

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

CENTRE FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DES SCIENCES ALIMENTAIRES ET METABOLISME

LABORATORY OF FOOD SCIENCES AND METABOLISM

**Caractérisation structurale, activités
biologiques et propriétés fonctionnelles
des protéines des graines de *Moringa
oléifera***

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du **Doctorat/Ph.D. en Biochimie**

Spécialité : **Science des Aliments et Nutrition**

Par

BAKWO BASSOGOG Christian Bernard

Matricule : 08R0082

Master en Biochimie

Sous la co-direction de :

Pr MINKA Samuel René

Maître de Conférences, UYI

Pr MUNE MUNE Martin Alain

Maître de Conférences, UMa



Année académique : 2021-2022

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE DE
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH DOCTORATE TRAINING UNIT
IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

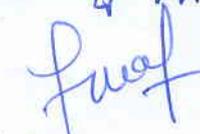
ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, Prof. KANSKI Germain, Professeur, Prof. NGONDI Judith Laure, Maître de Conférences, Dr MEDOUA NAMA Gabriel, Directeur de Recherche et Prof. FOKOU Elie, Professeur respectivement Examineurs et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D. en Biochimie, spécialité Science des Aliments et Nutrition, soutenue par M. BAKWO BASSOGOG Christian Bernard (matricule: 08R0832) le 30 Novembre 2022 à 10h dans la salle multimédia du nouveau bloc pédagogique de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I sur le thème «**Caractérisation structurale, activités biologiques et propriétés fonctionnelles des protéines des graines de *Moringa oléifera***», attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation de correction lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit./-

Fait à Yaoundé, le **21 DEC 2022**

Examineurs


KANSKI

Prof. NGONDI

Medoua Nama G.

Président du Jury


Pr. Elie Fokou
Dr. d'Etat en Biochimie
Nutrition et Sciences Alimentaires

Le Chef de Département


P. MOUNDIPA
Professor
Toxicology & Toxicology


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

PAIX-TRAVAIL – PATRIE

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES

**CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ ET
ENVIRONNEMENT**

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROON

PEACE-WORK-FATHERLAND

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

*POSTGRADUATE SCHOOL OF LIFE
SCIENCES, HEALTH AND ENVIRONMENT*

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DES SCIENCES ALIMENTAIRES ET DE METABOLISME

LABORATORY OF FOOD SCIENCE AND METABOLISM

**Caractérisation structurale, activités
biologiques et propriétés fonctionnelles des
protéines des graines de *Moringa oléifera***

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du **Doctorat /Ph.D. en Biochimie**

Spécialité : **Sciences des aliments et nutrition**

Par :

BAKWO BASSOGOG Christian Bernard

Matricule : 08R0082

Master en Biochimie

Sous la co-direction de :

**Pr MINKA Samuel René
Maître de Conférences, UYI**

**Pr MUNE MUNE Alain Martin
Maître de Conférences, UMa**

Année académique 2021-2022

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

Liste protocolaire

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022
(Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 31 OCTOBRE 2021

ADMINISTRATION**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences***VICE-DOYEN / DPSAA**: ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences***VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur***VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences***Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences***Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur***1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)**

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	BOUDJEKO Thaddée	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	FOKOU Elie	Professeur	En poste
5	KANSCI Germain	Professeur	En poste
6	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
7	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
8	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
9	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
10	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
11	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
12	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
13	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste

16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
26	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
27	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
28	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Assistant	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistant	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>

14	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>
15	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ MINESUP</i>
16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épouse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
20	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
23	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
24	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
25	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
26	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
27	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
28	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
29	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
30	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Chargée de Cours	En poste
31	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
32	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
33	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
34	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
35	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
36	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
37	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
38	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
39	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41	NGOuateu KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	<i>Chef Div. U.Bda</i>
43	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
44	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
46	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48	AMBADA NDZENGUE GEORGIA E.	Assistante	En poste
49	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
50	MAPON NSANGOU Indou	Assistant	En poste
51	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef de Département
2	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
19	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
11	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
12	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
13	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
14	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
26	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
27	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste

33	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
----	-------------------	-----------	----------

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (31)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	En poste
2	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
3	GHOOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
4	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
5	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
6	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>

7	NENWA Justin	Professeur	En poste
8	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
9	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

10	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
18	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>CT/ MINPROFF</i>
19	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
21	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
22	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
23	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

24	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
25	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
26	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
27	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
30	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
31	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (38)

