

Propriétés coagulantes de *calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire

BABA-MOUSSA Farid*, BABA-MOUSSA Lamine**, AHISSOU Hyacinthe**, BOKOSSA Innocent*, CAPO-CHICHI Bénédicte*, TOUKOUROU Fatiou*, SANNI Ambaliou**

RESUME

Le Bénin dispose d'une flore constituée de plusieurs types de formations végétales parmi lesquelles bon nombre sont exploitées pour leurs nombreuses vertus en médecine traditionnelle, en alimentation, en cosmétique etc. *Calotropis procera* (Ait) Ait. F est une plante arbustive de la famille des Asclépiadaceae caractérisée par la production d'un latex blanc. Ses différentes parties (feuilles, tiges, fruits, latex) sont utilisées pour cailler le lait de vache dans un processus traditionnel de fabrication de fromage appelé « warangachi » bien connu au Bénin. Le but de cette étude est d'analyser les propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et de voir l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la coagulation. Des solutions coagulantes de cette plante ont été préparées à partir de feuilles, de tiges, de fruits et du latex puis testées sur le lait de vache en vue de déterminer la partie la plus efficace pour la coagulation. Les résultats obtenus ont montré que le latex avait une activité plus importante. L'activité protéolytique de cette présure végétale est influencée par les facteurs du milieu, principalement la température et le pH. La température optimale se situe entre 65 – 70°C pour un pH compris entre 7 et 8. Enfin, des essais d'isolement de la protéine enzymatique par des méthodes de séparations chromatographiques ont montré que 3 fractions étaient coagulantes.

Mots clés : *Calotropis procera*, latex, lait, coagulation, protéine.

ABSTRACT

Benin has several plant flora among which a lot of are exploited in traditional medicine, in food, in cosmetic etc. *Calotropis procera* Ait. F is a shrubby plant of the family of the Asclepiadaceae characterized by the production of white latex. Different parts (leaves, stems, fruits, latex) are used to curdle milk in a traditional process of cheese making in Benin. The present study is about the coagulant properties of *Calotropis procera* and the effect of physical and chemical parameters on the coagulation. Coagulant solutions were prepared with leaves, stems, fruits, latex and tested on milk in order to determine the most efficient part for the coagulation. The results have shown that the latex had a more important activity. The proteolytic activity of this plant rennet is influenced by the factors like the temperature and the pH. The optimal temperature is located between 65–70°C for a pH between 7 and 8. The enzymatic protein isolation by chromatographic methods has given three coagulant fractions.

Keywords : *Calotropis procera*, latex, milk, coagulation, enzyme.

INTRODUCTION

La valorisation des ressources naturelles dans les pays en voie de développement pourrait constituer une solution au progrès socio-économique (Dewan S. et al., 2000). Le Bénin, possède une diversité de formations végétales dont certaines ont révélé des vertus qui suscitent l'intérêt et méritent une étude approfondie en vue d'une exploitation plus judicieuse voire bénéfique pour les populations (Egounlety M. et al., 1974).

Ainsi, depuis plusieurs années, des travaux de recherches sont entrepris dans ce sens et plusieurs espèces susceptibles d'être exploitées dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires etc., sont prospectées et étudiées (Egounlety M, et al.,

1974). C'est dans ce contexte que se place la présente étude qui porte sur les propriétés coagulantes de *Calotropis procera* (Ait) Ait. F. Cette plante, communément appelé Arbre à soie ou Pommier de Sodome ou plante à lait ou encore Roustonnier (Berhaut, 1971), est un arbuste caractérisé par de grandes feuilles ovales de couleur gris vert, opposées, sessiles, couvertes d'un velours dense formé de petites fibres blanches. Ses fleurs sont blanches et violines pourpres

* Laboratoire de Microbiologie et des Technologies Alimentaires, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, BP 36 Abomey-Calavi, Bénin.

** Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin.

***Auteur de correspondance Email : fbmouss@yahoo.fr, Tel : (229) 90-03-65-25

de 15mm de diamètre avec une corolle large de 2 à 3 cm formée de 5 pétales verdâtres portant une tâche violacée au sommet. Le fruit est un follicule verdâtre, ovoïde, lâchement et mollement fibreux à l'intérieur. Les graines sont aplaties et surmontées d'une aigrette blanche. Toutes les parties de la plante sont riches en sève laiteuse (von Maydell, 1990). Elle est répandue dans les zones sèches sur sols sableux d'Afrique, d'Asie Mineure, du Pakistan et d'Inde (Kees, 1996). Elle est utilisée en pharmacopée traditionnelle comme vermifuge (Neuwinger, 2000), antidiarrhéique (Kumar et al., 2001), analgésique (Dewan et al., 2000), émétique (Adjanohoun *et al.*, 1989). Elle dispose également d'une propriété très peu connue, celle de faire cailler le lait (Kees, 1996). En effet, les bergers Peuhls du Nord Bénin et de l'Etat d'Oyo au Nigeria (Aworh et Nakai, 1986) l'utilisent comme coagulant végétal dans le processus de la fabrication traditionnelle du fromage local. Dans la plupart des pays en développement particulièrement en Afrique de l'Ouest où la consommation en protéine animale est très faible (moins de 10 g/jour/habitant), le fromage local est une importante source de protéines (35,6%) et de matière grasse (49,4%) (Egounlety et al., 1981). Sa faible teneur en lactose en fait un aliment recommandé aux personnes souffrant de l'intolérance au lactose (Egounlety et al., 1981).

Ce fromage traditionnel est utilisé en remplacement de la viande ou du poisson dans divers mets. L'importance de sa consommation actuelle incite à entreprendre des études pour améliorer le mode de préparation afin de réduire les risques de contamination microbiologique et toxicologique.

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles, tiges, fruits et latex de *C. procera* collectés à Cotonou à la place du Champ de Foire. Un échantillon a été déposé à l'herbier national pour identification et pour servir de référence. Les essais de mise en évidence de la coagulation ont été réalisés avec du lait entier de vache prélevé le jour même sur un campement peuhl à Cotonou, près du marché de Zongo.

1.2. Méthodes

1.2.1. Etude de l'activité coagulante des différentes parties de la plante

1.2.1.1. Préparation des échantillons

Dix (10) grammes de feuilles, tiges, ou fruits frais de *C. procera* sont soigneusement lavés puis broyés séparément dans un mortier en porcelaine avec 10 ml d'eau distillée. Le mélange est filtré sur papier filtre. Le filtrat obtenu est recueilli dans un becher. A l'aide d'un

scalpel, on incise la tige de *C. procera* et 1 ml de latex est recueilli. A partir de celui-ci, on prépare des solutions à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} respectivement diluées dans de l'eau distillée.

1.2.1.2 Test de coagulation

Cinquante (50) ml de lait entier de vache sont prélevés dans un Erlenmeyer puis chauffé. Lorsque la température du lait atteint 35°C, 2 ml de solution de *C. procera* sont ajoutés et le chauffage est poursuivi.

Pour cette l'étude, le temps de coagulation est le temps qui s'écoule entre l'addition du coagulant et l'apparition des premiers flocons. En cas de coagulation, le coagulum est récupéré et gardé à l'étuve à 37°C pendant 4 heures pour faire évaporer l'eau. Le coagulum est ensuite pesé. Dans le cas échéant le résultat est négatif.

1.2.2. Influence des facteurs physico-chimiques sur la coagulation

La variation du pH est suivie en ajoutant progressivement une solution d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. La lecture du pH se fait à l'aide d'un ph-mètre METTLER P200®. Des échantillons de lait de pH compris entre 6,6 et 4 sont obtenus par ajout d'acide chlorhydrique et des échantillons de lait de pH compris entre 6,6 et 10 par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium. A partir de ces échantillons de lait de 50 ml à pH modifié, les tests de coagulation sont réalisés suivant la méthode décrite ci-dessus. Les valeurs de pH supérieures à 5 sont prises en compte car lorsqu'on atteint le pHi des caséines (4,6), on observe une coagulation chimique sans ajout du coagulant. Pour tracer le graphe, des valeurs ont été attribuées aux signes (-, +, ++, +++) comme suit :

- - correspond à la valeur 0 ;
- + correspond à la valeur 1 ;
- ++ correspond à la valeur 2 ;
- +++ correspond à la valeur 3.

A des températures comprises entre 20 et 80°C, les tests de coagulation sont réalisés pour montrer l'effet de la température sur le temps de coagulation.

