal permet de coaguler le lait (Cattaneo et al., 1994 ; Froc, 2001).

La papaye fruit, de *Carica papaya*, permet de récolter un latex très riche en une puissante enzyme, la papaïne, qui coagule le lait mais dont l'usage en laiterie est faible (Cabezas et al., 1981 ; Froc, 2001).

Plusieurs études ont été faites dans des pays où l'animal est vénéré, en particulier l'Inde. Ainsi Kothavella et Khuchandavi (1940), Krishnamurti et Subrahmayan (1948), Dastur et al. (1948) ont étudié de nombreux coagulants extraits de plantes indigènes, comme *Streblus asper* (arbuste), *Benincasaertifera* et *Withania coagulans*. *Withania coagulans* contient une protéase dite « présure indienne ». Présente dans le jus des fruits frais, elle coagule le lait dans des proportions analogues à celle de la présure de veau. Son efficacité est encore renforcée par mélange avec la papaïne ; le caractère amer du fromage obtenu avec *Withania* seule est atténué en présence de papaïne (Froc, 2001).

D'autres travaux ont été réalisés en Israël sur la courge (*Cucurbita pepo*) par Berkowitz – Hundert et al. (1964). Ailleurs, au Tchad, le korourou dont la feuille fraîche est incorporée sous forme de macérat au lait, assure l'obtention d'un caillé mou égoutté sur un paillason. Après ressuyage, ce fromage appelé touareg est déshydraté au soleil et conservé sec, non salé (Froc, 2001).

Aux Philippines, le jus fermenté de *Nypa fruticans* ou « palmier d'eau » est utilisé pour coaguler le lait du buffle d'eau. Il s'agit là de la voie acide et non plus enzymatique qui produit le kesong puti consommé en l'état ou cuit (Froc, 2001).

D'autres situations traduisent une imagination débridée qui enrichit la fromagerie et les pratiques qui lui sont liées. La grassette (*Pinguicula vulgaris*) est utilisée en Laponie pour produire un lait de vache filant, le tåttmjôlk. Une autre pratique disparue consistait à laisser macérer des fleurs de serpolet (*Thymus serpyllum*), des fragments de chardon (*Cynara cardunculus*) et de gaillet vrai (*Galium verum*), afin d'obtenir une solution coagulante conservée en bouteille (Froc, 2001). Des études récentes ont porté sur une nouvelle protéase, la lettucine. Cette enzyme purifiée des feuilles de laitue (*Lactuca sativa* L. cv Romana) possède un pouvoir coagulant du lait bien qu'elle agisse sur des liaisons différentes de la liaison Phe 105 – Met 106 de la caséine κ (Lo Piero et al., 2002).

D'une façon générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée et produisent des fromages amers (Lo Piero et al., 2002).

Une exception à cette règle générale est représentée par l'extrait aqueux de fleurs de charbon (Verissimo et al., 1995). Cet extrait est utilisé pour la production d'un fromage de brebis de haute qualité dans les pays méditerranéens et spécialement au Portugal (Macedo et al., 1993). Cet extrait est connu depuis les temps romains et donne le fromage traditionnel connu sous le nom de Serra da Estrela (Vieira de Sa et Barbosa, 1972 ; Campos et al., 1990).

Des études récentes ont caractérisé, dans l'extrait de chardon, deux protéases aspartiques, les cardosines A et B (Verissimo et al., 1996). Ces enzymes sont semblables respectivement de par leur spécificité et leur activité à la chymosine et à la pepsine (Pires et al., 1994 ; Verissimo et al., 1995) et coagulent le lait par le clivage de la liaison Phe 105 – Met 106 de la caséine κ (Faro, 1991).

II.3. Le caroubier au Liban

Le nom scientifique du caroubier, *Ceratonia siliqua* L. dérive du grec Keras (= corne) et du latin siliqua désignant une siliqua ou gousse et faisant allusion à la dureté et à la forme du fruit (Battle et Tous, 1997). Le nom commun serait d'origine hébraïque : karuv. Le nom arabe « kharroub » en dérive. Au Liban et selon les régions, il est appelé « kharroub » ou « kharnub » (Annexe 2).

Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des légumineuses (Fabacées) de l'ordre des Rosales, de la sous-famille des césalpiniciacées. Deux espèces du genre *Ceratonia* sont connues, *Ceratonia oreothauma* et *Ceratonia siliqua* (Tucker, 1992).

Le caroubier est distribué dans toute la région du bassin méditerranéen. On le rencontre actuellement en allant de l'Espagne et du Portugal jusqu'en Turquie, en Syrie, en passant par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Lybie, l'Egypte, la Grèce, le Liban, l'Italie et la France. La production mondiale de gousses de caroube est estimée à 310 000 tonnes par an concentrée principalement en Espagne, Italie, Portugal, Maroc, Grèce, Chypre, Turquie et Algérie (Battle, 1997). Plus récemment, le caroubier a été introduit dans des zones chaudes et semi-arides d'Australie, Californie, Arizona, Chili, Mexique et Afrique du Sud (Battle et Tous, 1997).

La culture du caroubier au Liban remonte à une époque très ancienne, ce qui peut être vérifié par la présence de grands arbres très âgés au voisinage de certains monuments romains, surtout dans la région nommée « Eklim El Kharoub » ou « département du caroube » (Haddad, 2004).

Le recensement réalisé par le ministère de l'Agriculture montre que la superficie cultivée n'a pas varié alors que la production a fortement diminué (Tableau 2.6).

Selon une étude faite par le Ministère de l'Agriculture (1996), le nombre de caroubiers est estimé à 10000 alors qu'il s'élevait à 15000 avant la guerre dans les années soixante. Cette chute du nombre de caroubiers est causée par le surpâturage, la guerre, les constructions et le manque de nouvelles plantations (Haddad, 2004). Selon une étude effectuée par Eid (2001), la majeure partie de la population de *Ceratonia siliqua* L. se trouve dans la partie ouest du pays à des altitudes allant de 20 à 800 mètres, sachant que les arbres présents à des altitudes élevées présentent souvent un

aspect rabougri et chétif sauf s'ils bénéficient d'une protection assurée par les parois d'une vallée, d'un rocher, ou par d'autres espèces végétales.

Tableau 2.6 : Production de caroubier et superficie cultivées (Ministère de l'Agriculture, 2001).

Année	Superficie (en milliers Ha)	Production (en milliers T)
1998	0,7	7,0
1999	0,7	7,4
2000	0,7	4,6
2001	0,7	5,0

D'un point de vue écologique, *Ceratonia siliqua* L. appartient à l'étage méditerranéen inférieur ou thermoméditerranéen qui s'élève du littoral jusqu'à une altitude de 500 m environ sur le versant occidental du Mont Liban, présent sur roche mère calcaire sous forme de garrigue où domine *Pistacia lentiscus* L. et où *Myrtus communis* L. est relativement abondant. Selon Haddad (2004), les arbres existants sont dans un mauvais état ; les mauvaises herbes et les adventices les entourent, les haies les couvrent. On ne trouve pas de jardins propres aux caroubiers, mais on les trouve dispersés parmi d'autres arbres tels que l'olivier, l'amandier et le figuier. Notons que le caroubier est absent de la plaine de la Békaa ainsi que de toutes les régions intérieures. Ceci est dû à un ensemble de conditions climatiques et géologiques avec un rôle primordial joué par la température (Eid, 2001).

En effet, le caroubier peut être endommagé par des températures basses atteignant -4°C et ne peut survivre à -7°C. Par contre, il peut subir des températures estivales de 40°C accompagnées de vents secs et chauds sans être visiblement affecté.

Notons que pour une maturation complète, les caroubes ont besoin d'une exposition à un total de 5000 à 6000 heures à des températures supérieures à 9°C et donc des températures inférieures peuvent sérieusement affecter la production (Battle et Tous, 1997).

Une étude effectuée au Liban (Eid, 2001) a permis l'identification, d'après les différentes caractéristiques physico-chimiques des gousses de caroube, de quatre variétés principales : Ahmar, Kheshabi, Makdissi et Sandali. Ces variétés ne sont pas

réparties uniformément dans tout le pays. Dans la région nord du pays comprenant les cazas de Akkar, Tripoli, Zgorta, Koura, Bcharré, Jbeil et Kesrouan, la variété dominante est Ahmar. Dans la région comprenant les casas Metn, Baabda, Aley et Chouf, les variétés observées sont Kheshabi, Sandali, Makdissi et rarement Ahmar. Dans la région du sud comprenant les cazas Jezzine, Saida, Nabatieh, Marjeyoun, Tyr et Bint Jbeil les variétés présentes sont Makdissi, Sandali et Kheshabi (Annexe 3).

Les gousses de caroube sont principalement utilisées au Liban pour extraire la mélasse ou « débés ». Un traitement mécanique (broyage) puis plusieurs séries de décantation permettent d'obtenir un jus sucré. Ce jus subit une ébullition pour obtenir la mélasse de caroube. Le tourteau de caroube broyé ou haché, deux sous-produits de l'industrie du « débés », furent aussi testés avec succès comme substitut de la tourbe pour les plantes en pépinière (Rishani et Rice, 1988). D'autres débouchés économiques commencent à apparaître puisque certains marchands achètent les graines résiduelles et les vendent sur le marché international à des firmes spécialisées dans l'extraction de la gomme de graine de caroube (GGC) (Eid, 2001).

Une autre utilisation des caroubes est la fabrication d'un produit laitier artisanal connu sous le nom de « mekika ». Ce produit est préparé par coagulation du lait avec l'extrait de gousses vertes de caroube. Il est spécifique de la région Eklim El Kharoub dans le Chouf où on le trouve en parallèle avec la culture du caroubier.

Une étude socio-économique et un questionnaire auprès des habitants de cette région nous ont permis de comprendre la spécificité de ce produit dont la méthode de fabrication, très ancienne, est perpétuée depuis des générations de père en fils. La première étape consiste à extraire le jus de caroube. Pour cela, les gousses sont récoltées dans un sac en nylon et sont ensuite écrasées entre deux pierres ou avec un marteau. Ensuite, les gousses écrasées sont mises à macérer dans de l'eau pendant quelques heures. C'est le macérat ou extrait qui est utilisé pour la mekika. Pour un litre de lait, cent millilitres d'extrait sont nécessaires. On ajoute peu à peu l'extrait au lait tout en agitant le mélange jusqu'à épaississement et formation de la mekika dont l'aspect ressemble à celui de la crème fouettée. A noter que le lait n'est pas chauffé mais est plutôt utilisé à température ambiante. Le lait frais pasteurisé convient mieux que le lait en poudre pour la mekika mais le lait en poudre est souvent utilisé compte tenu de l'utilisation fréquente de lait en poudre dans les ménages libanais. La mekika se consomme comme dessert, parfois comme dîner après ajout de sucre ou de miel.

Elle se conserve deux à trois jours au froid. La mekika se prépare toute l'année mais surtout durant la période de mai à juin qui est la période de récolte des gousses vertes

Tableau 2.7: Teneur en polyphénols dans quelques aliments et boissons (mg/100 g de matière fraîche ou mg/100 mL), (Scalbert et Williamson, 2000). Les valeurs correspondant aux différentes classes de polyphénols ont été estimées par des méthodes chromatographiques.

Les teneurs en polyphénols totaux ont été estimées par la méthode colorimétrique de Folin.

Aliment ou boisson	Acides phénoliques	Flavonoïdes				Phénols totaux	
		Flavonols	Flavanols		Anthocyanes		
			Catéchines monomères	Proantho- cyanidines			
Pomme de terre	14						28
Tomate	8	0,5					37
Laitue	8	1					23
Oignon		35					90
Pomme	5	3,5	10	100			220
Cerise	18	0,5	1,5	17		100	
Farine complète de blé	50						
Chocolat noir			80	430			840
Jus d'orange					22		75
Vin rouge	10	2	27	36		3	180
Café	75						90
Thé noir		4	65				100

de caroube. En effet, l'extrait de caroube se conserve un an dans un récipient bien fermé, à l'abri de la lumière et à la température du réfrigérateur. Les habitants de la région attribuent à l'extrait un pouvoir médicinal dans le traitement des diarrhées et du diabète, mais curieusement, le produit n'a jamais été commercialisé et cette fabrication artisanale est en train de se perdre avec les nouvelles générations.

II.4. Les tannins ou polyphénols

II.4.1. Caractéristiques générales

Les tannins ont été utilisés depuis des temps ancestraux pour convertir la peau des animaux en cuir grâce à l'interaction des flavonoïdes avec les fibres de collagène, protéine riche en résidus proline et hydroxyproline (Codorniu-Hernandez et al., 2003).

Plus de 5000 molécules polyphénoliques, dont 2000 flavonoïdes, ont été identifiées jusqu'à ce jour et leur nombre est toujours en augmentation (Tsao et Yang, 2003). Les polyphénols sont présents dans toutes les plantes mais leur nature et teneur varient largement d'une espèce à l'autre, et donc d'un aliment à l'autre (Grolier et al., 2001). Quelques teneurs sont données dans le tableau 2.7. Les principales sources alimentaires de polyphénols sont les fruits et les légumes, les huiles et les plantes aromatiques ainsi que les boissons comme le thé, le café, la bière et le vin (Socynska-Kordala et al., 2001). Chimiquement, les polyphénols sont très hétérogènes et peuvent être constitués de simples monomères ou de très grands polymères avec une masse molaire de 20000 D (Loomis et Bataile, 1966).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires qui se caractérisent, selon Bate-Smith et Swain (1962) et Haslam (1998) par:

leur solubilité dans l'eau ; bien que les polyphénols purs des plantes soient difficilement solubles dans l'eau à l'état naturel, les interactions polyphénol- polyphénol assurent une solubilité minimale en milieu aqueux. Les tannin peuvent être dissous par des solvants organiques comme les alcools ou l'acetone (loomis et bataile, 1966).

leur masse moléculaire ; les polyphénols naturels possèdent une masse moléculaire entre 500 g.mol^{-1} et 3000-4000 g.mol^{-1} . En général, la masse moléculaire des polymères de proanthocyanidines solubles se situe entre 1000 et 6000 g.mol^{-1} . Cependant, dans certains tissus végétaux, la masse moléculaire peut atteindre 20 000 g.mol^{-1} (≈ 40 unités flavan-3-ol).

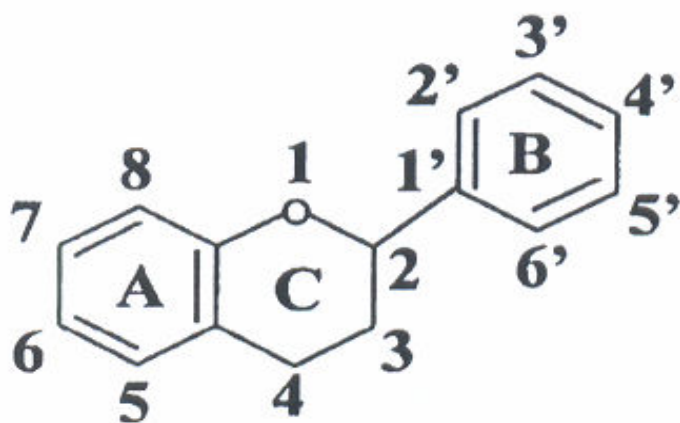


Figure 2.5: Structure nucléaire des flavonoïdes (Heim et al., 2002).

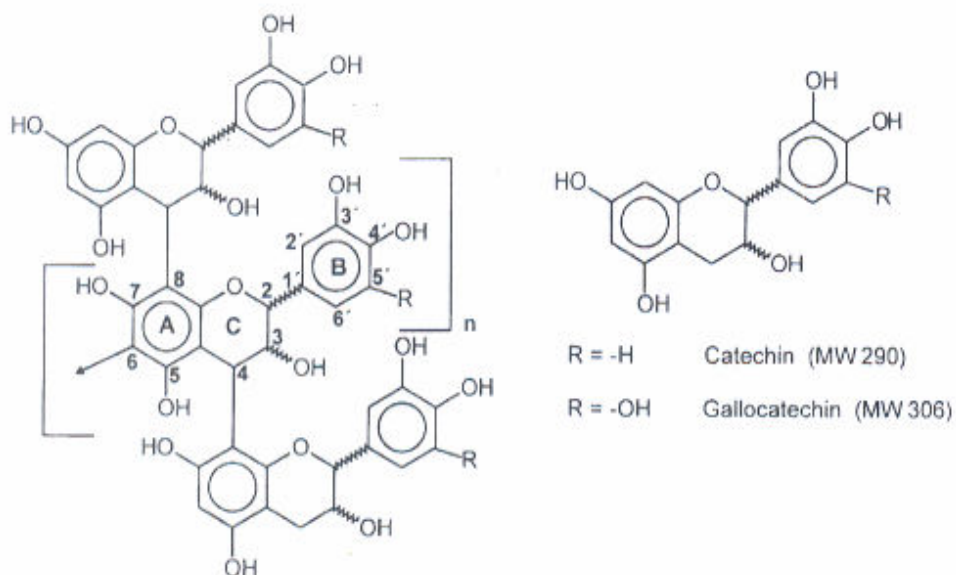


Figure 2.6: Structure oligomérique des tannins condensés (proanthocyanidines et leurs monomères correspondants (catéchine et gallo catéchine), (Zywicki et al., 2002).

- leur structure ; pour une masse moléculaire relative de 1000 g.mol^{-1} , les polyphénols possèdent entre 12 et 16 groupes phénoliques et entre 5 et 7 noyaux aromatiques.
- leur complexation intermoléculaire. Les polyphénols possèdent la capacité de précipiter quelques alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines en solution.

II.4.2. Les différents groupes de polyphénols

Les polyphénols sont classés selon leur structure en deux groupes majeurs : les tannins condensés et les tannins hydrolysables (Griffith, 1991) et un groupe mineur, les phlorotannins.

1-Les tannins condensés

Cette classe, notée aussi proanthocyanidines, correspond à des chaînes oligomériques et polymériques d'unités polyhydroxyflavanes (Zywicki et al., 2002). Les monomères typiques de cette classe sont des stéréoisomères, (+)/(-) - catéchine et (+)/(-) - épicatechine qui diffèrent dans leur stéréochimie en positions 2 et 3. Un autre monomère important est la gallocatéchine qui présente un groupe hydroxyle additionnel, et on a aussi les stéréoisomères (+)/(-) - gallocatéchine et (+)/(-) - épigallocatéchine (Zywicki et al., 2002), (Figures 2.5 et 2.6).

Les oligomères sont solubles et sont formés de 2 à 5 ou 6 unités de catéchine et les polymères sont insolubles dans l'eau (Haslam, 1998). Les monomères sont liés entre eux par des liaisons interflavonoïdes C_4-C_8 (Haslam, 1998) mais des liaisons C_4-C_6 peuvent aussi exister (Zywicki et al., 2002).

Les flavanols sont une classe appartenant aux flavonoïdes qui sont des dérivés benzo- γ -pyrone formés de noyaux phénoliques et pyrane (Heim et al., 2002). Les flavonoïdes sont classifiés selon les différentes substitutions sur leur structure générale (Figure 2.7) et diffèrent par les arrangements des groupements hydroxyle, méthoxy et glycosidiques (Heim et al., 2002).

La biosynthèse des flavan-3-ols (Figure 2.8) se fait à partir de précurseurs, les « leucoanthocyanidines » ou flavan-3,4-diols par l'action d'une enzyme, la flavan-3,4-diol réductase (Haslam, 1998).

2- Les tannins hydrolysables

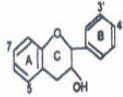
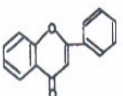
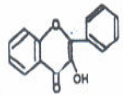
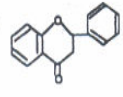
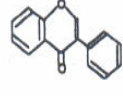
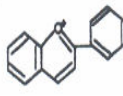
Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern	Dietary Sources	TEAC (mM)
Flavanol		(+)-catechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea (camellia sinensis) ⁶	2.4
		(-)-epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea ⁶	2.5
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Tea ⁶	4.75
Flavone		chrysin	5,7-OH	Fruit skins	1.43
		apigenin	5,7,4'-OH	Parsley, celery	1.45
		rutin	5,7,3',4'-OH, 3-rutinoside	Red wine ³ , buckwheat ⁷	2.4
		luteolin	5,7,3',4'-OH ¹¹	citrus, tomato skin ⁸	2.1
		luteolin glucosides	5,7,3',4'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose	Red pepper ¹¹	1.74 0.79
Flavonol		kaempferol	3,5,7,4'-OH	Leek, broccoli, endives	1.34
		quercetin	3,5,7,3',4'-OH	grapefruit, black tea Onion, lettuce, broccoli tomato, tea, red wine berries, olive oil, appleskin	4.7
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe	Cranberry grapes, red wine	3.1
Flavanone (dihydroflavon)		naringin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose	Citrus, grapefruit	0.24
		naringenin	5,7,4'-OH	Citrus fruits	1.53
		taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Citrus fruits	1.9
		eriodictyol	5,7,3',4'-OH	Lemons ⁶⁴	1.8
		hesperidin	3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoside	Oranges ⁹	1.08
Isoflavone		genistin	5,4'-OH, 7-glucose	Soybean ¹⁰	1.24
		genistein	5,7,4'-OH	Soybean ¹⁰	2.9
		daidzin	4'-OH, 7-glucose	Soybean ¹⁰	1.15
		daidzein	7,4'-OH	Soybean ¹⁰	1.25
Anthocyanidin		apigenidin	5,7,4'-OH	Colored fruits	2.35
		cyanidin	3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Cherry, raspberry, strawberry	4.42

Figure 2.7: Classification, structure et sources alimentaires des différents flavonoïdes (Heim et al., 2002).

Les tannins hydrolysables sont des polyesters phénoliques de dérivés de sucre (Zywicki et al., 2002). L'unité glycosidique la plus commune est le glucose, mais d'autres flavonoïdes comprennent le glucorhamnose, le galactose, l'arabinose et le rhamnose (Cook et Samman, 1996). La plupart des polyphénols hydrolysables sont considérés comme des dérivés d'une molécule intermédiaire (Figure 2.9), le β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D- glucose (Haslam, 1998). En fait, le glucose est estérifié par des acides hydroxyphénoliques, principalement l'acide gallique et l'acide ellagique, pour produire les gallotannins et les ellagitannins (Zywicki et al., 2002), (Figure 2.10). La variation structurelle entre les différentes molécules est causée par la nature du couplage oxydatif entre les unités d'acide gallique ou par l'oxydation des noyaux aromatiques (Mueller-Harvey, 2001).

Les tannins hydrolysables sont hydrolysés par les acides doux, les bases, ou certaines enzymes (la tannase) pour libérer du glucose ou un autre alcool polyhydrique, de l'acide gallique ou l'acide phénolique correspondant (Salunkhe et al., 1989).

3- Les phlorotannins

Récemment, une troisième classe mineure de polyphénols a été reconnue : les phlorotannins. Ils sont isolés de plusieurs genres d'algues rouge brunâtres. La structure fondamentale de ce groupe est formée de sous-unités de phloroglucinol liées par des liaisons C-C et C-O (Haslam, 1998). Le fucofureckol (Figure 2.11) est un phlorotannin typique (ayant le plus faible poids moléculaire de ce groupe) obtenu à partir d'*Eisenia arborea* (Glombitza et Gerstberger, 1985).

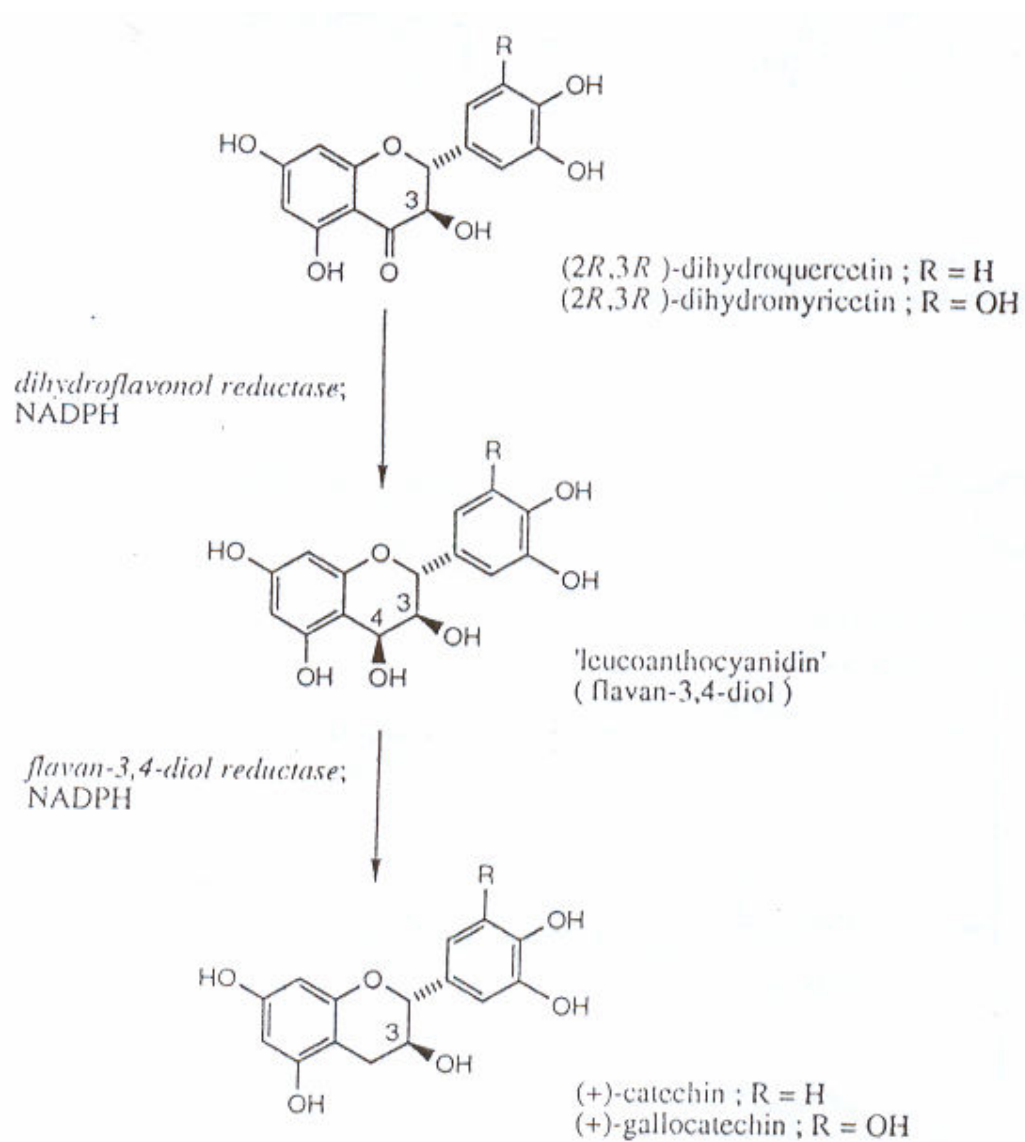


Figure 2.8: Biosynthèse des flavan-3-ols à partir des dihydroflavonols (Haslam, 1998).

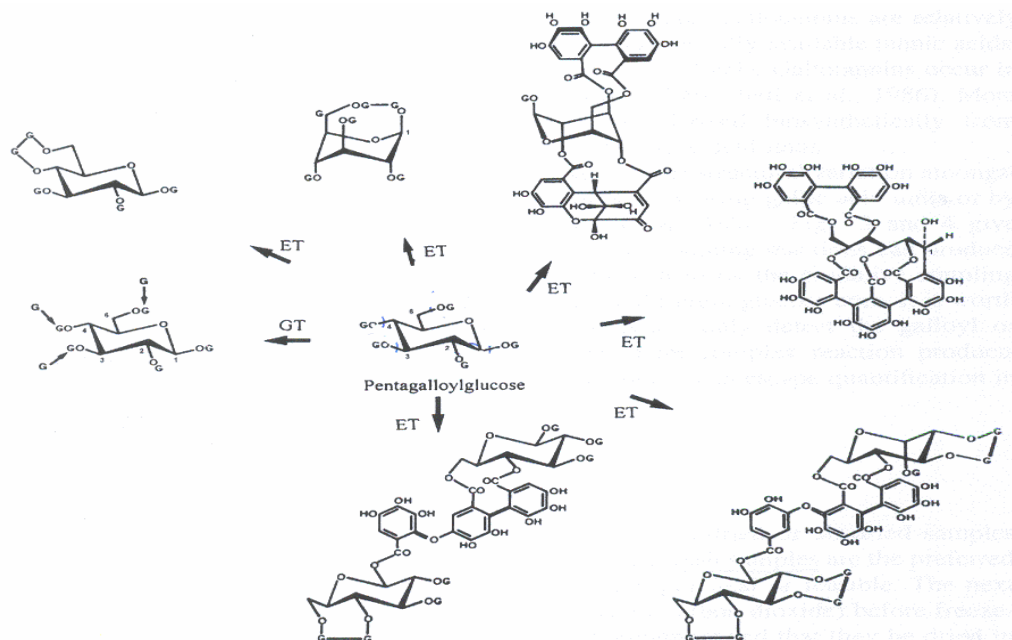


Figure 2.9: Métabolisme de l'acide gallique (G) dans les tannins hydrolysables: le pentagalloylglucose est le précurseur des gallotannins (GT) et des ellagitannins (ET), (Mueller-Harvey, 2001).

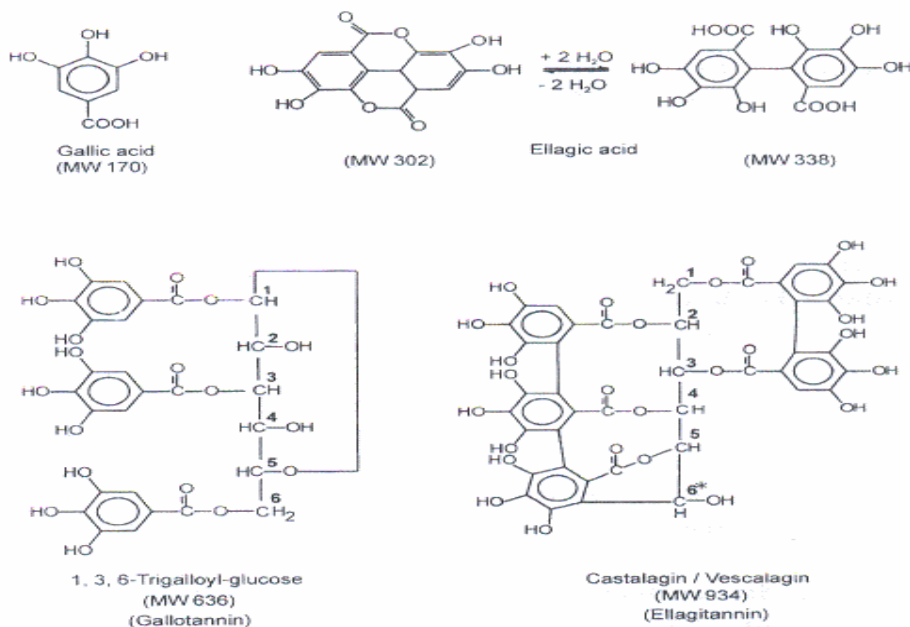


Figure 2.10: Structures des monomères de tannins hydrolysables: acide gallique et acide ellagique d'un gallotannin (1,3,6,-trigalloyl-glucose) et d'un ellagitannin (vescalagin/castalagin), (Zywicki et al., 2002).

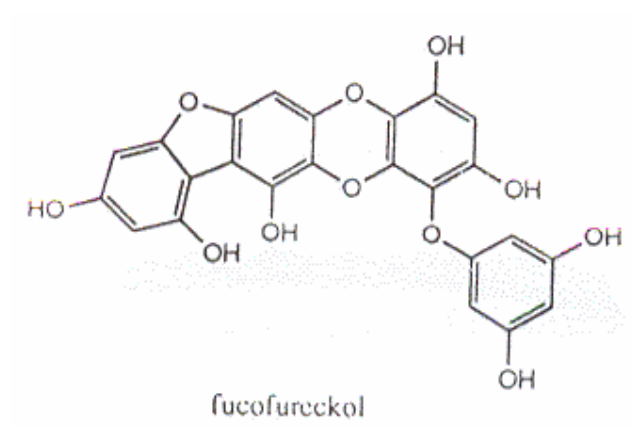


Figure 2.11: Structure du fucofureckol (Haslam, 1998).

II.4.3. Propriétés biologiques et effet santé des polyphénols

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs.

En effet, les polyphénols font partie de ce que l'on appelle les phytomicronutriments. Ce sont les antioxydants les plus abondants dans les aliments puisque l'homme en consomme environ 1 g/jour (Scalbert et Williamson, 2000), soit près de dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de vitamine E ou de caroténoïdes (Grolier et al., 2001).

Les polyphénols neutralisent les radicaux libres et contribuent ainsi à prévenir diverses pathologies dégénératives telles que cancer, maladies cardiovasculaires, cataracte, maladies du système nerveux central ou déficiences immunitaires... (Jovanovic et al., 1998 ; Torres et Bobet, 2001 ; Vaher et Koel, 2003). Les proanthocyanidines oligomériques (comprenant deux à sept résidus) sont considérées comme plus efficaces que les monomères. Les polymères sont actifs aussi, mais peuvent présenter des effets indésirables liés à leur capacité à précipiter les protéines (Torres et Bobet, 2001). L'effet protecteur des polyphénols contre l'oxydation des LDL (Low Density Lipoproteins) est bien établi *in vitro* et pourrait s'expliquer par un effet d'épargne d'autres antioxydants lipophiles tels que la vitamine E intégrée dans la phase lipidique des LDL (Grolier et al., 2001; Vaher et Koel, 2003).

Cependant, les polyphénols se caractérisent par une faible biodisponibilité dans l'organisme (Arts et al., 2001). Premièrement, les taux d'absorption intestinale des polyphénols ingérés peuvent varier largement d'un polyphénol à l'autre (Heim et al., 2002). L'absorption dépend aussi d'autres facteurs comme le dosage, le véhicule d'administration, le régime alimentaire, les différences de sexe et la population microbienne du côlon (Heim et al., 2002). Les proanthocyanidines dont le degré de polymérisation moyen dans les aliments varie communément entre 4 et 10 (masse moléculaire comprise entre 1200 et 3000) ne sont pas absorbées à travers la barrière intestinale à moins d'être dégradées en molécules de plus petite taille (Grolier et al., 2001). Le métabolisme des polyphénols concerne des modifications de structure telles l'hydroxylation, la méthylation, la déglycosylation et le clivage de l'hétérocycle (Heim et al., 2002). Un autre facteur entravant l'activité des polyphénols dans l'organisme est le masquage dû à leur interaction avec les protéines du plasma (Arts et al., 2001).

II.4.4. Les polyphénols du caroube

Les polyphénols se trouvent dans les gousses de caroube sous forme de granules brun clair, de taille entre 100 et 500 μm . Ces granules se trouvent dans la fraction fibreuse de la pulpe de caroube et peuvent être extraits par des solvants polaires, à haute température (Würsch et al., 1984). La section d'une gousse de caroube examinée au microscope électronique montre la présence de larges cellules parenchymateuses remplies de granules de tannin ressemblant à des pièces d'ambre en microscopie optique (Würsch et al., 1984). En analyse par diffraction à rayons X, les granules ne possèdent pas de structure cristalline (Würsch et al., 1984).

1- Extraction des polyphénols du caroube

Pour l'analyse des polyphénols, on recommande généralement l'utilisation d'échantillons frais au lieu des échantillons séchés à l'air ou lyophilisés (Mueller-Harvey, 2001). Okuda et al. (1989) démontrent que certains composés phénoliques se décomposent rapidement s'ils sont exposés à la lumière ou à des températures élevées. Pour le séchage au four, des températures inférieures à 40°C sont utilisées. Il est à noter aussi que les tannins hydrolysables sont relativement stables à l'air et à température ambiante tandis que les tannins condensés ont tendance à s'oxyder dans les mêmes conditions (Okuda et al., 1989). Les tannins complexes et de grande taille sont facilement dégradés en tannins de taille inférieure sous l'action de l'eau, des acides dilués et d'autres solvants comme le méthanol (Mueller-Harvey, 2001).

Pour l'extraction plusieurs solvants peuvent être employés. L'hexane ou le dichlorométhane sont utilisés préalablement pour éliminer les lipides et la chlorophylle (Mueller-Harvey, 2001). Les tannins peuvent être extraits à l'eau (à température ambiante ou à 90°C), à 50% méthanol (à température ambiante ou bouillant) et à 50-70% acétone aqueux (4°C ou température ambiante), (Hagerman, 1988; Waterman et Mole, 1994).

Selon Scalbert (1992), l'étape critique dans l'analyse des tannins est leur extraction. En effet leur faible solubilité dans les solvants organiques et leur présence en mélanges complexes, compliquent la séparation et l'identification des polyphénols du caroube (Nachtom et Alumot, 1963).

Une méthode, employée par Kumazawa et al. (2002), consiste à laisser en contact les gousses de caroube, écrasées et séchées préalablement, pendant 12 heures à l'eau froide (3°C). Ce procédé, répété 2 fois, permet d'éliminer les oses présents. Le résidu est ensuite extrait avec de l'eau bouillante pendant 10 minutes. Après 12 heures à température ambiante, l'extrait est filtré, concentré puis séché avant d'être analysé. L'échantillon obtenu représente 10% de la masse des gousses de caroube engagées.

Les résultats de l'analyse des polyphénols en HPLC (Owen et al., 2003) montrent un rendement supérieur avec une extraction à l'hexane (pour l'élimination des lipides) puis au méthanol (3 h), qu'avec une extraction à l'eau distillée (18 h à température ambiante).

Nishira et Joslyn (1968) séparent les phénols extraits au méthanol en deux fractions : l'une soluble dans l'acétate d'éthyle et l'autre soluble dans le butanol. Les phénols sont ensuite précipités à l'hexane.

Une étude effectuée récemment par Avallone et al. (1997) étudie l'efficacité de différents solvants pour l'extraction des tannins. L'acétone pure est inefficace pour l'extraction des tannins tandis que l'acétone à 70% s'avère meilleure que le méthanol à 70% et permet d'extraire la majorité des polyphénols. Les polyphénols restant dans les résidus sont estimés après catalyse acide dans du butanol additionné de sulfate de fer. Cependant, l'analyse des résidus indique la présence d'une quantité non négligeable de tannins ($4 \pm 0,77$ mg/g) qui n'ont pas été extraits dans l'acétone à 70%.

2- Caractéristiques des polyphénols du caroube

Peu d'études ont été consacrées à l'analyse des polyphénols du caroube. Les teneurs et la composition en polyphénols diffèrent d'un auteur à un autre. Les fluctuations obtenues doivent être dues à différents facteurs comme la variété du caroube, le pays producteur, la partie analysée (pulpe, fibre, partie soluble ou partie résiduelle insoluble), les méthodes utilisées pour l'extraction des polyphénols ou leur détermination (Marakis, 1996). Les variétés sauvages sont plus riches en tannins que les variétés cultivées (Marakis et al., 1993).

Selon Würsch et al. (1984), la teneur en tannins condensés des gousses de caroube se situe entre 16 et 20% de la masse sèche. Saura-Calixto (1988) rapporte aussi une teneur en polyphénols de 19,2% (17,9% de tannins condensés et 1,3% de tannins solubles dans l'eau). 94% de ces polyphénols font partie des résidus de fibre du caroube.

Avallone et al. (1997) constate une teneur plus élevée des tannins condensés (proanthocyanidines) en comparaison avec les tannins hydrolysables représentés par les ellagitannins et les gallotannins. En effet, une gousse de caroube contient, en moyenne, 19 mg de polyphénols totaux par g de matière fraîche, 2,75 mg/g de tannins condensés et 0,95 mg/g de tannins hydrolysables. A noter que des concentrations beaucoup plus élevées (40,8 mg/g de polyphénols totaux, 16,2 mg/g de tannins condensés et 2,98 mg/g de tannins hydrolysables) sont détectées dans le germe alors que ces composés se trouvent à l'état de traces dans la graine.

Les polyphénols du caroube ont une masse moléculaire très élevée rarement rencontrée chez d'autres plantes (Würsch et al., 1984). Près de 50% des tannins sont de masse moléculaire comprise entre 3200 et 3600 Dalton (Tamir et al., 1971), l'autre moitié se rencontre sous forme de granules de plus haute masse moléculaire avoisinant 32 000 Da (Würsch et al., 1984).

Les principaux polyphénols décrits dans les gousses de caroube sont insolubles, hautement polymérisés, appartenant aux tannins condensés contenant un noyau flavane (Würsch et al., 1984). Le degré de polymérisation des flavanols, estimé par Kumazawa et al. (2002) est de 31,1% et les flavanols constituent 23% des polyphénols totaux. Les composés obtenus par les expériences de dégradation avec l'acide thioglycolique ou l'acide chlorhydrique sont (+)-catéchine, (-)-épicatechine, (-)-épicatechine gallate, (-)-épigallocatechine gallate, (-)-épigallocatechine, delphinidine, pélargonidine et cyanidine. Ceci indique que les polymères sont composés de sous unités de flavan-3-ol et de flavan-3,4-diol (Tamir et al., 1971 ; Marakis et al., 1993 ; Marakis et al., 1997).