1	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
2	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
3	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
4	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
15	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK Carine	Maître de Conférences	En poste

18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

35	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Sous- Directeur/MINFOPRA</i>
6	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
15	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur adjoint ENSET. Ebolowa</i>
16	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste

19	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
20	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
21	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
22	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	DA/ENS-UYI Chef de Département
---	-----------------------	------------	-----------------------------------

2	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
7	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Uté Bertoua</i>
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
22	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
23	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste

24	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
25	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
26	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste
30	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
17	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
19	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

20	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
21	NKOUÉ TONG ABRAHAM	Assistant	En poste
22	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOUA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
9	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
11	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de Centre/IRGM/MINRESI</i>
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	BOYOMO Marthe	Maître de Conférences	<i>DA / ENSPY</i>
19	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
20	EYEBE FOUA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
21	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
22	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
25	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU DerbetiniAppolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UIYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	<i>Absente depuis Janvier 2022</i>
37	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
38	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
29	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste

41	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
42	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
43	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
44	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste

11	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
12	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département /Uté Maroua</i>
14	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
15	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
17	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
20	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
21	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
23	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
24	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
25	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
27	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
28	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30	MAMDEM TAMTO LIONELLE ESTELLE	Chargé de Cours	En poste
31	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
32	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
33	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
34	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>CD/ Uté Maroua</i>
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
41	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
42	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste

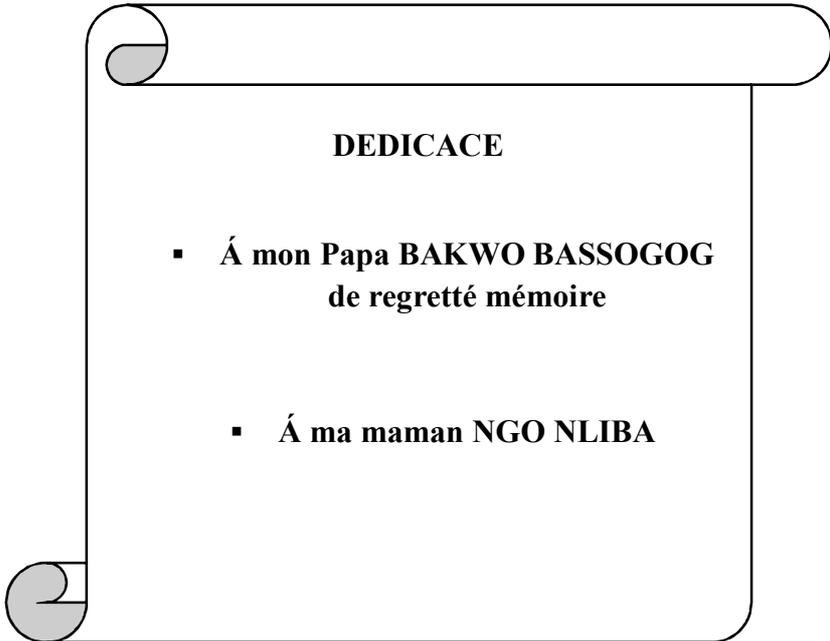
Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (00)	14 (10)	15 (05)	02 (01)	39 (16)
BPA	14 (01)	12 (08)	21 (06)	04 (02)	51 (17)
BPV	06 (01)	10(01)	16 (09)	01 (00)	33 (11)
CI	09(01)	14(04)	08 (01)	00 (00)	31 (06)
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	38(09)
IN	02 (00)	02 (00)	12 (01)	06 (00)	22 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	30 (02)
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	22 (08)
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	43 (06)
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	42(08)
Total	71 (07)	115 (34)	133 (36)	32 (07)	351 (84)

Soit un total de **351 (84)** dont :

- Professeurs **71 (07)**
- Maîtres de Conférences **115 (34)**
- Chargés de Cours **133 (36)**
- Assistants **32 (07)**

() = Nombre de Femmes **84**



DEDICACE

- **Á mon Papa BAKWO BASSOGOG
de regretté mémoire**

- **Á ma maman NGO NLIBA**

REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes ont indéniablement concouru à la réalisation de ce travail. Trouvez à travers ces quelques mots l'expression de ma profonde gratitude. Mes remerciements particuliers :

Au **Professeur MINKA Samuel René**, qui m'a confié ce travail, malgré son calendrier bien fourni. Sa passion du travail bien fait, ses conseils et sa rigueur ont indéniablement et grandement amélioré ce travail.