1.2.3. Essai d'isolement de la protéine enzymatique

Du gel (Sephadex G100 Superfine, limites : 4000-150000 Da) est gonflé dans de l'eau distillée toute la nuit. Il est ensuite coulé dans une colonne (40 x 3,2 cm) puis équilibré avec le tampon d'éluion composé de Tris HCl 10mM pH 7.4 NaCl 0.15 M azide de sodium 0.02 %. L'azide de sodium est utilisé comme agent bactériostatique contre l'apparition de bactéries et de moisissures qui peuvent altérer les propriétés chromatographiques du Sephadex ainsi que le débit

Tableau I : Activité du filtrat des feuilles, tiges et fruits

Organes	Masse du coagulum	Temps de coagulation	Température	Appréciation du coagulum
Feuilles	14,53g	15mn	69°C	+++
Tiges	15,73g	13mn	67°C	+++
Fruits	10,86g	21mn	70°C	++

de la colonne (Hosttetman K *et al.*, 1997).

Cinq (5) ml de latex frais sont mélangés avec 3ml du tampon d'éluant composé de Tris HCl 10 Mm pH

Tableau II : Activité du latex

Paramètres	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻³	Dilution 10 ⁻⁴	Dilution 10 ⁻⁵
Température à l'ajout du coagulant	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Temps de coagulation	7 mn	10 mn	14 mn	19 mn	-
Température au début de la coagulation	62°C	65°C	66°C	66°C	-
Appréciation du coagulum	+++	+++	++	+	-
Masse du coagulum	21g	18,5g	12,3g	8,1g	-

7,4 NaCl 0,15M azide de sodium 0,02%. Le mélange est centrifugé pendant 30mn à 4000 tr/mn. Après centrifugation, 7,5 ml du surnageant sont déposés sur le gel. Le tampon d'éluant est ensuite coulé sur le gel à l'aide d'une ampoule à décanter. Le débit d'entrée du tampon sur le gel est le même que le débit de sortie

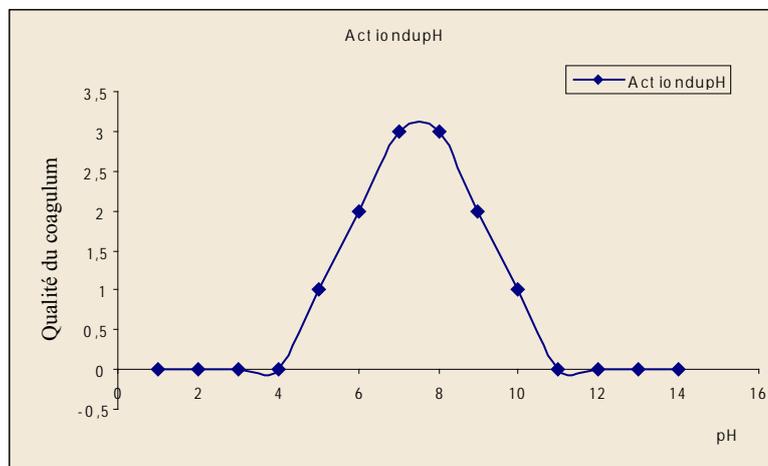


Figure 1 : Effet du pH du lait sur la qualité du coagulum

de la colonne. Pour cette séparation, le débit est de 2 ml d'éluant toutes les 10 mn, soit 12 ml/heure. Les

densités optiques des fractions recueillies ont été mesurées à 280 nm. Les valeurs obtenues ont permis de tracer le profil d'éluant de l'échantillon déposé, et de regrouper les fractions en 7 lots. Les 7 lots de fractions sont ramenés à la même concentration (100 mg/ml) après dilution. La lecture de la concentration se fait au spectrophotomètre (JENWAY GENOVA®). Ces fractions sont utilisées comme coagulant dans les tests de coagulation. Ainsi, sur des échantillons de lait de même volume (5 ml), les fractions coagulantes de volume allant de 0 à 100 µl ont été ajoutées. L'appréciation du coagulum a été réalisée grâce à un panel d'observateurs qui attribuent des signes +++, ++, + et - au coagulum :

- + : floculation,
- ++ : Prise en masse,
- +++ : Bonne coagulation (prise en masse et fermeté),
- : Pas de coagulation.

Les fractions ayant révélé une activité coagulante, subissent une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970) pour visualiser les bandes protéiques et déterminer la masse des protéines.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Etude de l'activité coagulante du filtrat des différentes parties de C. procera

Des tests de coagulation ont été effectués en utilisant comme coagulant le filtrat de feuilles, de tiges ou de fruits broyés, et également du latex dilué avec de l'eau distillée. Les résultats sont consignés dans le tableau I et II. En nous basant sur la masse de coagulum obtenue et sur le temps au bout duquel la coagulation a lieu, les tableaux I et II montrent que les différentes parties (feuilles, tiges, fruits, et le latex) de C. procera ont une activité coagulante sur la caséine du lait. Les feuilles et tiges donnent à peu près le même résultat. Les fruits sont moins efficaces, par contre le latex présente une activité plus marquée et les dilutions au 10^e et 100^e donnent les meilleurs résultats.