Les polyphénols extraits par l'eau se composent de (-)- épigallocatechine, (+)-catéchine, (-)-épicatechine gallate, (-)-épigallocatechine gallate, avec l'acide gallique comme composant le plus abondant (Corsi et al., 2002). L'extraction au méthanol/acide acétique 0,5% (90/10, v/v) donne en plus, des glycosides de quercétine et de l'acide ellagique (Sakakibara et al., 2003).

Les gousses vertes du caroube ont fait l'objet de très peu d'études (Nachtomi et Alumot, 1963 ; Joslyn et al., 1968 ; Nishira et Joslyn, 1968). Ces études ont été conduites dans le but de comparer la composition en polyphénols des gousses mûres et des gousses vertes du caroube. En effet, Joslyn et al. (1968) constate par extraction à l'eau chaude et au méthanol que les gousses vertes contiennent beaucoup plus de polyphénols totaux que les gousses mûres (67 mg/g matière sèche pour les gousses mûres et 204,3 mg/g matière sèche pour les gousses vertes). Le principal composé trouvé est la leucodelphinidine ainsi que neuf composés hydrolysables dont deux sont identifiés comme étant le β -D-glucogallin et le β -D-1,6-di-O-galloylglucose (Nishira et Joslyn, 1968). Ces tannins hydrolysables ne sont pas retrouvés ou sont présents en quantités très faibles dans les gousses mûres (Joslyn et al., 1968). Par contre, on retrouve dans les gousses mûres une quantité abondante d'acide gallique, supposé dériver des tannins hydrolysables par hydrolyse enzymatique (Joslyn et al., 1968). Nachtomi et Alumot (1963) ont identifié plusieurs catéchines et leuco-anthocyanines dans les gousses vertes : (+)-gallocatechine, (-)-épicatechine, (-)-épicatechine gallate et (+)-catéchine. Ces molécules sont considérées comme les précurseurs possibles des tannins condensés qu'on trouve dans les gousses mûres.

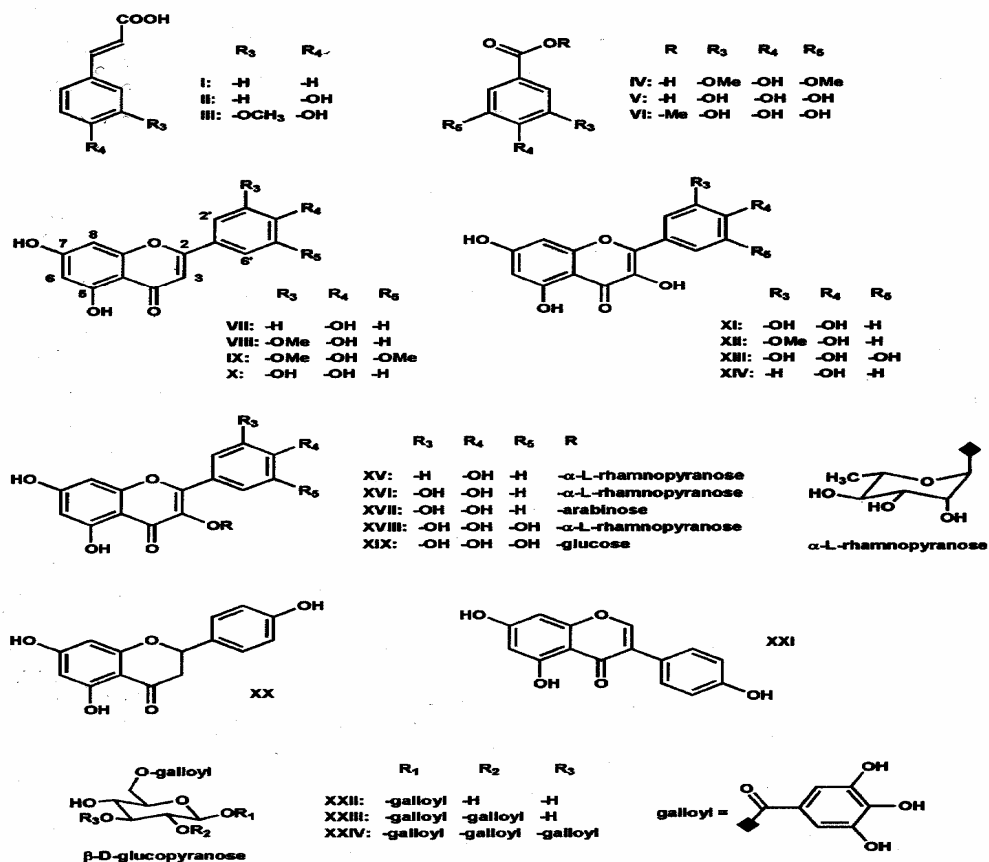


Figure 2.12: Structure des composés isolés et purifiés de la fibre de caroube (Owen et al., 2003). Phénols: I = acide cinnamique, II = acide p-coumarique, III = acide férulique, IV = acide syringique, V = acide gallique, VI = méthyl gallate. Flavones: VII = apigénine, VIII = chrysoeriol (lutéoline 3'-méthyl éther), IX = tricétine 3',5'-diméthyl éther, X = lutéoline. Flavonols: XI = quercétine, XII = isorhamnétine (quercétine 3'-méthyl éther), XIII = myricitine, XIV = kaempférol. Glycosides de flavonol: XV = kaempférol-3-O- α -L-rhamnoside, XVI = quercétine-3-O- α -L-rhamnoside, XVII = quercétine arabinoside, XVIII = myricétine-3-O- α -L-rhamnoside, XIX = myricétine glucoside (configurations pour arabinoside XVII et glucoside XIX non confirmées); flavanone: XX = naringénine; isoflavone: XXI = genistéine. Gallotannins: XXII = 1,6-di-O-galloyl- β -D-glucose, XXIII = 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose, XXIV = 1,2,3,6-tétra-O-galloyl- β -D-glucose.

Une étude récente menée par Owen et al. (2003) pour l'élucidation de la structure des polyphénols présents dans la fibre de caroube conduit à l'identification et à l'isolement de 24 composés différents (Figure 2.12). Ces composés se groupent en acides phénoliques (acide cinnamique, acide coumarique, acide férulique, acide syringique, acide gallique, méthyl gallate), flavones (apigénine, chrysoeriol, tricétine 3',5'-diméthyl éther, lutéoline), flavonols (quercétine, isorhamnétine, myricétine, kaempferol), glycosides de flavonol (kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercétine-3-O- α -L-rhamnoside, quercétine arabinoside, myricétine-3-O- α -L-rhamnoside, glycoside de myricitine), flavanones (naringénine), isoflavone (génistéine), gallotannins (1,6-di-O-galloyl- β -D-glucose, 1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose, 1,2,3,6-tétra-O-galloyl- β -D-glucose).

II.4.5. Interactions polyphénols protéines

L'une des propriétés majeures des tannins est leur capacité à lier et précipiter les protéines en formant des complexes (Vergé et al., 2002). Un exemple simple de conséquence de cette complexation est l'astringence qui est due à des interactions entre les polyphénols et les protéines salivaires. C'est une sensation de sécheresse et de constriction causée par l'obstruction de la lubrification du palais qui résulte de la précipitation des agrégats polyphénols protéines (Jöbstl et al., 2004a). Ces auteurs ont proposé un modèle moléculaire en trois étapes pour la complexation entre protéines salivaires riches en proline et l'épigallocatechine-gallate, modèle qui pourrait expliquer les interactions polyphénols-protéines (Figure 2.13).

Dans une première étape et à une faible concentration en épigallocatechine-gallate, le polyphénol s'associe à la surface de la molécule protéique, et généralement on a plusieurs molécules de polyphénols qui se lient simultanément à une même molécule protéique. La molécule protéique change alors de la conformation relâchée ou pelote statistique (loose randomly coiled conformation) à une structure plus compacte.

Dans une deuxième étape, l'épigallocatechine se lie (cross-link) à plusieurs molécules protéiques rendant ainsi le complexe insoluble et formant une solution colloïdale.

Dans une troisième étape, une augmentation du nombre d'interactions (cross-linking) cause l'accroissement de la taille des agrégats, ce qui provoque leur précipitation. Ce phénomène se traduit par une diminution du volume hydrodynamique de la molécule protéique durant la première minute qui suit le mélange entre les deux molécules suivi par une augmentation des tailles des particules due à l'agrégation (Jöbstl et al., 2004a). L'étude effectuée par Jöbstl et al. (2004a) montre aussi que, en formant des complexes avec les polyphénols, la molécule protéique

étudiée (caséine β) adopte une conformation compacte différente de la structure originelle flexible et déroulée.

La précipitation tannins-protéines est affectée par des facteurs divers (Calderon et al., 1968 ; Van Buren et Robinson, 1969; Beart et al., 1985; Luck et al., 1994 ; Makkar et Becker, 1996), incluant les caractéristiques des différentes protéines (volume hydrodynamique, composition en acides aminés, point isoélectrique), les caractéristiques des polyphénols (taille, structure, solubilité dans l'eau et flexibilité de conformation) et les conditions dans lesquelles se déroulent la réaction (pH, composition du solvant, température, présence de sels et d'autres molécules organiques telles que les polysaccharides).

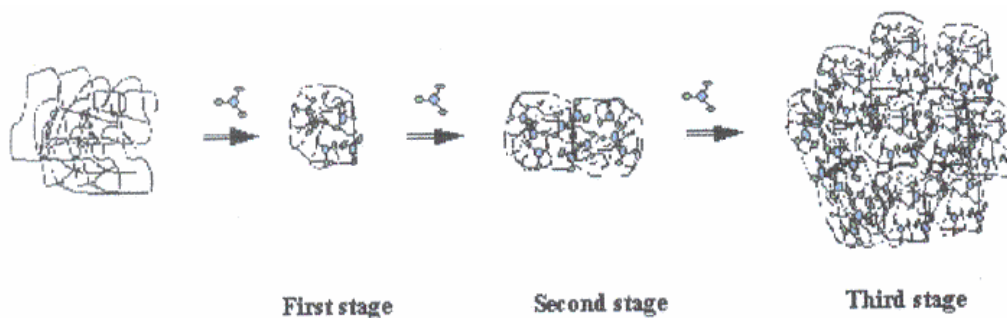


Figure 2.13: Modèle moléculaire proposé pour l'interaction entre les protéines salivaires riches en proline et les polyphénols (Jobstl et al., 2004a).

II.4.5.1. Les caractéristiques des protéines

1- Le volume hydrodynamique, la structure et la masse moléculaire

La capacité des tannins à précipiter les différentes protéines varie considérablement. Hagerman et Butler (1981) ont trouvé que l'affinité des protéines pour un tannin condensé varie dans une échelle de 1 à 1000. Goldstein et Swain (1963) assurent que l'aptitude des polyphénols à former de forts liens avec les protéines salivaires et les glycoprotéines dépend largement de leur taille moléculaire. Les peptides possédant moins de six résidus se lient très faiblement aux

tannins. L'affinité de la polyproline pour les proanthocyanidines augmente avec la masse moléculaire de l'acide polyaminé. De même, pour les protéines pauvres en proline et ayant des masses moléculaires inférieures à 20 000, l'affinité pour les tannins est très faible (Hagerman et Butler, 1981).

Les protéines possédant des structures globulaires compactes comme la ribonucléase A, le cytochrome C, le lysozyme et la myoglobine ont moins d'affinité pour les polyphénols que les protéines à structure ouverte, flexible, en forme de pelote statistique (random coil) comme la BSA et l'histone F1, probablement à cause de la plus grande accessibilité des oxygènes des liaisons peptidiques nécessaires à la mise en place de liaisons hydrogène (Hagerman et Butler, 1981 ; Haslam, 1998).

2- La composition en acides aminés

Il a été démontré que les tannins ont une grande affinité pour les protéines riches en résidus proline (Haslam, 1998). En effet, le pourcentage molaire de proline dans un polypeptide est linéairement relié à la capacité de ce polypeptide à former un précipité avec 400 mg/L de catéchine (Asano et al., 1982).

Dans les mêmes conditions, aucun précipité n'est formé par les homopolymères d'acide polyglutamique, de polylysine et de polysérine. Selon Siebert et Lynn (1998), seules les protéines contenant de résidus proline peuvent former des précipités et un nombre fixe de sites (les résidus proline accessibles) servent de points d'attachement aux polyphénols.

D'autres acides aminés affectent également la formation des complexes tanno-protéiques. Certains acides aminés jouent un rôle dans le repliement de la protéine et donc dans l'accès aux sites de liaison. Pour d'autres, leur présence près des sites de liaison peut faciliter ou inhiber la complexation. Par exemple, l'hydroxyproline qui, en homopolymère ne produit pas de précipité, est bien connue pour interrompre la formation des structures hélicoïdales et aussi des feuillettes beta dans les protéines et notamment dans le cas de la gélatine, contribuant ainsi à la création de régions de la molécule avec des sites de liaison accessibles aux polyphénols et contenant des prolines (Siebert et al., 1996).

De plus, si le mécanisme de liaison est basé sur des interactions hydrophobes, les acides aminés non polaires peuvent gêner la formation de complexes en favorisant le repliement des régions hydrophobes de la molécule vers l'intérieur, les rendant ainsi inaccessibles. Alternativement, ces même acides aminés peuvent favoriser la formation de complexes, s'ils agissent en coopérant avec un résidu proline adjacent pour augmenter l'activité du site de liaison

(Siebert et al., 1996). D'autres acides aminés peuvent agir stériquement ou électrostatiquement sur la complexation (Siebert et al., 1996).

II.4.5.2. Les caractéristiques des polyphénols

1- La taille et la masse moléculaire

La capacité des tannins condensés à précipiter les protéines dépend de leur masse moléculaire (Porter et Woodruffe, 1984). Par exemple, la capacité à précipiter les protéines augmente régulièrement lorsque l'on considère une série de polyphénols ayant une masse moléculaire allant de 578 jusqu'à 1134 (Singleton, 1981). Les grandes molécules comme l'acide tannique (typiquement représenté par une molécule de glucose avec trois à neuf molécules d'acide gallique) peuvent se lier sur de plus grandes distances et être donc capables de s'attacher à plus de sites sur les protéines. Par contre, ces mêmes molécules ont un problème d'encombrement stérique que les petites molécules comme la catéchine n'ont pas (Siebert et al., 1996).

Selon White (1987), les molécules tanniques doivent être suffisamment petites pour pouvoir pénétrer les régions protéiques, mais en même temps, suffisamment larges pour pouvoir lier les chaînes protéiques en plus d'un point. Donc, pour les galloyl-D-glucose, l'addition de groupes galloyl ester augmente la complexation avec la BSA avec un maximum pour le pentagalloyl glucose (Mc Manus et al., 1985).

De même, un tannin condensé doit avoir au moins trois sous-unités flavonol pour pouvoir précipiter les protéines. Les dimères sont moins efficaces tandis que les monomères sont généralement incapables de précipiter les protéines (Bate-Smith, 1973 ; Artz et al. 1987).

2- La flexibilité conformationnelle

La flexibilité conformationnelle des tannins favorise leur association aux protéines (Haslam, 1998 ; Mc Manus et al., 1985 ; Richard et al., 2006).

3- La solubilité dans l'eau

Une bonne solubilité des polyphénols dans l'eau réduit leur efficacité à complexer les protéines (Haslam, 1998).

4- La nature et la structure des polyphénols

La nature et la structure des polyphénols affectent l'accès aux sites accepteurs lors des interactions avec les protéines (Siebert et al., 1996). L'efficacité des polyphénols à lier les protéines réside dans leur structure polydentée qui leur permet de s'attacher simultanément et consécutivement à plus d'un emplacement de la structure protéique (Haslam, 1998).

La capacité des polyphénols à former des complexes avec les protéines augmente avec le nombre de groupes hydroxyles phénoliques (Calderon et al., 1968). Mc Manus et al. (1985) ont démontré qu'un noyau aromatique avec au moins deux groupes hydroxyles est requis pour la complexation. Les groupes OH voisins (ex. o-diphenol) sont plus actifs que les groupes séparés (ex. m-diphenol) (Siebert et Lynn, 1998).

En considérant que la prodelphinidine B₃ possède un résidu gallotannin (avec trois groupements OH adjacents sur le noyau aromatique), alors que la procyanidine B₃ possède un groupement catéchine (avec deux groupements OH adjacents sur le même noyau), la prodelphinidine est considérée comme plus active (Mulkay et Jerumanis, 1983 ; Mc Murrough et al., 1996). L'étude menée par Codorniu-Hernandez et al. (2003) sur les interactions des flavonoïdes monomériques et la proline montre que la robinetinidine agit avec la proline par les groupements OH des noyaux B et C alors que les positions préférentielles d'interaction sont différentes pour la catéchine qui se lie par les groupements des noyaux A et B.

Il convient de noter que c'est plus la fréquence des sites de liaison que la taille des polyphénols qui compte dans la complexation.

II.4.5.3. Nature des liaisons impliquées dans la complexation

La nature des interactions tannin-protéine a été le sujet de plusieurs études. Théoriquement, plusieurs types de liaison peuvent être impliqués dans la formation du complexe tanno-protéique : liaisons covalentes ou ioniques, interactions hydrophobes ou liaisons hydrogène.

Les polyphénols forment par oxydation, des ortho-quinones qui sont des molécules hautement réactives pouvant permettre des liaisons covalentes tannin-protéine (Haslam et al., 1991), mais, à l'heure actuelle, il n'y a que peu d'arguments pour l'existence de liaisons covalentes entre tannins et protéines.

Aucune interaction n'a été observée entre tannins et protéines à des valeurs de pH où les groupements hydroxyles phénoliques du tannin sont ionisés, ce qui indique que les interactions

ioniques avec les protéines ont peu d'importance (Hagerman et Butler, 1978). A noter que lorsque les groupements hydroxyles sont ionisés, des répulsions électrostatiques empêchent la complexation.

Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes sont les principaux types de liaisons impliquées dans la formation des complexes tanno-protéiques (Haslam, 1998).

Des études ont mis en évidence un effet hydrophobe dans les interactions tannin-protéines. Oh et al. (1980) ont trouvé que la formation de complexes entre les tannins condensés et la gélatine augmente avec l'augmentation de la température et la force ionique, indiquant une interaction hydrophobe. Hagerman et al. (1998) concluent que le pentagalloyl glucose précipite la BSA en formant une enveloppe hydrophobe autour de la protéine. Au niveau moléculaire, Murray et al. (1994) ont mis en évidence que l'interaction hydrophobe entre un peptide dérivé d'une protéine salivaire riche en proline et le pentagalloyl glucose est due au regroupement des groupes phénols de l'acide tannique contre le noyau pyrrolidone de la proline protéique.

Il a été également démontré que les liaisons hydrogène jouent un rôle dans la formation des complexes tannin-protéine (Hagerman et Bulter, 1980). La proline joue un rôle très important à cause de l'oxygène du groupe carbonyle adjacent à l'amine secondaire dans les résidus proline et qui est un fort accepteur de liaison hydrogène (Hagerman et Klucher, 1986).

En effet, un polyphénol naturel de masse moléculaire de 1000 D renferme 12 à 16 fonctions hydroxyles, ce qui lui permet de contracter plusieurs liaisons hydrogène durant la complexation avec d'autres substrats (Haslam, 1998).

De nouvelles études (Richard et al., 2005 ; Richard et al., 2006) confirment la formation du complexe tanno-protéique en deux étapes. Premièrement, il y a reconnaissance mutuelle entre les molécules protéiques et polyphénoliques par leur caractère hydrophobe avec adaptation de leurs structures à cette reconnaissance. En deuxième étape, la formation de liaisons hydrogène vient stabiliser le complexe sans modification fondamentale de la structure déjà obtenue en première étape.

Donc, différents mécanismes mettant en action à la fois les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes sont responsables de la précipitation des tannins condensés et hydrolysables.

II.4.5.4. Les conditions du milieu

1- Le pH du milieu

La précipitation des complexes tanno-protéiques dépend du pH avec une précipitation maximale près du point isoélectrique de la protéine (Hagerman et Butler, 1981; Naczki et al., 1996). Ceci est dû à la diminution des répulsions électrostatiques des molécules protéiques à ce pH (Hagerman et Butler, 1978). Le pH optimal pour la précipitation de la BSA, la pepsine, la gélatine, la fétuine et le lysozyme se trouve entre 0,3 et 3,1 unités pH au-dessous des points isoélectriques de ces protéines (Naczki et al., 1996).

Les résultats de Makkar et Becker (1996) montrent que les pH alcalins inactivent les tannins. Selon Loomis et Battaile (1966), la capacité des tannins condensés à précipiter les protéines est indépendante du pH tant que celui-ci est au-dessous de 8. Dans des conditions alcalines, la conversion de l'acide tannique en acide gallique et puis la disparition de l'acide gallique ont été observées (Osawa et Walsh, 1993). Ceci est à lier avec les pKa des polyphénols qui se situent en majorité à des valeurs entre 7 et 9 (Herrero-Martinez et al., 2005). A des pH supérieurs au pKa, les polyphénols se retrouvent ainsi sous leur forme non protonée et perdent leur capacité à complexer les protéines.

2- La température du milieu

La précipitation des protéines par les tannins augmente généralement avec la température (Oh et al., 1980). L'augmentation de la température déroule les protéines, permettant aux sites hydrophobes concentrés à l'intérieur des protéines d'être exposés aux interactions hydrophobes qui peuvent les lier aux polyphénols (Siebert et al., 1996). Mais une augmentation excessive de la température conduit à inactiver les tannins (Makkar et Becker, 1996). De même, le complexe tanno-protéique déjà formé pourrait être plus stable à basse température (Hagerman et Butler, 1978).

3- La force ionique du milieu

La formation du complexe tannin-gélatine augmente avec l'augmentation de la force ionique (Oh et al., 1980). En effet, en augmentant la concentration en sel dans le milieu, le taux de précipitation augmente ; ceci est probablement dû au phénomène de « salting out » observé généralement avec les protéines (Siebert et al., 1996).

4- Les solvants

Codorniu-Hernandez et al. (2003) concluent que la présence de l'eau favorise entropiquement la réaction entre les protéines contenant la proline et la robinetinidine. Oh et al. (1980) affirment que les deux modes d'association entre les tannins et les protéines dépendent du solvant. Les liaisons hydrogène sont favorisées dans les solvants hydrophobes comme le tétrachlorure de carbone, tandis que les liaisons hydrophobes sont favorisées dans les solvants hydrophiles ou polaires comme l'eau. En ajoutant un solvant non polaire (dioxane) ou un accepteur de liaisons hydrogène (diméthyl-formamide, DMF) à une solution contenant des polyphénols et des polypeptides, la formation de précipité est inhibée. Puisque les interactions polyphénols-protéines sont réversibles, il est alors possible de dissoudre les complexes par addition d'un solvant non polaire ou d'un accepteur de ponts hydrogène (Siebert et al., 1996).

5- Les polysaccharides

L'interaction entre tannins et protéines est influencée par la présence d'autres co-substrats comme les polysaccharides (Mc Manus et al., 1985; Ozawa et al., 1987 ; Luck et al., 1994 ; Haslam 1998). Plusieurs études ont démontré la capacité des polysaccharides à délier le complexe polyphénols-protéines (Ozawa et al., 1987). La pectine, la gomme arabique, les carraghénanes et le xanthane sont des inhibiteurs efficaces de la précipitation tandis que la gomme de caroube, de guar et de tara ne le sont pas (Luck et al., 1994). Ces phénomènes résultent probablement de la capacité des polysaccharides à former un complexe ternaire protéine/polyphénol/ polysaccharide qui favorise la solubilité en milieu aqueux ou de l'association moléculaire en solution entre polyphénols et polysaccharides en compétition avec l'agrégation protéique. Haslam (1998) avance la proposition que certains polysaccharides ont la capacité à développer une structure secondaire en solution, formant des poches hydrophobes capables d'encapsuler et de complexer les polyphénols (Figure 2.14). Les oses neutres comme le glucose, la β -cyclodextrine et l'arabinogalactane ont une faible affinité pour les polyphénols (Luck et al., 1994 ; Haslam, 1998 ; De Freitas et al., 2003). Les carbohydrates anioniques comme la pectine, le xanthane, l'acide polygalacturonique et la gomme arabique sont plus efficaces, suggérant ainsi que les interactions hydrophiles sont dominantes (De Freitas et al., 2003).

Toutefois, il faut noter que l'inhibition par les polysaccharides ne s'exerce qu'à des concentrations élevées. En effet, les tannins ont une affinité plus élevée pour les protéines que pour les polysaccharides, car le groupe phénolique du tannin est un excellent donneur

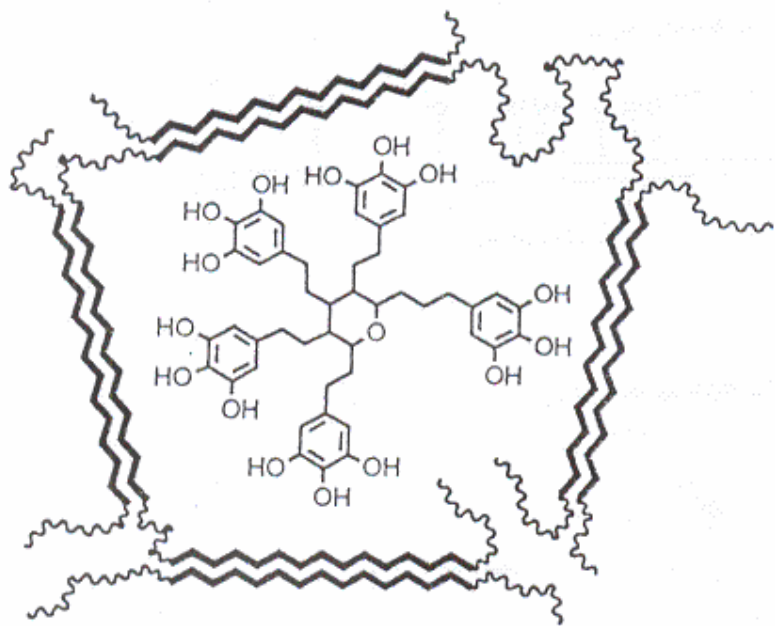


Figure 2.14: Représentation schématique de l'encapsulation d'un polyphénol par les polysaccharides, (Haslam, 1998).

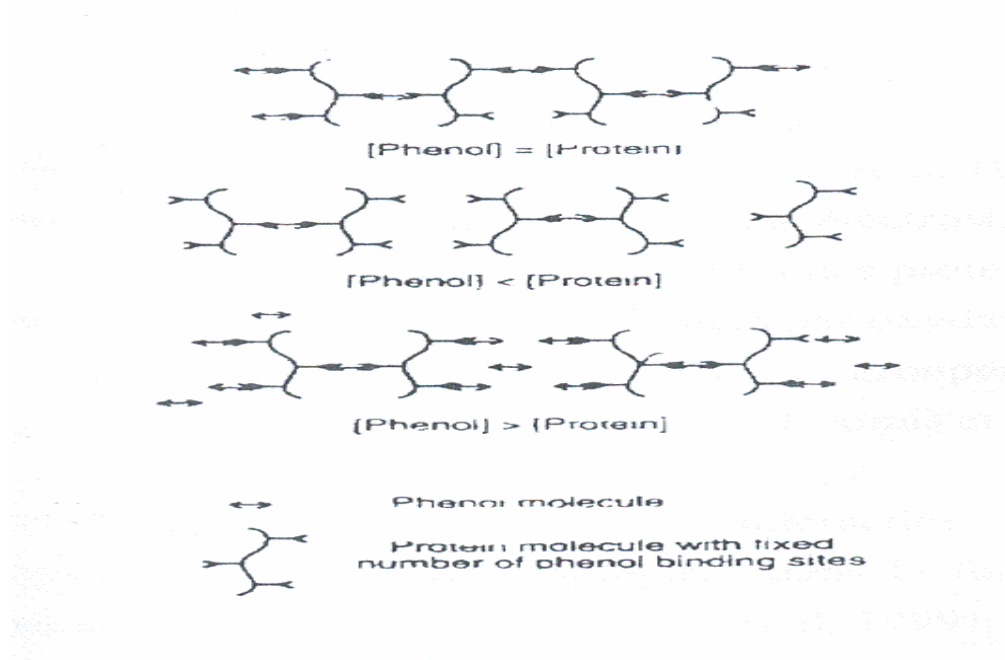


Figure 2.15: Modèle pour l'interaction protéines-polyphénols (Siebert et al., 1996).

d'hydrogène capable de former de fortes liaisons avec l'oxygène des fonctions carboxyle et carbonyle des protéines (Desphande et Salunkhe, 1982).

6- Le rapport polyphénols / protéines

La quantité de précipité formé dépend des concentrations en polyphénols et protéines dans la solution ainsi que du rapport polyphénols/protéines (Siebert et al., 1996). De plus, selon Mc Manus et al. (1985), la stœchiométrie et la taille des complexes polyphénol–protéine sont influencées par les concentrations des réactifs et le rapport protéines/polyphénols. En effet, pour une concentration donnée en protéines, la quantité de précipité augmente avec l'addition de polyphénols pour arriver à un plateau qui est souvent suivi d'une diminution. Une allure similaire est observée en fixant la concentration en polyphénols et en faisant varier la concentration en protéines (Siebert et al., 1996). Ce phénomène a été noté par d'autres auteurs (Luck et al., 1994 ; Haslam et Lilley, 1998 ; Siebert, 1999) et peut être expliqué par la réversibilité de l'agrégat tannin / protéine.

Siebert (1999) et Siebert et al. (1996) ont proposé un modèle pour expliquer ce comportement (Figure 2.15). Dans ce modèle, les protéines sont supposées avoir un nombre fixe de sites accepteurs de polyphénols. D'un autre côté, les polyphénols sont considérés comme ayant un nombre de terminaisons pouvant se lier aux protéines. Lorsque la concentration en terminaisons polyphénoliques égale le nombre des sites de liaisons protéiques, la complexation et la précipitation sont maximales.

En présence d'un excès de protéines, chaque molécule polyphénolique est capable de relier deux molécules protéiques. On a la formation de protéines dimériques, d'agrégats de petite taille, avec pas assez de polyphénols pour une plus large complexation.

En présence d'un excès de polyphénols, tous les sites de liaisons protéiques sont occupés, mais la complexation est faible, puisque les polyphénols ne trouvent plus de sites de liaisons protéiques libres et sont incapables de complexer plusieurs protéines en même temps. Ce fait entraîne aussi des agrégats de petite taille. Selon De Freitas et al. (2003), une estimation de la stœchiométrie du complexe correspondant à l'agrégation maximale polyphénol/BSA est 7:1 (rapport molaire) pour des polyphénols de masse moléculaire moyenne de 1002 Daltons. Ceci est en accord avec les travaux de Hagerman et al. (1998) qui trouvent, pour une procyanidine de masse moléculaire de 578, un rapport molaire polyphénol/BSA de 20:1.

Chapitre III

MATERIEL ET METHODES

III.1. Caractéristiques des extraits de caroube employés

III.1.1. Origine des gousses et obtention du jus de caroube

Les gousses vertes de caroube sont récoltées dans la région Eklim El Kharroub dans le Chouf. Cette récolte est effectuée durant le mois de juin. Ces gousses sont ensuite congelées à -18°C pour être disponibles aux analyses durant toute l'année. Certaines gousses ont aussi été lyophilisées.

Avant leur utilisation, les gousses sont portées à température ambiante pendant quelques heures, jusqu'à décongélation. Puis elles sont broyées à l'aide d'un extracteur de jus électrique. Le jus recueilli, de couleur vert clair, est centrifugé à 3 000 g (5 300 tours/min) pendant 15 min. L'extrait obtenu (surnageant) est conservé au réfrigérateur dans des flacons de couleur sombre pour éviter l'oxydation. Ce jus de caroube sera utilisé pour toutes les expériences de coagulation de laits.

Deux autres méthodes d'extraction à l'eau ont été utilisées à partir de matériel congelé ou lyophilisé :

Trois gousses fraîches lyophilisées sont broyées à l'aide d'un broyeur Waring Blendor deux fois avec 200 mL d'eau distillée milli Q. On procède après à une filtration à travers 8 couches de gaze.

La même procédure s'effectue pour trois gousses congelées mais cette fois en ajoutant 100 mL d'eau seulement.

Les extraits obtenus sont centrifugés (centrifugeuse Beckman, rotor JA20) pendant 30 min à la vitesse de 16 000 rpm (ou 31 000 g) à une température de 4°C .

L'extraction des polyphénols est réalisée sur les 3 extraits obtenus (jus, extrait aqueux de gousses congelées, extrait de gousses lyophilisées) et nécessite trois extractions à l'acétate d'éthyle en ajoutant 10 mL d'acétate d'éthyle à 10 mL d'extrait à chaque fois. La solution obtenue est ensuite évaporée. Le résidu est repris avec 1 mL de méthanol-eau (50/50).

III.1.2. Dosage des polyphénols

Les polyphénols totaux de l'extrait de caroube sont estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Scalbert et al., 1989). Les composés phénoliques sont oxydés par les acides

phosphotungstique et phosphomolybdique et ceux-ci sont réduits en oxyde bleu de tungstate et de molybdène. La coloration bleue développée présente un maximum d'absorbance à 760 nm.

Les polyphénols sont dosés en équivalent d'acide gallique. Pour cela, une courbe d'étalonnage est construite à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 et 100 mg/L). Les extraits de caroube, étant très concentrés en polyphénols, sont dilués 1000 fois avant le dosage.

Dans un tube de 1 mL, on ajoute à 100 µL de l'échantillon à doser, 500 µL de réactif de Folin (dilué dix fois) et 400 µL d'une solution saturée de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 75 g/L. La solution de carbonate de sodium est ajoutée 30 sec à 8 min après le réactif de Folin. Le mélange est agité et chauffé à 50°C pendant 5 min puis refroidi rapidement. La couleur jaune du réactif vire au bleu et on mesure l'absorbance de l'échantillon à 760 nm.

III.1.3. Analyse des polyphénols en couplage chromatographie liquide haute performance-spectrométrie de masse.

L'appareil utilisé est un appareil LCQ Deca (ThermoElectron) associé à un ensemble de chromatographie Spectra System comprenant une pompe P4000, un système de dégazage SCM 1000, un injecteur automatique AS 3000. Le spectromètre de masse est un appareil à trappe d'ions équipé d'une source électrospray.

La séparation des polyphénols s'effectue sur une colonne hypersil C18 (150 mm × 4,6 mm). Le solvant est délivré à un débit de 1 mL/min et consiste en un mélange d'acétonitrile et d'eau contenant 1% d'acide formique. Au niveau du gradient, on passe en 30 min de 5% à 60% d'acétonitrile puis en 5 min à 95%. La colonne est reconditionnée à 5% d'acétonitrile pendant 15 min. Le volume d'injection est de 10 µL. En sortie de colonne, une détection UV est réalisée (détecteur à barrettes de diodes UV 6000 LP avec une gamme fixée de 190 à 600 nm) et l'éluant est introduit dans la source du spectromètre de masse à l'aide d'une interface électrospray à travers un capillaire porté à haute température et à haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées (tension du spray 4 kV, voltage du capillaire – 4V). Un flux d'azote est appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant (débit de gaz auxiliaire de 50 u.a.). Les ions formés sont conduits vers la trappe d'ions (analyseur) par l'intermédiaire d'un capillaire maintenu à haute température (350°C). Pour l'analyse des polyphénols, on travaille en mode négatif et les spectres obtenus sur une gamme de masse allant de 120 à 1100 uma correspondent aux ions négatifs $[\text{M} - \text{H}]^-$. Les échantillons d'extrait de caroube analysés sont préparés comme

indiqué au paragraphe "origine des gousses et extraction du jus de caroube". On utilise aussi deux solutions de référence dans l'eau, d'acide gallique et de catéchine à 10 mg/mL.

III.2. Caractéristiques des laits employés

Pour les tests de rhéologie et de mesure de taille des micelles de caséines, nous avons utilisé des laits de vache ayant subi des traitements thermiques différents. Les laits utilisés ont la composition décrite dans le tableau 3.1 et sont préalablement écrémés avant les expériences.

Tableau 3.1: Composition des différents laits utilisés dans les tests de rhéologie et de mesure des tailles des micelles.

Caractéristiques	Marque	Protides	Glucides	Lipides
Pasteurisé demi écrémé	Candia	3,15 g/100 g	4,8 g/100 g	1,55 g/100 g
UHT écrémé	Bridel	3,2 g/100 g	4,9 g/100 g	0,15 g/100 g
Ecrémé en poudre reconstitué (dilution 10 g/100 mL)	Auchan	35 g/100 g	52 g/100 g	0,8 g/100 g

Pour les tests de coagulation et de synérèse, nous avons pu tester différents laits provenant d'élevage locaux. Les laits recueillis sont à l'exception du lait de soja des laits de mélange écrémés par centrifugation et pasteurisés (Tableau 3.2).

Tableau 3.2: : Composition des différents laits utilisés dans les tests de coagulation et de synérèse.

Caractéristiques	pH	Matière grasse %	<u>Matière sèche %</u>	Protides %
Lait de vache	6,62	0,15	9,81	3,54
Lait de brebis	6,78	0,10	12,81	6,06
Lait de chèvre	6,50	0,10	7,92	2,40
Lait de chamelle	6,53	0,10	8,94	2,59
Lait de soja (Bjorg)	6,72	0,10	7,34	3,32

III.2.1. Détermination du pH du lait

La mesure du pH du lait est faite à l'aide d'un pH-mètre GLP 21-22 (Crison instrument, Italia). La standardisation de l'appareil est assurée par l'usage de deux solutions tampon à pH 7,01 et 4,00. L'étalonnage est fait systématiquement avant les mesures de pH. La mesure s'effectue en introduisant les deux sondes (pH et température) dans un échantillon de lait de 40 mL préalablement chauffé à une température de 20-25°C.

III.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse du lait

La matière grasse du lait est déterminée par la méthode de Gerber ou méthode acido-butyrométrique.

Le principe est la séparation de la matière grasse du lait par centrifugation, dans un butyromètre, après avoir dissous les protéines du lait par l'acide sulfurique. La séparation de la matière grasse est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool isoamylique.

On introduit dans le butyromètre 10 mL d'acide sulfurique (de densité 1,813–1,825 et de concentration 90-91%). On ajoute avec la pipette 10,75 mL de lait bien agité et on verse à la surface 1 mL d'alcool isoamylique. On bouche le butyromètre et on procède à l'agitation jusqu'à complète dissolution. Le butyromètre est ensuite placé dans une centrifugeuse (1 20 t/min) pendant 5 min et à une température de 65°C. Deux phases apparaissent l'une foncée, l'autre claire. C'est la phase claire qui représente le pourcentage de matière grasse dans le lait et qu'on peut lire sur l'échelle graduée du butyromètre.

III.2.3. Détermination de la matière sèche totale

On utilise l'étuve Genlab windes model pp9 vs03d. 2 g de produit sont mis à l'étuve à 102-103°C pendant 15 heures. Après ce temps, les capsules sont mises à refroidir en dessiccateur puis pesées. La matière sèche exprimée en pourcentage en masse est donnée par la formule:

$$\frac{M_1 - M_0}{M_2 - M_0} \times 100$$

où M_0 est la masse, en grammes, de la capsule vide

M_1 est la masse, en grammes, de la capsule et du résidu après dessiccation.

M_2 est la masse, en grammes, de la capsule et de la prise d'essai.

III.2.4. Détermination de la teneur en azote

III.2.4.a. Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines est déterminée selon la méthode de Kjeldahl où l'azote total du lait est dosé par titrimétrie après minéralisation et distillation. L'appareil utilisé pour la digestion est le Velp Scientifica DK et pour la distillation le Velp Scientifica UDK 130D. Avant la prise d'essai, l'échantillon de lait est bien homogénéisé par chauffage et agitation à 38°C.

On introduit dans le tube 1 g de l'échantillon pesé à 1 mg près. On ajoute le catalyseur (2,4 g de K_2SO_4 et 200 μL d'une solution à 0,05g/mL de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) et 4 mL d'acide sulfurique à 95-98%. Tous les produits chimiques employés sont exempts d'ammoniaque. Le tube est placé sur le dispositif de chauffage avec un aspirateur pour absorber les vapeurs. Le chauffage est augmenté doucement et en plusieurs étapes pour une minéralisation totale. Le programme est le suivant : 35 minutes à 160°C, 30 minutes à 220°C, 35 minutes à 300°C puis 60 minutes à 369°C.

Les tubes sont laissés refroidir à température ambiante. Puis, on procède à la distillation. 20 mL d'eau distillée sont ajoutés au tube suivis par 20 mL d'hydroxyde de sodium NaOH à 40%. On place sur la plateforme de réception un erlenmeyer contenant 25 mL d'acide borique H_3BO_3 à 4% auquel on a ajouté l'indicateur coloré (3 mL d'indicateur par litre de solution d'acide borique).

La solution d'indicateur coloré est préparée en dissolvant 0,2 g de rouge de méthyle dans 100 mL d'éthanol à 95% et 1 g de vert de bromocrésol dans 500 mL d'éthanol à 95 %. Les deux solutions sont ensuite combinées dans les proportions 1 :1.