Au **Professeur MUNE MUNE Martin Alain**, pour m'avoir tenu la main pendant mes premières foulées dans la recherche et durant toute cette thèse. Sa disponibilité sur la paillasse, lors de la rédaction et sa rigueur dans le travail ont inéluctablement concouru à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Au **Chef de Département de Biochimie : Professeur MOUNDIPA FEWOU Paul**, et à travers lui, à tous **les enseignants du dit Département** pour toutes les connaissances transmises pendant leurs illustres enseignements.

Aux Chefs du Centre de Recherche en Alimentation, Sécurité Alimentaire et Nutrition et du Centre de Recherche en Plantes Médicinales et Médecine Traditionnelle de l'Institut de Recherche Médicale et d'Etude des Plantes Médicinales (IMPM) pour m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein de leurs laboratoires. Mes remerciements particuliers à Docteur FANTA YADANG Sabine pour son appui lors de l'analyse des activités antioxydantes des peptides.

Au **Laboratoire National d'Analyse Diagnostique des Intrants Agricoles du MINADER** pour le dosage de l'azote total.

Au **Laboratoire de Phyto-protection et de Valorisation des Ressources Végétales** de la Faculté des Sciences, particulièrement à son Chef le **Professeur BOUDJEKO Thaddée**, pour m'avoir permis de réaliser certains travaux au sein de son laboratoire.

Au **Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle** de la Faculté des Sciences, particulièrement, au **Professeur NGONDI Judith Laure** et à son étudiant **Monsieur AMBAMABA Dupont Bruno**, pour l'assistance lors de l'analyse des activités antihyperglycémiques des peptides.

Au **Laboratoire de Chimie Analytique** de la Faculté des Sciences et en particulier au **Pr. NANSEU** pour m'avoir permis la réalisation de la Spectroscopie Infra-Rouge à Transformé de Fourier (IFTR).

Aux aînés académiques : **MAHOP Joseph Raymond, YOUOVOP FOTSO Janvier, TAKUISSU Guy, SIMO Brice** pour les conseils et encouragements.

A mes camarades de promotion et aux collègues de l'IMPM pour toute la convivialité.

A mes frères et amis : **BASSOGOG BAKWO Paul, BAKWO Marc, BAKWO, NGO BAKWO Marie Michèle, BAYIGA Robert, la famille NDJENG, NYEMECK Ghislain, MANDENG Emile Rigo, NYOBE Carine, NKOA NGAGNA Murielle, NNA BISSO Gwladys, MPECK Audrey Sandra, KOA MBIDA, ASSAOU Landry, BOM Yannick, Josias NGUE, Louis Bruce SOKAMTE, NYEMEG Franck, DJOULDE** pour cette chaleur familiale et fraternelle qu'ils m'ont continuellement témoignés pendant ce travail.

TABLE DES MATIERES

LISTE PROTOCOLAIRE	I
DEDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
LISTE DES ANNEXES	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
RESUME	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE	5
I.1. Généralités sur <i>Moringa oléifera</i>	5
I.1.1. Origine et distribution	5
I.1.3. Description	6
I.1.5. Utilisation du <i>Moringa oléifera</i>	9
I.1.5.1. Utilisation alimentaire	9
I.1.5.2. Utilisation médicinale	10
I.1.5.3. Autres utilisations du <i>Moringa</i>	11
I.1.6. Importance socioéconomique de <i>Moringa oléifera</i>	12
I.2. Les protéines végétales	13
I.2.1. Généralités	13
I.2.2. Classification générale	14
I.2.3. Propriétés technofonctionnelles.....	17
I.2.3.1. Propriétés physicochimiques	17
I.2.3.2. Propriétés fonctionnelles	18
I.2.3. Utilisation des protéines comme ingrédient alimentaire.....	21
I.3. Les matières protéiques végétales (MPV).....	22
I.3.1. Les farines	22
I.3.2. Les concentrats protéiques	22
I.3.3. Les isolats protéiques	23
I.3.4. Les procédés d'extraction des protéines	23
I.3.4.1. Procédé de lavage avec une solution hydro-alcoolique	24
I.3.4.2. Procédé de lavage à l'acide	24
I.3.4.3. Procédé de dénaturation à la chaleur / extraction à l'eau	25
I.3.5. Facteurs influençant l'extraction des protéines	25
I.3.6. Utilisation des matières protéiques végétales en industrie agroalimentaire.....	26
I.4. Procédés de modification des protéines	26
I.4.1. L'approche physiques de modification des protéines	27
I.4.2. Techniques chimiques de modification des protéines.....	29