2.2. Etude de l'influence des facteurs physico-chimiques sur la coagulation

2.2.1. Influence du pH du lait

Les tests de coagulation effectués sur les échantillons de lait à pH modifié ont permis d'avoir les résultats consignés dans la figure 1. L'enzyme a une activité maximale sur la caséine du lait à un pH situé entre 7 et 8 (figure 2).

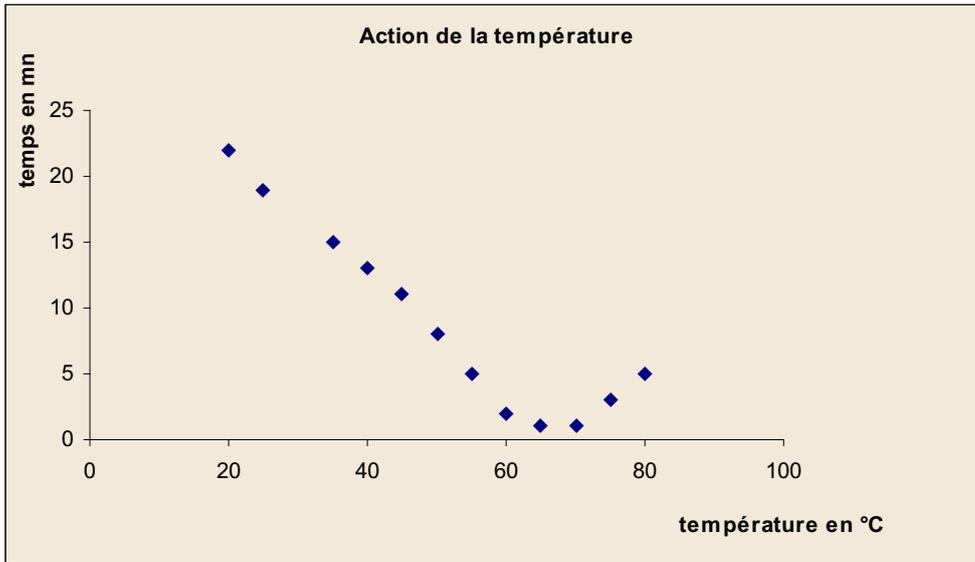


Figure 2 : Effet de la température du lait sur le temps de coagulation

2.2.2. Influence de la température du lait

L'étude de l'influence de la température du lait sur l'activité coagulante de *C. procera* a montré que plus la température augmente, plus le temps de début de coagulation diminue (figure 3). La température optimale de coagulation pour cette présure végétale

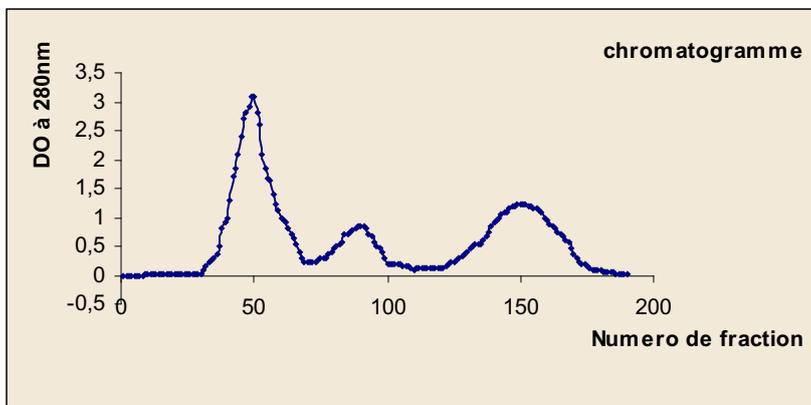


Figure 3 : Profil d'élution du latex après Chromatographie de filtration sur gel

présente dans le latex de *C. procera* se situe entre 65°C et 70°C. Au-delà de cette fourchette, il n'y a plus coagulation ; cela peut être dû à la dénaturation de l'enzyme.

2.3. Recherche de l'activité coagulante des fractions

Parmi les sept (7) lots de fractions testées, trois (3) ont une activité coagulante sur la caséine du lait (tableaux III et IV). L'enzyme responsable de la coagulation serait présent dans ces 3 fractions.