L'ammoniac est alors entraîné par un courant de vapeur d'eau qu'on fait barboter dans l'erenmeyer. Après deux min, l'indicateur contenu dans l'erenmeyer vire à sa teinte alcaline. La solution obtenue dans l'erenmeyer est ensuite titrée avec une solution standard d'acide chlorhydrique HCl 0,1N jusqu'à apparition de la couleur rose. On note le volume de HCl versé. Dans chaque série de dosages, un essai à blanc et un essai de contrôle doivent être inclus.

La teneur en azote total, exprimée en grammes d'azote pour 100 grammes de lait est calculée selon la formule suivante :

$$N \% = 1,4007 \times (V_e - V_b) \times N/M$$

Où V_e = le volume en millilitres de la solution HCl 0,1N nécessaire pour titrer l'échantillon.

V_b = le volume en millilitres de la solution HCl 0,1N nécessaire pour titrer l'essai à blanc.

N = la normalité de la solution de HCl.

M = masse de la prise d'essai en grammes.

Par convention, le résultat peut être exprimé en protéines du lait, en multipliant le chiffre d'azote total par le coefficient 6,38.

III.2.4.b. Détermination de la teneur en azote non protéique

Avant la prise d'essai, l'échantillon de lait est bien homogénéisé par chauffage et agitation à 38°C. On introduit dans un erlenmeyer prépesé 10 mL de lait pesés à 1 mg près. On ajoute 40 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 15% (masse/volume). L'erenmeyer et son contenu sont pesés. Le mélange est agité puis laissé précipiter pendant 5 min. Le mélange est ensuite filtré (filtre papier Whatman no 1 exempt d'ammoniac). 4 mL du filtrat sont placés dans un tube Kjeldahl et on procède à la minéralisation, la distillation et le titrage comme indiqué au paragraphe III.2.4.a.

La teneur en azote non protéique, exprimée en grammes d'azote pour 100 grammes de lait est calculée selon la formule suivante :

$$ANP \% = [1,4007 \times (V_e - V_b) \times N] / \{ (M_f \times M_l) / M_t - (M_f \times 0,065) \}$$

Où V_e = le volume en millilitres de la solution HCl 0,1N nécessaire pour titrer l'échantillon.

V_b = le volume en millilitres de la solution HCl 0,1N nécessaire pour titrer l'essai à blanc.

N = la normalité de la solution de HCl.

M_f = masse de 4 mL de filtrat en grammes.

M_l = masse de 10 mL de lait en grammes.

M_t = masse totale du lait plus 40 mL d'acide trichloroacétique 15% en grammes.

III.2.5. Détermination du rayon hydrodynamique des micelles par diffusion dynamique de la lumière laser.

L'appareil utilisé est un Malvern HPPS (High Performance Particle Sizer). Il permet d'obtenir une mesure de la taille des particules en les illuminant avec un rayonnement laser et en analysant la lumière diffusée dans toutes les directions.

La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de mesurer avec précision la taille des particules. Ainsi les particules de grosse taille dévient des quantités importantes de lumière sous des angles faibles par rapport à l'axe de propagation, et les petites particules au contraire, dévient des quantités infimes de lumière sous des angles beaucoup plus larges.

Les échantillons analysés correspondent à du lait auquel on a ajouté des volumes variables d'extrait de caroube, insuffisants pour une coagulation totale. Les échantillons sont dilués dix fois dans du perméat. Le perméat est obtenu par ultrafiltration du lait de vache pasteurisé (seuil de coupure 10 000 kDa). Après dilution, les échantillons sont filtrés à travers des filtres millipore de 0,45 μm .

Les analyses sont effectuées à la température de 20°C et au pH du lait. L'indice de réfraction du perméat, mesurée au réfractomètre, est de 1,3419, sa viscosité déterminée à l'aide d'un viscosimètre capillaire est de 1,2 mPas.s. L'indice de réfraction des micelles du lait a été calculé par extrapolation de la courbe de mesure de l'indice de réfraction du lait en fonction de sa concentration dans le milieu pour une concentration en micelles de 100. Il est de 1,566.

Les analyses sont réalisées dans des cuves en quartz. Les résultats obtenus sont des moyennes de 10 à 14 mesures pour chaque échantillon et les mesures sont effectuées en triple.

Dans les mêmes conditions expérimentales, on mesure également le rayon hydrodynamique de la $\square$ caséine commerciale native ou déphosphorylée mise en présence de quantités croissantes d'acide gallique ou de catéchine. Les solutions de protéines sont préparées dans l'eau à 2,5 g/L, les solutions de polyphénols sont mM. 1 mL de solution protéique est laissé à température ambiante pendant 30 min en présence de polyphénol (0 à 500 μL) dans un ratio polyphénol/protéine variant donc de 0 à 5 avant d'être dilué par 1 mL de perméat, filtré (0,45 μm) et analysé en diffusion de la lumière. Les paramètres de mesure utilisés sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

III.3. Tests rhéologiques et physicochimiques

III.3.1. Tests de coagulation

Plusieurs expériences ont été réalisées en vue de caractériser les coagulums obtenus par l'action de l'extrait de caroube sur différents laits (pasteurisé, microfiltré, UHT, en poudre reconstitué et concentré non sucré reconstitué). Pour comparaison, les coagulums obtenus sur ces mêmes laits par action de chymosine sont également analysés.

Préalablement, l'extrait de caroube est centrifugé (10 min, 3 500 g, centrifugeuse Labofuge 200 Heraeus Sepatech) pour éliminer les grosses particules provenant du broyage et le pH est ajusté à un pH voisin de celui du lait 6,60–6,65.

La première expérience a consisté à caractériser les coagulums obtenus en fonction du volume d'extrait de caroube utilisé. On travaille avec 5 mL de lait auxquels on ajoute des volumes différents d'extrait de caroube (0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 et 3500 µL). Les volumes sont complétés à 8,5 mL avec une solution tampon d'acétate de sodium 50mM ajustée au pH du lait pour garder un volume total identique. On laisse réagir pendant 30 min puis on procède à la centrifugation (10 min, 5000 g, 4°C). Les culots obtenus sont alors pesés et on mesure leurs teneurs en protéines et en matière sèche.

Le volume optimal d'extrait, donnant le culot le plus important, est ensuite utilisé après ébullition pour éliminer toute hypothèse d'activité enzymatique.

L'effet de la température de la réaction (15, 20, 25, 30, et 40°C) est suivi pendant 30 min avec le volume optimal d'extrait sur des laits préalablement amenés à ces différentes températures.

On effectue de même une série de coagulation à différents temps de réaction (0, 5, 10, 15, 30, 45 et 60 min).

On réalise aussi une série de coagulation avec des extraits de caroube ajustés à différents pH (pH 2 à pH 10) à l'aide de solutions de différentes concentrations en hydroxyde de sodium et en acide chlorhydrique.

Pour étudier l'effet conjugué présure–extrait de caroube, on effectue une série d'expériences à 33°C sur des laits amenés et maintenus au préalable pendant 15 min à 33°C:

- lait et extrait seul 1h de réaction.
- lait et présure seule 1h de réaction.
- lait et extrait et présure ajoutés en même temps 1h.

- lait et présure pendant 1h puis extrait pendant 1h.

III.3.2. Mesure de la synérèse

Des expériences de synérèse sont effectuées avec des volumes de coagulum plus importants de 100 mL. Ces expériences permettent la comparaison des gels obtenus par l'action de l'extrait de caroube à des gels lactiques ou présure.

Le lait pasteurisé est refroidi à une température de 42-43°C. 3 échantillons sont inoculés avec 2% d'une culture de bactéries lactiques. On utilise des sachets MY 900 de Rhodia Food contenant une culture de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. Les échantillons inoculés sont bien agités avant de subir une incubation à 42-43°C pendant 3 heures au bain-marie. Les gels sont mis à refroidir jusqu'à une température de 4°C. D'autres échantillons sont amenés à 33°C puis incubés à cette température après être inoculés avec la présure (1/10000).

Les échantillons avec l'extrait de caroube subissent le même traitement que les gels lactiques.

Les coagulums obtenus sont disposés sur une toile dans des entonnoirs reposant sur des éprouvettes graduées. Le volume du lactosérum est contrôlé toutes les 1/2 heures pendant 2 jours.

En fin d'expérience on mesure la synérèse :

Synérèse (%) = (masse sérum/masse coagulum) × 100 et on effectue un dosage de protéines et de matière sèche des différents gels obtenus.

III.3.3. Mesure de la viscosité des produits laitiers

La viscosité est définie comme la caractéristique qu'a un fluide d'engendrer des forces de frottement lorsqu'il est mis en mouvement. La viscosité dynamique est alors égale à la contrainte de cisaillement divisée par la vitesse de cisaillement (René 1997). La viscosité des gels obtenus est mesurée grâce à un rhéomètre à contrainte imposée de modèle RS1 (Rheo-Stress 1, Haake) piloté par le logiciel Reowin Pro Job Manager.

Le rhéomètre, schématisé à la figure 3.1, est équipé d'un module cône-plan de 60 mm de diamètre, avec un angle de 2° et un entrefer de 117 µm. Afin d'éviter la présence de grains de gros diamètres dans l'entrefer, ce qui perturbe la mesure avec les géométries à faible entrefer, 8 mL de lait, inoculé par de l'extrait de caroube ou de la présure, sont déposés sur le plateau du

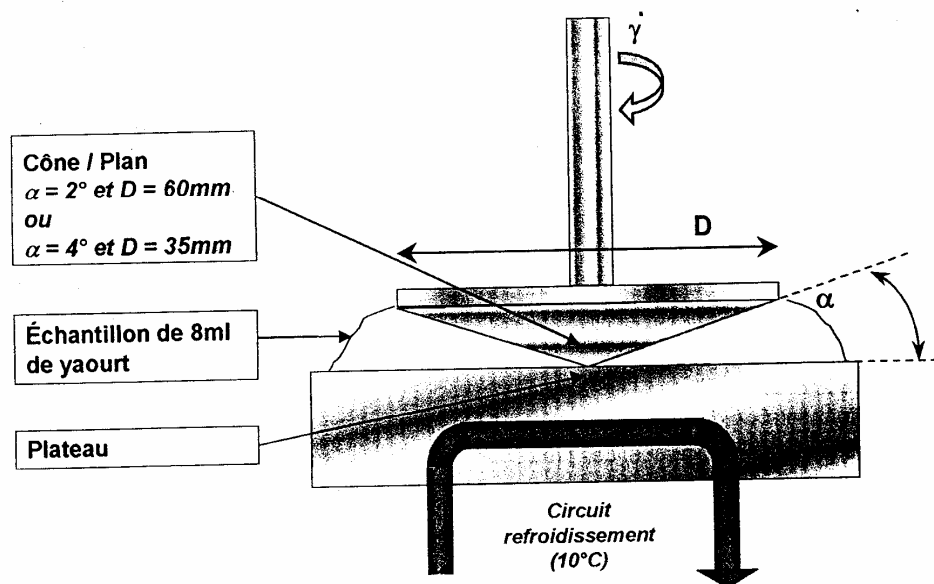


Figure 3.1: Schéma du système en cône plan du rhéomètre qui permet d'analyser la viscosité complexe et la viscosité apparente des coagulum.

rhéomètre à l'aide d'une seringue sur laquelle une aiguille de 0,8 mm de diamètre interne a été fixée. Les analyses sont réalisées à 33°C.

Les échantillons subissent deux types de mesures successifs.

Des mesures en régime harmonique à faible contrainte non destructurant permettent d'accéder à une viscosité complexe η^* . Puis des mesures en régime permanent destructurant avec cisaillement permettent d'accéder à une valeur de la viscosité apparente η_{app} ou viscosité dynamique. Il n'existe pas de relation simple entre viscosité complexe et apparente qui sont mesurées dans des conditions très différentes.

Pendant la phase de régime harmonique, une force sinusoïdale d'amplitude 0,10 Pa est appliquée à la fréquence f de 1 Hz pendant 60 sec avec un enregistrement toutes les 6 sec des paramètres suivants : le module conservatif G' en Pa (correspondant à la composante élastique du matériau), le module dissipatif G'' en Pa (correspondant à la composante visqueuse) et tangente $\delta = G''/G'$ où δ est le déphasage ou l'angle de perte. La viscosité complexe est obtenue sur les 10 points de mesure par la formule :

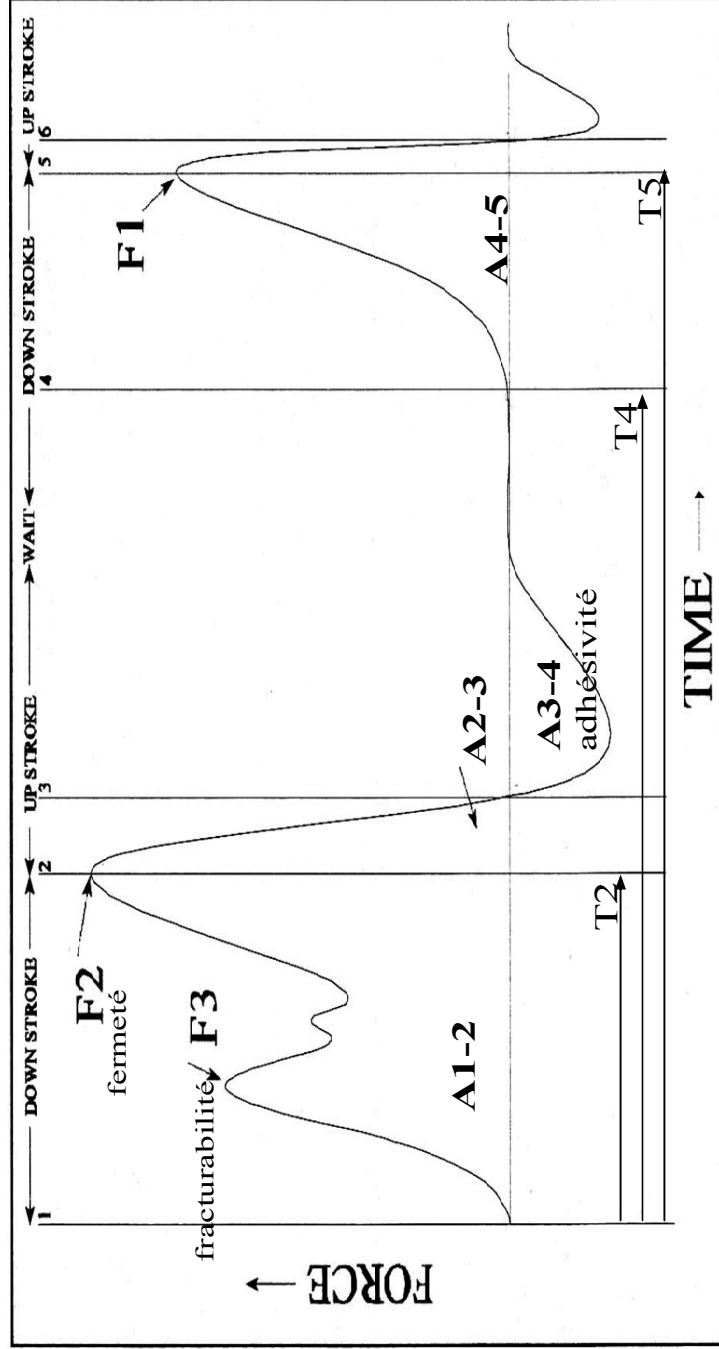
$\eta^* = 1/\omega \sqrt{(G'^2 + G''^2)}$ en Pa.s avec $\omega = 2\pi f$. Pour des solutions contenant un ou plusieurs polymères, les grandeurs G'' et G' varient fortement avec la fréquence d'étude et correspondent à des phénomènes d'interaction et d'enchevêtrement au niveau des molécules elles-mêmes (René 1997).

La viscosité apparente ou viscosité dynamique est mesurée lorsque le rhéomètre fonctionne en régime permanent. C'est le test de visco-écoulement où une vitesse de cisaillement γ' constante de 10 s^{-1} est appliquée et la contrainte de cisaillement τ de l'échantillon est enregistrée après 180 sec : $\eta_{app} = \tau/\gamma'$ en Pa.s.

Le rhéomètre peut également être utilisé pour suivre la gélification ou la coagulation d'un échantillon. Il fonctionne alors en régime harmonique (ou dynamique) avec une fréquence de 0,1 Hz et en appliquant une contrainte maximale de 0,07 Pa pendant 30 min sur l'échantillon. Dans le cas d'une coagulation, on détermine le temps au bout duquel $G' = G''$ ou le temps pour lequel $G' = 1\text{Pa}$.

III.3.4. Tests de pénétrométrie

L'appareil utilisé est un pénétromètre TA-XT2 (Texture analyser de Stable Micro Systems) avec un logiciel d'analyse texture expert.



fermeté : F2
fracturabilité : F3
adhérence : A3-4

élasticité : T5-T4/T2
cohésion : A4-5/A1-2
résilience : A2-3/A1-2

Figure 3.2: Profil de texture.

L'appareil est calibré avec un poids de 2 kg. On utilise ensuite le module cylindrique de plexiglass de 2,54 cm de diamètre pour effectuer une analyse de profil de texture. Les paramètres choisis pour l'analyse sont une pré vitesse de 5 mm/s, une vitesse de 2 mm/s, une post vitesse de 2 mm/s, un déplacement de rupture de 1 mm, un déplacement de 15 mm, une force de 0,981 N.

Le profil de texture obtenu (Figure 3.2) permet d'obtenir un certain nombre de caractéristiques du gel (Pons et Fiszman 1996) dont :

La fracturabilité : force F3

La dureté : force F2

L'élasticité : $T5 - T4 / T2$

La cohésion : surface A4 – 5 / surface A 1-2

L'adhérence : surface A3-4

L'aspect gommeux : force F2 x cohésion

La masticabilité : aspect gommeux x élasticité

La résilience : surface A 2-3 / surface A1-2

Les échantillons sont préparés 1 heure avant le test de pénétrométrie. On mélange 15 mL de lait et 7,5 mL d'extrait de caroube qu'on agite bien puis on laisse agir. Les essais sont effectués sur différents types de lait (lait pasteurisé, lait UHT, lait congelé et lait en poudre reconstitué). Les coagulums obtenus sont comparés à des coagulums présure (dosage de la présure 6/10 000).

III.4. Analyse biochimique des complexes protéines laitières-extrait de caroube obtenus

III.4.1. Analyse des complexes par chromatographie liquide haute performance.

La chromatographie liquide haute performance permet de séparer les différents constituants d'un mélange. En phase inverse et conditions dénaturantes (présence de solvant), le complexe sera dissocié et les deux constituants du complexe seront séparés. En conditions natives (chromatographie d'exclusion stérique en milieu tamponné), le complexe sera maintenu.

On utilise une chaîne HPLC Beckman Coulter pilotée par un ordinateur équipé du logiciel Gold (Programmable Solvent Module 126) et reliée à un détecteur UV à barrette de diode System Gold 168.

Les essais en conditions natives ont été effectués avec une colonne à exclusion stérique, TSK 3000 SW Beckman (30 cm x 7,5 mm, taille des particules de la phase stationnaire 10 μm). On travaille en mode isocratique en tampon Tris 100 mM à pH 7, au débit de 1 mL/min. La détection UV se fait à 2 longueurs d'onde (214 nm et 271 nm), permettant la détection des protéines et des phénols respectivement et les spectres sont enregistrés parallèlement entre 190 et 400 nm.

D'autres essais sont réalisés en conditions dénaturantes avec une colonne phase inverse Vydac C₁₈ (25 cm x 4,6 mm, taille des particules de 5 μm). La séparation se fait en mode gradient au débit de 1 mL/min à l'aide de deux solvants A (H₂O, 1% acide trifluoroacétique TFA) et B (ACN, 1% acide trifluoroacétique TFA) : on maintient 5% de B pendant 1 min, puis on passe de 5 à 70% de B en 30 min, de 70 à 95% en 1 min et après maintien de 95% de B pendant 10 min, on retourne à 5% de B.

Des solutions, d'une part de caséine α et de α -lactoglobuline, d'autre part d'acide gallique et de catéchine, sont préparées aux concentrations respectives de 1 mg mL⁻¹ et de 10 mg mL⁻¹ (solutions dans l'eau). Les mélanges sont réalisés avec 10 μL de polyphénol pour 1 mL de protéine laitière ce qui représente un ratio molaire polyphénol/protéine compris entre 9 et 15 dans le cas de la caséine α et 7 et 12 dans le cas de la α -lactoglobuline (en considérant des masses moyennes de 24 kDa et 18 kDa pour la α -caséine et la α -lactoglobuline respectivement et de 170 et 290 pour l'acide gallique et la catéchine). Ce ratio est beaucoup plus important si l'on considère le nombre de fonctions phénols (au nombre de 5 par molécule d'acide gallique ou de catéchine) qui peuvent potentiellement se lier aux protéines. Le mélange est maintenu 30 min à température ambiante avant d'être analysé en CLHP en conditions natives ou dénaturantes (injection de 100 μL du mélange). Les protéines et les polyphénols sont également injectés individuellement dans les mêmes concentrations que dans le mélange.

III.4.2. Analyse du devenir des protéines par électrophorèse capillaire

Le principe de l'électrophorèse capillaire est de séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des particules chargées injectées dans un tube capillaire rempli d'une solution tampon. La mobilité apparente des espèces à séparer résulte à la fois de leur mobilité propre (fonction de leur charge et de leur taille) et du flux d'électroosmose. La séparation des protéines laitières est effectuée sur un appareil Beckman P/ACE 5000.

Les protéines laitières sont séparées sur un capillaire de silice fondu (diamètre 50 μm , longueur 57 cm) à pH acide. Pour éviter l'adsorption des protéines sur le capillaire on effectue des étapes de rinçage du capillaire entre chaque électrophorèse : 1 min d'eau, 1 min de solution d'oxyde de polyéthylène à 0,2% dans HCl 1N, 1 min d'eau et 4 min de l'électrolyte.

La séparation est effectuée à 45°C et 30 kV, la détection est réalisée à 214 nm par un détecteur UV à filtre. L'injection des échantillons est faite sous pression pendant 10 secondes.

La solution d'électrolyte (pH 2,5) contient : urée 6 M, dihydrogénophosphate de sodium 10 mM et méthyl 2 hydroxyethylcellulose 0,5%. L'urée est préalablement débarrassée de ses contaminants par passage sur une double résine échangeuse d'ions (AG 801-X8 BioRad). La solution d'électrolyte est filtrée avant utilisation (filtre Millipore de 0,45 μm).

On prépare des échantillons de lait pasteurisé (1 mL) mis en présence pendant 30 min soit avec de la présure (30 ou 60 μL), soit avec de l'extrait de caroube (50 ou 100 μL). Après coagulation, les culots et les surnageants sont analysés en électrophorèse capillaire. La préparation des échantillons nécessite une dénaturation au moins pendant 1 heure à température ambiante en présence d'un tampon dénaturant à pH 8 (NaH_2PO_4 5 mM, dithiothréitol 5 mM et urée 6 M). Pour l'analyse des culots, on ajoute au culot 1 mL de tampon dénaturant. Pour l'analyse des surnageants, on prélève 500 μL du surnageant que l'on dénature avec 1 mL de tampon dénaturant. Avant d'être analysés, les échantillons sont filtrés (filtre 0,45 μm).

III.4.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (Phast-system)

On utilise une méthode mise au point pour la séparation des protéines laitières sur un matériel Phast-System (Pharmacia) par Van Hekken et Thompson (1992). La séparation des caséines et des protéines sériques se fait selon le rapport charge/masse.

Avant d'être utilisés, les gels natifs sont trempés 30 min dans le tampon suivant pour permettre une saturation en urée : urée 6,6 M + Tris 0,112 M + acétate de sodium 0,112 M ajusté à pH 6,4 avec de l'acide acétique. Puis les gels sont mis à sécher en position verticale sur du papier absorbant pendant 10 à 15 min. Les échantillons de lait avec présure ou extrait de caroube sont préparés comme au paragraphe III.4.2. Avant dépôt sur gel, les échantillons sont dénaturés par dilution au 1/5 avec du tampon dénaturant (urée – Tris – acétate, 10% de 2-mercaptoéthanol et 0,025% de bleu de bromophénol).

La phase de séparation dure environ 2 heures et se fait dans les conditions suivantes : 300V, 15°C et une intensité allant de 0,1mA à 7,5 mA.

Les bandes de protéines sont colorées pendant 9 min à 50°C à l'aide d'une solution de coloration préparée avec du bleu de Coomassie R 0,2%, de l'acide acétique pur et de l'eau dans les proportions relatives 50:10:40 (v/v/v).

La solution de bleu de Coomassie 0,2% est préparée préalablement en dissolvant une tablette de bleu (GE Healthcare) dans 80 mL d'eau (agitation 5 à 10 min), en ajoutant 120 mL d'éthanol pur (agitation 2 à 8 min) et en filtrant sur papier.

Les gels sont ensuite décolorés à l'aide d'une solution contenant de l'éthanol, de l'acide acétique et de l'eau dans les proportions 30:10:60 (v/v/v). La décoloration est effectuée trois fois avec des temps de décoloration différents (5 min, 10 min, 15 min) à 50°C.

La dernière étape est la conservation à l'aide d'une solution contenant du glycérol, de l'acide acétique et de l'eau dans les proportions 6:10:84 (v/v/v). Cette étape s'effectue à 50°C pendant 15 min.

III.4.4. Analyse des complexes en spectrométrie de masse.

La mise en évidence des liaisons non covalentes dans le complexe tanno-protéique se fait en spectrométrie de masse. Les protéines (α lactalbumine et β lactoglobuline) sont analysées en infusion directe (débit 5 μ L/min à l'aide d'une seringue unimetrics) et en mode d'ionisation positive. Les protéines doivent être multi chargées afin d'obtenir des valeurs de m/z (masse/charge) compatibles avec la gamme d'analyse du spectromètre de masse 150 à 2000 Da. Un logiciel de déconvolution permet de déterminer la masse de la protéine entière.

On utilise des solutions de protéines laitières commerciales (α lactalbumine et β lactoglobuline) préparées dans l'eau à 2,5 mg/mL.

L'analyse se fait en deux étapes. Premièrement, l'analyse s'effectue en conditions classiques ou dénaturantes, en présence d'un mélange eau/acétonitrile (50/50 v/v) acidifié par 1% d'acide formique. La deuxième analyse se fait en conditions natives ou non dénaturantes, dans un tampon acétate d'ammonium 5 mM à pH 5. Les paramètres du spectromètre de masse sont optimisés sur les 2 ions majeurs du spectre de masse de la β -lactoglobuline : débit gaz vecteur (80 unités arbitraires), débit gaz auxiliaire (0), voltage de spray (5 kV), température du capillaire (285°C), voltage du capillaire (37 V).

Des analyses en conditions non dénaturantes sont ensuite effectuées pour des mélanges protéine-catéchine et protéine-acide gallique laissés à température ambiante pendant 30 min avant dilution (50/50 v/v) en tampon acétate d'ammonium et analyse en infusion. Le rapport protéine/polyphénols a été fixé à 1/5.

III.4.5. Analyse des complexes par turbidimétrie.

Des essais de turbidimétrie sont effectués au spectrophotomètre à 600 nm de longueur d'onde. On travaille avec l'extrait frais (45 mg/mL de polyphénols) dilué 10 fois avec le tampon acétate d'ammonium.

On réalise des rapports molaires caséine / acide gallique, caséine / catéchine et caséine / polyphénols de l'extrait de caroube allant de 1/5 à 1/3000. De même avec la β -lactoglobuline. Pour chaque expérience, on conduit une expérience témoin comprenant l'extrait de caroube, l'acide gallique ou la catéchine seuls, sans protéines et dans les concentrations correspondantes. Pour chaque valeur on soustrait l'absorbance du témoin.

Les mêmes essais sont effectués avec l'extrait de caroube débarrassé des polysaccharides. Pour cela, on procède à l'élimination des polysaccharides en mélangeant 40 mL d'extrait et 160 mL d'éthanol. Après agitation, le mélange est centrifugé (1500 g pendant 30 min). Le surnageant est récupéré et on procède alors à l'évaporation de l'éthanol puis on reprend le culot avec 12 mL de tampon acétate. On mesure la teneur en polyphénols de cette solution avant de faire les essais avec les protéines.

L'influence de la force ionique sur la complexation des protéines par les polyphénols de l'extrait de caroube est aussi déterminée. Pour cela on utilise le rapport protéines/polyphénols pour lequel on obtient un trouble maximal. Des expériences sont conduites avec plusieurs concentrations de NaCl dans l'extrait (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,5 M). Le mélange est laissé 30 min avant d'ajouter la protéine. A nouveau, on attend 30 min avant de lire l'absorbance au spectrophotomètre.

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Caractérisation de l'extrait de caroube

IV.1.1. Préparation des extraits de caroube

La gousse verte de la variété kheshabi se caractérise par une forme plus allongée que les autres variétés et présente un rendement à l'extraction supérieur d'après les essais d'extraction effectués au laboratoire. C'est pour cela qu'elle a été choisie dans notre étude.

Au laboratoire, les gousses fraîches ou fraîchement décongelées ont été broyées à l'aide d'un extracteur de jus. L'extrait obtenu par pressage traditionnel (broyage manuel utilisant des pierres avec récupération du jus) a été fourni par des personnes de Eklim El Kharroub et non préparé au laboratoire. La composition du jus de caroube obtenu par ces deux méthodes physiques est donnée dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Composition des jus de caroube obtenus par broyage (en pourcentages par rapport aux gousses fraîches).

	Broyage laboratoire	Pressage traditionnel
Rendement (%)	41	-
PH	5	5,33
Teneur matière sèche (%)	14,79	9,02
Teneur protéines (%)	1,12	0,11
Azote non protéique (%)	1,09	0,04

Le jus de caroube obtenu au laboratoire est plus riche en matière sèche et en protéines que le jus obtenu de manière traditionnelle. L'extracteur à jus électrique est plus performant que la méthode utilisée de manière familiale. Le pH des deux jus est voisin et se révèle acide. Il est nécessaire de tenir compte de cette acidité et donc de ramener le pH des jus à celui des laits pour éviter une précipitation acide des caséines. La majorité des analyses, à l'exception des premiers tests de coagulation du lait de vache effectués avec les deux extraits, sont effectuées avec le jus de caroube préparé au laboratoire. Ce dernier est plus facile à préparer et ainsi on peut disposer toujours d'extrait frais préparé le jour même, pour les analyses

IV.1.2. Teneur en polyphénols des extraits de caroube

Le dosage des polyphénols totaux, en équivalent acide gallique, des extraits de gousses vertes de caroube a été estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu. La courbe d'étalonnage utilisée est reportée sur la figure 4.1. La courbe montre une zone de linéarité sur l'intervalle de concentrations en acide gallique allant de 0 à 100 mg/L.

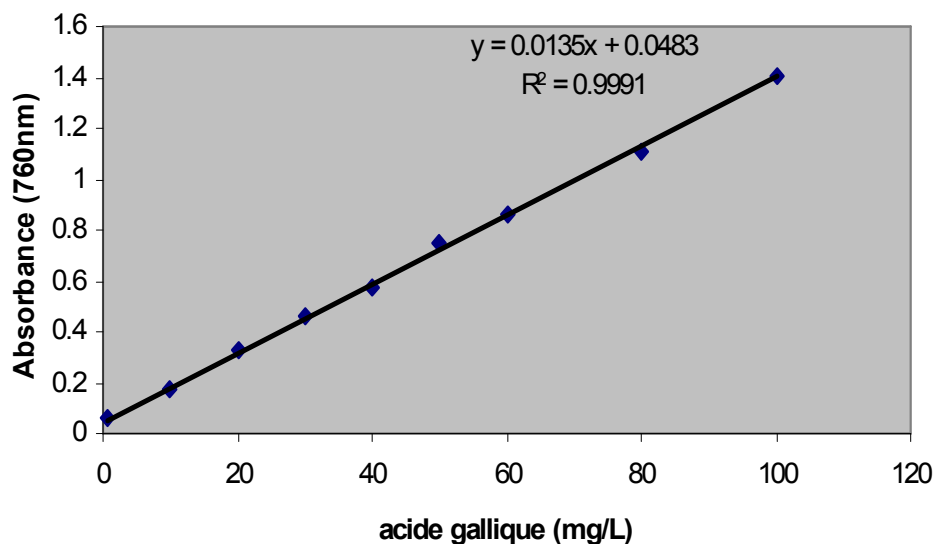


Figure 4.1: *Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.*

Les teneurs en polyphénols d'extraits ayant subi différents traitements (gousses fraîches, gousses congelées et gousses lyophilisées) sont données dans le tableau 4.2. Les dosages ont été réalisés en triplicat. L'extrait de gousses vertes s'avère une source importante de polyphénols totaux (45,2 g/L à partir de gousses fraîches). Cette teneur en polyphénols est très élevée en comparaison avec d'autres sources alimentaires comme le vin rouge (1,8 g/L), le café (0,9 g/L) ou le thé noir (1 g/L), (Tableau 2.7).

Une étude précédente (Joslyn et al., 1968) indique une valeur de 6,9 g/L en polyphénols totaux de l'extrait de gousses vertes. Malheureusement, le manque de méthodes d'extraction standardisées et la non considération des pertes et des altérations de certaines substances durant l'extraction, rend impossible la comparaison des valeurs obtenues avec celles d'autres études.

Tableau 4.2 : Teneurs en polyphénols des extraits de caroube par rapport au volume total d'extrait.

	Gousses fraîches	Gousses congelées	Gousses lyophilisées
Absorbance			
Moyenne	0,6581	0,2380	0,1776
Ecart type	0,0410	0,0036	0,0011
Conc (g/L)	45,17	14,05	9,58

IV.1.3. Identification des polyphénols présents dans les extraits de gousses vertes de caroube

La séparation et l'identification des polyphénols des extraits de caroube se fait en couplage chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse. L'extrait de caroube présente une concentration élevée en polyphénols totaux, ainsi qu'une riche variété en composés polyphénoliques. Les chromatogrammes reconstitués à partir du courant ionique total (Figure 4.2) montrent qu'il n'y a pratiquement pas de différence qualitative importante, sauf pour le composé élué à 2 min 84, entre les polyphénols extraits à partir de gousses fraîches, lyophilisées ou congelées. L'identification des composés est facilitée par leur spectre UV, la connaissance de spectres de masse de quelques références, la fragmentation qui permet d'avoir des indications sur la structure des composés, en particulier la présence d'oses ou d'acide gallique, les identifications récentes des polyphénols faites dans le cas de la fibre de gousse de caroube (Owen et al., 2003) ou des gousses mûres (Papagiannopoulos et al., 2004). Trente composés phénoliques ont été identifiés d'après les spectres de masse obtenus avec l'extrait de gousses lyophilisées qui est le moins concentré et présente la meilleure séparation (Figure 4.3 et Tableau 4.3).

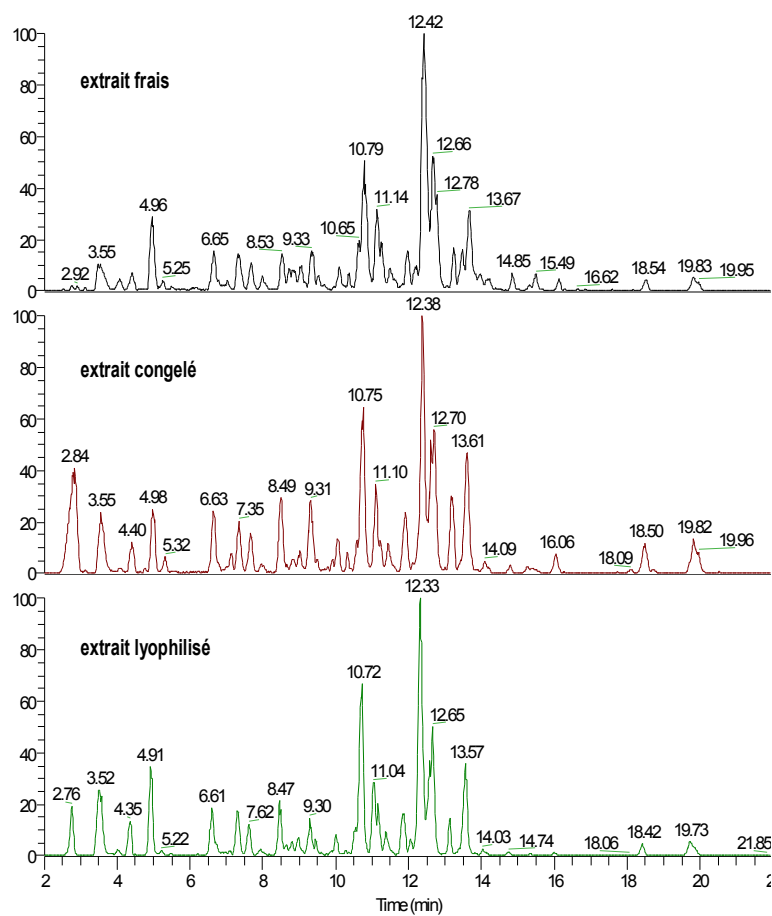


Figure 4.2: Chromatogrammes reconstitués à l'aide du courant ionique dans le cas des extraits obtenus à partir de gousses de caroube fraîches, congelées ou lyophilisées.

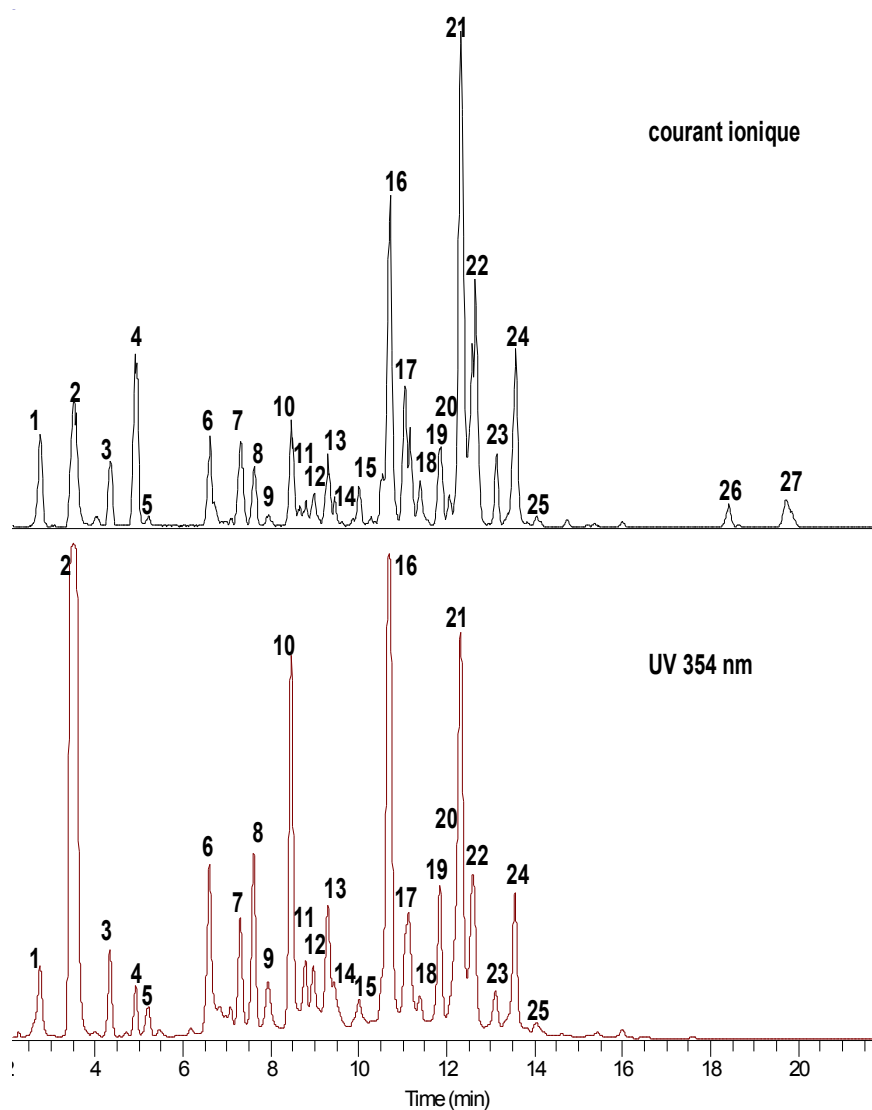


Figure 4.3: Chromatogrammes reconstitués à l'aide du courant ionique ou de la détection UV mesurée à 354 nm dans le cas de l'extrait obtenu à partir de gousses de caroube lyophilisées et faisant apparaître les pics identifiés grâce à leur spectre de masse.