I.4.3. Techniques biologiques/enzymatiques de modification des protéines	30
I.5. Analyse structurale des protéines	32
I.6. Protéolyse et peptides bioactifs	35
I.5.1. Protéolyse	35
I.5.2. Mesure de l'activité enzymatique	36
I.5.3. Les méthodes de contrôle du procédé de protéolyse enzymatique.....	37
I.5.4. Peptides bioactifs	37
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	39
II.1- Matériel végétal.....	39
II.2. Méthodes.....	39
II.2.1. Préparation de la farine délipidée des graines de <i>Moringa oléifera</i>	41
II.2.2. Préparation de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	42
II.2.2.1. Détermination des conditions optimales d'extraction et de précipitation des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	42
II.2.2.2. Préparation de l'isolat protéique dans les conditions optimales.....	44
II.2.3. Caractérisation chimique globale de la farine délipidée et de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	45
II.2.3.1. Détermination de la teneur en eau	45
II.2.3.2. Détermination de la teneur en cendres.....	45
II.2.3.3. Détermination de la teneur en lipides totaux.....	46
II.2.3.4. Détermination de la teneur en protéines brutes par la méthode de <i>Kjeldhal</i>	46
II.2.3.5. Détermination de la teneur en glucides totaux	48
II.2.3.6. Détermination de la composition en acides aminés des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	48
II.2.4. Analyse de l'influence du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	49
II.2.4.1. Traitement thermique.....	49
II.2.4.2. Influence du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	49
II.2.4.3. Influence du traitement thermique sur quelques propriétés fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	51
II.2.5. Analyse de l'influence de la composition en protéines sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	53
II.2.5.1. Fractionnement des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	53
II.2.5.2. Influence du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	53
II.2.5.3. Influence des fractions protéique solubles sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	53
II.2.6. Evaluation de quelques propriétés bioactives des protéines des graines de <i>Moringa</i> <i>oléifera</i>	54
II.2.6.1. Hydrolyse enzymatique des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	54
II.2.6.2. Calcul degré d'hydrolyse.....	57
II.2.7. Analyse de quelques propriétés antioxydantes des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	58
II.2.7.1. Etude du pouvoir antiradicalaire	58

II.2.7.2. Etude du pouvoir réducteur	60
II.2.8. Etude des propriétés hypoglycémiantes des hydrolysats protéiques.....	61
II.2.8.1. Etude des effets des hydrolysats sur la capture du glucose par les cellules non insulino-dépendantes	61
II.2.8.2. Etude des effets des hydrolysats sur la capture du glucose par les cellules insulino-dépendantes	62
II.3. Analyses statistiques des résultats.....	64
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	65
III.1. Composition chimique de la farine délipidée de graines de <i>Moringa oléifera</i>	65
III.2. Paramètres de solubilisation et de précipitation des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	65
III.3. Composition chimique globale et teneur en acides aminés de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	69
III.4. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	72
III.4.1. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	72
III.4.1.1. Effet du traitement thermique sur la structure secondaire de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	72
III.4.1.2. Influence du traitement thermique sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	76
III.4.2. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	78
III.4.2.1. Effet du traitement thermique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	78
III.4.2.2. Effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	79
Conclusion partielle	81
III.5. Fractionnement des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	82
III.5.1. pH-isoélectrique des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	82
III.5.2. Teneurs en protéines des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	83
III.6. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	83
III.6.1. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	83
III.6.1.1. Effet du traitement thermique sur la structure secondaire des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	83
III.6.1.2. Effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	85
III.6.2. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés fonctionnelles des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	87
III.6.2.1. Effet du traitement thermique sur la solubilité des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	87
III.6.2.2. Effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	88

III.7. Effet de la composition en protéines sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	90
III.7.1. Effet de la composition protéique sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	90
III.7.2. Effet de la composition protéique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	92
III.7.3. Effet de la composition protéique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	94
Conclusion partielle	96
III.8. Analyse de quelques activités bioactives des hydrolysats protéiques issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	97
III.8.1. Degrés d'hydrolyse des hydrolysats des graines de <i>Moringa oléifera</i>	97
III.8.2. Effets antioxydants <i>in vitro</i> des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	99
III.8.2.1. Effet des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i> sur le piégeage du radical libre DPPH [•]	99
III.8.2.2. Effet des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i> sur le piégeage du radical libre ABTS ^{•+}	103
III.8.2.3. Effet des hydrolysats protéiques sur la réduction du Fe ³⁺	106
III.8.3. Effets des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i> sur la capture cellulaire du glucose	109
III.8.3.1. Effet des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i> sur la capture périphérique du glucose à travers les cellules non insulino-dépendantes	109
III.8.3.2. Effet des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i> sur la capture périphérique du glucose à travers les cellules insulino-dépendantes.....	110
CONCLUSION PARTIELLE.....	116
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
ANNEXES	118