Tableau III : Etude de l'activité coagulante des 7 lots de fractions

N° des fractions	F1 1 à 40	F2 41 à 60	F3 61 à 80	F4 81 à 100	F5 101 à 130	F6 131 à 151	F7 151 à 190
Activité coagulante	négatif	positif	négatif	Positif	négatif	positif	négatif

L'influence du pH du lait sur la coagulation par l'enzyme a été étudiée par observation et appréciation de la fermeté du coagulum obtenu par coagulation des échantillons de lait à pH modifié. Le pH optimum

tiges, fruits, latex) de *Calotropis procera* nous ont permis d'observer une activité plus importante au niveau du latex. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'enzyme responsable de la coagulation est concentré dans le latex. D'après les résultats que nous avons obtenus, les tiges sont plus efficaces que les feuilles. Les fruits ont donné de faibles concentrations. La quantité de latex varie selon les différentes parties de la plante. Il faut ajouter que cela dépend aussi de l'âge de la plante, de sa station écologique et de son approvisionnement en eau. Ces différentes raisons font qu'il n'est

pas possible de donner avec précision la quantité de matière végétale qu'il faut utiliser pour la fabrication du fromage. La mise au point de cette présure végétale permettra de surmonter ces difficultés et de maîtriser plus facilement cette technique de fabrication traditionnelle.

III. DISCUSSION

Les expériences réalisées en vue de déterminer l'activité coagulante des différentes parties (feuilles,

d'action de cette enzyme sur la caséine du lait est environ 7.

Au Nigeria, la présure végétale obtenue par précipitation des feuilles de *Calotropis procera* au sulfate d'ammonium a montré une importante activité coagulante à pH 6.4 à 65 °C (Aworh et Muller, 1987). Toutefois Ogudiwin et Oke (1983) ont observé que la température du début de caillage varie entre 70 et 92 °C et dans la majorité des cas entre 80 et 92 °C.

Tableau IV : Comparaison de l'activité des trois fractions coagulantes (100 mg/ml) par appréciation de la qualité du coagulum

	0	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl	100 µl
Fraction 2	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
Fraction 4	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++
Fraction 6	-	-	+	+	+	++	+	++	++	+++	+++

La purification de la présure végétale contenue dans *Calotropis procera* par chromatographie de gel filtration sur sephadex G100 superfine a permis d'avoir 3 fractions coagulantes. Les résultats du SDS PAGE réalisé sur les trois fractions coagulantes ont montré que la protéine recherchée a une masse d'environ 30Kda. Les travaux de Aworh et al (1994) ont révélé la présence dans le latex de *Calotropis procera* de deux protéases hydrolysant la caséine, de masses respectives 25000 et 30000 Da et de pH optimum 7 et 8. Une protéase d'environ 28.8 Kda a été purifiée à partir du latex de *Calotropis procera* (Kumar et al, 2003).

Contrairement à la plupart des enzymes d'origines végétales qui ont une forte activité protéolytique, l'enzyme issu de *Calotropis procera* a une activité protéolytique faible (Kees M., 1996). Différents travaux ont montré qu'il n'y a presque pas de différence du point de vue qualité nutritive entre le fromage emprésuré avec l'extrait de *Calotropis procera* et le fromage fabriqué avec la présure de veau ou avec du jus de citron (Mohamed et al, 1997).

Ces propriétés montrent que cette enzyme pourrait faire l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère.

CONCLUSION

Les résultats de notre étude ont abouti à l'obtention de cette présure végétale sous forme de fractions. Ces travaux doivent être poursuivis en vue d'une purifi-

cation complète et de la cristallisation de l'enzyme. Pour une utilisation large en industrie agroalimentaire, l'hydrolyse de la caséine k par cette présure végétale n'est pas une condition suffisante. Plusieurs propriétés physico-chimiques et technologiques (propriétés rhéologiques du coagulum, la synérèse du coagulum, le rendement en fromage etc.) compatibles avec l'environnement fromager et la qualité alimentaire des produits finis doivent être étudiés. Des travaux visant à mettre en évidence d'autres propriétés de l'enzyme doivent être réalisés. En effet cet enzyme pourrait avoir des applications dans les domaines alimentaires, biotechnologiques, pharmaceutiques, etc. Les travaux de Kareem et al., (2002) ont montré que cet enzyme interviendrait dans la purification d'autres enzymes et constituerait une méthode de purification efficace et moins coûteuse par rapport à l'ultrafiltration et l'utilisation des polyélectrolytes.