Tableau 4.3 : Liste des composés phénoliques obtenus dans l'extrait de caroube (gousses lyophilisées)

temps rétention (min)	pic	composé phénolique	m/z [M-H]⁻
2,74	1	monogalloyl glucose	331
3,52	2	acide gallique	169
4,34	3	digalloyl glucose	483
4,91	4	(epi)gallocatéchine	305
5,21	5	digalloyl glucose	483
6,59	6	digalloyl glucose	483
7,32	7	(epi)catéchine	289
7,62	8	monogalloyl glucose	331
7,93	9	trigalloyl glucose	635
8,45	10	trigalloyl glucose	635
8,65	11	(epi)gallocatéchine gallate	457
8,72	12	(epi)catechine	289
8,72	12	trigalloyl glucose	635
9,31	13	(epi)gallocatéchine méthylée	319
9,45	14	(epi)gallocatéchine gallate	457
9,97	15	myricetine glucoside	479
10,68	16	tetragalloyl glucose	787
11,09	17	myricetine rhamnoside	463
11,38	18	quercetine glucoside	463
11,87	19	quercetine acide glucuronique	477
12,06	20	quercetine glucoside	463
12,33	21	tetragalloyl glucose	787
12,65	22	quercetine rhamnoside	447
13,38	23	quercetine arabinoside	433
13,38	23	tetragalloyl glucose	787
13,55	24	myricetine arabinoside	449
14,03	25	kaempferol rhamnoside	431
14,03	25	(epi)gallocatéchine gallate	471

		méthylée	
18,41	26	kaempferol triméthylé	327
19,73	27	tricetine 3',5' diméthyl ether	329

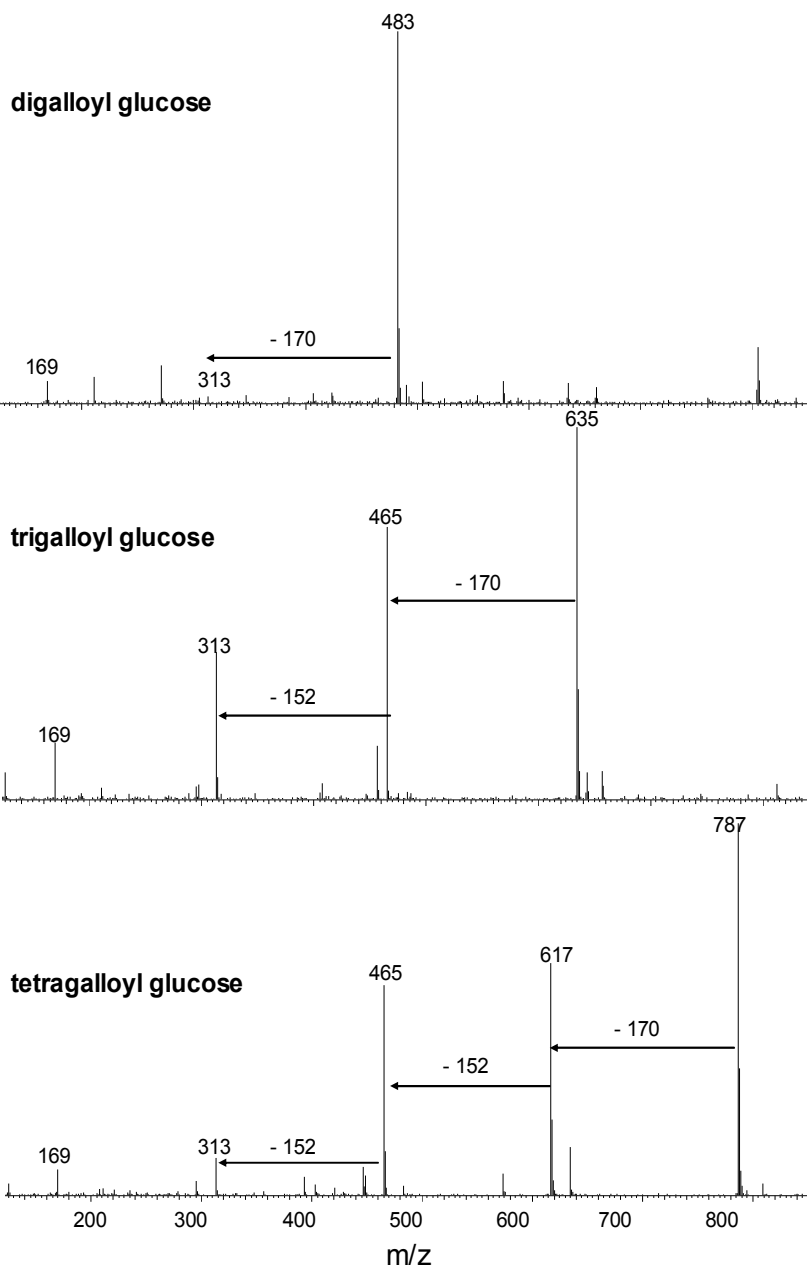


Figure 4.4 : Spectres de masse de trois gallotannins

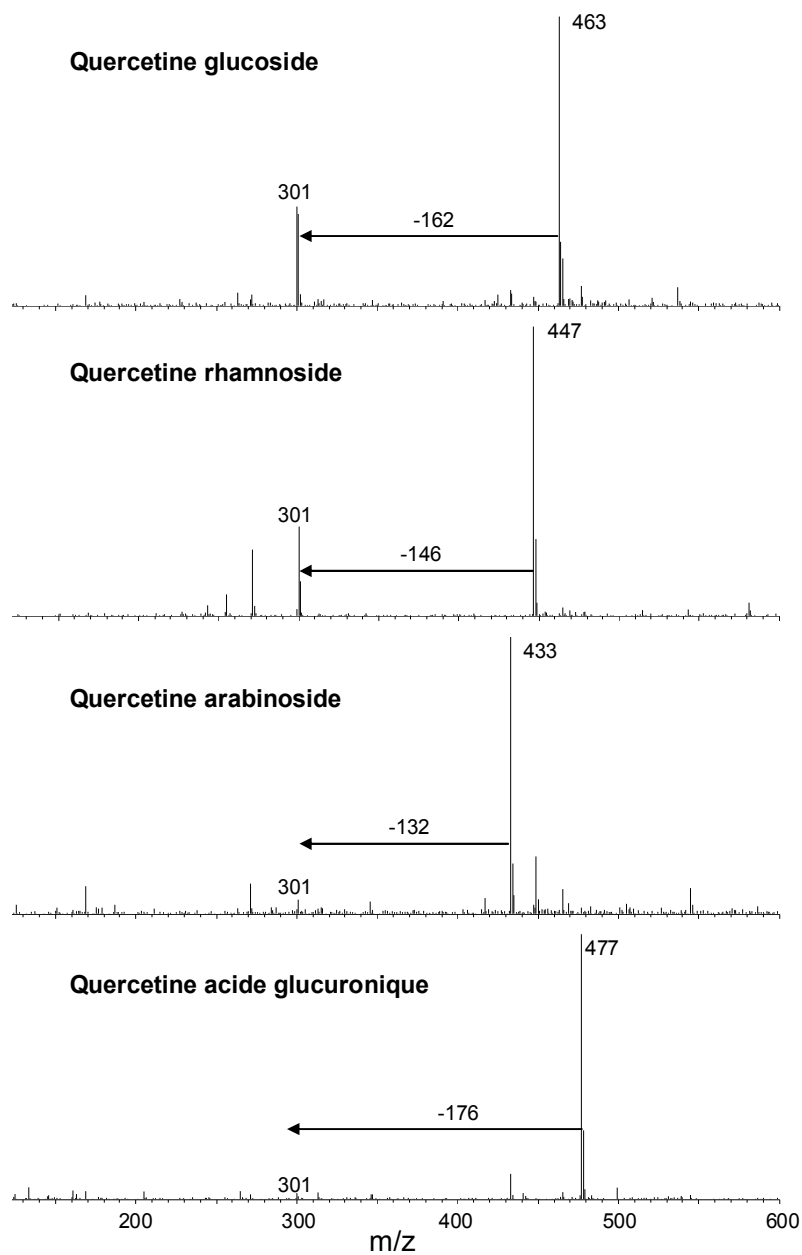


Figure 4.5 : Spectres de masse des glucosides de la quercetine

Les polyphénols des gousses vertes du caroube sont très riches en acide gallique sous différentes formes, acide gallique, flavan 3-ols (galcatéchine et galcatéchine gallate) et gallotannins qui apparaissent majoritaires. Sur la figure 4.4, les spectres de masse des gallotannins (digalloyl, trigalloyl et tetragalloyl glucose) font apparaître la perte de l'hexose (- 170) puis des unités gallate (- 152). Cette fragmentation spécifique aide à l'identification. Après hydrolyse chlorhydrique (2 N) pendant 1 h 30 min à 95°C, l'acide gallique et le méthyl gallate représentent plus de 47% des polyphénols présents dans l'extrait. L'extrait de caroube contient également des flavonols (quercétine, myricétine et kaempferol) sous forme de flavonols glucosides. Les figures 4.5 et 4.6 illustrent la fragmentation des glucosides de la quercétine et de la myricétine montrant la perte de l'ose, glucose (- 162), rhamnose (- 146), arabinose (- 132), pour donner le fragment non glycosylé correspondant à la myricétine (M-1 = 317) ou à la quercétine (M-1 = 301). Il est ainsi possible de distinguer la myricétine rhamnoside de la quercétine glucoside, deux flavonols glucosides ayant le même ion moléculaire, en l'occurrence M-1 = 463.

Tous les composés qui ont été identifiés dans l'extrait de gousses vertes de caroube ont été également retrouvés dans les gousses mûres ou seulement les fibres (Owen et al., 2003 ; Papagiannopoulos et al., 2004). A l'inverse, il n'a pas été possible de détecter des acides phénoliques (acide cinnamique, *p*-coumarique, férulique, syringique) et des flavones (hormis la tricétine 3', 5'-diméthyl éther) qui ont été décrits précédemment. On peut peut-être imaginer que ces composés apparaissent au cours du mûrissement de la gousse ou sont produits au cours du processus technologique qui conduit à la fabrication de fibres.

A noter que l'acide gallique se trouve en quantités moindres au profit des tannins hydrolysables, di-, tri- et tétra-galloyl-glucose. Au contraire, dans les gousses mûres, l'acide gallique libre constitue 41,8% (en masse) des polyphénols totaux (Owen et al., 2003). Il semble que l'acide gallique trouvé dans les gousses mûres dérive, par hydrolyse enzymatique, de tannins hydrolysables plus complexes abondants dans les gousses vertes (Joslyn et al., 1968). Ce qui pourrait expliquer l'utilisation unique de l'extrait de gousses vertes pour la coagulation des protéines laitières.

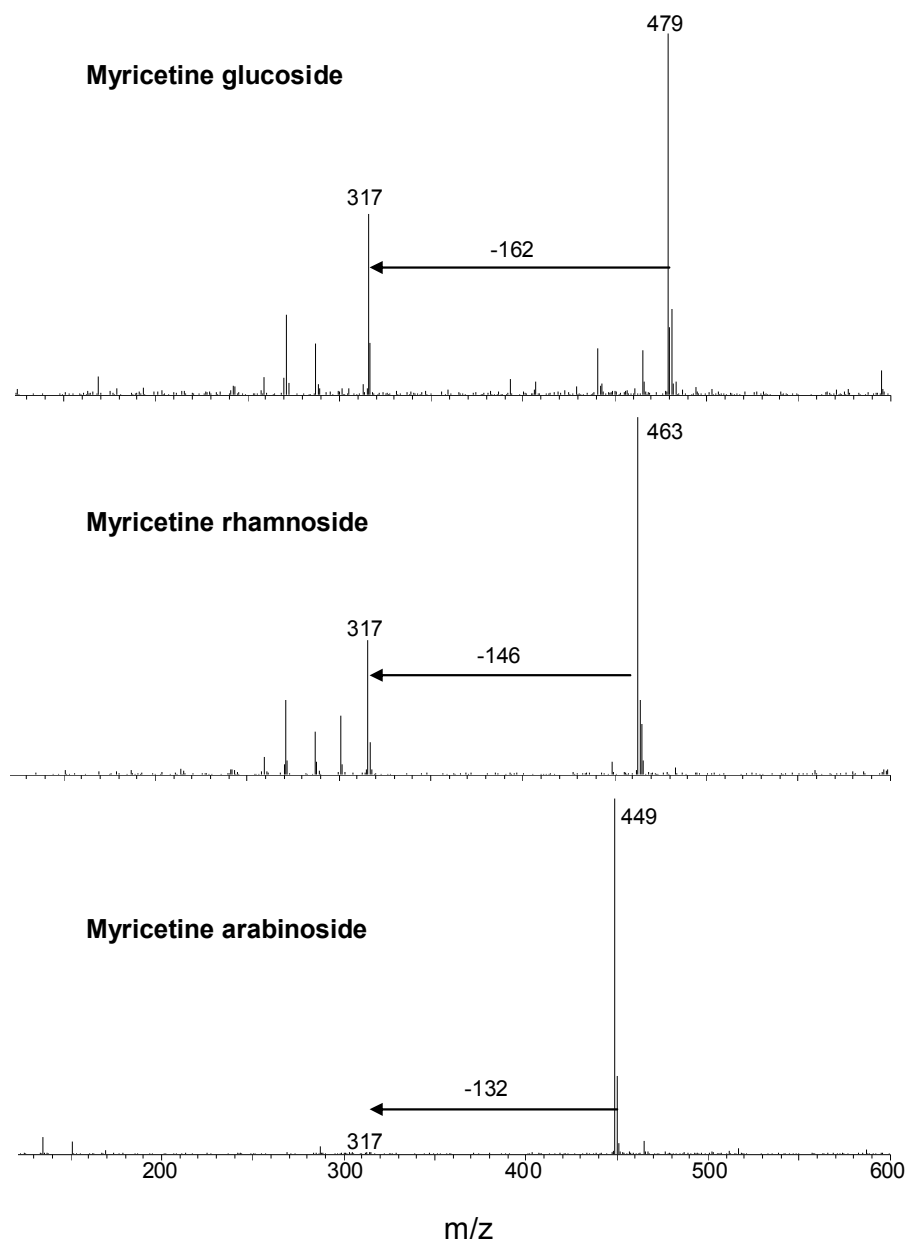


Figure 4.6 : Spectres de masse des glucosides de la myricetine.

IV.1.4. Conclusion

La teneur élevée en polyphénols et leur diversité structurale dans l'extrait de gousses vertes de caroube, en font un produit exceptionnel comme antioxydant naturel qui pourrait contribuer à la prévention de diverses pathologies. De plus, son utilisation comme coagulant du lait constitue une technologie originale. Les conditions optimales de la coagulation du lait par l'extrait de caroube doivent être définies par étude des rendements et de la cinétique de la réaction. Ce processus est, de plus, influencé par plusieurs facteurs comme les variations de température et de pH qui méritent d'être approfondis.

IV.2. Etude de la coagulation de différents laits avec l'extrait de caroube

IV.2.1. Rendements obtenus en fonction du volume d'extrait pour le lait de vache.

Le lait de vache est testé avec les deux extraits : extrait obtenu au laboratoire et extrait pressé traditionnellement. Les résultats sont donnés par les figures 4.7 et 4.8 (Tableaux 1 et 2 de l'annexe 4). L'ajout d'extrait de caroube au lait de vache s'accompagne de la formation d'un culot après centrifugation et ceci même à des faibles volumes d'extrait. La formation d'agrégats dans les mélanges protéines-polyphénols a déjà été observée (Van Buren et Robinson, 1969 ; Hagerman et Butler, 1981 ; Siebert et Lynn, 1998). La masse du coagulum obtenu augmente avec la quantité d'extrait du laboratoire ajouté de 783 mg à 3180 mg pour des volumes d'extrait allant de 250 μ L à 3000 μ L respectivement. De même, on a un gain de matière sèche du coagulum allant de 12,2% à 18%. Par contre, le taux de protéines du coagulum n'augmente pas de façon significative et reste relativement constant.

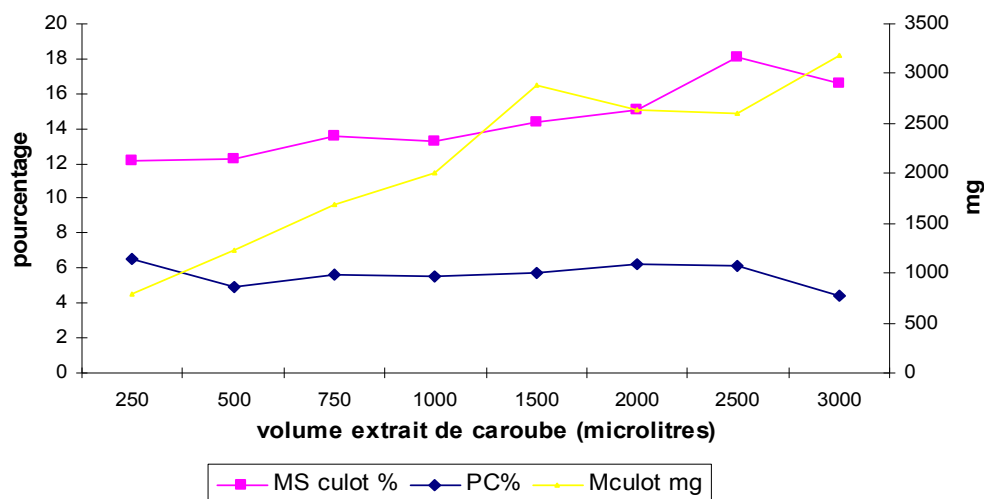


Figure 4.7: Etude du rendement de coagulation du lait de vache (masse de matière fraîche, teneur en matière sèche et protéines) en fonction du volume d'extrait de caroube ajouté (extrait laboratoire). Matière fraîche : M culot ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MS culot et PC.

Toutefois, il faut noter que, contrairement à la présure ou aux ferments lactiques, l'extrait de caroube apporte une quantité non négligeable de matière sèche et de protéines. Donc le lait et l'extrait de caroube apportent tous les deux de la matière sèche et des protéines. En effet, le lait se compose de 9,81% de matière sèche et 3,5% de protéines et l'extrait de caroube du laboratoire de 14,8% de matière sèche et 1,1% de protéines. Ainsi dans le coagulum obtenu, une certaine partie de la matière sèche et des protéines précipitées provient de l'extrait de caroube. Or ce qui nous intéresse le plus c'est d'obtenir la précipitation des protéines laitières sans trop ajouter de matière sèche provenant du caroube et constituée essentiellement de polysaccharides et de polyphénols. On peut calculer (tableau 1, annexe 4) que le volume d'extrait de caroube optimal à ajouter est de 1,5 mL (pour 5 mL de lait), pour lequel 87% des protéines et 59% de la matière sèche engagées dans la réaction sont précipitées. Les rendements rencontrés en fromagerie classique sont exprimés par des coefficients de récupération et diffèrent selon les types de fromage. Le coefficient de récupération le plus élevé en matières azotées est de 82,84% pour le fromage frais maigre à 13,5% de matière sèche (Mahaut et al., 2000a). Le rendement est donc de 4% supérieur dans le cas de la coagulation par l'extrait de caroube. Là, il faut considérer les protéines apportées par l'extrait de caroube (17 mg contre 177 mg apportés par le lait) qui sont non négligeables et qui peuvent précipiter.

Pour des volumes d'extraits supérieurs à 1,5 mL, les rendements en matière sèche et en protéines diminuent légèrement bien que la masse fraîche du culot augmente toujours. En effet, la quantité de précipité formé dépend des concentrations des polyphénols et des protéines dans la solution ainsi que du rapport polyphénols/protéines (Siebert et al., 1996). En présence d'un excès de polyphénols, tous les sites de liaison protéiques sont occupés, mais la complexation est faible, puisque les polyphénols ne trouveront plus d'autres sites de liaison libres. Ce qui conduit à des agrégats de petite taille et ainsi à un coagulum moins ferme et contenant davantage d'eau.

L'extrait traditionnel semble moins efficace que l'extrait du laboratoire (Figure 4.8). Comme le broyage manuel utilisant des pierres ne permet pas de récupérer tous les agents actifs obtenus par l'extracteur de jus, ces résultats sont tout à fait compréhensibles. Le rendement optimal n'est atteint que pour un volume de 3 mL d'extrait (tableau 2, annexe 4). Ceci s'explique par le fait que l'extrait traditionnel est beaucoup moins concentré en matière sèche (9%) et en protéines (0,1%) que l'extrait

du laboratoire. Ceci se traduit donc par une quantité moindre de polyphénols et donc une moins bonne efficacité à précipiter les protéines laitières.

Cependant, il est à remarquer que 92% des protéines engagées dans la réaction sont précipitées. Ces résultats peuvent indiquer la coagulation, par l'extrait de caroube, des protéines solubles (α -lactalbumine et β -lactoglobuline) qui ne sont pas récupérées dans les caillés présure.

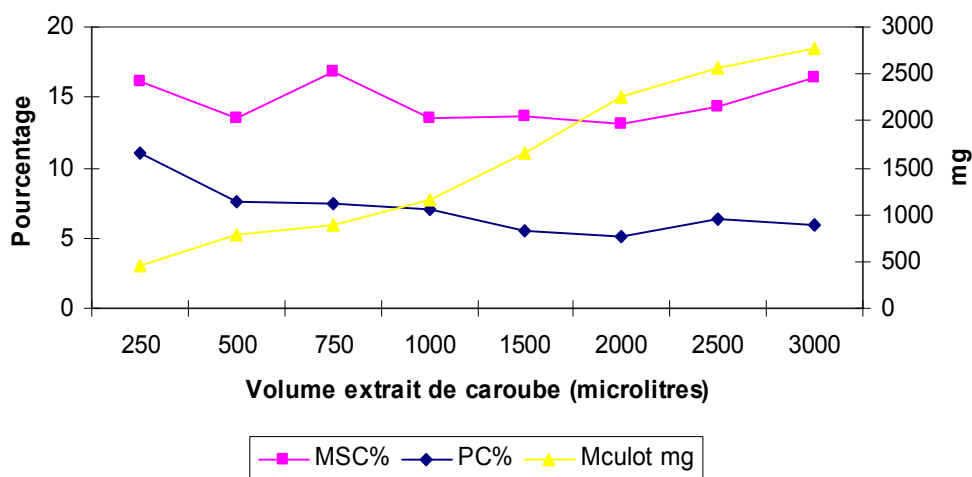


Figure 4.8: Etude du rendement de coagulation du lait de vache (masse de matière fraîche, teneur en matière sèche et protéines) en fonction du volume en extrait de caroube ajouté (extrait traditionnel). M culot : matière fraîche culot ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MS culot et PC

IV.2.2. Effet de la température sur la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube

L'effet de la température est mesuré en utilisant 3 mL d'extrait de caroube du laboratoire ajustés au pH du lait pour 5 mL de lait. Il a déjà été mis en évidence que l'augmentation de la température rompt les liaisons hydrogène, déroule les protéines et rend les sites hydrophobes plus accessibles aux liaisons hydrophobes avec les polyphénols (Siebert et al., 1996). Les essais de coagulation effectués à des températures allant de 15°C à 40°C ne montrent pas un changement du comportement de l'extrait de caroube en fonction de la température (Tableau 4.4). La masse fraîche

du culot ainsi que le taux de protéines du culot restent inchangés. Le dosage de l'azote non protéique du surnageant montre aussi qu'il n'y a aucun effet de la température.

Contrairement à la présure et aux ferments lactiques qui agissent à des températures optimales bien déterminées, l'effet de l'extrait de caroube est indépendant de la température d'incubation dans la gamme étudiée. Ce résultat tend à privilégier l'existence d'interactions hydrophobes entre protéines laitières et polyphénols du caroube puisque les sites hydrophobes des protéines laitières sont accessibles quelque soit la température.

Tableau 4.4 : Effet de la température sur les rendements de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.

Température (°C)	Masse fraîche culot (g)	Protéines (%)	Azote non protéique (%) (surnageant)
15	3,04 ± 0,03	5,4 ± 0,2	0,46 ± 0,04
20	3,09 ± 0,01	5,2 ± 0,1	0,47 ± 0,02
25	2,99 ± 0,08	5,1 ± 0,2	0,39 ± 0,04
30	3,08 ± 0,12	5,5 ± 0,7	0,52 ± 0,02
35	2,84 ± 0,18	5,0 ± 0,5	0,46 ± 0,03
40	3,07 ± 0,13	5,2 ± 0,1	0,47 ± 0,02

Un essai de coagulation est effectué avec, au préalable, l'ébullition de l'extrait de caroube pendant 10 min (Tableau 4.5). Les résultats montrent qu'il n'y a aucun effet de l'ébullition de l'extrait sur les rendements en matière fraîche, en matière sèche et en protéines. Comme l'ébullition a pour but l'inactivation de tout type d'enzyme qui peut être présent dans l'extrait de caroube, ceci confirme que la réaction qui provoque la coagulation des protéines laitières n'est pas un phénomène enzymatique.

Tableau 4.5 : Effet de l'ébullition sur les rendements de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube.

	Sans ébullition	10 min ébullition
Masse fraîche culot (g)	3,27 ± 0,06	3,15 ± 0,04
Matière sèche (%)	16,62 ± 0,38	16,66 ± 0,31
Protéines (%)	4,41 ± 0,21	3,91 ± 0,75
Azote non protéique (%) (surnageant)	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,04

IV.2.3. Cinétique de coagulation

Une des questions soulevées par l'étude du complexe protéines laitières-extrait de caroube concerne l'évolution de ce complexe au cours du temps. Les caractéristiques des coagulums ont été observées à différents temps de réaction (Tableau 4.6). On peut constater que la réaction entre les protéines laitières et les polyphénols du caroube est très rapide et quasi instantanée. Dès 2,5 min l'agrégation est presque complète avec un culot de 2,84 g où l'on retrouve 50% de la matière sèche totale engagée et 73% des protéines totales engagées.

Cependant, on observe de légères variations suivant les différents temps de réaction. Les meilleurs rendements sont situés à un temps de 15 min avec un culot de 3,69 g où 57% de la matière sèche est précipitée et 88% des protéines. Des échanges entre le culot et le milieu extérieur qu'on peut nommer sérum semblent se produire. Jusqu'à 15 min, on observe une augmentation de la masse du culot avec diminution des pourcentages de matière sèche et de protéines, ce qui indique une augmentation de l'hydratation du culot. Après 15 min, au contraire, la diminution de la masse du culot avec augmentation des pourcentages de matière sèche et de protéines indique en une deuxième étape, une réorganisation des liaisons entre protéines et polyphénols et un rejet d'eau, donc un certain raffermissement du coagulum obtenu.

Tableau 4.6 : Cinétique de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube. Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

Temps de réaction (min)	MFC (g)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
2,5	2,84 ± 0,13	16,07 ± 0,01	5,40 ± 0,16	50,20	72,92
5	3,36 ± 0,02	15,02 ± 0,07	5,14 ± 0,05	55,43	82,02
10	3,20 ± 0,15	14,49 ± 0,40	5,06 ± 0,20	50,10	76,83
15	3,69 ± 0,07	14,07 ± 0,10	5,06 ± 0,10	56,95	88,53
30	2,52 ± 0,06	16,08 ± 0,07	6,11 ± 0,20	44,42	73,01
45	2,75 ± 0,08	16,26 ± 0,29	6,17 ± 0,20	49,04	80,45
60	2,63 ± 0,06	16,32 ± 0,08	6,15 ± 0,17	47,17	76,89

IV.2.4. Effet du pH sur la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube

La caséine, qui constitue 80% des protéines du lait, et les polyphénols, sont tous deux sensibles au pH. L'évolution des rendements obtenus par la complexation protéines laitières – polyphénols du caroube à différents pH est donnée par le tableau 4.7. Pour toutes les valeurs de pH, on a une bonne précipitation protéique allant de 85 à 99%. Mais la précipitation est maximale (99,27%) à pH 6. Pour des valeurs de pH inférieures à 6, on a une diminution progressive jusqu'à moins de 90% à pH 3. A des pH acides, la modification de la charge de la caséine doit induire d'importantes modifications de sa structure et de la polarité de ses acides aminés (Sausse, 2003). Ces modifications pourraient être à l'origine des diminutions du pourcentage de protéines précipitées observées à des pH bas. Or on sait qu'à leur pI (4,6), les protéines ont une structure plus compacte avec moins de groupements hydrophobes accessibles et moins de sites de complexation. De même, on a une diminution pour les pH supérieurs à 6, qui atteint 85,75% à pH 10. Cette diminution est notable à partir de pH 8. Ceci est à lier avec les pKa des différents polyphénols de l'extrait de caroube situés

à des valeurs entre 7 et 9. Au dessus du pKa les polyphénols existent sous leur forme basique et des répulsions électrostatiques s'établissent entre protéines et polyphénols.

Contrairement aux protéines, la matière sèche n'est que légèrement affectée par les variations de pH. La matière sèche des culots est variable entre 60 et 67% de la matière sèche totale engagée avec une stabilisation aux alentours de 62% pour une large gamme de pH allant de 4 à 9. Cela laisse penser que les composants de la matière sèche du lait et de l'extrait de caroube, outre les protéines et les polyphénols, sont peu influencés par le pH du milieu.

Tableau 4.7 : Effet du pH de l'extrait de caroube sur les rendements de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube. Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvée dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

pH	MFC (g)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
2	2,83 ± 0,02	19,52 ± 0,01	6,90 ± 0,20	60,59	92,64
3	3,13 ± 0,02	19,31 ± 0,10	6,02 ± 0,08	66,42	89,52
4	3,16 ± 0,00	17,92 ± 0,55	6,36 ± 0,17	62,16	95,37
5	3,32 ± 0,03	17,09 ± 0,31	6,20 ± 0,05	62,27	97,65
6	3,41 ± 0,04	16,71 ± 0,52	6,14 ± 0,12	62,50	99,27
7	3,27 ± 0,15	17,13 ± 0,95	6,15 ± 0,05	61,46	95,39
8	3,05 ± 0,00	18,54 ± 0,10	6,28 ± 0,05	62,13	90,97
9	3,48 ± 0,07	16,22 ± 0,89	5,22 ± 0,51	61,94	86,17
10	3,84 ± 0,11	16,02 ± 0,24	4,70 ± 1,06	67,61	85,75

IV.2.5. Comparaison de la coagulation de différents laits par l'extrait de caroube

Des laits provenant de différentes origines ont pu être testés : vache, chèvre, brebis, chamelle et lait de soja. Ces laits diffèrent essentiellement par leur teneur en matière sèche qui peut aller de 7 à 13% et leur concentration en protéines (2,4 à 6%, Matériel et Méthodes). Tous les laits testés réagissent avec l'extrait de caroube pour donner des coagulums qui diffèrent par leur masse fraîche (Figure 4.9) et par leur contenu en matière sèche et en protéines (Tableaux 3-4-5-6 en annexe 4).

Pour le lait de chèvre (Figure 4.9 et tableau 3 de l'annexe 4), le plus gros culot atteint est de 2530 mg et reste toutefois inférieur à celui atteint dans le cas du lait de vache (3180 mg). Ceci est tout à fait compréhensible car en comparaison avec le lait de vache, le lait de chèvre testé présente des teneurs moindres en matière sèche et en protéines, 7,92% et 2,40% respectivement, contre 9,81% et 3,54% pour le lait de vache. Par contre, la récupération des protéines est quasi totale avec plus de 99% des protéines engagées se retrouvant dans le culot (contre 87% pour le lait de vache). Là,

il convient de noter que le lait de chèvre diffère très sensiblement du lait de vache par sa composition en protéines (Parkash et Jenness, 1968 ; Jenness, 1980). Les protéines du lait de chèvre sont constituées de 71% de caséines, de 22% de protéines sériques, dites solubles, et de 7% d'azote non protéique. Comparativement au lait de vache, le lait de chèvre contient donc moins de caséines mais plus de protéines sériques et d'azote non protéique. De plus, le lait de chèvre se caractérise par un pourcentage élevé de caséines solubles (de 10 à 20% contre 1% pour le lait de vache). On peut en déduire une plus grande accessibilité des sites de liaison protéiques pour les polyphénols, ce qui contribue à provoquer la précipitation totale des protéines.

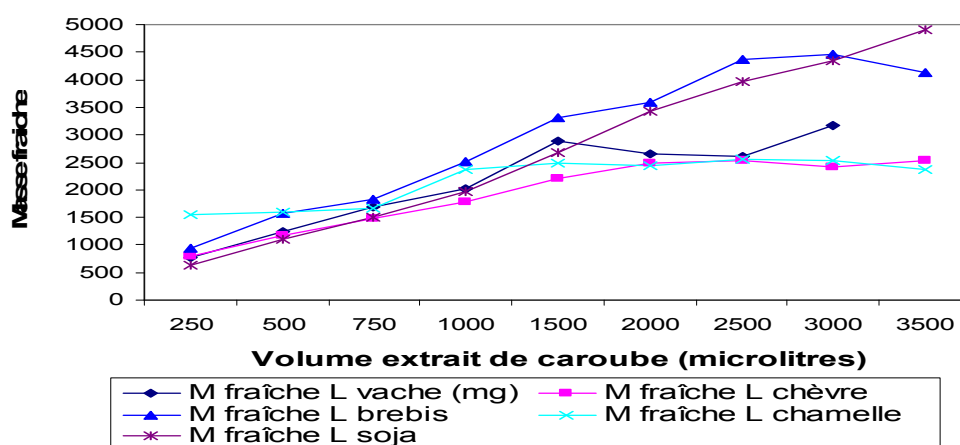


Figure 4.9 : Evolution de la masse fraîche des coagulums obtenus par l'action de l'extrait de caroube sur 5 mL de différents laits (vache, chèvre, brebis, chamelle et soja).

Pour le lait de brebis (Figure 4.9 et tableau 4 de l'annexe 4), les culots obtenus sont de taille élevée et on atteint au maximum une masse fraîche de 4470 mg, supérieure à celles obtenues pour les laits de vache et de chèvre. Par contre la teneur en protéines de ces culots est faible et reste de l'ordre de 3 à 4% alors que dans le cas du lait de vache et de chèvre les teneurs en protéines des culots sont de l'ordre de 5 et de 6%. Or le lait de brebis est plus riche en protéines (6,1%) que les laits de vache et de chèvre (respectivement 3,5% et 2,4%). Il semble donc que les protéines du lait de brebis sont moins bien récupérées dans le coagulum avec au maximum 49% des protéines engagées dans la réaction qui précipitent, nécessitant un volume énorme d'extrait de caroube (3500 μL). Les coagulums sont peu denses et riches en eau. A

l'inverse, on peut noter que dans le cas d'une coagulation par la présure, le lait de brebis coagule plus vite et donne un coagulum plus ferme que le lait de vache.

Le lait de chamelle (Figure 4.9 et tableau 5 de l'annexe 4) présente de très bons rendements en matière sèche et en protéines (85% et 83% respectivement). Les rendements sont élevés même avec de faibles concentrations en extrait de caroube. Or on sait qu'il est très difficile de fabriquer du fromage à partir du lait de chamelle et ceci n'est possible qu'en employant de très fortes doses de présure (Ramet, 2001). Là, l'extrait de caroube pourrait jouer le rôle de substitut de la présure. Les culots obtenus (2570 mg) sont plus faibles que dans le cas du lait de vache et plutôt comparables aux culots obtenus dans le cas du lait de chèvre. Par contre, les culots formés se caractérisent par une matière sèche très élevée oscillant entre 21 et 27% et une concentration en protéines allant de 4,3 à 8%. Les culots sont donc moins gros que pour les autres laits mais sont par contre moins hydratés et présentent donc une bonne récupération des protéines et de la matière sèche.

Le lait de soja réagit mal avec l'extrait de caroube (Figure 4.9 et tableau 6 de l'annexe 4). Bien qu'il présente une teneur en protéines non négligeable (3,3%) et proche de celle du lait de vache, la teneur en protéines du culot reste de l'ordre de 1% et on arrive à précipiter au maximum 20% des protéines engagées. Les masses de culots frais vont en augmentant en fonction du volume d'extrait ajouté alors que le pourcentage de protéines va en diminuant de 3% à moins de 1%. Les culots qui atteignent une masse de 4900 mg sont constitués en majorité de la matière sèche de l'extrait de caroube et d'eau puisque 75% de la matière sèche engagée est précipitée pour une teneur en matière sèche de 13% et une teneur en protéines de 0,9%. On peut conclure que les protéines du lait de soja qui ne sont pas des caséines ne sont pas aptes à la coagulation par l'extrait de caroube. Alors qu'il est reconnu que la fabrication de tofu à partir du lait de soja s'effectue avec un bon rendement de 1 kg de tofu pour 4 litres de lait de soja et avec des teneurs de 14,3% en matière sèche et 8,4% en protéines (Beddows et Wong, 1987).

IV.2.6. Comparaison de la coagulation du lait de vache par l'extrait de caroube à la coagulation par la présure ou par fermentation lactique

IV.2.6.1. Effets comparés de la présure, de l'extrait de caroube et de la combinaison présure – extrait de caroube.

Il convient de noter tout d'abord que le test effectué avec la présure engage seulement 177 mg de protéines et 491 mg de matière sèche qui correspondent aux protéines et à la matière sèche apportées par le lait (5 mL) alors que pour les autres tests s'ajoutent les protéines (34 mg) et la matière sèche (420 mg) apportées par 3 mL d'extrait de caroube. Le tableau 4.8 présente les résultats concernant les caractéristiques des coagulum obtenus dans quatre conditions de coagulation.

L'échantillon lait + extrait de caroube correspond à une quantité de 911 mg de matière sèche. La même quantité de matière sèche peut être apportée par 9,3 mL de lait qui ne donnerait qu'un culot de 984 mg de matière fraîche par coagulation présure, ce qui reste très inférieur au culot obtenu avec l'extrait de caroube (3020 mg). Le culot obtenu avec l'extrait est équivalent à la coagulation de 28 mL de lait par la présure. Par contre, le culot contient beaucoup moins de matière sèche (2 fois moins), ce qui joue sur la texture du culot qui doit être proche d'un caillé lactique riche en eau.

Si l'extrait est apporté en même temps que la présure, tout se passe comme s'il n'y avait que l'extrait. En effet, les rendements en masse de culot frais, en pourcentage de matière sèche et de protéines sont semblables dans les deux cas. Donc quand ils sont ajoutés en même temps, seul l'extrait de caroube semble agir et la présure n'a aucun effet remarquable. La réaction de complexation est immédiate et prend le pas sur la réaction enzymatique. La présure semble inhibée par les polyphénols. Si la présure est apportée en premier, l'extrait de caroube permet d'augmenter le culot et l'on passe de 532 à 1870 mg en masse fraîche. La teneur en matière sèche et en protéines de ce culot est supérieure à celles obtenues avec l'extrait de caroube seul. On n'obtient pas un culot aussi important qu'avec l'extrait de caroube seul mais plus important qu'avec la présure seule ce qui prouve que les protéines sériques qui demeurent solubles après action de la présure peuvent être complexées par l'extrait de caroube.

Tableau 4.8: Comparaison des rendements (matière fraîche, matière sèche et protéines) des traitements caroube et présure du lait de vache.

Traitement	Caroube	Présure	Présure+caroube (en même temps)	Présure (1h) puis caroube
Masse fraîche culot (mg)	3020 ± 21	532 ± 26	2973 ± 101	1870 ± 59
Quantité MS engagée (mg)	911	491	911	911
Quantité P engagée (mg)	210,7	177	210,7	210,7
MSC (%)	16,5 ± 0,8	34,3 ± 1,1	16,2 ± 0,1	20,7 ± 0,7
PC (%)	5,5 ± 0,5	27,4 ± 1,4	4,4 ± 0,4	6,7 ± 0,9
MSC/MST (%)	54,7	37,1	52,9	42,5
PC/PT (%)	78,8	82,4	62,6	59,2
Azote non protéique (%) (surnageant)	0,53±0,02	0,13±0,01	0,55±0,01	0,57±0,01

On sait cependant que les protéines sériques sont moins bons substrats pour les polyphénols que les caséines et en particulier la caséine β qui est très riche en résidus proline. En effet, les protéines sériques contiennent peu de proline et de ponts disulfure intramoléculaires qui structurent davantage la protéine. L'extrait de caroube agit donc sur le lait en privilégiant d'abord l'action sur la caséine β , ce qui doit entraîner la coagulation de l'ensemble des protéines par déstructuration des micelles, puis en précipitant les protéines sériques. Toutefois si l'on observe les résultats des pourcentages de protéines précipitées, les rendements pour les expériences avec présure et extrait de caroube à la fois sont moindres que ceux avec présure ou extrait de caroube seuls. En effet, on a à peu près 60% de protéines précipitées, alors qu'on a 79% dans le cas de l'extrait de caroube seul et 82% dans le cas de la présure seule. Cela nous amène à penser que l'extrait de caroube et la présure s'inhibent simultanément, peut-être parce qu'ils agissent sur le même substrat que sont les protéines laitières. Les coagulums obtenus par action de la présure ou de l'extrait de caroube ont une organisation de leur réseau différente. Une étude de la synérèse de ces coagulums et des tests rhéologiques vont nous permettre de compléter la comparaison.

IV.2.6.2. Etude de la synérèse dans les cas de traitements du lait de vache par l'extrait de caroube, la présure et les ferments lactiques.

Le comportement des différents coagulums a été étudié, en contrôlant le volume du sérum égoutté sur toile pendant 48 heures. Le tableau 4.9 donne les résultats jusqu'à 60 min, car après ce temps ci, l'égouttage semble terminé et les volumes de lactosérum n'augmentent plus. Il est à remarquer que dans le cas de la coagulation avec l'extrait de caroube, l'égouttage est très rapide et prend fin dès 30 min. La synérèse est de 16,7% dans le cas de l'extrait de caroube, très inférieure à la synérèse du caillé présure (50,5%) et celle du caillé lactique (44,7%). En conséquence on a un gros culot dans le cas de l'extrait de caroube (83 g) en comparaison avec le culot présure (30 g) et le culot lactique (37 g). Ce gros culot est dû aussi en partie aux 30 mL d'extrait de caroube qui apportent de la matière sèche et des protéines s'ajoutant à celles du lait.

Tableau 4.9 : Comparaison des volumes de sérum égoutté, de la synérèse et des rendements du lait de vache (matière fraîche, matière sèche et protéines) des traitements caroube, présure et ferments lactiques.

Traitement	Extrait de caroube	Présure	Ferments lactiques
Volume sérum (mL)			
à 30 min	21,67 ± 0,47	35,67 ± 2,36	35,00 ± 0,00
Volume sérum (mL)			
à 60 min	21,67 ± 0,47	53,00 ± 1,41	45,00 ± 0,00
Synérèse (%)	16,67	50,48	44,67
MFC (g)	83,47 ± 0,80	30,53 ± 0,70	36,66 ± 0,53
MSC (%)	18,85 ± 0,18	30,48 ± 0,81	24,64 ± 2,33
PC (%)	4,46 ± 0,06	10,46 ± 0,09	9,02 ± 0,70
MSC/MST (%)	89,19	72,94	67,21
PC/PT (%)	96,01	90,51	88,96

L'égouttage est un phénomène complexe et encore mal connu. Cependant la synérèse est commandée par la contraction du gel et son aptitude à laisser le lactosérum occlus s'écouler (Mahaut et al., 2000a). Le gel lactique présente une forte perméabilité car il est constitué d'un réseau de caséines déminéralisées. L'écoulement du sérum reste toutefois faible en l'absence de liaisons susceptibles de créer des forces de contraction. Par contre, dans le gel présure, des liaisons calciques électrostatiques et hydrophobes conduisent à une rétractation du gel qui se manifeste par une expulsion importante de lactosérum (Mahaut et al., 2000a). A la différence des gels présure et lactique, le gel obtenu par l'extrait de caroube est constitué, en plus des protéines laitières, de polyphénols apportés par l'extrait de caroube. Ces composés ont une capacité de rétention d'eau élevée qui explique la forte hydratation du coagulum formé avec l'extrait de caroube. De même, l'effet de cet apport en matière sèche et en protéines de l'extrait de caroube est aussi constaté sur les pourcentages de matière sèche et de protéines récupérés dans le culot.

IV.2.7. Conclusion

Il semble qu'on puisse tirer un schéma général de l'effet de l'extrait de caroube sur le lait. L'extrait de caroube agit sur le lait et provoque la formation d'un coagulum, quelque soit la quantité d'extrait ajouté. Cependant, une quantité optimale d'extrait de caroube permet de récupérer la majorité des protéines et de la matière sèche laitières. Ceci est sûrement à lier avec les caractéristiques de l'interaction protéines laitières – polyphénols de l'extrait de caroube qui dépendent des concentrations relatives des deux substrats dans le milieu. Ce phénomène est observable que ce soit dans le cas de l'extrait de caroube pressé au laboratoire ou l'extrait obtenu par pressage traditionnel.

Dans l'ensemble, les effets des conditions du milieu confirment l'hypothèse selon laquelle la coagulation du lait par l'extrait de caroube est due aux polyphénols et non aux enzymes. Effectivement, l'extrait de caroube ne montre aucune variation de son comportement vis-à-vis de la coagulation du lait avec les changements de température. Même une ébullition de l'extrait de caroube visant à inactiver toute action enzymatique n'arrive pas à altérer les propriétés de l'extrait de caroube. Il est par contre clair que le pH joue un rôle important dans la coagulation avec une coagulation optimale à pH 6. Le coagulum obtenu semble se raffermir avec le temps, probablement par réarrangements entre protéines et polyphénols, et la création de nouvelles liaisons. Ceci s'accompagne par l'exsudation d'eau et la diminution de l'hydratation.

L'effet de l'extrait de caroube est très variable suivant les laits utilisés. On obtient de très bons résultats avec le lait de chèvre et le lait de chamelle alors que l'extrait n'est pas aussi efficace avec le lait de brebis et le lait de soja. En outre, le gel obtenu est difficilement comparable aux gels présure et lactique. Le culot reste beaucoup plus hydraté, avec synérèse moindre. Ceci conduit nécessairement à une texture du coagulum différente que les tests rhéologiques permettraient de confirmer.

IV.3. Tests rhéologiques des coagulums obtenus par le traitement du lait de vache avec l'extrait de caroube

IV.3.1. Tests effectués avec le rhéomètre

IV.3.1.1. Test de coagulation

La formation des coagulums est suivie à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée après dépôt immédiat sur le module cône-plan de l'appareil du mélange constitué par le lait et l'extrait de caroube ou la présure ou les deux. La figure 4.10 illustre l'enregistrement des différents paramètres obtenus en régime harmonique (force oscillante de 0,07 Pa à la fréquence de 0,1 Hz appliquée pendant 30 min) : les modules conservatif G' , dissipatif G'' et le déphasage ϕ . Le processus de coagulation peut être caractérisé en déterminant le temps nécessaire pour obtenir soit $G' = G''$ soit $G' = 1$ Pa. Les paramètres obtenus dans différentes conditions de coagulation sont rassemblés dans le tableau 4.10.

Dans le cas du lait pasteurisé coagulé par de la présure, on obtient $G' = G''$ en $658 \text{ s} \pm 46 \text{ s}$ et $G' = 1$ Pa en $748 \text{ s} \pm 82 \text{ s}$. Aucune mesure n'est possible dans le cas du lait UHT mis en présence de présure. Il n'y a pas de coagulation et les modules G' et G'' n'augmentent pas. Il n'y a pas non plus de mesure possible du temps de coagulation avec l'extrait de jus de caroube car G' et G'' sont déjà trop élevés au début de l'expérience (Figure 4.11). Le gel est déjà formé et la coagulation est instantanée, dès la mise en contact des protéines laitières avec les polyphénols de l'extrait de caroube.

A l'inverse, la coagulation est également permise lorsque le lait pasteurisé est mis en présence à la fois de présure et d'extrait de jus de caroube mais dans ce cas, la coagulation est tantôt accélérée ou retardée (Figure 4.12, tableau 4.10). On observe dans le cas de la coagulation du lait par l'extrait de caroube que G' est toujours supérieur à G'' indiquant ainsi un comportement rhéologique de type gel. G' est en constante augmentation au cours du temps (Figure 4.11). Ceci prouve que le gel poursuit sa stabilisation avec des réarrangements du réseau protéines-polyphénols (Fizman et al., 1999). Ceci peut être comparé aux caillés présure où l'augmentation du module élastique G' s'explique par l'augmentation de la taille des agrégats et du nombre de liaisons entre agrégats avec fusion partielle des agrégats (Esteves et al., 2002).

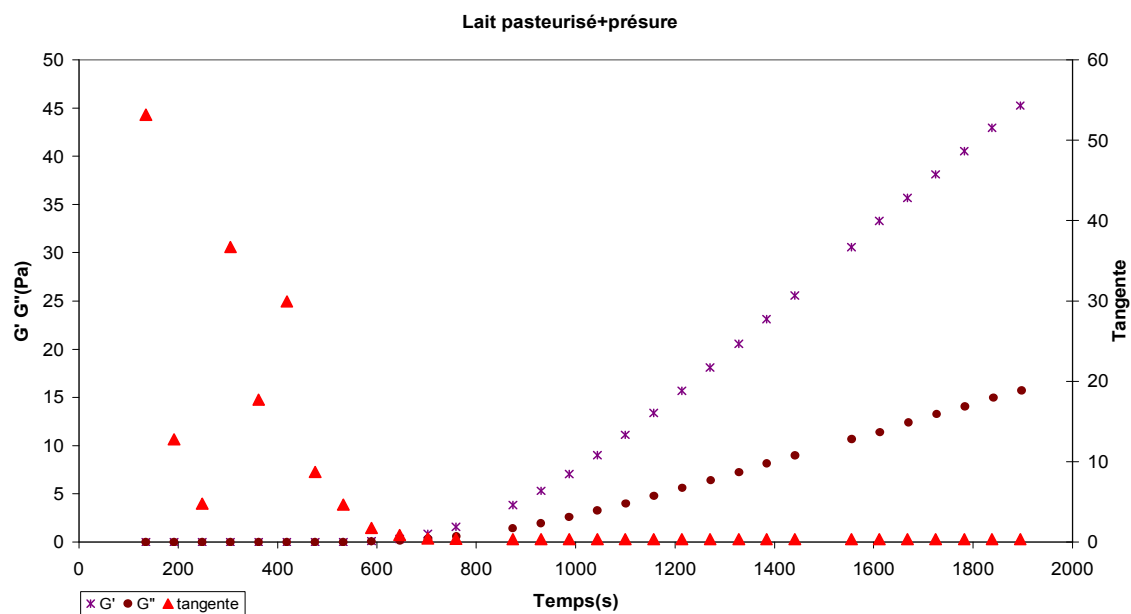


Figure 4.10 : Evolution du module conservatif G' , du module dissipatif G'' et du déphasage (tangente δ) au cours du temps lors de la coagulation du lait pasteurisé avec la présure.

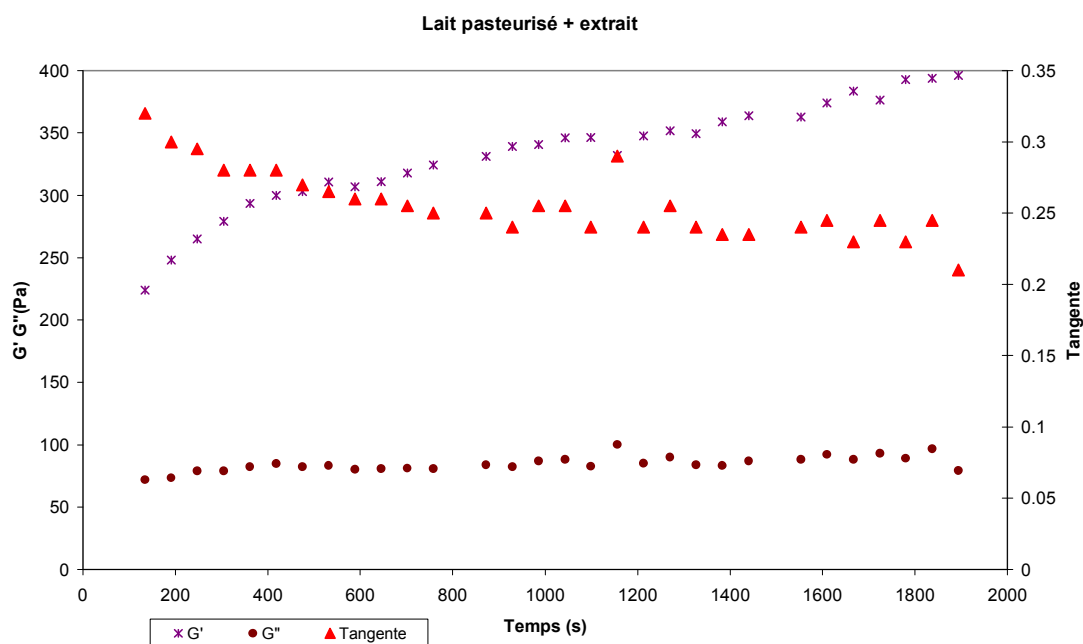


Figure 4.11 : Evolution du module conservatif G' , du module dissipatif G'' et du déphasage (tangente δ) au cours du temps pour la coagulation du lait pasteurisé avec l'extrait de caroube.

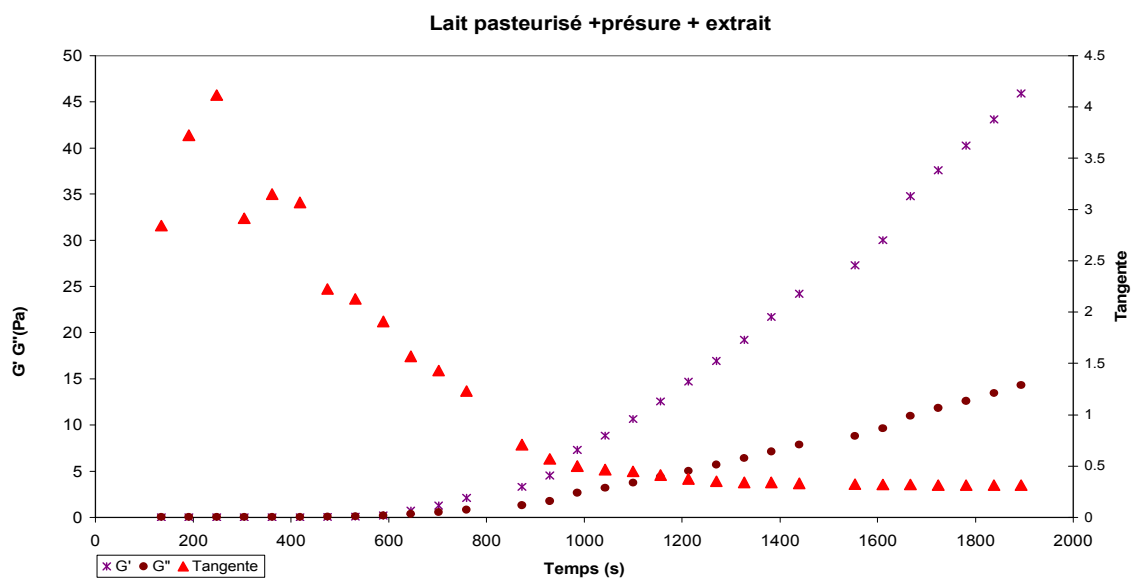


Figure 4.12 : Evolution du module conservatif G' , du module dissipatif G'' et du déphasage (tangente δ) au cours du temps pour la coagulation du lait pasteurisé conjointement avec l'extrait de caroube et la présure.

Tableau 4.10 : Test de coagulation réalisé à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée (module conservatif G' , module dissipatif G'' et tangente de l'angle de déphasage tangente δ)

	$G'=1\text{Pa}$		$G'=G''$		Tangente δ	
past + 600 μl présure	723	748,3	651	658,3	0,35	0,347
past + 600 μl présure	840	$\pm 82,0$	708	$\pm 46,4$	0,35	$\pm 0,006$
past + 600 μl présure	682		616		0,34	
past +1000 μl extrait	*		*		0,26	
past +1000 μl extrait	*		*		0,25	
past +1500 μl extrait	*		*		0,23	
past +1500 μl extrait	*		*		0,19	0,237
						$\pm 0,026$
UHT + 1000 μl extrait	*		*		0,26	
UHT + 1500 μl extrait	*		*		0,25	
UHT + 1500 μl extrait	*		*		0,22	
past + prés + extrait	1123		952		0,32	
past + prés + extrait	663		576		0,31	0,297
						$\pm 0,032$
UHT + prés + extrait	*		*		0,26	
Yaourt					0,240	
						$\pm 0,006$

Si l'on considère le paramètre correspondant à tangente $\delta=G''/G'$ (tableau 4.10), on s'aperçoit qu'il est de 0,347 dans le cas du lait avec présure, 0,237 dans le cas du lait avec l'extrait de caroube et intermédiaire 0,297 dans le cas du mélange présure et extrait avec le lait. Le même paramètre a été déterminé dans le cas de yaourts préparés à la ferme de Grignon avec du lait pasteurisé: $0,240 \pm 0,006$. Si l'expérience est conduite sur des temps longs d'oscillation (4 h), la différence entre les valeurs de tangente δ est toujours visible : 0,35 pour le lait avec présure, 0,19 pour le lait avec l'extrait et 0,26 pour le lait en présence de présure et d'extrait. Le paramètre tangente δ reflète les interactions existant dans les gels entre les caséines et l'équilibre entre les forces d'attraction et de répulsion. Il est toujours élevé dans le cas de gels présure (Lucey et al.

2000, Esteves et al. 2002) et diminue lorsque la coagulation est effectuée avec des protéases végétales (Esteves et al. 2002), lorsqu'une coagulation acide est associée ou lorsque le lait a subi un traitement thermique (Lucey et al. 2000). D'après ces auteurs, la diminution de tangente δ traduirait une diminution des interactions entre les particules de caséines, une solubilisation partielle du phosphate de calcium colloïdal et une moindre aptitude à la synérèse. Nos résultats montrent effectivement une différence de structure des réseaux des coagulum, avec des interactions fortes dans les coagulum présure et plus faibles dans les coagulum obtenus avec l'extrait de caroube. Ces coagulum se rapprocheraient davantage des gels obtenus par fermentation lactique.

IV.3.1.2. Test de visco-écoulement

Le test s'effectue en régime permanent avec une vitesse de cisaillement constante (10 s^{-1}) et mesure de la viscosité apparente après 180 s. Ce test a été conduit sur les coagulum obtenus à partir d'extrait de jus de caroube sur différents laits : lait pasteurisé, lait UHT, lait en poudre reconstitué, lait pasteurisé congelé et comparé aux résultats obtenus avec du lait pasteurisé mis en présence de présure (tableau 4.11).

On constate que la viscosité apparente est voisine pour les coagulum obtenus avec le lait pasteurisé, le lait UHT et le lait congelé. Elle est plus forte dans le cas du lait en poudre reconstitué et encore plus importante dans le cas d'un coagulum présure. Les valeurs de tangente δ sont voisines pour tous les coagulum obtenus avec l'extrait de caroube et toujours plus faibles que dans le cas du coagulum présure comme précédemment.

Tableau 4.11 : Test de visco-écoulement permettant de mesurer la viscosité apparente et le déphasage de différents coagulums.

Echantillon	Tangente δ		Viscosité apparente (Pa.s)	
Lait pasteurisé	0,21	$\pm 0,02$	0,58	$\pm 0,20$
Lait UHT	0,20	$\pm 0,02$	0,64	$\pm 0,20$
Lait en poudre	0,22	$\pm 0,01$	1,11	$\pm 0,22$
Lait congelé	0,21	$\pm 0,01$	0,66	$\pm 0,22$
Lait + présure	0,33		1,59	

La viscosité complexe mesurée en régime harmonique a pu être obtenue sur tous ces échantillons sauf sur les échantillons provenant de lait en poudre reconstitué. Là encore, la viscosité complexe des échantillons obtenus par action de l'extrait de caroube est plus faible que celle du coagulum présure : $\eta^* = 21,9$ Pa.s pour le lait pasteurisé, 27,9 Pa.s pour le lait UHT, 19,2 pour le lait congelé et 31,2 pour le coagulum présure.

IV.3.2. Résultats obtenus avec le pénétromètre (profil de texture)

Des profils de texture ont été obtenus à partir de coagulums obtenus par coagulation de différents types de lait (lait pasteurisé, lait UHT, lait congelé, lait en poudre reconstitué) avec l'extrait de caroube et comparés à ceux obtenus avec des coagulums présure. Un volume plus important (22 mL) est nécessaire pour ces expériences. Un certain nombre de paramètres ont été retenus (Tableau 4.12). On s'aperçoit que la reproductibilité (3 répétitions) est relativement bonne.

Tableau 4.12: Paramètres obtenus à partir des profils de texture des coagulums caroube et présure.

Echantillon	Résultat	Dureté F2	Cohésion A4-5/A1-2	Adhérence A3-4	Elasticité T5-T4/T2	aspect gommeux cohésion×F2	masticabilité élasticité×gomm	résilience A2-3/A1-2
Lait pasteurisé	Moy ET	0,192 0,004	0,663 0,075	- 0,025 - 0,018	0,985 0,022	0,127 0,017	0,126 0,019	0,140 0,032
Lait UHT	Moy ET	0,214 0,030	0,547 0,121	- 0,029 - 0,004	1,000 0,022	0,120 0,040	0,119 0,038	0,191 0,140
Lait congelé	Moy ET	0,302 0,109	0,564 0,063	- 0,113 - 0,100	0,984 0,034	0,166 0,047	0,163 0,042	0,108 0,053
Lait en poudre	Moy ET	0,314 0,023	0,524 0,024	- 0,163 - 0,020	0,929 0,007	0,164 0,007	0,153 0,007	0,073 0,021
Lait pasteurisé + présure	Moy ET	1,089 0,021	0,370 0,049	- 0,043 - 0,006	1,044 0,083	0,404 0,059	0,425 0,095	0,367 0,178
Lait congelé + présure	Moy ET	1,116 0,179	0,318 0,013	- 0,092 - 0,030	1,047 0,075	0,356 0,070	0,374 0,088	0,287 0,092

Les coagulums caroube diffèrent foncièrement des coagulums présure pour ce qui est de la dureté et de la cohésion et par conséquent pour l'aspect gommeux et la masticabilité qui en découlent. Les coagulums caroube se caractérisent par une dureté beaucoup plus faible et une cohésion plus forte que les coagulums présure et la différence est significative. L'aspect gommeux et la masticabilité des coagulums présure sont plus importants. A l'inverse, l'élasticité est comparable. L'indice de résilience de même que l'adhérence sont plus difficilement interprétables en raison de la forte hétérogénéité des résultats. Il est à noter que la présure est capable d'agir sur un lait préalablement conservé au congélateur.

IV.3.3. Conclusion concernant les caractéristiques des coagulums obtenus avec l'extrait de caroube

Les caractéristiques rhéologiques des coagulums caroube et présure sont très différentes.

- Il n'y a pas de coagulation au sens strict quand on mélange du lait en présence d'extrait de caroube. La précipitation des protéines laitières est quasi instantanée ce qui interdit de pouvoir mesurer un temps de coagulation. Par contre cette précipitation existe quel que soit le type de lait utilisé même après un traitement thermique interdisant une coagulation enzymatique par la présure.
- Le paramètre tangente δ semble un bon indicateur pour différencier les différents coagulums obtenus. Ce paramètre reflète l'état des liaisons protéine-protéine au sein de la micelle de caséine et l'équilibre entre les forces de répulsion et d'attraction (Lucey et al., 2000). Un gel susceptible de se réarranger au cours d'un phénomène de synérèse présente une valeur de tangente δ plus forte (Esteves et al., 2002) ce qui est le cas d'un coagulum présure. Le coagulum caroube se rapproche davantage d'un coagulum lactique pour ce paramètre.

Les coagulums caroube et présure se distinguent également par d'autres paramètres. Le coagulum caroube présente une viscosité apparente et une dureté plus faible et une cohésion plus importante que le coagulum présure. Ces résultats sont sans doute à mettre en lien avec les teneurs en eau différentes dans les 2 types de coagulum.

IV.4. Mécanisme d'action des polyphénols sur les protéines

IV.4.1. Effet sur le diamètre hydrodynamique

Les diamètres hydrodynamiques des micelles de caséines ont été mesurés par diffusion de la lumière laser sur différents laits (lait frais pasteurisé, lait UHT, lait en poudre reconstitué, lait pasteurisé congelé). L'appareil fournit à partir d'une dizaine de mesures la distribution des tailles des particules en intensité ou en volume et indique une taille moyenne associée à un indice de polydispersité (Figure 4.13). Les expériences sont réalisées au moins en triple.

Le diamètre hydrodynamique est très différent suivant les laits utilisés (Tableau 4.13).

Tableau 4.13 : Variation du diamètre hydrodynamique en fonction des laits utilisés. Les échantillons sont écrémés et dilués au 1/10 dans du perméat. Les résultats sont la moyenne d'environ 6 mesures.

Lait	Diamètre hydrodynamique (nm)	Écart-type
Lait frais pasteurisé	154,7	5,7
Lait pasteurisé congelé	157,4	2,2
Lait UHT	200,2	4,8
Lait poudre reconstitué	221,1	2,6

On a un diamètre élevé des micelles pour les laits UHT et lait en poudre, respectivement 200 et 221 nm alors que le diamètre des micelles est voisin de 155-157 nm dans le cas du lait pasteurisé. Les traitements thermiques conduisent à la dénaturation des protéines solubles et à la formation de complexes entre β -lactoglobuline et caséine κ (Dalglish, 1990; Mahaut et al. 2000a). La présence de ces complexes dans le lait après chauffage conduisent à une augmentation de la taille des micelles (Remeuf et al., 2002).

Comme les diamètres hydrodynamiques des micelles sont variables suivant les laits, il est nécessaire de considérer la variation relative de diamètre hydrodynamique en présence de volumes variables d'extrait de caroube ou de présure par rapport au

diamètre hydrodynamique mesurée uniquement en présence d'un volume de tampon de même pH destiné à simuler la présence de l'extrait. Les volumes d'agent coagulant

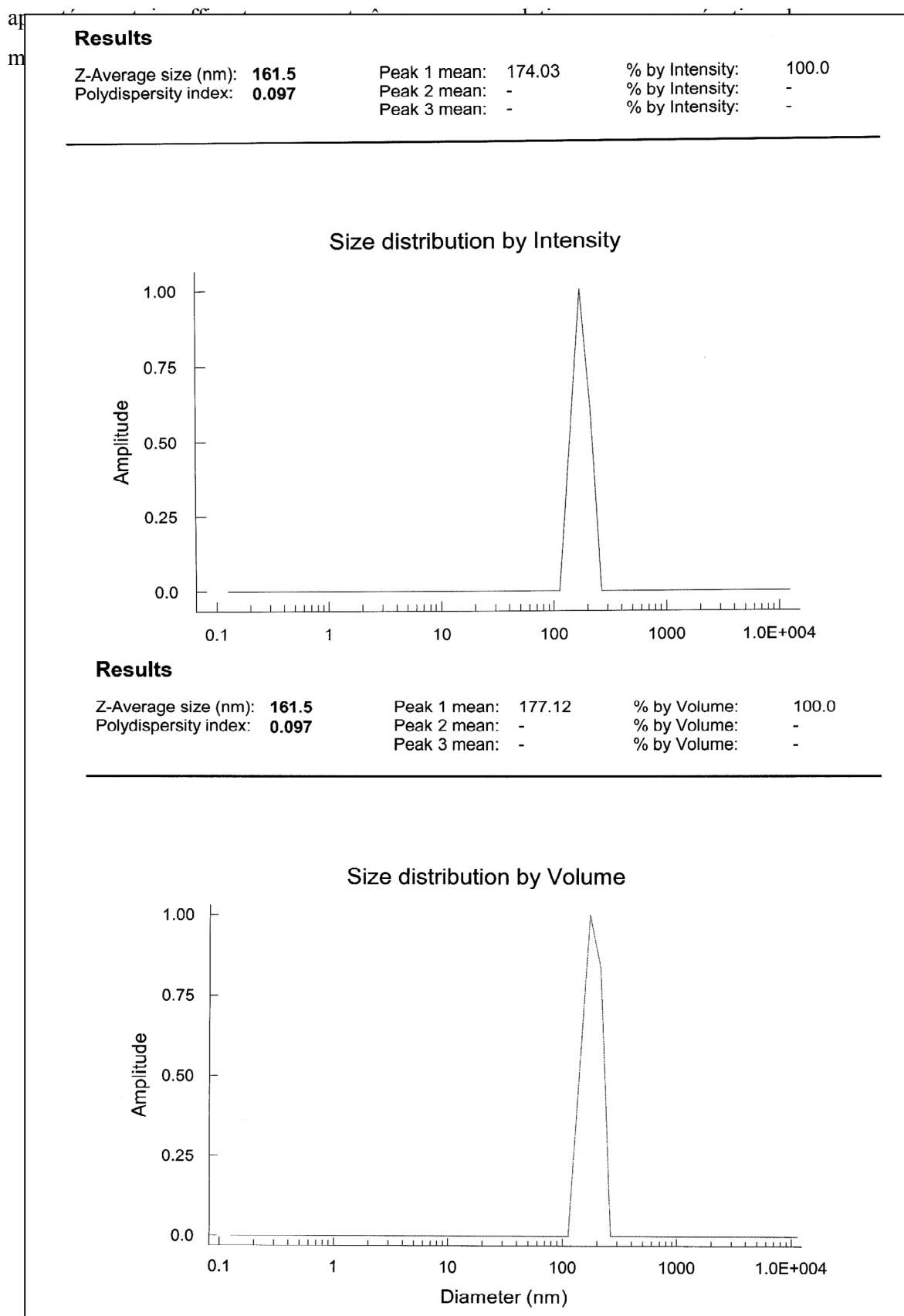


Figure 4.13 : Mesure de la taille des micelles par diffusion de la lumière.

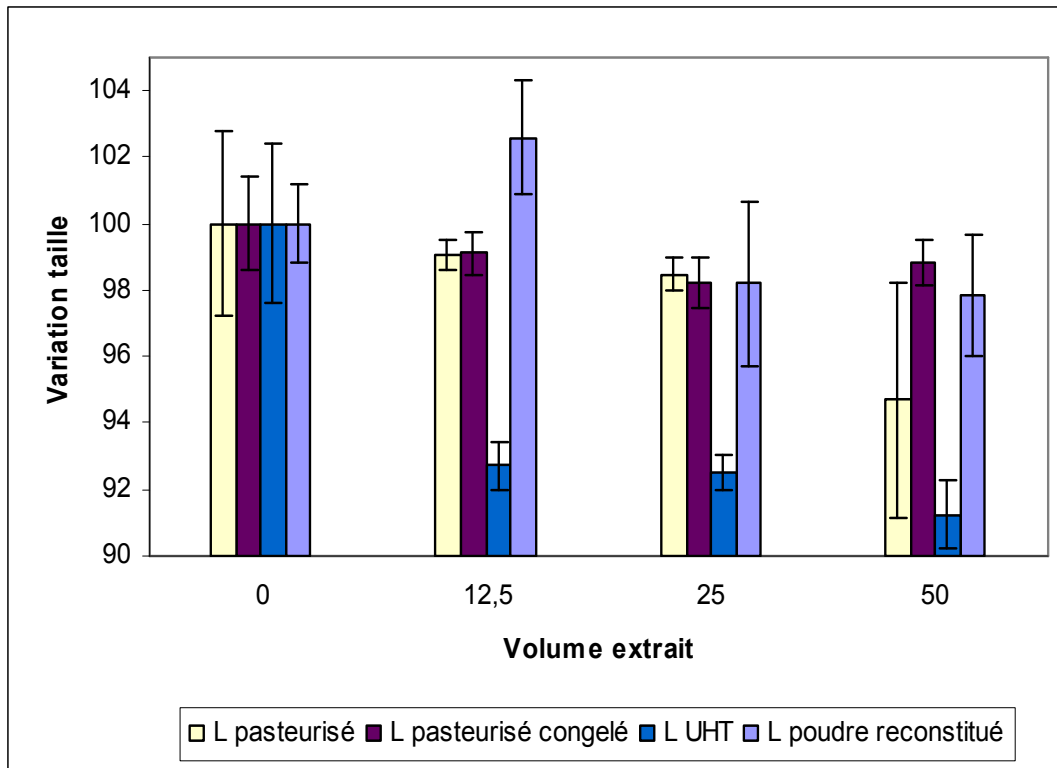


Figure 4.14 : Variation du diamètre hydrodynamique des micelles en fonction du volume d'extrait de caroube ajouté. La taille des micelles sans ajout d'extrait est fixée à 100.

Tableau 4.14 : Variation du diamètre hydrodynamique en fonction du volume d'extrait de caroube ajouté. Le diamètre hydrodynamique sans ajout d'extrait est fixé à 100.

Volume d'extrait (µL)	0	12,5	25	50
Lait utilisé				
Lait frais pasteurisé	100	99,1	98,5	94,7
Lait pasteurisé congelé	100	99,1	98,2	98,8
Lait UHT	100	92,7	92,5	91,2
Lait poudre reconstitué	100	102,6	98,2	97,8

En présence d'extrait de caroube une diminution de diamètre est observée dans tous les cas. Cette diminution est voisine avec le lait frais pasteurisé et le lait pasteurisé congelé qui possèdent une structure semblable des micelles protéiques. La diminution de diamètre hydrodynamique a été observée de manière systématique sur le lait de vache ainsi que sur celui de brebis. Pour le lait UHT, la diminution est encore plus forte et l'effet de l'extrait de caroube est significatif dans ce cas. La dénaturation des protéines solubles par l'effet du chauffage et la formation de complexes entre β -lactoglobuline et caséine κ serait favorable à l'action ultérieure de l'extrait de caroube. La légère augmentation du diamètre des micelles dans le cas du lait en poudre serait causée par un problème de solubilité.

Jöbstl et al. (2004a) ont observé qu'à une faible concentration en polyphénols, le polyphénol s'associe à la surface de la molécule protéique, et généralement on a plusieurs molécules de polyphénols qui se lient simultanément et fortement à une même molécule protéique. La molécule protéique change alors de la conformation lâche ou dépliée à une conformation plus compacte, ceci pouvant expliquer la diminution du diamètre des micelles protéiques avec l'ajout d'extrait de caroube.

Cependant cette diminution n'est observée que pour des faibles volumes d'extrait de caroube car la réaction est quasi instantanée et on a vite, en deuxième étape, la formation de complexes insolubles à partir de l'interaction du polyphénol avec plusieurs molécules protéiques.

Le diamètre hydrodynamique a été également suivi en présence de présure. Là aussi on observe une légère diminution du diamètre hydrodynamique allant jusqu'à

3% (tableau 4.15). La présure cause une déstabilisation du système colloïdal en attaquant la couche chevelue à la surface des micelles qui correspond à la partie C-terminale de la caséine κ et provoque une diminution du diamètre hydrodynamique (Mahaut et al., 2000a).

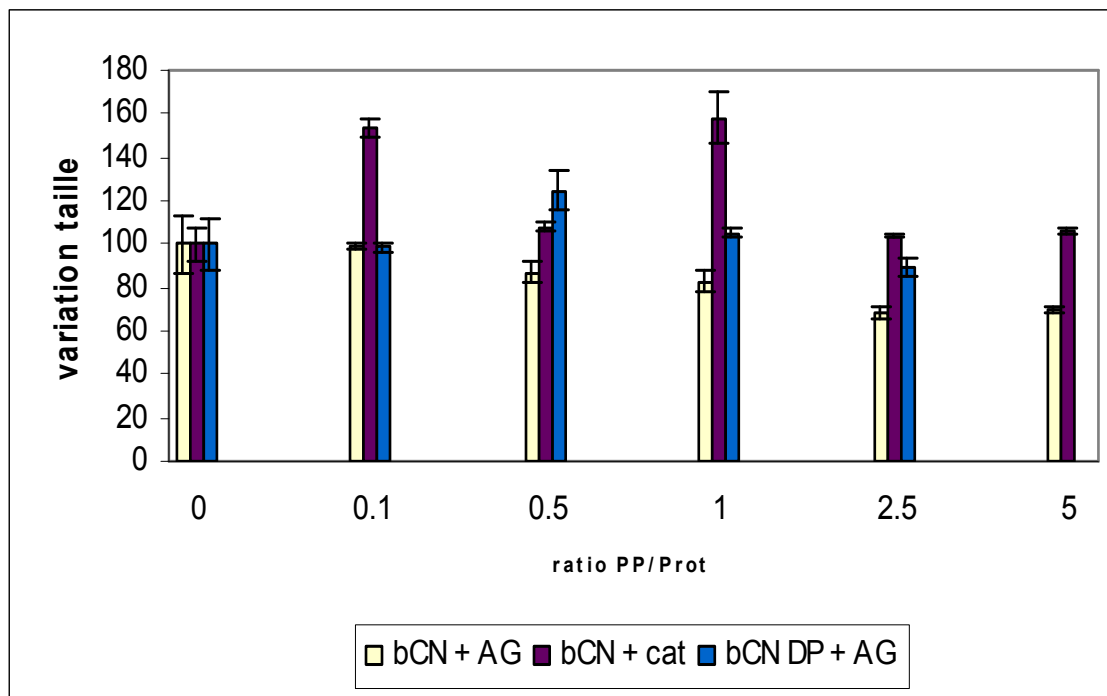


Figure 4.15 : Variation du diamètre hydrodynamique de la caséine β en fonction des différents ratios polyphénols/protéines. Le rayon hydrodynamique de la β caséine sans ajout d'extrait est fixé à 100 (bCN + AG : caséine β + acide gallique, bCN + cat : : caséine β + catéchine, bCN DP + AG : caséine β déphosphorylée + acide gallique).

Tableau 4.15 : Variation du diamètre hydrodynamique en fonction du volume de présure ajoutée (lait frais pasteurisé écrémé).

Volume présure (μL)	0	20	40	60
Exp 1	100	99,0	98,1	98,1
Exp 2	100	98,1	97,6	96,9

IV.4.2. Effet des polyphénols sur la taille des micelles de caséine □

Pour mieux étudier l'effet des polyphénols sur les protéines laitières, on a mesuré le rayon hydrodynamique de la caséine β en présence de polyphénols au Malvern, par diffusion de la lumière. Les résultats que nous présentons ici, permettent dans une certaine mesure de caractériser le comportement de la caséine β après l'ajout du polyphénol (Figure 4.15 et Tableau 4.16). Il semble que la caséine □ en solution soit capable de reconstituer des agrégats micellaires car les diamètres mesurés ne sont pas très différents des tailles habituelles des micelles du lait. A noter que la CMC ou seuil de concentration au-delà de laquelle la caséine β se polymérise, dépend de la force ionique du pH, de la température et du calcium (Pornaya et al., 2006).

Par contre, comme la taille de ces micelles reconstituées diffère légèrement d'une solution à l'autre, les résultats sont présentés en variation de taille par rapport à la taille, fixée à 100, de la caséine sans présence de polyphénol.

Dans le cas de l'acide gallique, on constate une diminution régulière de la taille de la caséine. Cette diminution a été observée de manière transitoire par Jöbstl et al. (2004b) dans le cas de l'interaction de la caséine □ avec l'épigallocatechine gallate. Lorsque l'interaction de l'épigallocatechine gallate peut être observée à l'échelle de la simple molécule de caséine, Jöbstl et al. (2006) constate une réduction de la taille de la molécule, du rayon de gyration et du rayon hydrodynamique. Le modèle moléculaire en trois étapes proposé par Jöbstl et al. (2004a) pour expliquer le phénomène observé dans nos expériences a déjà été cité dans le paragraphe IV.4.1. Dans une première étape, on a une diminution de la taille avec l'augmentation de la quantité d'acide gallique ajouté jusqu'à un minimum pour le rapport polyphénols/protéines de 2,5. Cette phase correspond au compactage de la caséine autour des polyphénols et au passage de la conformation déroulée à la forme sphérique (Jöbstl et al., 2004a). Pour un ratio acide gallique/caséine = 10, la mesure est impossible car l'agrégation est à son maximum et on a la formation de larges complexes protéines-polyphénols. L'apparente diminution de taille observée

au ratio acide gallique/caséine = 100 peut être expliquée par la précipitation qui soustrait les gros agrégats de la solution (Jöbstl et al., 2004b) ou bien ceci est dû à la solubilisation des complexes à cause d'un excès de polyphénols comme le souligne l'étude effectuée par Siebert et al. (1996). Jöbstl et al. (2004a) affirment de toute façon que les mesures deviennent non fiables dès la formation d'agrégats.

Tableau 4.16 : Variation du rayon hydrodynamique de la caséine β en fonction des différents ratios polyphénols/protéines. La solution de caséine β est à 2,5 g/L et les tests sont effectués à 20°C. Le rayon hydrodynamique de la caséine β sans ajout de polyphénol est fixé à 100 (PP : polyphénols, Prot : protéines, AG : acide gallique, cat : catéchine, caséine DP : caséine déphosphorylée).

Ratio PP/Prot	Caséine + AG	Caséine + cat	Caséine DP + AG
0	100 $\pm$ 13,4	100 $\pm$ 7,4	100 $\pm$ 11,6
0,1	99,2 $\pm$ 1,7	153,9 $\pm$ 3,9	98,6 $\pm$ 2,0
0,5	87,1 $\pm$ 4,6	107,9 $\pm$ 1,7	124,4 $\pm$ 9,2
1,0	82,9 $\pm$ 4,7	158,2 $\pm$ 11,9	105,3 $\pm$ 2,2
2,5	68,0 $\pm$ 2,5	103,4 $\pm$ 0,8	89,3 $\pm$ 4,4
5,0	69,8 $\pm$ 1,0	105,8 $\pm$ 1,2	
10,0		104,0 $\pm$ 3,1	
100,0	65,7 $\pm$ 0,4		

Par contre, les résultats sont différents dans le cas de la catéchine. On constate un grossissement de la taille de la caséine puis une stabilisation à une valeur proche de la taille de la caséine de départ. On peut dire que l'action de la catéchine est différente de celle de l'acide gallique et apparemment n'influence pas la conformation de la caséine puisqu'on n'observe aucun compactage ou diminution de taille. L'augmentation de la taille pour les rapports catéchine/caséine entre 0,1 et 1 indique une incorporation de la catéchine au sein des particules avant une agrégation plus complète conduisant à la précipitation de la protéine comme cela a été observé avec l'épigallocatechine gallate (Jöbstl et al. 2004b). Sausse (2003) a également observé une augmentation de la taille de la caséine β (avec un doublement du rayon hydrodynamique) en présence d'épigallocatechine gallate.

La caséine β déphosphorylée commerciale est débarrassée des 5 groupements phosphoséryles présents du côté de l'extrémité N-terminale de la protéine. La caséine

déphosphorylée est plus hydrophobe que la caséine native. Or les interactions hydrophobes favoriseraient la formation des micelles. Les résultats obtenus sont difficilement interprétables. On ne peut conclure si l'acide gallique agit sur la caséine déphosphorylée plus efficacement que sur la caséine native ne permettant pas d'observer le compactage de la caséine avant la formation de gros agrégats ou si la caséine déphosphorylée et donc plus hydrophobe est responsable de la grande taille des agrégats. On a, dès le ratio acide gallique/caséine de 0,5, une augmentation du rayon de la caséine puis à partir du ratio 5, il est impossible d'obtenir une mesure, probablement à cause de l'agrégation.