Dans les années à venir, le clonage du gène codant pour la synthèse de cette protéine sera d'une grande utilité car elle permettra de la produire en grande quantité grâce aux méthodes actuelles de génie génétique. Ce serait une solution face aux difficultés liées à la collecte de la matière végétale et au coût de la purification qui ne permet pas de mettre sur le marché des préparations coagulantes commerciales à des prix raisonnables.

Enfin, s'il est reconnu scientifiquement que la sève de *Calotropis procera* est toxique, la quantité de sève utilisée dans la fabrication du fromage est tellement faible qu'une intoxication alimentaire est à écarter. Toutefois, il ne serait pas inutile de préciser par des études approfondies tous les paramètres de toxicité de la sève de *Calotropis procera*.

BIBLIOGRAPHIE

1- **ADJANOHOUN E. J., ADJAKIDJE V., AHYI M. R. A., AKE ASSI L., AKOEGNINOUN A., D'ALMEIDA J., APOVO F., BOUKEF K., CHADARE M., CUSSET G., DRAMANE K., EYME J., GASSITA J.-N., GBAGUIDI N., GOUDOTE E., GUINKO S., HOUNGNON P., LO I., KEITA A., KINFFO H.V., KONE-BAMBA D., MUSAMPA N., SAADOU M., SODOGANDJI T., DE SOUZA S., TCHABI A., ZINSOU DOSSA., ZOHOUN T., 1989.** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée. ACCT, 656-659 pp.

- 2- AWORH O C., MULLER H. G. 1987.** Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple *Calotropis procera*. *Food Chemistry*, 26 (1), 71-79
- 3 AWORH O. C., KASCHE V., APAMPA O. O., 1994.** Purification and some properties of Sodom-apple latex proteinases. *Food Chemistry*, 50 (4), 359-362
- 4- AWORH O.C., NAKAI S., 1986.** Extraction of milk clotting enzyme from Sodom apple. *Journal of Food Sciences*, 51 (6), 1569-1570
- 5- AWORH O.C., NAKAIS., 1988.** Separation of Sodom apple protéinases by gel filtration. *International Journal of Food Sciences and Technology*, 23 (4), 419-423
- 6- BERHAUT J., 1971.** Flore illustrée du Sénégal.
- 7- BOURDIER J.F., 1974.** Présure et succédanés de présure. *Séries bibliographiques N°3*, 9-13
- 8- DEWAN S., SAUGRAULA H., KUMAR VL., 2000.** Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 73 (1-2), 307-311
- 9- EGOUNLETY M., 1981.** Fabrication du Woagachi (fromage à pâte molle) en République du Bénin. Enquête technologique. *Faculté des Sciences Agronomiques, UNB. Novembre 1981*, 50-53 pp.
- 10- EGOUNLETY M., EDEMA M., YEHOUESSI B., AHOUANSOU M., 1994.** Production et qualité du fromage Peulh en République du Bénin. *Rapport de Recherche. DNSA/FSA/UNB*, 30-33 pp.
- 11- HOSTETTMAN K., MARSTON A., HOSTETTMAN M., 1997.** Preparative chromatography Techniques : Application in Natural Product Isolation, édition Spinger, 230-231 pp.
- 12- KAREEM S.O., AKPAN I., OSHO M.B., 2003.** *Calotropis procera* a potential material for enzyme purification, *Bioresource Technology* 87, 133-135 pp.
- 13- KUMAR DUBEY V., JAGANNADHAM MV., 2003.** Procerain, a stable cysteine protease from latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 62 (7) 1057-1071.
- 14- KUMAR S., DEWAN S., SAUGRAULA H., KUMAR VL., 2001.** Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 76 (1), 115-118.
- 15- LAEMMLI U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- 16- MOHAMED MUCTAR A., O'CONNOR CHARLES B., KEBEDE SOLOMON., 1997.** Assessment of chemical composition and yield of queso blanco (white cheese) made with *Calotropis procera* and lemon juices. *Journal of Food Science and Technology*, 34 (6), 523-525
- 17- NEUWINGER H.D., 2000.** African traditional medicine, 86 p.
- 18- OGUNDIWI J.O., OKÉ O.L., 1983.** Factors affecting the processing of Wara a Nigerian White Cheese. *Food Chemistry*, 11, 11-12
- 19- VON MAYELL H. J., 1990.** Arbres et arbustes du Sahel : leurs caractéristiques et leurs utilisations. *Scientifics Books*, 191-192