IV.4.3. Effet de l'extrait de caroube et de la présure sur le comportement des protéines par observation en électrophorèse

IV.4.3.1. Analyse en électrophorèse capillaire

On compare la composition en protéines laitières

- d'un lait pasteurisé (ferme de Grignon) qui nous sert de lait témoin
- d'un yaourt issu du même lait pasteurisé,
- du lait pasteurisé en présence d'extrait de caroube ou de présure,
- du lait pasteurisé ayant subi une congélation prolongée en présence d'extrait de caroube ou de présure.
- du lait UHT en présence d'extrait de caroube ou de présure.

Les échantillons sont dénaturés en présence d'urée 6 M et de dithiothreitol avant d'être analysés sur un capillaire greffé à pH acide (tampon phosphate urée 6 M, pH 2,5). Toutes les protéines laitières sont séparées et on peut distinguer les différents taux de phosphorylation des caséines α_s ainsi que les variants génétiques de la caséine β (figures 4.16 et 4.17). La quantité injectée pour les différents échantillons de laits sont les mêmes. On peut donc comparer non seulement les proportions des différentes protéines entre elles dans un même échantillon mais également, pour une même protéine, leur quantité relative (déterminée par l'intégration des surfaces de pic) d'un échantillon à l'autre. Les surfaces de chaque composé sont corrigées par le temps de sortie du composé.

Si l'on considère dans un premier temps la proportion relative des différentes protéines laitières (en % des protéines totales), on s'aperçoit que la composition du lait pasteurisé est très proche de celle du yaourt (Tableau 4.17). De même, l'ajout de présure affecte peu les caséines

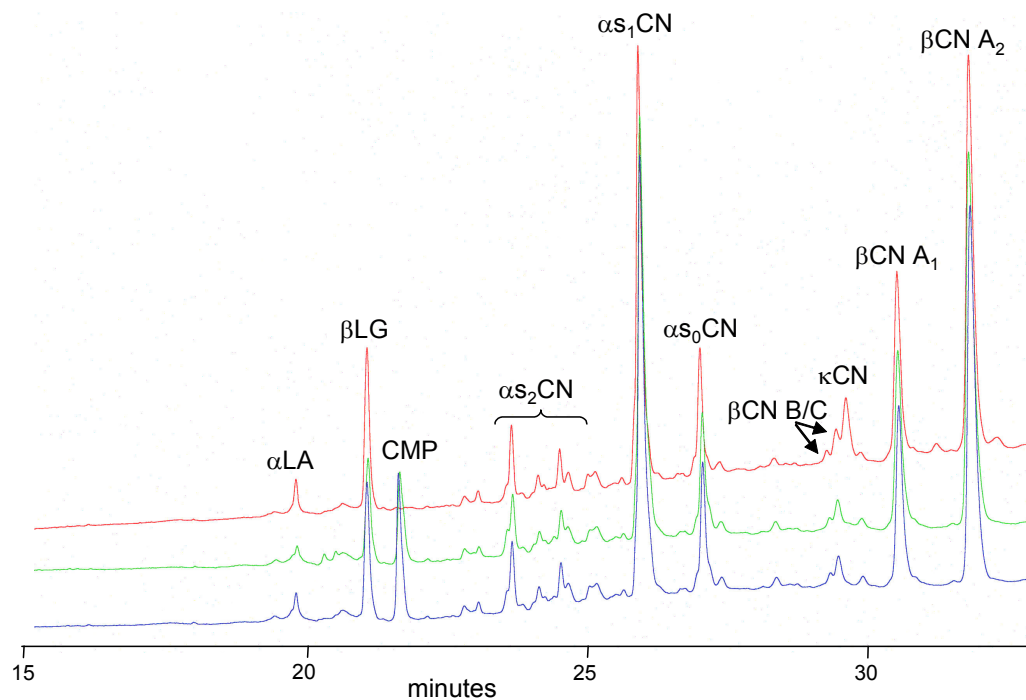


Figure 4.16: Electrophorégrammes capillaires des protéines lactières en présence de présure. En rouge: lait pasteurisé seul, vert: lait pasteurisé + 60 μL présure, bleu: lait pasteurisé + 30 μL présure.

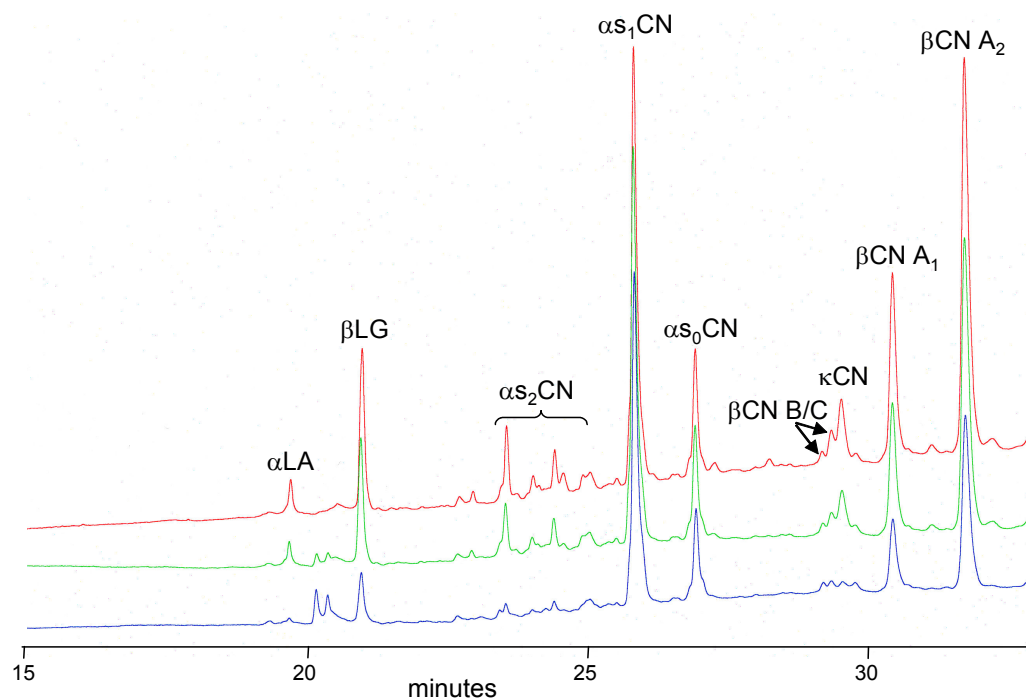


Figure 4.17: Electrophorégrammes capillaires des protéines lactières en présence de l'extrait de caroube. En rouge: lait pasteurisé seul, vert: lait pasteurisé + 50 μL extrait, bleu: lait pasteurisé + 100 μL extrait.

autres que la caséine κ qui diminue très fortement. Il ne reste que 9% en moyenne de caséine κ et on note l'apparition d'un nouveau pic illustrant la présence du caséino-macropéptide issu de l'hydrolyse de la caséine κ par la chymosine.

A l'inverse, l'ajout d'extrait de caroube affecte l'ensemble des protéines laitières. La proportion de caséines β , α_{s2} et κ diminue (de 21 à 30%) alors que les protéines sériques et les caséines α_{s0} et α_{s1} (que nous ne dissocions pas) sont plus représentées en proportion (20 à 36%).

En réalité, la quantité de toutes les protéines diminue (diminution globale de 21% avec 50 μ L d'extrait et de 44% avec 100 μ L d'extrait, tableau 4.18) mais l'effet négatif de l'extrait de caroube est plus marqué dans le cas des caséines β , κ et α_{s2} (diminution de 55 à 60%) et un peu moins dans le cas des protéines sériques et de la caséine α_{s1+s0} (diminution de 21 à 31%) ce qui se traduit par une augmentation relative de ces protéines par rapport aux protéines totales.

L'extrait de caroube agit de la même façon sur les protéines laitières contenues dans du lait congelé ou du lait UHT (Tableau 4.19). Cependant, dans ces deux cas, les protéines sont déjà fortement dénaturées dans les laits de départ soit par le stockage ou le traitement thermique. Par rapport à un lait pasteurisé, les protéines sériques sont pratiquement inexistantes, les caséines α_{s1} et α_{s0} sont surreprésentées, les électrophorégrammes présentent des pics élargis. L'effet négatif de l'extrait de caroube est plus marqué dans le cas des caséines β , κ et α_{s2} ce qui conduit à une très forte concentration relative en caséine α_{s1} et α_{s0} proche de 60%.

Tableau 4.17 : Composition en protéines sériques et caséines des échantillons analysés par électrophorèse capillaire avec ou sans addition d'agent coagulant. Pour chaque échantillon, on considère la proportion relative de chaque protéine par rapport aux protéines totales puis la variation de concentration de chaque protéine par rapport à sa teneur dans le lait pasteurisé qui est considéré comme ayant une composition témoin.

	Caseino											
	α lactalbumine	β lactoglobuline	α caséine s_2	α caséine $s_0^{+s_1}$	β caséine	κ caséine	macropeptide					
Pasteurisé	1,54	100,0	8,74	100,0	10,23	100,0	33,14	100,0	35,64	4,31	100,0	
Past + extrait 50 μ L	1,57	101,9	8,45	96,7	8,79	85,9	38,01	114,7	32,23	3,99	92,6	
Past + extrait 100 μ L	1,84	119,5	10,9	124,7	7,15	69,9	45,25	136,5	28,12	2,90	67,3	
Past + présure 30 μ L	1,62	105,2	6,36	72,8	9,43	92,2	35,11	105,9	35,93	0,28	6,5	5,99
Past + présure 60 μ L	1,69	109,7	7,87	90,0	10,73	104,9	33,00	99,6	34,29	0,50	11,6	7,70
Yaourt	1,67		9,02		8,52		34,29		35,62	4,25		

Tableau 4.18 : Surface (corrigée) correspondant à chaque protéine dans les différents échantillons de lait et variation de concentration de chaque protéine par rapport à sa teneur dans le lait pasteurisé qui est considéré comme ayant une composition témoin.

	α -lactalbumine	β lactoglobuline	caséine α_{s2}	caséine α_{s0+s1}	caséine β	caséine κ	Caséino macropeptide	total
Pasteurisé	221	100,0	1425	100,0	1483	100,0	4746	100,0
Past + 50 μL ex	183	82,9	989	69,2	1026	73,8	4436	79,0
Past + 100 μL ex	162	73,2	959	40,8	604	45,7	3755	56,3
Past + 30 μL prés	248	112,1	973	95,3	1412	105,3	5377	101,2
Past + 60 μL prés	257	116,2	1227	109,9	1630	102,0	5206	105,0

Tableau 4.19 : Composition en protéines sériques et caséines des échantillons de laits congelé ou UHT analysés par électrophorèse capillaire avec ou sans addition d'agent coagulant. Pour chaque échantillon, on considère la proportion relative de chaque protéine par rapport aux protéines totales.

	β lactoglobuline	α caseine _{s2}	α caseine _{s0+s1}	β caseine	κ caseine	Caseino macropeptide
Lait congelé	1,4	7,2	37,9	48,9	6,0	
cong + extrait 50 μL	0,7	5,5	50,4	39,9	4,1	
cong + extrait 100 μL	0,6	5,0	58,0	33,5	3,4	
cong + présure 30 μL	0,7	5,9	39,7	48,5	0,3	5,6
cong + présure 60 μL	0,5	5,4	44,6	45,1	0,3	4,5
Lait UHT		5,0	32,1	57,5	5,3	
UHT + extrait 50 μL		3,7	46,0	46,7	3,6	
UHT + extrait 100 μL		0	67,4	31,7	0,8	
UHT + présure 30 μL		4,9	36,3	53,2	0,6	4,9
UHT + présure 60 μL		4,5	35,4	53,6	0,6	6,0

L'effet de l'extrait de caroube sur les protéines laitières est différent de l'effet induit par la présure ou une fermentation lactique. L'extrait de caroube affecte l'ensemble des protéines laitières sans exception ce qui se traduit par une diminution de leur quantité décelable en électrophorèse capillaire. Ceci peut correspondre soit à une moindre solubilité soit à une moindre réponse électrophorétique de ces protéines. Des résultats similaires sont obtenus lorsque les protéines laitières dénaturées thermiquement sont analysées en électrophorèse capillaire. La dénaturation se traduit par une modification du comportement électrophorétique des protéines dont le comportement électrophorétique se trouve modifié. Les pics observés dans les électrophorégrammes sont élargis et déformés avec présence d'épaulements. C'est ce que l'on observe en particulier dans le cas du lait UHT. La distorsion des pics serait due à une lactosylation des protéines qui apparaîtrait par condensation entre du lactose et des groupements aminés des protéines au cours d'une réaction de Maillard. Cette lactosylation dépend de la sévérité du traitement thermique (Miralles et al., 2000). Des changements importants des électrophorégrammes ont été également observés dans le cas de lait UHT au cours d'un stockage prolongé avec notamment une dégradation des caséines et la formation de complexes protéiques impliquant des caséines et des protéines sériques et plus particulièrement la caséine κ et la β -lactoglobuline qui pourraient se lier de manière covalente par un pont disulfure (Garcia-Risco et al., 1999). De la même façon, la présence d'extrait de caroube doit conduire à un changement de conformation ou à une modification du rapport global charge/masse des protéines laitières entraînant un nouveau comportement électrophorétique.

IV.4.3.2. Analyse des protéines en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Phast-system)

La séparation des protéines laitières en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) n'est pas très performante et on lui préfère bien souvent une séparation en urée, même si dans ces conditions opératoires, les protéines sériques ne sont pas très bien résolues et apparaissent sous forme de larges bandes. Van Hekken et Thompson (1992) ont adapté cette technique au matériel Phast-System. Les gels commerciaux sont saturés en urée par trempage dans un tampon 6,6 M d'urée (paragraphe III.4.3.). Dans ces conditions, la séparation des protéines du lait se fait selon le rapport masse/charge et une séparation relativement bonne des caséines et des protéines sériques est obtenue. Comme dans le cas de l'électrophorèse capillaire, on a préparé des échantillons de lait pasteurisé (1 mL) mis en présence pendant 30 min soit avec de la présure (30 ou 60 μ L), soit avec de l'extrait de caroube (50 ou 100 μ L). Après une centrifugation rapide, les

protéines contenues dans le surnageant sont caractérisées sur gel après dénaturation d'un aliquot (Figure 4.18).

On constate que dans le cas de la chymosine, les protéines sériques (β -lactoglobuline et α -lactalbumine) sont retrouvées dans le surnageant et donc qu'elles ne sont pas impliquées dans la précipitation des caséines sous l'effet de la présure. A l'inverse, avec l'extrait de caroube, on constate nettement une diminution des protéines lactières majeures (caséine β , caséine α_{s1} , β -lactoglobuline et α -lactalbumine), diminution qui est accentuée quand la quantité d'extrait est augmentée. Cette diminution se traduit même par une disparition complète de certaines bandes protéiques, plus particulièrement celles qui correspondent aux protéines lactières sériques. Ce résultat confirme donc que l'ensemble des protéines lactières est complexé par l'extrait de caroube.

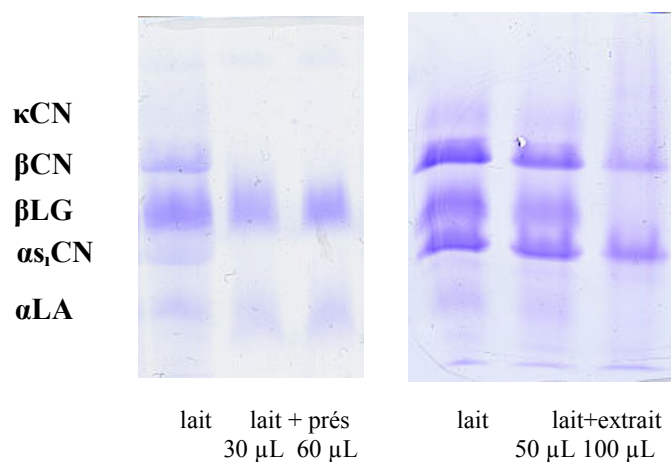


Figure 4.18: Séparation en électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines lactières dans les surnageants obtenus après coagulation par la présure et l'extrait de caroube. Le lait témoin est soumis au même traitement.

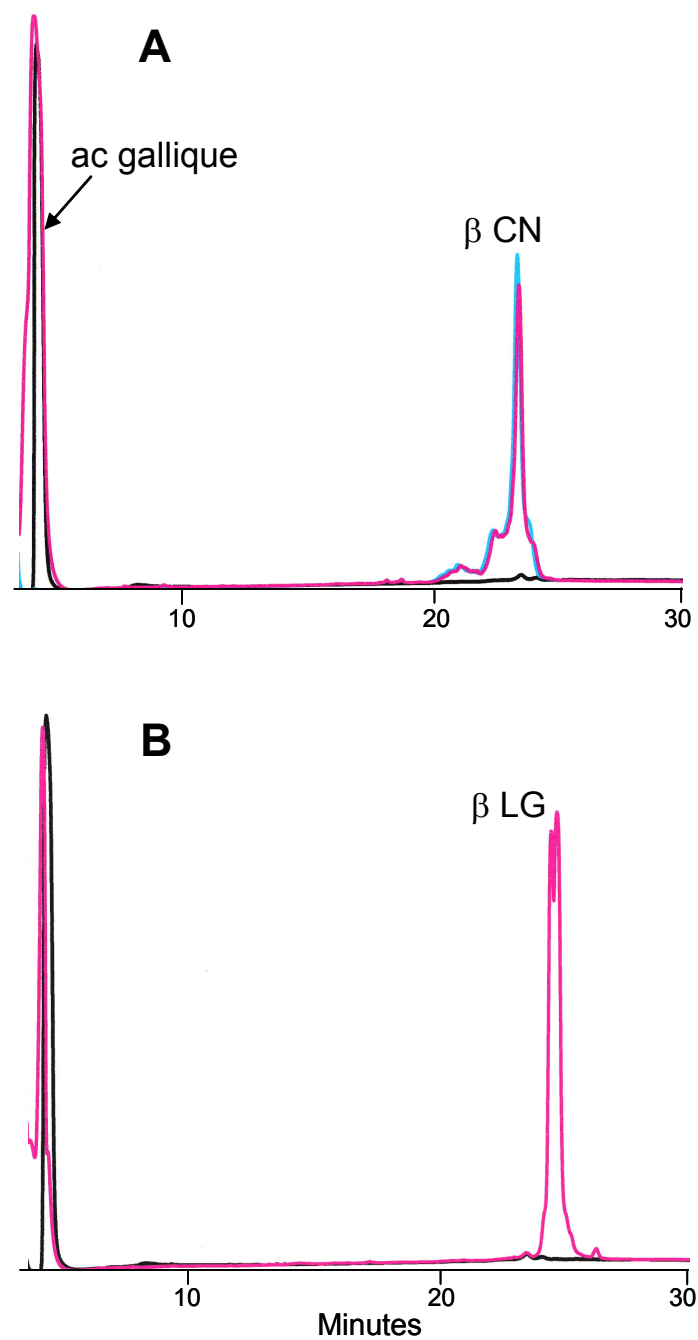


Figure 4.19: Chromatogrammes obtenus sur colonne en phase inverse de la β caséine (A) et de la β -lactoglobuline (B) en présence d'acide gallique. Le tracé du mélange est en fuschia et peut être comparé aux tracés des composés analysés individuellement (longueurs d'onde 214 et 271 nm).

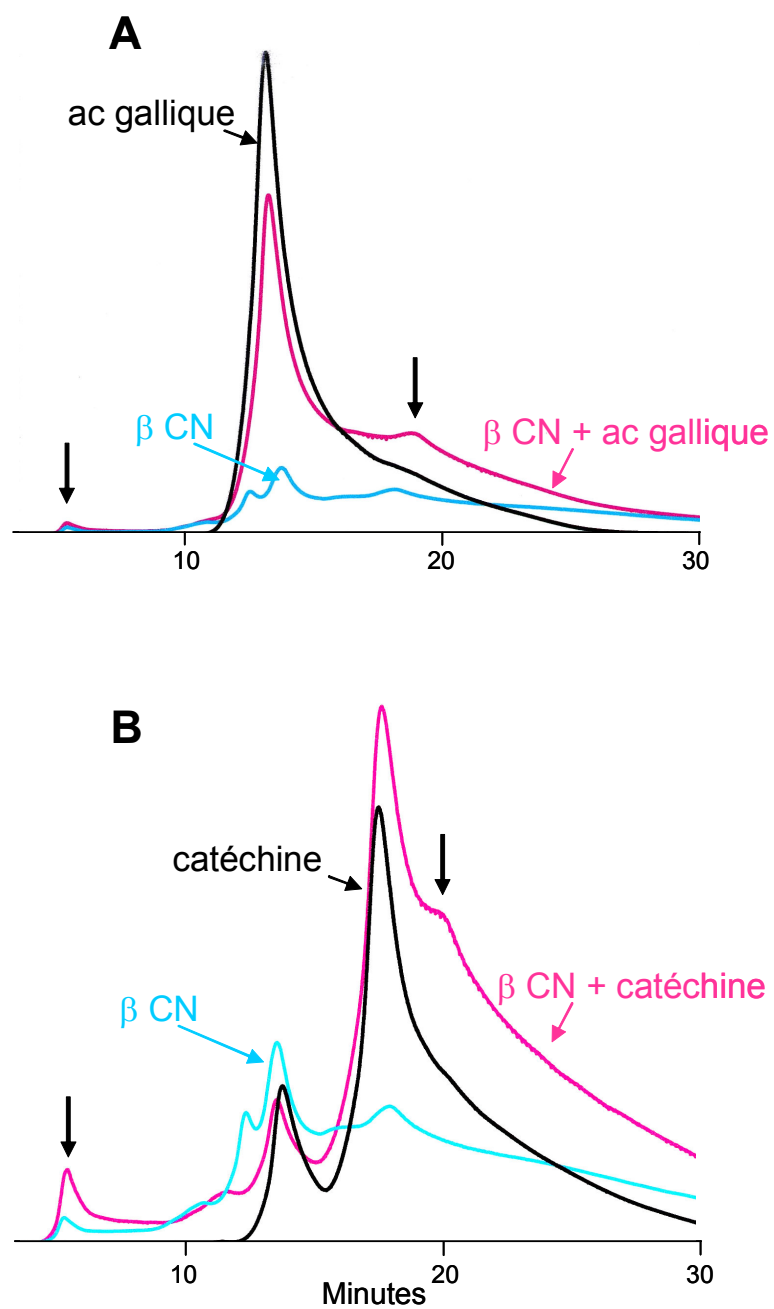


Figure 4.20: Chromatogrammes obtenus sur colonne d'exclusion stérique de la β caséine avec l'acide gallique (A) et avec la catéchine (B) (longueurs d'onde 214 et 271 nm).

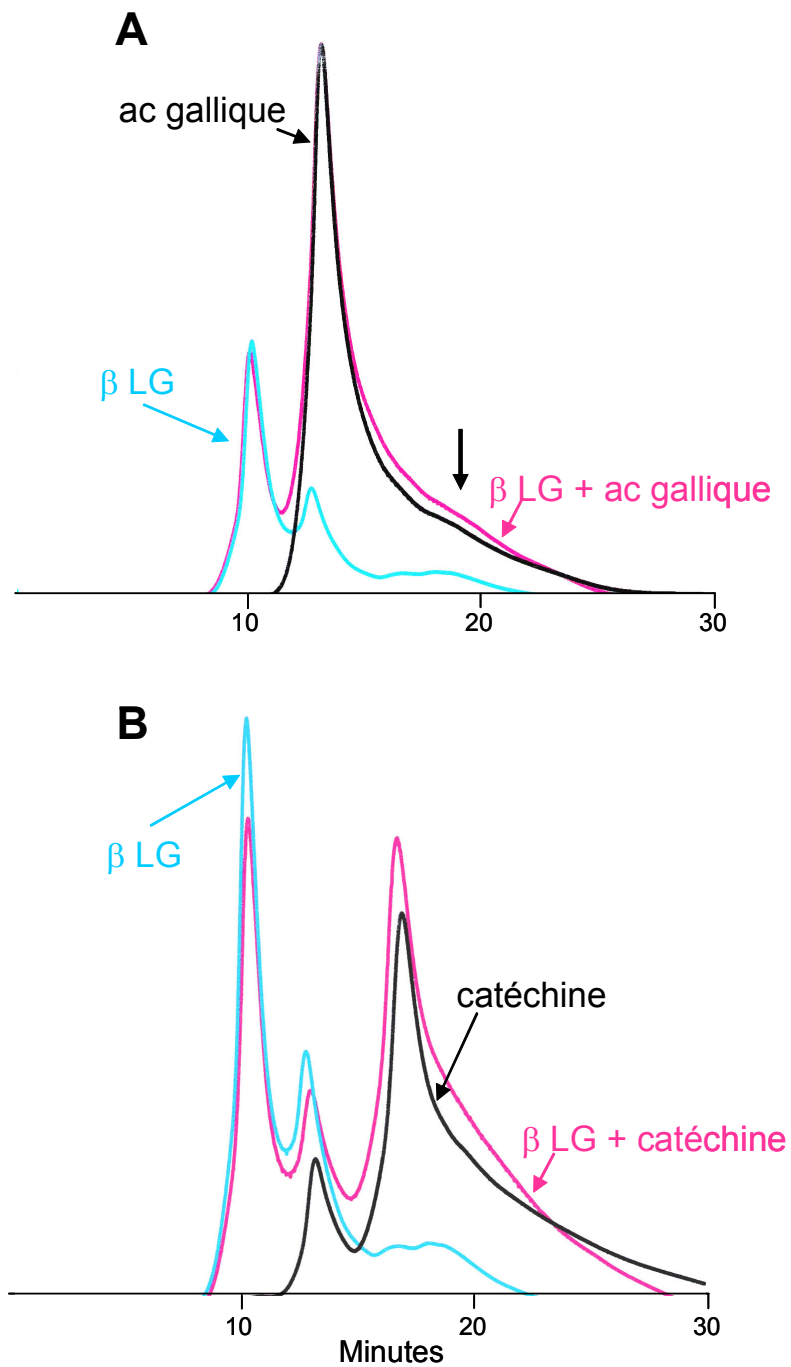


Figure 4.21: Chromatogrammes obtenus sur colonne d'exclusion stérique de la β lactoglobuline avec l'acide gallique (A) et avec la catéchine (B) (longueurs d'onde 214 et 271 nm).

IV.4.4. Effet de l'acide gallique et de la catéchine sur le comportement des protéines observé en chromatographie liquide haute performance

Deux protéines laitières ont été choisies pour une étude plus approfondie de leurs interactions éventuelles avec des polyphénols : une caséine, la caséine α et une protéine sérique, la β -lactoglobuline. Il nous a semblé intéressant de considérer d'une part une des caséines, protéines qui sont coagulées sous l'effet de la présure, d'autre part une des protéines sériques qui ne sont pas concernées par la coagulation enzymatique. Nous avons choisi la α -lactoglobuline qui est la plus abondante des protéines sériques. Elle contient 8 résidus proline qui représentent 4,9% des acides aminés totaux. La caséine α est très riche en proline (35 résidus proline soit 16,7% des acides aminés totaux). Nous avons constaté que ces deux protéines semblaient réagir de façon relativement importante à la présence d'extrait de caroube lors de nos analyses en électrophorèse capillaire (paragraphe IV.4.3.). Deux polyphénols que l'on trouve aisément dans le commerce et qui sont également présents dans le mélange de polyphénols de l'extrait de caroube (paragraphe IV.1.3.) ont été choisis, l'acide gallique et la catéchine.

Les résultats de séparation, sur colonne de phase inverse, des deux mélanges de caséine α et de β -lactoglobuline en présence d'acide gallique sont illustrés par la figure 4.19A et 4.19B. L'acide gallique n'est pratiquement pas retenu sur la colonne (temps de rétention 3 min) alors que les deux protéines sortent beaucoup plus tardivement (temps de rétention du pic majeur de la caséine α 23,3 min ; temps de rétention de la β -lactoglobuline 24,4 et 24,6 min correspondant à la séparation des deux variants B et A ; Veloso et al., 2002, Enne et al., 2005). Les deux composés en mélange sont complètement séparés et ont un comportement chromatographique identique à celui des composés analysés individuellement. L'interaction entre protéine et polyphénol, si elle existe, ne se traduit pas par une liaison covalente forte mais consiste en une liaison faible qui ne résiste pas à des conditions dénaturantes (présence de solvant).

Au contraire, en utilisant une colonne d'exclusion stérique, l'analyse des mélanges de la caséine β avec l'acide gallique (Figure 4.20A) ou avec la catéchine (Figure 4.20B) fait apparaître d'une part un pic en début de chromatogramme et un épaulement autour de 19 min qui n'existent pas dans les chromatogrammes témoins.

De plus, dans le cas de la catéchine, le chromatogramme est modifié du côté des composés de haute masse moléculaire avant 15 min. Les spectres UV de ces pics montrent qu'ils contiennent à la fois le polyphénol et la protéine (absorption à 260 nm pour l'acide gallique et à 280 nm pour la catéchine).

Par contre, la β -lactoglobuline semble moins réactive que la caséine β avec l'acide gallique et la catéchine (Figure 4.21A et 4.21B) et les chromatogrammes ne présentent qu'un très léger épaulement. Il y aurait donc apparition de nouveaux composés de haut poids moléculaire qui doivent correspondre à des composés d'association protéine-polyphénol ou à des agrégats, et de composés se comportant comme des molécules plus petites que les polyphénols. A côté de ces observations, il apparaît une diminution nette du pic d'acide gallique lorsqu'il est incubé avec la caséine α comme s'il était utilisé pour la fabrication de composés d'agrégation. Cette disparition d'acide gallique n'est pas observable avec la β -lactoglobuline. La catéchine présente un chromatogramme complexe qui ne permet pas de constater facilement une disparition du polyphénol en présence de protéine. Ce chromatogramme révèle vraisemblablement une polymérisation partielle de la catéchine au cours du stockage comme cela a pu être vérifié avec le spectre de masse. Nous avons tenté une estimation de la consommation de polyphénols par réaction avec les protéines laitières en analysant les polyphénols en couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons fait réagir pendant 30 min (i) du lait pasteurisé, (ii) des protéines laitières individuelles commerciales (caséine α s, caséine α , caséine β et β -lactoglobuline) dont les solutions ont été préparées à leur concentration approximative dans le lait, (iii) du tampon soit avec de l'extrait de caroube (150 μ L par mL de lait ou de protéine), soit avec la catéchine (10 mg de phénol par mL de lait ou de protéine). A la fin de la réaction, les échantillons sont centrifugés et les surnageants contenant les polyphénols qui n'ont pas réagi sont extraits à l'acétate d'éthyle comme décrit au paragraphe III.1.3. Une quantité connue de morine (polyphénol qui ne se rencontre pas dans les extraits de gousses vertes de caroube ; $[M-H]^+ = 301$; temps de rétention 14,5 min ; 0,1 mg mL⁻¹) est ajoutée comme étalon. La caséine α s laisse 80% de la catéchine dans le surnageant, la caséine α et la β -lactoglobuline en laissent 60%, la caséine β 53% et le lait pasteurisé seulement 30%. Avec l'extrait de caroube incubé en présence de lait, 70% des phénols contenus dans l'extrait sont retrouvés dans le surnageant de réaction. Ces résultats montrent bien l'implication directe des polyphénols dans la réaction de complexation et d'agrégation.

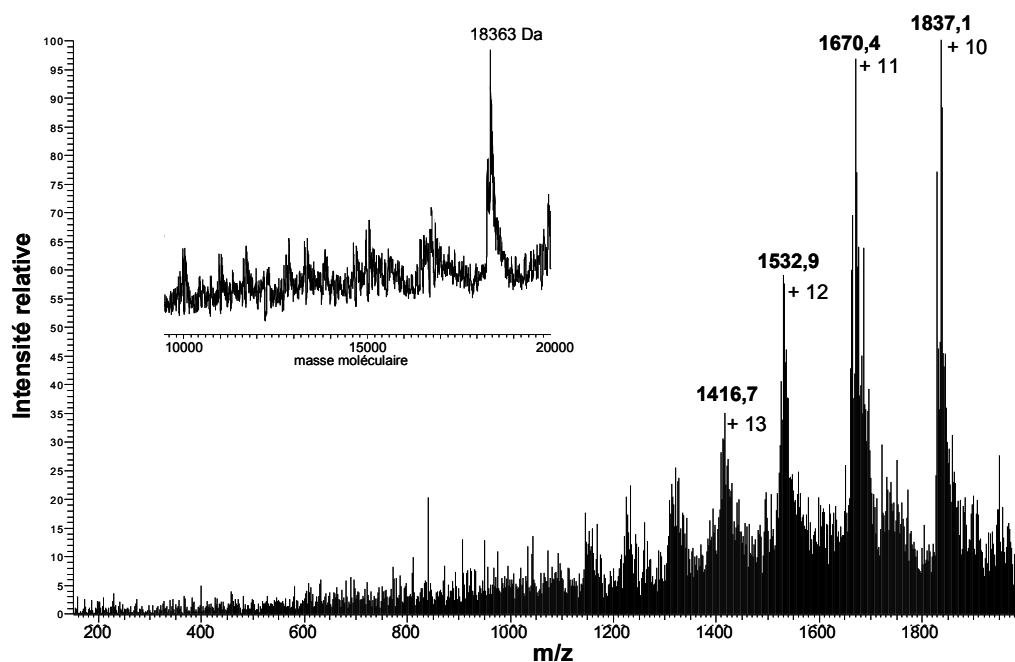


Figure 4.22: Profil d'ions multichargés obtenus avec la β lactoglobuline en conditions dénaturantes et spectre de masse obtenu par déconvolution en insert.

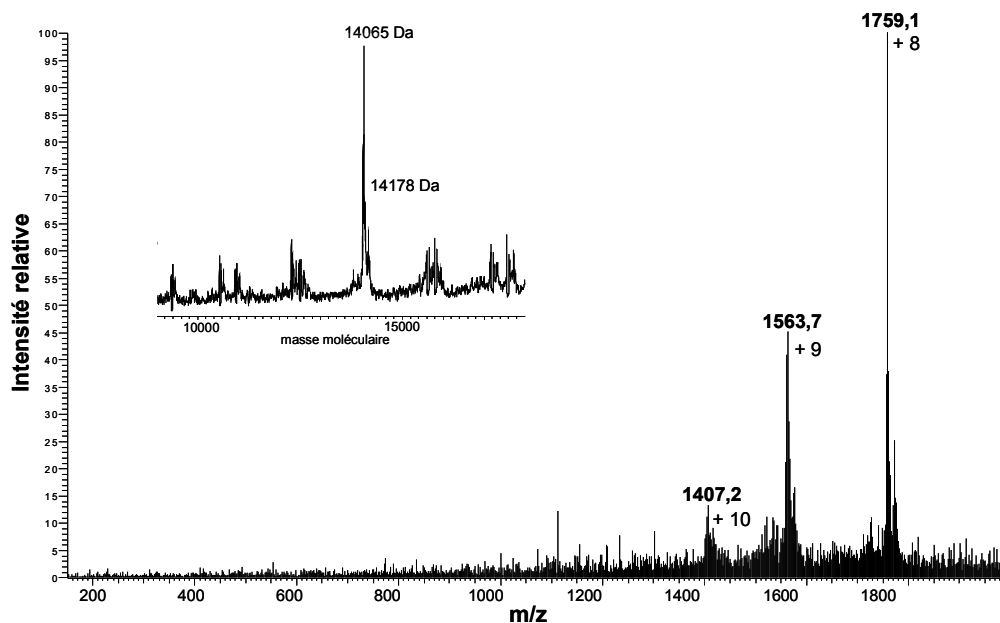


Figure 4.23: Profil d'ions multichargés obtenus avec l' α lactalbumine en conditions dénaturantes et spectre de masse obtenu par déconvolution en insert.

IV.4.5. Etude du complexe protéines laitières-polyphénols en spectrométrie de masse et en conditions dénaturantes ou non dénaturantes

La mise en évidence d'un complexe non-covalent par spectrométrie de masse se fait en deux étapes. L'analyse se fait d'abord en conditions classiques dénaturantes en présence d'un solvant organique acidifié. Dans de telles conditions, les interactions non-covalentes entre protéines laitières et polyphénols n'existent pas et la protéine est dénaturée. Ensuite, l'analyse se fait en tampon aqueux, à pH et force ionique contrôlés permettant à la fois le maintien de l'intégrité structurale en solution des complexes biologiques étudiés et l'analyse par spectrométrie de masse en electrospray (Pramanik et al., 1998 ; Sanglier et al., 2005).

Les profils d'ions multichargés en conditions dénaturantes (présence d'acétonitrile) nous permettent d'obtenir la masse entière de la protéine par déconvolution, conversion mathématique d'un spectre constitué d'ions multichargés en un seul pic correspondant à la masse moléculaire de la protéine (Figures 4.22 et 4.23). Sur le spectre de masse de la β -lactoglobuline (Figure 4.22), les ions possédant de 10 à 13 charges sont nettement visibles. Par déconvolution (insert de la figure 4.22), on obtient une masse molaire moyenne de la protéine de 18363 Da qui diffère de 82 de la masse attendue (18281 Da) indiquant l'addition très classique de molécules de sodium et potassium (2 Na et 1 K). En ce qui concerne l' α -lactalbumine (Figure 4.23), la masse obtenue (14065 Da) par déconvolution du profil des ions chargés 8, 9 et 10 fois est inférieure à la masse attendue (14186 Da) rapportée pour l' α -lactalbumine dans les bases de données Swiss Prot ou NCBI (National Center of Biotechnological Information). En fait, on s'aperçoit que la protéine doit perdre très facilement son résidu leucine en C terminal puisque l'on note une masse moléculaire de 14178 Da visible après déconvolution. Cette masse correspond à la masse de l' α -lactalbumine (14156 Da) séquencée par Vilotte et al. (1987, 1991) ou Viaene et al. (1991) présentant un adduit d'une molécule de sodium (+ 22).

En présence d'acétate d'ammonium, la sensibilité est fortement diminuée (15 à 30 fois) et l'enveloppe des ions multichargés est légèrement déplacée vers les hautes masses en raison d'adduit d'ions ammonium (Figures 4.24 et 4.25).

Les protéines laitières sont mises en présence d'acide gallique ou de catéchine pendant 30 min avant dilution en tampon acétate d'ammonium et analyse en infusion. Le rapport polyphénols/protéine a été fixé à 1 et à 5.

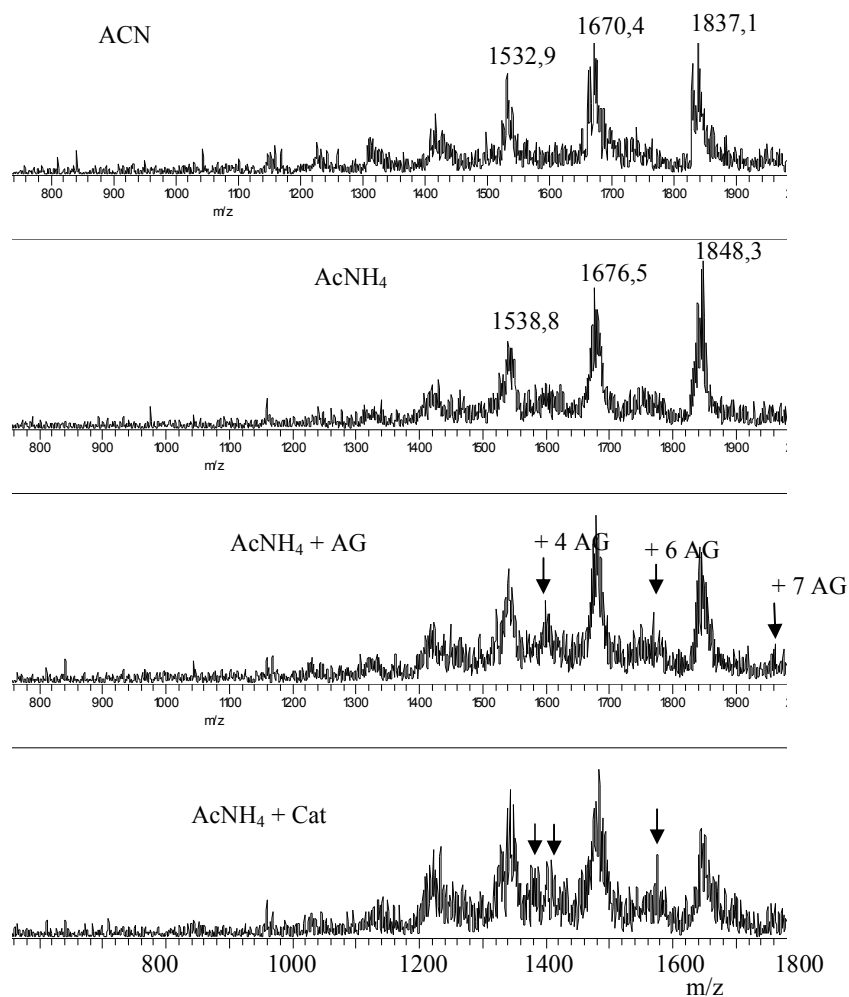


Figure 4.24: Profil d'ions multichargés obtenus avec la β lactoglobuline en milieu acétonitrile ou acétate d'ammonium en présence d'acide gallique ou de catéchine (ratio polyphénol/protéine = 5).

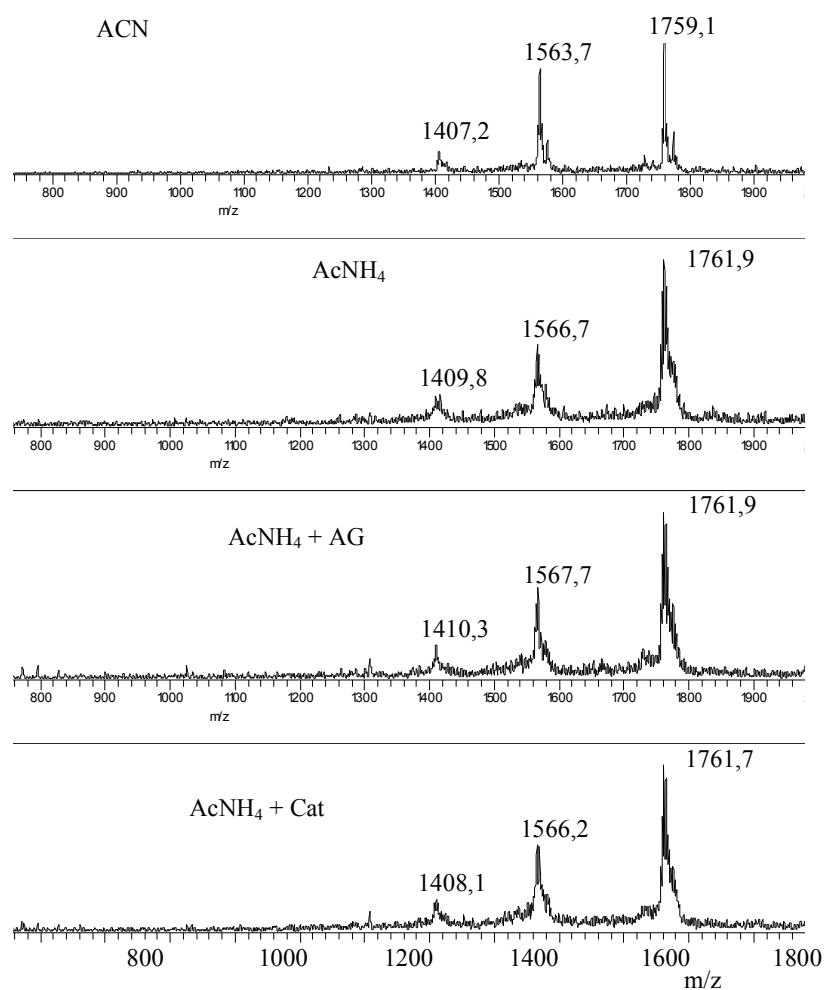


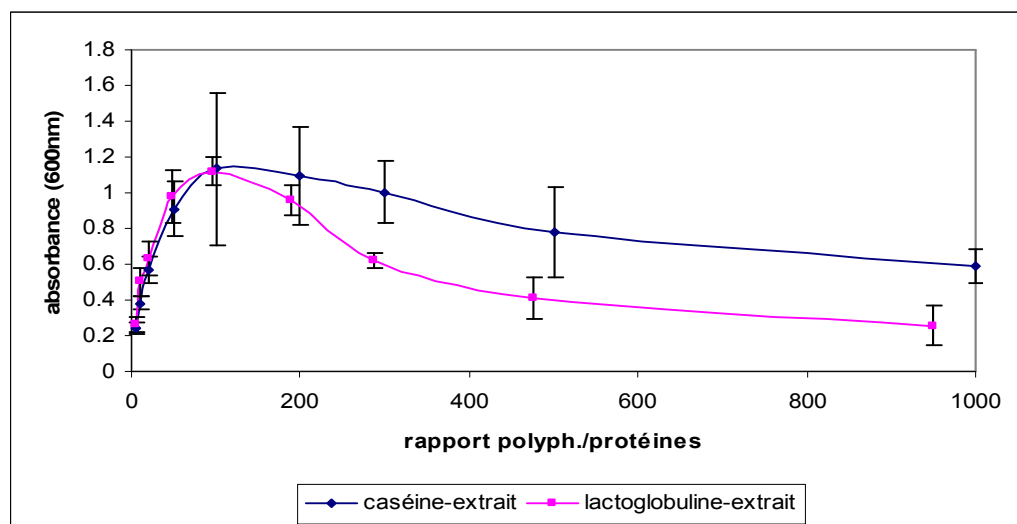
Figure 4.25: Profil d'ions multichargés obtenus avec l' α lactalbumine en milieu acétonitrile ou acétate d'ammonium en présence d'acide gallique ou de catéchine (ratio polyphénol/protéine = 5).

Dans le cas de la α -lactoglobuline (figure 4.24), on observe des ions supplémentaires à côté des ions majoritaires pouvant s'expliquer par l'addition non covalente de molécules d'acide gallique (170) ou de catéchine (290). La différence de masse observée permet de déterminer le nombre de molécules d'acide gallique complexées à la molécule de protéine. Par contre, dans le cas de la catéchine, les différences de masse ne correspondent pas à un nombre entier de molécules de catéchine ce qui fait penser que la complexation de la catéchine fait intervenir non pas les molécules de catéchine mais vraisemblablement les polymères de catéchine formés au cours du stockage et dont l'existence a déjà été signalée au paragraphe IV.4.4. La complexation de polyphénols simples et d' α -lactalbumine n'est pas visible dans nos expériences (figure 4.25). Cette protéine est beaucoup moins riche en résidus proline (2 résidus, 1,6% des acides aminés) que la α -lactoglobuline (8 résidus proline, 4,9% des acides aminés) ce qui peut expliquer sa moins bonne affinité pour les polyphénols.

IV.4.6. Etude des interactions polyphénols de l'extrait–protéines du lait par turbidimétrie

IV.4.6.1. Comportement de la caséine β et de la β -lactoglobuline en présence d'extrait de caroube, d'acide gallique ou de catéchine

Des solutions de caséine β et de β -lactoglobuline sont mises en présence de polyphénols avec des ratios polyphénol/protéine allant de 5 à 1000. Le trouble entraîné par la réaction est suivi au spectrophotomètre à 600 nm. L'extrait de caroube provoque un trouble beaucoup plus important que la catéchine ou l'acide gallique (Figures 4.26 à 4.28). Pour la β caséine en présence d'extrait de caroube, on atteint une absorbance maximale de $1,13 \pm 0,43$ et pour la β -lactoglobuline une absorbance de $1,12 \pm 0,07$. Ces valeurs sont atteintes pour un rapport polyphénol/protéine de 100 dans les deux cas. Par contre pour l'acide gallique et la catéchine les valeurs restent très faibles et atteignent au maximum 0,04. On sait que la nature et la structure des polyphénols affectent l'accès aux sites accepteurs lors des interactions avec les protéines (Siebert et al., 1996). Les monomères, les dimères et quelques oligomères ne peuvent pas former assez de ponts croisés et de forts complexes avec les protéines (Jones et al., 1976). Or l'extrait de caroube présente une composition en polyphénols complexe et comprenant de grosses molécules polyphénoliques pouvant complexer les protéines à la différence des monomères que sont la catéchine et l'acide gallique.



En

Figure 4.26 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β - lactoglobuline en fonction du rapport polyphénols de l'extrait de caroube/protéines en solution. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions (longueur d'onde 600 nm).

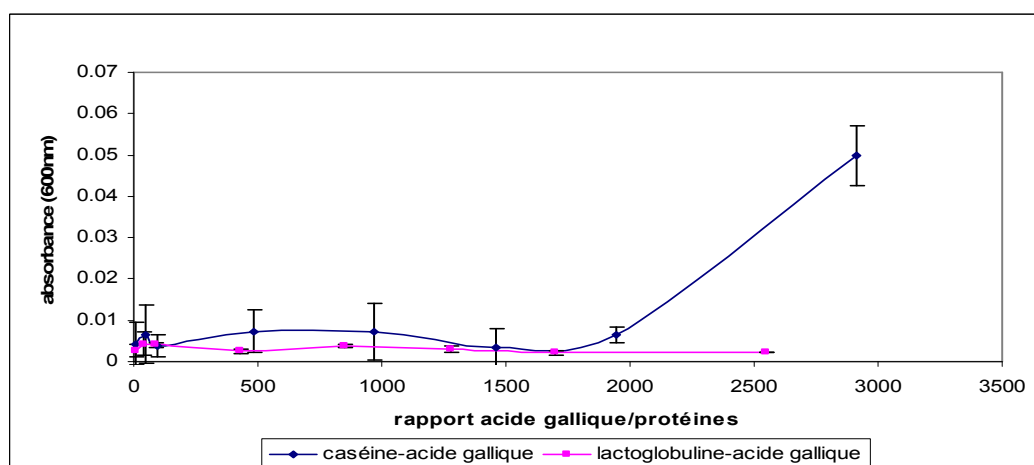


Figure 4.27 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β - lactoglobuline en fonction du rapport acide gallique/protéines en solution. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions (longueur d'onde 600 nm).

augmentant la quantité d'extrait de caroube, on obtient une diminution de l'absorbance qui est particulièrement importante dans le cas de la β -lactoglobuline. Ce phénomène a déjà été noté par plusieurs auteurs (Haslam et Lilley, 1988 ; Luck et al., 1994 ; Siebert et al., 1996 ; Siebert, 1999 ; De Freitas et al., 2003) et peut être expliqué par la réversibilité de l'agrégat tannin/protéine et par le changement de stœchiométrie du complexe formé, résultant du changement dans le rapport polyphénol/protéine. En présence d'un excès de polyphénols, tous les sites de liaisons protéiques sont occupés, mais la complexation est faible, puisque les polyphénols ne trouvent plus de sites de liaisons protéiques libres et sont incapables de complexer plusieurs protéines en même temps. Cette situation entraîne des agrégats de petite taille.

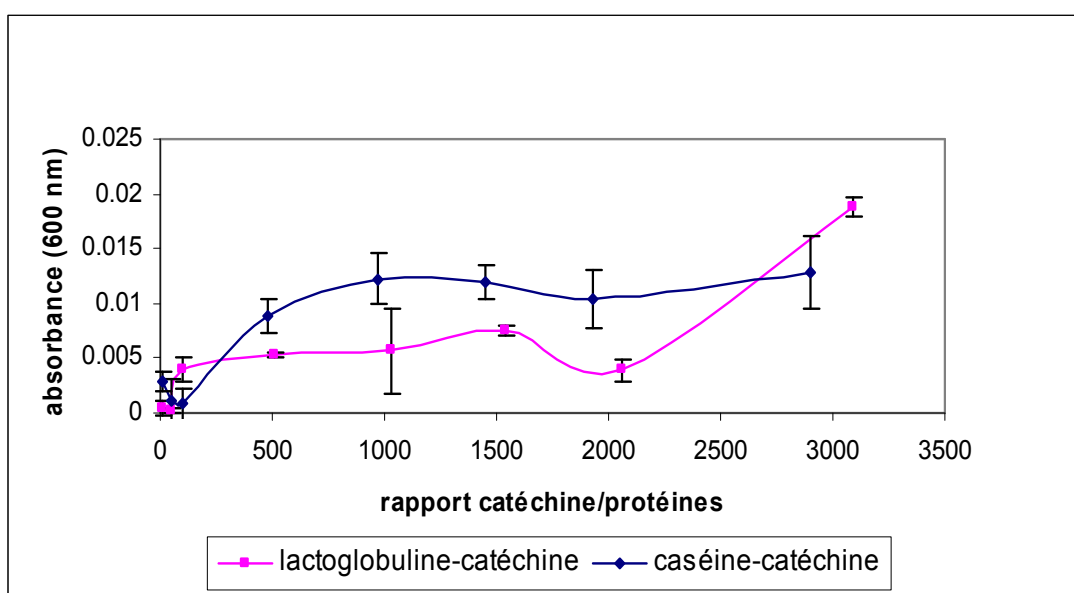


Figure 4.28 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en fonction du rapport catéchine/protéines en solution. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions (longueur d'onde 600 nm).

IV.4.6.2. Effet des polysaccharides sur l'interaction polyphénols de l'extrait-protéines

L'extrait de caroube comprend une quantité non négligeable de polysaccharides. Selon Joslyn et al. (1968) la teneur en sucres des gousses vertes de caroube est de 29,7%. Or l'interaction entre tannins et protéines est affectée par la composition du milieu, notamment par la présence d'autres co-substrats comme les polysaccharides (Mc Manus et al., 1985 ; Ozawa et al., 1987 ; Luck et al., 1994 ; Haslam, 1998). L'élimination des polysaccharides par précipitation

des sucres à l'éthanol provoque une moindre efficacité de l'extrait dans la complexation de la caséine β et de la β -lactoglobuline (Figure 4.29). Il faut augmenter le rapport polyphénol/caséine jusqu'à 1000 pour aboutir à une absorbance maximale de $1,13 \pm 0,28$ équivalente à l'absorbance obtenue précédemment avec l'extrait de caroube intact pour un rapport polyphénols/caséine de 100. Pour la β -lactoglobuline, l'absorbance maximale atteinte, pour un ratio polyphénols/protéine de 300, est de $0,77 \pm 0,01$, valeur très inférieure à celle obtenue avec l'extrait sans élimination des polysaccharides. A noter que les courbes suivent la même allure générale que ce soit avec l'extrait natif ou exempt de polysaccharides.

Plusieurs études ont démontré la capacité des polysaccharides à gêner la réaction de complexation entre polyphénols et protéines (Ozawa et al., 1987) cependant il a été signalé que la gomme de caroube, de guar et de tara ne présentait pas cet effet inhibiteur (Luck et al., 1994). Les polysaccharides neutres (β -cyclodextrine, arabinogalactane) ont habituellement une faible solubilité due à l'existence d'un grand nombre de liaisons hydrogène qui stabilise les interactions intrachaînes et interchaînes (Rinaudo, 2001). L'augmentation de l'agrégation en présence de polysaccharides peut être expliquée par une augmentation de la taille de l'agrégat tannin/protéine à cause de l'absorption de quelques molécules polysaccharidiques à sa surface, ce qui serait insuffisant pour dissoudre le complexe (De Freitas et al., 2003).

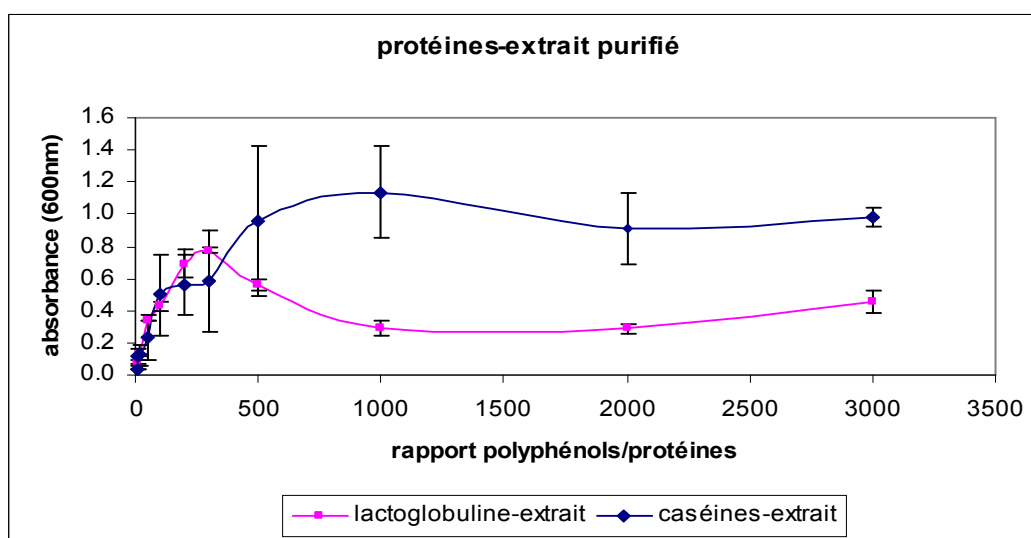


Figure 4.29 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en fonction du rapport polyphénols de l'extrait de caroube /protéines en solution (extrait de caroube exempt de polysaccharides par précipitation à l'éthanol). Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions (longueur d'onde 600 nm).

IV.4.6.3. Influence de la force ionique sur l'interaction polyphénols de l'extrait–protéines.

L'influence de la force ionique du milieu sur la capacité de l'extrait de caroube à agréger les protéines a été étudiée en ajustant la force ionique par l'addition de chlorure de sodium dans une gamme de 0 à 0,5 M et en suivant l'absorbance du précipité obtenu avec la caséine $\square$ et la $\square$ -lactoglobuline mises en présence d'extrait de caroube en respectant un ratio polyphénol/caséine de 1000 et polyphénol/lactoglobuline de 300 qui provoquent un trouble maximal (Figure 4.30). L'effet de la force ionique est faible aussi bien sur la caséine que sur la lactoglobuline. On observe en moyenne une augmentation du pourcentage d'agrégation de 11 à 20% en présence d'une concentration en NaCl supérieure à 0,1M.

Ces résultats sont difficilement interprétables parce que les polyphénols de l'extrait de caroube sont constitués d'un grand nombre de molécules différentes de tannins condensés et de tannins hydrolysables qui réagissent chacune de façon différente avec les protéines et le NaCl. De Freitas et al. (2003) ont suggéré que l'agrégation entre tannins condensés et BSA était dominée par des liaisons hydrophiles fortement affectées par les facteurs ioniques, avec une diminution de l'agrégation avec l'augmentation de la force ionique. A l'inverse, il a été rapporté que le caractère ionique du milieu pouvait entraîner une diminution de la solubilité du complexe protéine/polyphénol (Luck et al., 1994; Siebert et al., 1996 ; Kawamoto et Nakatsubo, 1997) dans le cas de gallotannins. Les gallotannins ou tannins hydrolysables sont supposés moins polaires que les tannins condensés (Hagerman et al., 1998), et les forces d'interaction entre gallotannins et protéines sont essentiellement hydrophobes. Ce sont principalement les polyphénols qui sont rencontrés dans notre extrait de caroube. Quoi qu'il en soit l'effet de la force ionique reste faible dans nos expériences.

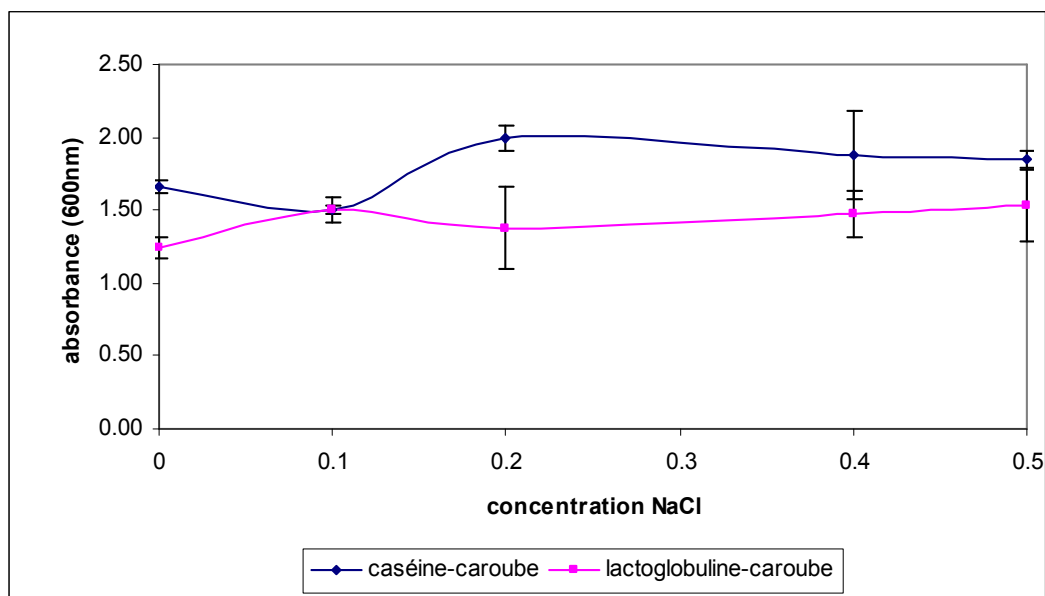


Figure 4.30 : Evolution de l'absorbance de solutions de caséine β et de β -lactoglobuline en présence d'extrait de caroube, en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu. Les résultats sont obtenus à partir de 3 répétitions (longueur d'onde 600 nm).

IV.4.7. Conclusion

L'extrait de caroube provoque un changement dans le comportement des protéines laitières. Ceci est visible par la diminution du rayon hydrodynamique des micelles lors de l'interaction entre les polyphénols et les protéines. Dans l'ensemble, les résultats confirment la spécificité de l'action des polyphénols du caroube sur les protéines laitières et montrent que l'effet de l'extrait de caroube est très différent de celui de la présure ou des ferments lactiques. En électrophorèse capillaire, l'extrait de caroube induit une modification du comportement électrophorétique de l'ensemble des protéines laitières avec un effet plus marqué sur les caséines β , κ et α_{s2} . De même, en étudiant le complexe protéine-polyphénol par chromatographie liquide haute performance en colonne d'exclusion stérique, la caséine β semble plus réactive que la β -lactoglobuline. Ces différences dans l'affinité de l'extrait de caroube aux protéines seraient dues à leurs différences d'hydrophobie et de leur contenu en résidus proline et aussi à leurs différences de conformation due aux ponts disulfure intramoléculaires.

Les interactions entre les polyphénols et les protéines peuvent être qualifiées de «faibles» car elles ne résistent pas à la présence de solvant. L'étude du complexe β -lactoglobuline-acide gallique et β -lactoglobuline-catéchine en spectrométrie de masse permet la mise en évidence d'une liaison de type non-covalent. Ces liaisons paraissent être majoritairement de type

hydrophobe dans le mélange extrait de caroube – protéines car elles réagissent très faiblement aux changements de force ionique dans le milieu.

Les polysaccharides présents dans l'extrait de caroube jouent un rôle important dans la complexation en se liant aux agrégats polyphénols – protéines et contribuent à multiplier par 10 l'efficacité de l'extrait de caroube.

Chapitre V
CONCLUSION GENERALE

La fabrication de produits laitiers utilisant le jus de gousses vertes de caroube est une pratique régionale libanaise. Une trentaine de composés phénoliques a été identifiée dans le jus extrait de gousses vertes de caroube. Avec une teneur de 45,2 g de polyphénols par litre de jus obtenu à partir de gousses fraîches, l'extrait de caroube est une source alimentaire très riche en polyphénols. L'extrait de gousses vertes s'est avéré aussi d'une grande richesse en composés phénoliques condensés et hydrolysables à la fois. De ce fait, l'extrait de caroube présente des propriétés en tant que coagulant du lait.

Nous avons mis en évidence l'effet des polyphénols de l'extrait sur les protéines laitières et nous avons cherché à caractériser le type de liaison qui était induite par la présence simultanée de protéines et d'extrait de caroube. Nous avons pu déterminer la quantité d'extrait de caroube à ajouter pour obtenir une coagulation optimale avec récupération de la plus grande quantité de protéines et de matière sèche. Ces conditions optimales pour la coagulation ont été établies et étudiées sur différents laits dont le lait de vache, de chèvre, de brebis, de chamelle et de soja. L'efficacité de l'extrait de caroube dans la coagulation du lait UHT et du lait de chamelle constitue un point tout à fait positif puisque l'on sait que les laits ayant subi des traitements thermiques ainsi que le lait de chamelle réagissent habituellement très mal à la présure. Par contre le lait de soja ne semble pas pouvoir être utilisé de manière intéressante avec l'extrait de caroube.

Des tests ont pu assurer qu'aucune activité enzymatique dans l'extrait n'était responsable de la coagulation du lait. La sensibilité des coagulums aux conditions du milieu a été aussi étudiée. La température est sans effet sur la coagulation par l'extrait de caroube tandis qu'un pH aux alentours de 6 permet de précipiter un maximum de protéines laitières. Le coagulum obtenu se raffermi avec le temps avec réarrangements des liaisons et exsudation d'eau. Toutefois les caractéristiques rhéologiques de ce coagulum restent très différentes de celles du coagulum présure en particulier en raison de sa richesse en eau. En réalité, il ne s'agit pas de coagulation au sens strict du terme, puisqu'il ne nous a pas été possible de mesurer un temps de coagulation au rhéomètre. On doit davantage parler de complexation des protéines laitières.

L'extrait de caroube provoque un changement du comportement des protéines laitières et la diminution de la taille des micelles. La nature de la protéine, son hydrophobie et son contenu en proline semblent jouer un grand rôle dans les interactions polyphénols-protéines. Ainsi, en électrophorèse capillaire, l'extrait de caroube provoque une modification du comportement électrophorétique de l'ensemble des protéines laitières avec un effet plus marqué sur les caséines β , κ et α_{s2} . De même, en étudiant le complexe protéine-polyphénol par chromatographie liquide

haute performance en colonne d'exclusion stérique, la caséine β semble plus réactive que la β -lactoglobuline.

L'étude du complexe β -lactoglobuline-acide gallique et β -lactoglobuline-catéchine en spectrométrie de masse indique la présence de liaisons non-covalentes que l'on peut qualifier de faibles puisqu'elles ne résistent pas à la présence de solvant dans le cas des expériences de chromatographie en phase inverse. Les interactions entre les polyphénols de l'extrait et les protéines sont donc majoritairement de type hydrophobe. En effet, ceci est confirmé par le faible effet provoqué par les changements de force ionique dans le milieu.

Les expériences en turbidimétrie confirment ce qui a déjà été observé dans la littérature. Le rapport molaire polyphénols/protéines est très important et un excès de polyphénols provoque la dissolution du complexe formé. Ce qui fait que le coagulum formé avec l'extrait de caroube possède encore une fois des caractéristiques bien spécifiques qui le rendent très différent des coagulums présure et lactique.

Un facteur important demeure inexploré, il s'agit de la composition en polysaccharides de l'extrait de caroube. Un prolongement intéressant de ce travail serait donc d'étudier si les polysaccharides de l'extrait de caroube ont un effet direct sur les protéines laitières. On a déjà constaté que la présence de polysaccharides dans l'extrait de caroube augmente son efficacité. L'existence d'interactions entre les protéines et certains polysides est mise à profit dans de nombreux secteurs de l'industrie alimentaire, comme par exemple l'utilisation des interactions carraghénanes-protéines du lait pour préparer des desserts lactés. Ces résultats peuvent être complétés aussi par une étude sensorielle du coagulum obtenu. Car seul le consommateur pourra juger de la réussite de ce produit et de sa possible commercialisation. La commercialisation de ce produit, qui jusqu'alors n'est qu'une pratique ménagère restreinte, permettrait le développement de la région rurale de Eklm El Kharoub ainsi que la promotion de la culture du caroubier qui convient tout à fait à l'écosystème méditerranéen libanais.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou Lahoud C., 2003. Oliviers, développement & Co. Le Commerce du Levant, 5525, 78-79.
- Abou Zeidan C., 2002. Coagulation du lait et complexation des protéines par l'extrait des gousses vertes du caroubier. Mémoire de fin d'études, Université Libanaise, Faculté d'Agronomie. 95p.
- Alaimo M.H., Farrell H.M. Jr., Germann M.W., 1999. Conformational analysis of the hydrophobic peptide α_{S1} -casein (136-196). Biochim. Biophys. Acta, 1431, 410-420.
- Alais C., 1984. Science du lait. Principes des Techniques Laitières. 4^e édition, Sepaic, Paris, 814p.
- Araji F., 2003. Compositions et aptitudes fromagères de différents laits de vache collectés dans la plaine de la Békaa. Thèse Docteur Ingénieur, ENSAIA. 138p.
- Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.P., Bast A., 2001. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with proteins. Food Chem. Toxicol., 39, 787-791.
- Artz W.E., Bishop P.D., Dunker A.K., Schanus E.G., Swansen B.G., 1987. Interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum albumin and purified bean globulin fraction. J. Agric. Food Chem., 35, 417-421.
- Attia H., Kherouatou N., Nasri M., Khorchani T., 2000. Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. Le Lait, 80, 503-515.
- Attia H., Kherouatou N., Dhouib A., Khorchani T., 2001. Dromedary milk fermentation: microbiological and rheological characteristics. J. Ind. Mic., 26, 263-270.
- Asano K., Shinagawa K., Hashimoto N., 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their role in chill haze formation. J. Am. Soc. Brew. Chem., 40, 147-154.
- Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A., 1997. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates and tannins. J. Food Compos. Anal., 10, 166-172.

- Barbano D.M., Rasmussen R.R., 1992. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. *J. Dairy Sci.*, 75, 1-12.
- Bate-Smith E.C., Swain T., 1962. Flavonoid compounds. In : comparative biochemistry. Florkin M. Mason H.S. Eds. Vol. 3, 75-809.
- Bate-Smith E.C., 1973. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochem.*, 12, 907-912.
- Battle I., 1997. Current situation and possibilities of development of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in the Mediterranean region, unpublished FAO report, Rome, Italy.
- Battle I., Tous J., 1997. Carob tree *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilised and neglected crops, n°17. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy, 92p.
- Bayoumi S., 1990. Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *Kiel Milch. Forsch.*, 42, 3-8.
- Beart J.E., Lilley T.H., Haslam E., 1985. Plant polyphenols. Secondary metabolism and chemical defence: some observations. *Phytochem.*, 24, 33-38.
- Beddows C., Wong J., 1987. Optimization of yield and properties of silken tofu from soybeans. I. The water:bean ratio. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22, 15-21.
- Belitz H.D., Grosch W., 1987. Food Chemistry ed. Springer-Verlag, Berlin, 992 p.
- Berkowitz-Hundert R., Leibowitz J., Ilany-Feigenbaum J., 1964. Research on milk clotting enzymes from palestinian plant sources. 5.A vegetable rennin from the pumpkin (*Cucurbita pepo*). *Enzymologia*, 27, 332-342.
- Bines V.E., Young P., Law B.A., 1989. Comparison of cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *J. Dairy Res.*, 56, 657-664.

Broome M.C., Hickey M.W., 1990. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 45, 53-59.

Brulé G., Lenoir J., Remeuf F., 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait. *In: Le Fromage*, 3^e édition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 7-41.

Cabezas L., Esteban M.A., Marcos A., 1981. Agar gel diffusion of *Cynara humilis* (L.) proteinases and other enzymes. *Alimentaria*, 128, 17-22.

Calderon P., Van Buren J.P., Robinson W.B., 1968. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatine and condensed and hydrolyzable tannins. *J. Agric. Food Chem.*, 16, 479-482.

Campos R., Guerra R., Aguilar M., Ventura O., Camacho L., 1990. Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chem.*, 35, 89-97.

Cattaneo T.M.P., Nigro F., Messina G., Giangiacomo R., 1994. Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, 269-272.

Chodat R., Rougé E., 1906. Fig leaves as coagulant. *Zentralblatt Bakteriologie anteilung*, 16, 1.

Codorniu-Hernandez E., Mesa-Ibirico A., Montero-Cabrera L.A., Martinez-Luzardo F., Borrmann T., Stohrer W., 2003. Theoretical study of flavonoids and proline interactions. Aqueous and gas phases. *J. Mol. Struct.*, 623, 63-73.

Cook N.C., Samman S., 1996. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.

Corsi L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi M., 2002. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73, 674-684

Cullen D., Gray G.L., Wilson L.J., Hayenga K.J., Lamsa M.H., Rey M.W., Norton S., Berka R.M., 1987. Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. Bio-Technol., 5, 369-376.

Dacosta Y., 1990. Lait de soja et tofu. Eds Apria / Cdiupa, 102 p.

Dalgleish D.G., 1982. Milk proteins. Chemistry and Physics. *In*: Food proteins. Fox P.F. Condon J.J. eds, Applied Sci. Publi., London, 155-178.

Dalgleish D.G., 1990. The effect of denaturation of beta-lactoglobulin on renneting-a quantitative study. Milchwissenschaft, 45, 491-494.

Dalgleish D.G., Horne D.S., Law A.J.R., 1989. Size-related differences in bovine casein micelles. Biochim. Biophys. Acta, 991, 383-387.

Danley D.E., Geoghegan K.F., 1988. Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. J. Biol. Chem., 263, 9785-9789.

Dastur N., Sastry K., Venkatappiah D., 1948. Vegetable rennet. Indian J. Vet. Sci., 18, 233.

De Freitas V., Carbalho E., Mateus N., 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. Food Chem., 81, 503-509.

Desphande S.S., Salunkhe D.K., 1982. Interaction of tannic acid and catechin with legume starches. J. Food Sci., 47, 2080-2081.

Dunn-Coleman N.S., Bloebaum P., Berka R.M., Bodie E., Robinson N., Armstrong G., Ward M., Przetak M., Garter G.L., Lacost R., Wilson L.J., Kodama K.H., Baliu E.F., Bower B., Lamsa M., Heinsohn H., 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. Bio-Technol., 9, 976-981.

Eck A., Gillis J., 1997. Le fromage: de la science à l'assurance qualité. Eds Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 7-39.

Eid M., 2001. Essai d'identification des variétés locales de *Ceratonia siliqua*. Mémoire de fin d'études, Université Saint Joseph, faculté d'ingénierie, Ecole Supérieure d'Ingénieurs d'Agriculture Méditerranéenne (ESIAM), 188p.

Emtage J.S., Angal S., Doel M.T., Harris T.J.R., Jenkins B., Lilley G., Lowe P.A., 1983. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 3671-3675.

Enne G., Elez D., Fondrini F., Bonizzi I., Feligini, Aleandri R., 2005. High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella : comparison with results from raw milk and cheese matrix. J. Chromatogr. A, 1094, 169-174.

Esteves C.L.C., Lucey J.A., Pires E.M.V., 2002. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. Int. Dairy J., 12, 427-434.

FAO, 2000. Résultats globaux du recensement agricole. Edition révisée, Ministère d'Agriculture, Beyrouth, Liban. 122p.

Farah Z., 1993. Composition and characteristics of camel milk. J. Dairy Res., 60, 603-626.

Faro C., 1991. Purificação et caracterização físico-química da protease de *Cynara cardunculus*, Ph.D. thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Fiszman S.M., Lluch M.A., Salvador A., 1999. Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties. Int. Dairy J., 9, 895-901.

Foltmann B., Pedersen V.B., Kauffman D., Wybrandt G., 1979. The primary structure of calf chymosin. J. Biol. Chem., 254, 8447-8456.

Franke A.E., Kaczmarek F.S., Eisenhard M.E., Geoghegan K.F., Danley D.E., De Zeeuw J.R., O'Donnel M.M., Gollaher M.G.Jr., Davidow L.S., 1988. Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. Dev. Ind. Microbiol., 29, 43-57.

Frem M., 2002. Liban: Le passage de l'économie informelle à l'économie formelle, le cas du secteur laitier informel. CIHEAM-IAMM, 46p.

Froc J., 2001. Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. INRA mensuel n°110, 41-42.

Gagnaire V., 1994. Utilisation de la trypsine libre et immobilisée comme sonde d'étude de la structure de la micelle de caséine bovine. Thèse de doctorat de l'université de Rennes I, 127p.

Garcia-Risco M., López-Fandino R., 1999. Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. J. Sci. Food Agric., 79, 1171-1178.

Glombitza K., Gerstberger G., 1985. Phlorotannins with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*. Phytochem., 24, 543-551.

Goff C.G., Moir D.T., Kohno T., Gravius T.C., Smith R.A., Yamasaki E., Taunton-Rigby A., 1984. Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 27, 35-46.

Goldstein J.L., Swain T., 1963. Changes in tannins ripening fruits. Phytochem., 2, 371-383.

Griffiths D.W., 1991. In Toxic substances in crop plants, ed. J.P.F. D'Mello, D.M. Duffus and J.H. Duffus, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p.180.

Grolier P., Borel P., Scalbert A., Remesy C., 2001. Les phytomicronutriments. In: Traité de nutrition clinique de l'adulte, Médecine-Sciences, Flammarion, 165-177.

Grosclaude F., 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relation avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. INRA Prod. Anim. 1, 5-17.

Guo S-T., Ono T., 2005. The role of composition and content of protein particles in soymilk on tofu curding by glucono- δ -lactone or calcium sulfate. J. Food Sci., 70, 4, 258-262.

Haddad G., 2004. Effets du traitement thermique du lait sur le rendement fromager: comparaison entre la présure animale et l'extrait vert du caroubier. Mémoire de fin d'études, Université Libanaise, Faculté d'Agronomie, 70p.

Hagerman A.E., 1988. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. J. Chem. Ecol., 14, 453-461.

Hagerman A.E., Butler L.G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. J. Agric. Food Chem., 26, 809-812.

Hagerman A.E., Butler L.G., 1980. Determination of protein in tannin-protein complexes. J. Agric. Food Chem., 28, 944-947.

Hagerman A.E., Butler L.G., 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J. Biol. Chem., 256, 4494-4497.

Hagerman A.E., Klucher K.M., 1986. Tannin-protein interactions. Prog. Clin. Biol. Res., 213, 67-76.

Hagerman A.E., Rice M.E., Ritchard N.T., 1998. Mechanisms of protein precipitation of two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16 (4-8) catechin (procyanidin). J. Agric. Food Chem., 46, 2590-2595.

Hamouche N., 2003. Un Européen tape à la porte. Le Commerce du Levant, 5529, 18-22.

Harrki A., Uusitalo J., Bailey M., Pentilla M., Knowles J.K.C., 1989. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Bio-Technol., 7, 596-600.

Haslam E., 1998. Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 420p.

Haslam E., Lilley T.H., 1988. Natural astringency in foodstuffs - a molecular interpretation. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 27, 1-41.

Haslam E., Lilley T.H., Warminski E., Liao H., Cai Y., Martin R., 1991. Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. *In: Phenolic compounds in food and their effects on health. I. Analysis, occurrence and chemistry*, Ho C-T, Lee CY, Huang M-T, editors, Am. Chem. Soc., 8-49.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. nutr. Biochem.*, 13, 572-584.

Herrero-Martinez J.M., Sanmartin M., Roses M., Bosch E., Rafols C., 2005. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 26, 1886-1895.

Holt C., 1992. Structure and Stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.*, 43, 63-150.

Horne D.S., Parker T.G., Dalgleish D.G., 1989. Casein micelles, polycondensation and fractals. *In: Food Colloids*. Bee R.D., Richmond P., Mingins J., eds, Special publication n°75, Royal Society of Chemistry, London, 400-405.

Institut de l'Elevage, 2003. Les filières lait et viande de ruminants au Liban. Compte- rendu d'étude. Bureau de la coopération technique internationale des organisations professionnelles de l'élevage français, Paris, France, 98p.

Jenness R., 1980. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.*, 63, 1605-1630.

Jöbstl E., Howse J.R., Fairclough J.P.A., Williamson M.P., 2006. Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4077-4081.

Jöbstl E., O'Connell J., Fairclough J.P.A., Williamson M.P., 2004a. Astringency- A molecular model for polyphenol / protein binding. *Fibre Diffraction Rev.*, 12, 66-69.

Jöbstl E., O'Connell J., Fairclough J.P.A., Williamson M.P., 2004b. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromol.*, 5, 942-949.

Jones W.T., Broadhurst R.B., Lyttleton J.W., 1976. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochem.*, 15, 1407-1409.

Joslyn M.A., Nishira H., Ito S., 1968. Leucoanthocyanins and related phenolic compounds of carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.*, 19, 543-550.

Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y., 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids. *In: Rice-Evans C., Packer L., Flavonoids in health and disease*, New York, Marcel Dekker, 137-161.

Kappeler S., Farah Z., Puhon Z., 1998. Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk casein. *J. Dairy Res.*, 65, 209-222.

Kawamoto H., Nakatsubo F., 1997. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochem.*, 46, 479-483.

Klessen C., Schmidt K.H., Gumpert J., Grosse H.H., Malke H., 1989. Complete secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1009-1015.

Kolmer M., Ord T., Ulmanen I., 1991. Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.*, 20, 131-140.

Kothavella R., Khuchandavi P., 1940. *Withania coagulans* a vegetable rennet. *Indian J. Vet. Sci.*, 10, 284.

Krishnamurti C., Subrahmayan V., 1948. Vegetable rennet. *Indian J. Dairy Sci.*, 1, 27-106.

Kumazawa S., Taniguchi M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M., Nakayama T., 2002. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 373-377.

Kurmann J., Rasic J., 1978. *Yoghurt, scientific grounds, technology, manufacture and preparations*, Eds Technical Dairy Publishing House, Denmark, 431 pages.

Lemoine R., 2002. La filière laitière libanaise: Un potentiel d'investissement dans l'élevage et l'industrie. Rev. lait. fr., 619, 12-15.

Lenoir J., Remeuf F., Schneid N., 1997. L'aptitude du lait à la coagulation par la présure. *In*: Le Fromage, 3^e édition Tec & Doc Lavoisier, Paris, 229-256.

Liu J-R., Chen M-J., Lin C-W., 2002. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. J. Food Sci., 67, 1, 104-108.

Liu Z-S., Chang SK-C., 2004. Effect of soymilk characteristics and cooking conditions on coagulant requirements for making filled tofu. J. Agric. Food Chem, 52, 3405-3411.

Loomis W.D., Battaile J., 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem., 5, 423-438.

Lo Piero A.R., Puglisi I., Petrone G., 2002. Characterization of lettuce, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. J. Agric. Food Chem., 50, 2439-2443.

Lovisi P., Jolivet P., Jagic F., Dalglish D., Chardot T., 2003. A protein kinase is located in the micellar fraction of fresh pasteurized skimmed farm milk. J Dairy Sci, 86, 1147-1156.

Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.H., 2000. Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- δ -lactone. J. Dairy Res., 67, 415-427.

Luck G., Liao H., Murray N.J., Grimmer H.R., Warminski E.E., Williamson M.P., Lilley T.H., Haslam E., 1994. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. Phytochem., 37, 357-371.

Luquet F.M., 1985. Lait et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre. 1. Les laits. De la mamelle à la laiterie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Macedo Q., Faro C., Pires E., 1993. Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. J. Agric. Food Chem., 41, 1537-1540.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., 2000a. Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France. 1-21.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., Schuck P., 2000b. Les produits industriels laitiers. Tec & Doc, Paris, France, 1-10.

Makkar H.P.S., Becker K., 1996. Effect of pH, temperature and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. J. Agric. Food Chem., 44, 1291-1295.

Marakis S., 1996. Carob bean in food and feed: Current status and future potentials- A critical appraisal. J. Food Sci. Technol., 33, 365-383.

Marakis S., Lambraki M., Diamantoglou S., 1993. Tannin chemistry of nine cretan carob varieties. Chimica Chronica, New Series, 22, 213-224.

Marakis S., Marakis G., Lambraki M., 1997. Tannins of eight carob varieties from the island of Lefkada, Greece. Chimica Chronica, New Series, 26, 57-66.

Marston F.A.O., Lowe P.A., Doel M.T., Schoemaker J.M., White S., Angal S., 1984. Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. Bio-Technol., 2, 800-804.

Mathieu J., 1998. Initiation à la physicochimie du lait. Tec & Doc, Paris, France, 220p.

McManus J.P., Davis K.D., Beart J.E., Gaffuey S.H., Lilley T.H., Haslam E., 1985. Polyphenol interactions. Part 1. Introduction: some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. J. Chem. Soc. Perkin Trans II, 1429-1438 A.

Mc Murrough L., Madigan D., Kelly R.J., Smyth M.R., 1996. The role of flavonoid polyphenols in beer stability. J. Am. Soc. Brew. Chem., 54, 141-148.

Mellor J., Dobson M.J., Roberts N.A., Tuite M.F., Emtage J.S., White S., Lowe P.A., Patel T., Kingsman S.M., 1983. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 24, 1-14.

Mercier J.C., 1981. Phosphorylation of casein presents evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63, 1-17.

Ministère de l'Agriculture, 1996. Etude de la diversité biologique du Liban. Publication n°9, Liban, 22, 70-71.

Ministère de l'Agriculture, 2001. Censuses des années 1998-2001. In: www.agriculture.gov.lb.

Miralles B., Bartolomé B., Amigo L., Ramos M., 2000. Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. *J. Dairy Sci.*, 83, 2759-2765.

Mueller-Harvey I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 3-20.

Mulkay P., Jerumanis J., 1983. Effets du poids moléculaire et du degré d'hydroxylation des proanthocyanidines sur la stabilité colloïdale de la bière. *Cerevisia*, 8, 29-35.

Murray P.A., Williamson M.P., Lilley T.H., Haslam E., 1994. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 2, 19, 923-935.

Nachtomi E., Alumot E., 1963. Tannins and polyphenols in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.*, 14, 464-468.

Naczek M., Oickle D., Pink D., Shahidi F., 1996. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: effect of pH, tannin and protein concentration. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2144-2148.

Nishimori K., Kawaguchi Y., Hidaka M., Uozumi T., Beppu T., 1982. Expression of cloned prochymosin gene sequence in *Escherichia coli*. *Gene*, 19, 337-344.

Nishimori K., Shimizu N., Kawaguchi Y., Hidaka M., Uozumi T., Beppu T., 1984. Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. *Gene*, 29, 41-49.

- Nishira H., Joslyn M.A., 1968. The galloyl glucose compounds in green carob pods. *Phytochem.*, 7, 2147-2156.
- Oh H.I., Hoff J.E., Armstrong L.A., 1980. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 394-398.
- Okuda T., Yoshida T., Hanato T., 1989. New methods of analysing tannins. *J. Nat. Prod.*, 52, 1-31.
- Ono T., Obata T., 1989. A model for the assembly of bovine casein micelles. *J. Dairy Res.*, 56, 453-461.
- Osawa R., Walsh T.P., 1993. Effects of acidic and alkaline treatments on tannic acid and its binding property to protein. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 704-707.
- Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelholder B., Bartsch H., Haber B., 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1727-1738.
- Ozawa T., Lilley T.H., Haslam E., 1987. Polyphenol interaction: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochem.*, 26, 2937-2942.
- Papagiannopoulos M., Wollseifen H.R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R., 2004. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 3784-3791.
- Parente D., De Ferra F., Galli G., Grandi G., 1991. Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77, 243-250.
- Parkash S., Jenness R., 1968. The composition and characteristics of goats' milk: A review. *Dairy Sci, Abstr.* 30, 67-87.

Pflug W., Araj F., Maalouf S., Andraos E., Misselmani H., Abou Zougheib A., Saad G., 2001. The cost of milk production on dairy farms in the Bekaa valley of Lebanon. Small holder livestock rehabilitation project, Zahle, Lebanon. 10p.

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

Pons M., Fiszman S.M., 1996. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. J. Texture Stud., 27, 597-624.

Porter L.J., Woodruffe J., 1984. Haemanalysis: The relative astringency of proanthocyanidin polymers. Phytochem., 32, 447-453.

Portnaya I., Cogan U., Livney Y.D., Ramon O., Shimoni K., Rosenberg M., Danino D., 2006. Micellization of bovine β -casein studied by isothermal titration microcalorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. J. Agric. Food Chem., 54, 5555-5561.

Pramanik B.N., Bartner P.L., Mirza U.A., Liu Y.-H., Ganguly A.K., 1998. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes : an emerging technology. J. Mass Spectrom., 33, 911-920.

Ramet J.P., 2001. The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*). FAO animal production and health paper, 113, 62 pages.

Remeuf F., Sodini I., Mohammed S., Corrieu G., 2002. Effets de l'enrichissement protéique et du chauffage du lait sur la microstructure et les propriétés physiques du yaourt brassé. Les Rencontres de l'INA. Nutrition et alimentation animale et humaine, sécurité des aliments, qualité, 2 pages.

René F., 1997. La rhéologie en biotechnologie. Le technoscope du futur, 167, 2-7.

Ribadeau-Dumas B., 1981. Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. Rev. Lait. Fr., 400, 17-32.

Richard T., Lefeuvre D., Descendit A., Quideau S., Monti J.P., 2006. Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760, 951-958.

Richard T., Vitrac X., Merillon J.M., Monti J.P., 2005. Role of peptide primary sequence in polyphenol-protein recognition: an example with neurotensin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1726, 238-243.

Rinaudo M., 2001. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel state. *Food Hydrocoll.*, 15, 433-440.

Rishani N., Rice R.P., 1988. Use of carob as potting medium component. *Hort Sci.*, 23, 334-336.

Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K., 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.

Salunkhe D.K., Chavan J.K., Kadam S.S., 1989. Dietary tannins: consequences and remedies, Ed. CRC press, Inc. Boca Raton, Florida.

Sanglier S., Van Dorsselaer A., Vivat-Hannah V., Renaud J.-P., 2005. La spectrométrie de masse des assemblages non-covalents en biologie : aspects fondamentaux et applications à la recherche pharmaceutique. *Spectra Anal.*, 245, 26-35.

Saura-Calixto F., 1988. Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carob pods. *J. Food Sci.*, 53, 1769-1771.

Sausse P., 2003. Effets de composés polyphénoliques sur la structure et les propriétés de couches d'adsorption de caséine β en milieu hydroalcoolique. Thèse de doctorat ès Physique des Liquides, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 127 p.

Sawaya W.N., Khalil J.K., Al-Shalhat A., Al-Mohammed H., 1984. Chemical composition and nutrition quality of camel milk. *J. Food Sci.*, 49, 744-747.

Scalbert A., Monties B., Janin G., 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1324-1329.

Scalbert A., 1992. Plant polyphenols. *In: Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues*. R.W. Hemingway and P.E. Laks Eds, 259-280.

Scalbert A., Williamson G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073-2085.

Schmidt D.G., 1980. Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy Res.*, 34, 42-64.

Schmidt D.G., 1982. Association of casein and casein micelle structure. *In: Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins* Fox P.F., ed., Applied Sci. Publi., London, 61-86.

Scott R., 1981. *Cheesemaking practice*, Applied Science Publishers, London, 44-165.

Siebert K.J., 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 353-362.

Siebert K.J., Lynn P.Y., 1998. Comparison of polyphenol interactions with PVPP and haze-active protein. *J. Am. Brew. Chem.*, 56, 24-31.

Siebert K.J., Troukhanova N.V., Lynn P.Y., 1996. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 80-85.

Singleton V.L., 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substance of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.*, 27, 149.

Socynska-Kordala M., Bakowska A., Oszmiansky J., Gabrielska J., 2001. Metal-ion flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 6, 277-281.

- Swaigood H.E., 1982. Association of casein aggregates. *In*: Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins. Fox P.F. ed., Applied Science Publishers, London, 1-59.
- Tamir M., Nachomi E., Alumot E., 1971. Degradation of tannins from carob pods by thioglycolic acid. *Phytochem.*, 10, 2769-2774.
- Teuber M., 1990. Production of chymosin by microorganisms and its use for cheesemaking. *Bull. IDF*, 251, 3-15.
- Torres J.L., Bobet R., 2001. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts, antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4627-4634.
- Tsao R., Yang R., 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1018, 29-40.
- Tsuchiya K., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C., Tamura G., 1993. Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 327-332.
- Tucker S.C., 1992. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). *Am. J. Bot.*, 79(3), 318-327.
- Uchiyama H., Uozumi T., Beppu T., Arima K., 1980. Purification of prorennin mRNA and its translation in vitro. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1373-1381.
- Uusitalo J.M., Nevalainen K.M.H., Harkki A.M., Knowles J.K.C., Penttilä M.E., 1991. Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *J. Biotechnol.*, 17, 35-50.
- Vaher M., Koel M., 2003. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 990, 225-230.
- Van Buren J.P., Robinson W.B., 1969. Formation of complexes between protein and tannic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 17, 772-777.

- Van Den Berg J.A., Van Der Laken K.J., Van Ooyen A.J.J., Renniers T.C.H.M., Rietveld K., Schaap A., Brake A.J., Bishop R.J., Schultz K., Moyer D., Richman M., Shuster J.F., 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio-Technol.*, 8, 135-139.
- Van Hekken D.L., Thompson M.P., 1992. Application of PhastSystem to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 75, 1204-1210.
- Veisseyre R., 1975. *Technologie du lait*. 3^e édition. La Maison Rustique, Paris, France, 713 p.
- Veloso A.C.A., Teixeira N., Ferreira I.M.P.L.V.O., 2002. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis; detection of milk adulterations. *J. Chromatog. A*, 967, 209-218.
- Vergé S., Richard T., Moreau S., Richelme-David S., Vercauteren J., Promé J.C., Monti J.P., 2002. First observation of non-covalent complexes for a tannin-protein interaction model investigated by electrospray ionisation mass spectroscopy. *Tetrahedron Lett.*, 43, 2363-2366.
- Verissimo P., Esteves C., Faro C., Pires E., 1995. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol. Lett.*, 17, 621-626.
- Verissimo P., Faro C., Moir A.J., Lin Y., Tang J., Pires E., 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L.. *Eur. J. Biochem.*, 235, 762-768.
- Viaene A., Volckaert G., Joniau M., De Baetselier A., Van Cauwelaert F., 1991. Efficient expression of bovine α lactalbumin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 202, 471-477.
- Vieira de Sa F., Barbosa M., 1972. Cheese-making with a vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus*). *J. Dairy Res.*, 39, 335-343.

Vilotte J.-L., Soulier S., Mercier J.-C., Gaye P., Hue-Delahaie D., Furet J.-P., 1987. Complet nucleotide sequence of bovine α lactalbumin gene : comparison with its rat counterpart. *Biochimie*, 69, 609-620.

Vilotte J.-L., Soulier S., Printz C., Mercier J.-C., 1991. Sequence of the goat α lactalbumin encoding gene : comparison with the bovine gene and evidence of related sequences in the goat genome. *Gene*, 98, 271-276.

Walstra P., 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Res.*, 73, 1965-1979.

Walstra P., Jenness R., 1984. *In: Dairy Chemistry and Physics*, Publication John Wiley & sons Inc, New York, USA, 467p.

Wang H.L., Cavins J.F., 1989. Yield and amino acid composition of fractions obtained during tofu production. *Cereal Chem.*, 66, 4, 359-361.

Ward M., Wilson L.J., Kodama K.H., Rey M.W., Berka R.M., 1990. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio-Technol.*, 8, 435-440.

Waterman P.G., Mole S., 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*, Blackwell, Oxford.

Waugh D.F., Creamer L.K., Slattery C.W., Dresdner G.W., 1970. Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, 9, 786-795.

White T., 1987. Tannins: their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.*, 8, 377.

Würsch P., Vedovo S., Rosset J., Smiley M., 1984. The tannins granules from ripe carob pod. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 17, 351-354.

Zywicki B., Reemtsma T., Jekel M., 2002. Analysis of commercial vegetable tanning agents by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and its application to waste water. *J. Chromatogr. A*, 970, 191-200.

www.fao.org/docrep/T4280F/T4280F07.htm. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.

ANNEXE 1

Liste et description des préparations lactières du Liban (Institut de l'Elevage, 2003).

Nom	Aspect	Technologie	Composition	Espèce	Zone de production	Remarques pour le Liban
LABAN	Pots de 500 g ou 1 kg	Pasteurisation puis fermentation lactique à 43 °C pendant 3h	12% MS 3% MG	Vache, chèvre	Moyen Orient	Fabrication fermière et surtout industrielle
LABNEH	Pots de 500 g	Egouttage du laban en sacs de toile	23 à 25% MS 10% MG	Vache, chèvre	Moyen Orient	Fabrication fermière et surtout industrielle
HALLOUMI	Rectangle plié en 2, 250 à 300 g en sac ou en bidon avec saumure ou alors à la coupe	Pasteurisation, puis caillage, moulage et pressage. Cuisson à 95°C dans le sérum durant 30 min environ puis pressage	58 à 68% MS 45 à 50% MG/MS	Vache, brebis	Originaire de Chypre, désormais partout au Proche Orient	Fabrication fermière et surtout industrielle.
AKKAWI	Carré de 500 g; vendu en saumure ou à la coupe	Pasteurisation, puis fermentation au levain, puis pressage et salage.	35% MS 30 à 50% MG/MS	Vache, brebis	Tout le Proche et le Moyen Orient	Fabrication fermière et surtout industrielle. Utilisé en pâtisserie (Kanafieh...)
DOUBLE CREME	Bloc de 300 g	Sous-produit des précédents, fromage de sérum cuit		Vache, brebis		Fabrication fermière et surtout industrielle. Fréquent.
MOUCHALILI ou JEDL	Effilé, en forme de tresse, à la coupe			Vache, chèvre	Liban	Fabrication fermière. Fréquent.
KACHKAVAL	Cylindres de 20 à 30	Lait cru emprésuré,	55 à 60% MS	Brebis	Originaire de	Fabrication

	cm de diamètre, et de 3 à 8 kg	puis caillé égrainé, cuit, pétri, moulé, recouvert de cire puis séché durant 2 mois	45 à 55% MG/MS		Bulgarie, désormais péri méditerranéen	industrielle. Fréquent.
BALADI ou "fromage vert"	Boules de 10 cm de diamètre	Fromage cru avec présure, pressé à la main		Chèvre surtout	Liban	Fabrication fermière. Fréquent. Fromage "vert" quand il est frais, il peut être mis en saumure pour être conservé, et prend un goût très marqué.

UMBRIS ou ANBARIS	Détaillé en pots	Fromage cru, mou et aigre fermenté en jarres, puis égoutté à la paille. La jarre est régulièrement remplie avec du nouveau lait.		Chèvre surtout	Bekaa et Chouf	Fabrication fermière. Rare. Peut être conservé dans l'huile d'olive, ou coupé et mis en saumure une fois sec.
CHANKLICH	Boules dans des bocaux ou des sacs, baignant dans l'huile d'olive	Lait pasteurisé, fermenté, égoutté puis moulé enrobé de thym, de cumin et de diverses	50 à 70% de MS 16 à 18% de MG/MS	Brebis surtout, parfois vache	Liban, Syrie, Jordanie	Fabrication fermière ou industrielle. Fréquent.

			épices				
KECHEK	Poudre		Lait pasteurisé, fermenté, additionné de blé concassé, puis séché au soleil, puis moulu.	85 à 90% de MS 8 à 10% de MG/MS	Vache, brebis, chèvre	Liban, Syrie, Jordanie	Fabrication surtout familiale. Très fréquent. Utilisé en cuisine pour les soupes et les ragoûts.
DARFIYEH	Boules de 250 g conservées dans une peau de chèvre		Lait cru mûré (1/2j), emprésuré, moulé à la main puis mis dans le Dariff (peau de chèvre nettoyée et salée). Salage et fermeture de la peau. Maturation de 1 à 6 mois	40 à 50 % de MG	Chèvre	Nord du Mont Liban, vers Beharré	Fabrication fermière. Rare. Goût marqué.
ARICHI ou KARICHI	Fromage frais		Sérum de fabrication, notamment du Darfiyeh, chauffé à 90°C pendant 30 mn		Chèvre surtout	Nord du Mont Liban	Fabrication fermière. Rare. Ne se conserve pas.
SAMNEH	Beurre clarifié liquide		Lait cru acidifié naturellement, puis baratté	99% de MG	Vache, brebis, chèvre	Asie	Fabrication fermière. Assez rare. Entre dans les recettes traditionnelles de pâtisserie.

ANNEXE 2



Figure 1: Gousses vertes, gousses mûres, feuillage et poudre de caroube.

ANNEXE 3

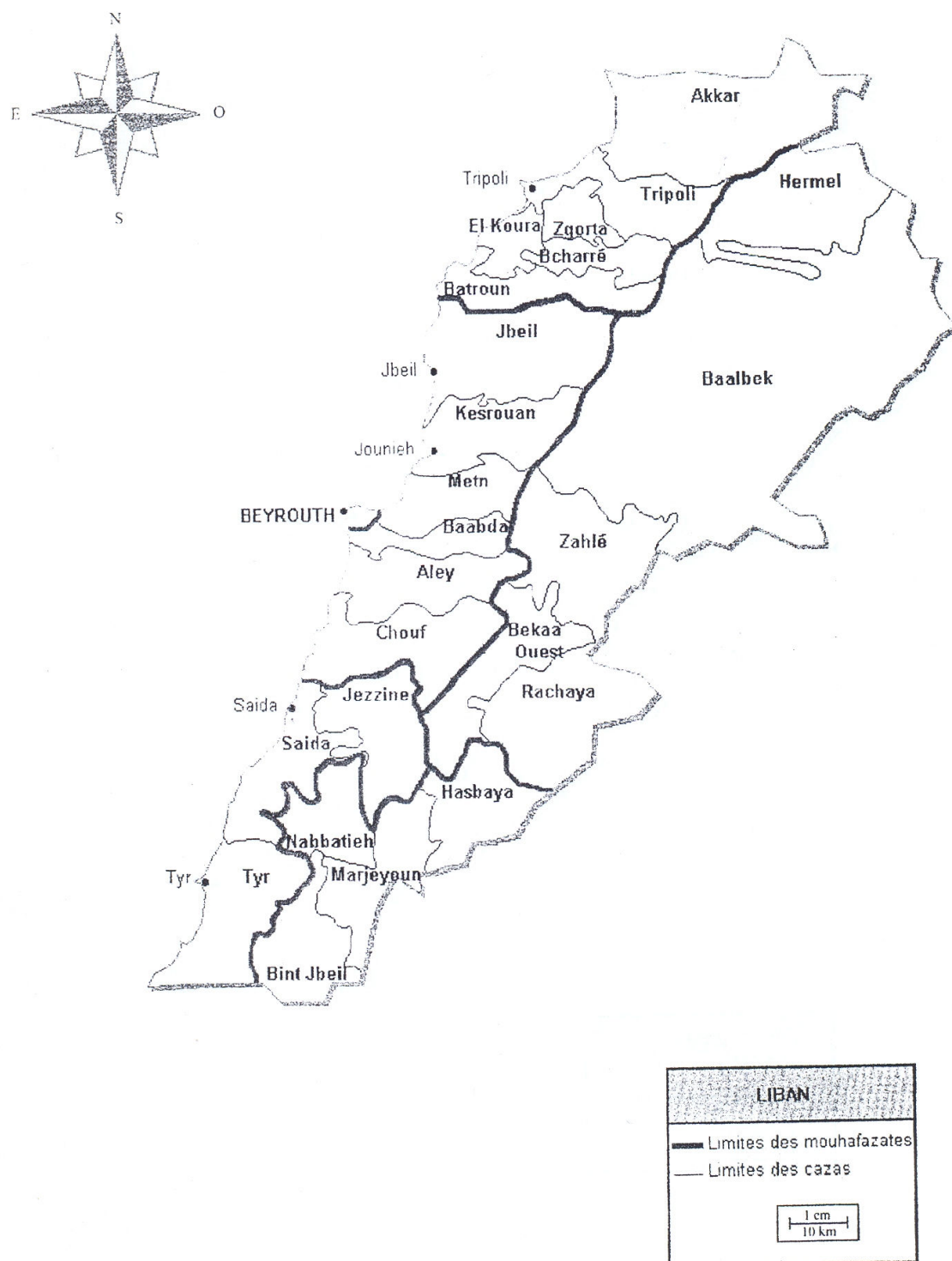


Figure 1: Carte administrative du Liban.

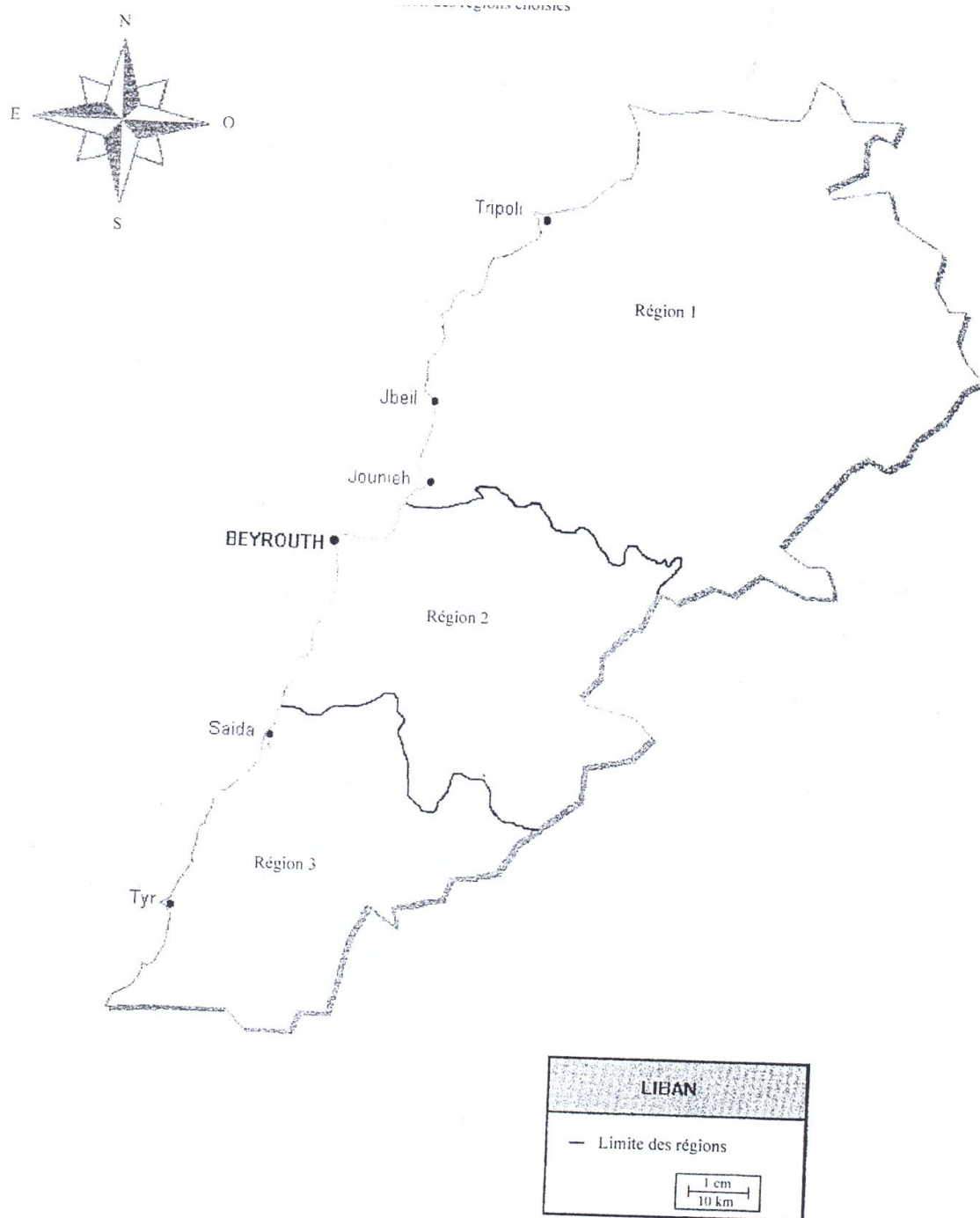


Figure 2: Délimitation des régions choisies.

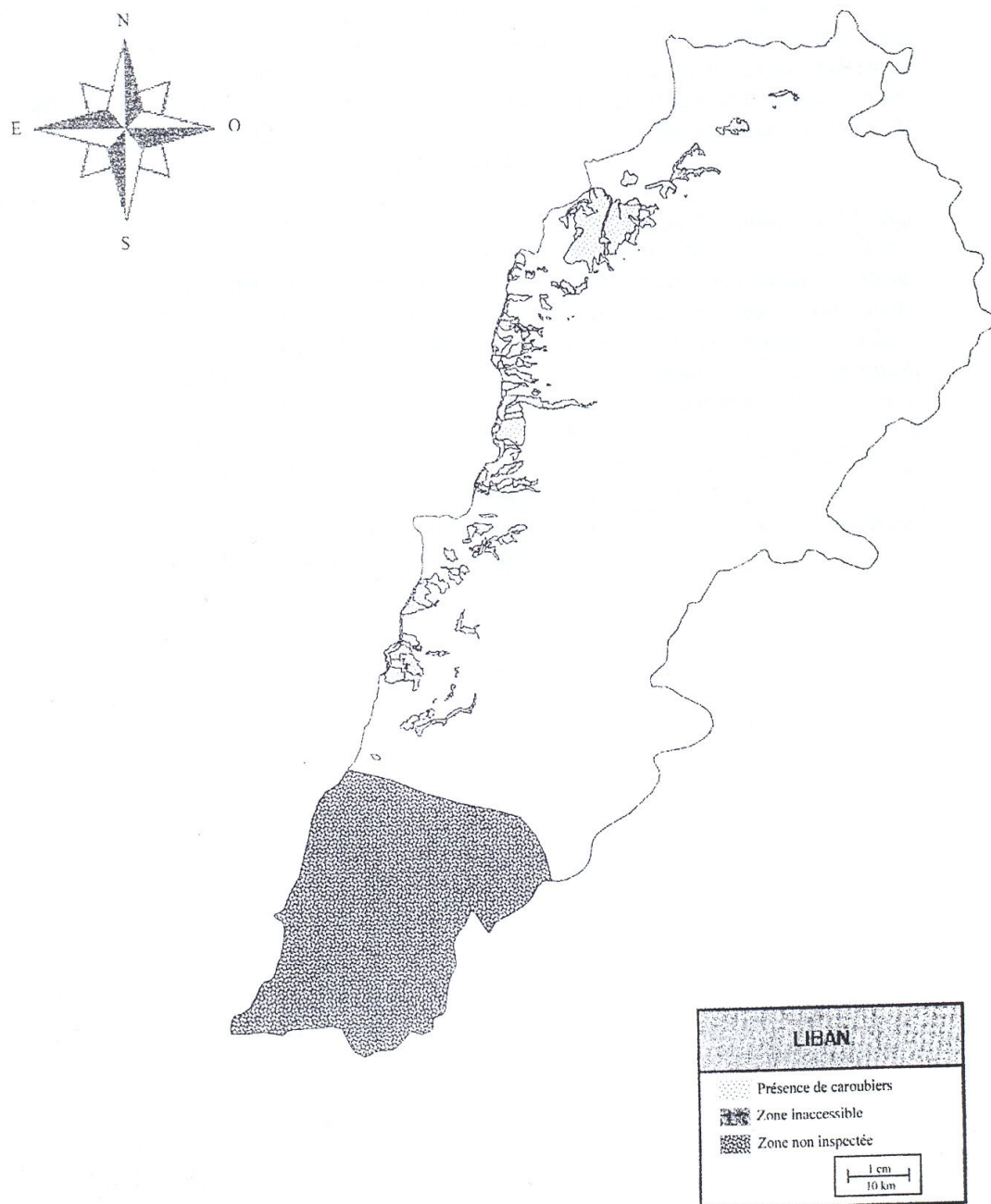


Figure 3: *Distribution de Ceratonia siliqua.*

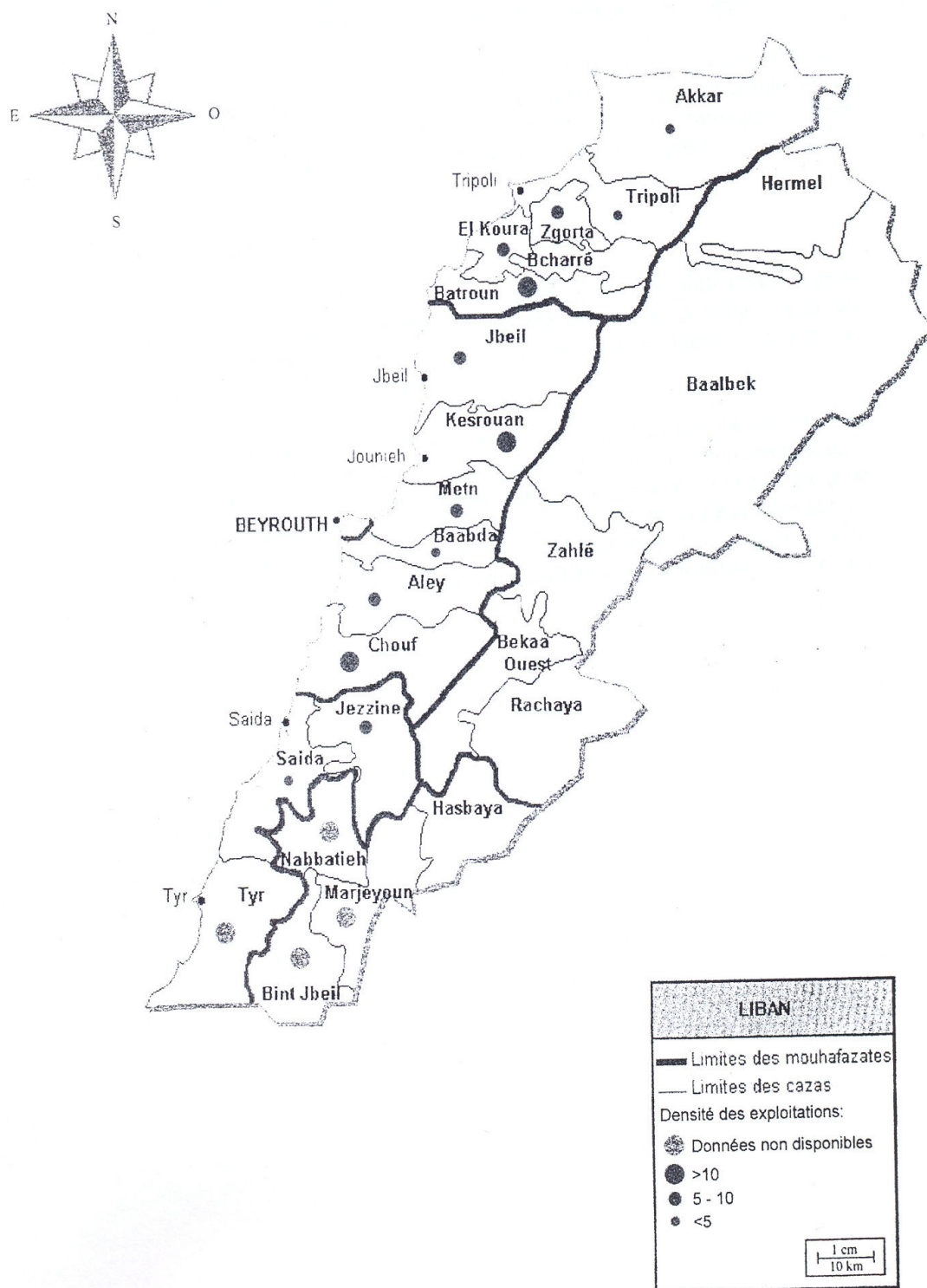


Figure 4: Zones et densité des exploitations de *Ceratonia siliqua*.

ANNEXE 4

Tableau 1 : Caractéristiques des coagulums (lait de vache) en fonction du volume d'extrait (V) de caroube ajouté (extrait du laboratoire). Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

V extrait (μl)	MF culot (mg)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
250	783,3 $\pm$ 56,0	12,2 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,5	20,3	32,3
500	1236,3 $\pm$ 39,4	12,2 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,1	28,4	35,8
750	1695,6 $\pm$ 120,9	13,6 $\pm$ 0,7	5,6 $\pm$ 1,6	38,8	54,0
1000	2010,2 $\pm$ 141,0	13,3 $\pm$ 1,5	5,5 $\pm$ 1,8	43,5	61,5
1500	2876,3 $\pm$ 138,1	14,3 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,4	59,1	86,6
2000	2643,4 $\pm$ 293,1	15,2 $\pm$ 2,4	6,2 $\pm$ 0,2	52,6	84,3
2500	2607,8 $\pm$ 132,6	18,0 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,1	57,6	79,9
3000	3179,6 $\pm$ 57,8	16,6 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,2	57,5	68,3

Tableau 2 : Caractéristiques des coagulums (lait de vache) en fonction du volume d'extrait (V) de caroube ajouté (extrait traditionnel). Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

V extrait (μl)	MF culot (mg)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
250	450,5 $\pm$ 18,2	16,2 $\pm$ 0,6	11,0 $\pm$ 1,4	14,0	28,0
500	778,2 $\pm$ 52,4	13,5 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 0,8	18,9	33,0
750	888,8 $\pm$ 41,5	16,9 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,5	25,5	37,2
1000	1168,4 $\pm$ 147,9	13,5 $\pm$ 1,6	7,0 $\pm$ 0,4	26,1	45,9
1500	1663,7 $\pm$ 54,0	13,6 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 1,6	34,5	51,1
2000	2247,1 $\pm$ 177,0	13,2 $\pm$ 1,8	5,1 $\pm$ 0,3	43,5	64,3
2500	2558,1 $\pm$ 45,6	14,4 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 1,3	50,0	91,1
3000	2765,8 $\pm$ 257,5	16,4 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,5	58,1	91,7

Tableau 3 : Caractéristiques des coagulums (lait de chèvre) en fonction du volume d'extrait (V) de caroube ajouté (extrait du laboratoire). Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

V extrait (μl)	MF culot (mg)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
250	796,1 $\pm$ 129,2	16,91 $\pm$ 1,78	7,27 $\pm$ 0,99	29,55	46,74
500	1179,4 $\pm$ 174,4	15,38 $\pm$ 2,00	6,24 $\pm$ 0,58	37,96	58,12
750	1487,1 $\pm$ 58,5	16,14 $\pm$ 0,83	5,01 $\pm$ 0,78	47,49	57,56
1000	1779,1 $\pm$ 88,4	15,92 $\pm$ 0,67	6,68 $\pm$ 0,14	53,10	89,86
1500	2210,9 $\pm$ 104,4	14,71 $\pm$ 0,32	5,68 $\pm$ 0,78	54,70	91,04
2000	2484,3 $\pm$ 85,2	15,44 $\pm$ 0,84	5,47 $\pm$ 0,48	55,12	94,70
2500	2529,9 $\pm$ 166,2	16,99 $\pm$ 0,48	5,84 $\pm$ 0,69	57,65	99,16
3000	2410,8 $\pm$ 144,3	18,07 $\pm$ 0,91	4,77 $\pm$ 0,39	53,17	74,45
3500	2530,1 $\pm$ 69,7	18,09 $\pm$ 0,47	5,62 $\pm$ 0,86	51,40	88,66

Tableau 4 : Caractéristiques des coagulums (lait de brebis) en fonction du volume d'extrait (V) de caroube ajouté (extrait du laboratoire). Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

V extrait (μl)	MF culot (mg)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
250	948,2 $\pm$ 60,7	16,20 $\pm$ 0,88	4,10 $\pm$ 0,69	22,44	12,71
500	1565,8 $\pm$ 58,6	16,15 $\pm$ 1,19	4,50 $\pm$ 0,52	35,24	22,83
750	1840,0 $\pm$ 274,4	15,01 $\pm$ 1,25	4,77 $\pm$ 0,99	37,00	28,24
1000	2508,4 $\pm$ 68,2	13,76 $\pm$ 0,74	3,08 $\pm$ 0,44	44,96	24,67
1500	3314,6 $\pm$ 64,9	13,02 $\pm$ 0,19	2,88 $\pm$ 0,16	50,63	29,95
2000	3583,7 $\pm$ 989,8	13,98 $\pm$ 0,97	3,57 $\pm$ 1,13	54,48	39,42
2500	4356,5 $\pm$ 126,1	14,83 $\pm$ 1,87	3,47 $\pm$ 1,22	65,94	45,65
3000	4470,6 $\pm$ 830,2	15,81 $\pm$ 1,15	3,50 $\pm$ 0,65	67,42	46,60
3500	4135,0 $\pm$ 470,0	17,51 $\pm$ 0,68	4,07 $\pm$ 0,62	65,81	49,28

Tableau 5 : Caractéristiques des coagulums (lait de chamelle) en fonction du volume d'extrait (V) de caroube ajouté (extrait du laboratoire). Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

V extrait (μl)	MF culot (mg)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
250	1538,8 $\pm$ 10,6	24,53 $\pm$ 0,68	8,10 $\pm$ 0,12	76,63	83,21
500	1596,8 $\pm$ 10,2	27,11 $\pm$ 1,26	6,61 $\pm$ 0,04	83,40	69,17
750	1667,7 $\pm$ 10,4	27,22 $\pm$ 0,53	6,54 $\pm$ 0,26	81,58	70,18
1000	2375,1 $\pm$ 63,2	20,51 $\pm$ 1,24	4,75 $\pm$ 0,50	84,96	71,29
1500	2489,8 $\pm$ 95,3	21,77 $\pm$ 0,14	4,78 $\pm$ 0,31	83,38	72,63
2000	2439,3 $\pm$ 42,2	21,40 $\pm$ 0,27	5,17 $\pm$ 0,31	70,45	74,40
2500	2569,7 $\pm$ 109,7	21,67 $\pm$ 0,06	4,31 $\pm$ 0,36	70,94	63,11
3000	2538,6 $\pm$ 70,0	23,56 $\pm$ 0,25	4,55 $\pm$ 0,60	70,28	63,92
3500	2365,9 $\pm$ 52,1	24,76 $\pm$ 0,55	4,58 $\pm$ 0,44	63,13	58,15

Tableau 6 : Caractéristiques des coagulums (lait de soja) en fonction du volume d'extrait (V) de caroube ajouté (extrait du laboratoire). Matière fraîche : MF ; teneur en matière sèche et en protéines du coagulum : MSC et PC ; pourcentage de la matière sèche et des protéines totales retrouvé dans le coagulum : MSC/MST et PC/PT. Les moyennes et écarts-type ont été calculés à partir de 3 expériences.

V extrait (μl)	MF culot (mg)	MSC (%)	PC (%)	MSC/MST (%)	PC/PT (%)
250	632,6 $\pm$ 14,3	11,03 $\pm$ 0,55	3,2 $\pm$ 0,38	17,36	11,99
500	1092,3 $\pm$ 217,1	10,68 $\pm$ 0,32	1,87 $\pm$ 0,43	26,7	11,90
750	1495,5 $\pm$ 35,2	10,52 $\pm$ 0,55	1,29 $\pm$ 0,09	33,33	11,06
1000	1965,1 $\pm$ 50,3	10,71 $\pm$ 0,19	1,25 $\pm$ 0,23	41,51	13,86
1500	2685,5 $\pm$ 212,6	11,22 $\pm$ 0,16	1,1 $\pm$ 0,46	52,22	16,15
2000	3419,9 $\pm$ 433,1	11,69 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,32	61,79	18,69
2500	3957,9 $\pm$ 84,3	12,24 $\pm$ 0,36	0,89 $\pm$ 0,11	67,57	18,15
3000	4345,7 $\pm$ 170,7	12,61 $\pm$ 0,30	0,92 $\pm$ 0,03	69,63	20,02
3500	4911,7 $\pm$ 162,2	13,15 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,28	75,37	20,57