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	: Acide (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique))
ACE	: <i>Angiotensin I – Converting Enzyme</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BBP	: Bleu de Bromophénol
CE	: Capacité Emulsifiante
CJP	: <i>Centre for Jatropha Promotion and Biodiesel</i>
CP₅₀	: Capacité de piégeage 50
DAAC	: Direction des Affaires Académiques et de la Coopération
DC	: Dichroïsme Circulaire
DH	: Degré d'Hydrolyse
DO	: Densité Optique
DPPH	: 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle, Hydroxyle, Superoxyde
DSC	: <i>Differential scanning calorimetry</i>
H₀	: Hydrophobicité
ISE	: Indice de Stabilité de l'Emulsion
FAO	: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
IFTR	: <i>Infrared Spectroscopy Fourier Transform</i>
IMPM	: Institut de Recherche Médicale et d'Etude des Plantes Médicinales
KRBA	: Krebs-Ringer Bicarbonaté Albuminé
LabSAM	: Laboratoire des Sciences Alimentaires et Métabolisme
MINADER	: Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
MPV	: Matière Protéique Végétale
MS	: Matière Sèche
OPA	: Acide Ortho-Phtal (di)-Adéhyde

PVT	: Protéines Végétales Texturées
RPL	: Rapport Phase Liquide
RSL	: Rapport Solide Liquide
SIDA	: Syndrôme d'Immunodéficience Acquis
S₀	: Solubilité
SFA	: <i>Smallholder Farmers Alliance</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCA	: Acide Trichloracétique
TC₅₀	: Trapping Capacity 50
TG	: Transglutaminase
TMS	: Teneur en Matière Sèche
TNBS	: Acide Trinitro-Benzène-Sulfonique
USDA	: <i>United States Department of Agriculture</i>
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Spectre FTIR de la fraction albumine à 25 °C(a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)	A
Annexe 2 : Spectres FTIR de la fraction globuline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d).....	C
Annexe 3 : Spectres FTIR de la fraction glutéline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d).....	E
Annexe 4 : Spectres FTIR de la fraction prolamine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d).....	G
Annexe 5 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de la fraction albumine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)	I
Annexe 6 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de la fraction globuline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)	K
Annexe 7 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de la fraction glutéline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)	M
Annexe 8 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de la fraction prolamine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)	O
Annexe 9 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de <i>Bradford</i>	Q
Annexe 10 : Droite d'étalonnage pour la détermination de la capacité réductrice du Fer	R
Annexe 11 : Liste des publications.....	S

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Pays où <i>Moringa oléifera</i> a été enregistré comme indigène ou naturalisé.....	5
Figure 2: Différentes parties de <i>Moringa oléifera</i> : feuilles (A); fleur (B); gousses (C) et plante (D)	7
La figure 3 : Récapitulatif des diverses utilisations des différents organes de <i>Moringa oleifera</i> ...	12
Figure 4 : Graines sèches de <i>Moringa oléifera</i>	39
Figure 5: Méthodologie générale du travail effectué sur les protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	40
Figure 6 : Procédure de délipidation de la farine des graines de <i>Moringa oléifera</i>	42
Figure 7 : Procédure de fractionnement des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i>	55
Figure 8 (a-e) : Influence du pH (a), de la force ionique (concentration en NaCl) (b), du temps d'agitation (c), du rapport solide – liquide (RSL) (d) et de température (e) sur la solubilité des protéines.....	67
Figure 9 (a-d) : Spectres FTIR de l'isolat protéique à 25°C (a), 50°C (b), 70°C (c), 80°C (d).....	73
Figure 10 (a-d) : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i> à 25°C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d).....	75
Figure 11 : Effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique.....	77
Figure 12 : Effet du traitement thermique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	78
Figure 13 : Effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	79
Figure 14: Courbes de turbidité des fractions albumine, globuline et glutéline en fonction du pH.	82
Figure 15: Effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	86
Figure 16 : Effet du traitement thermique sur la solubilité des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	87
Figure 17 : Effet du traitement thermique sur la capacité émulsifiante des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	88
Figure 18 : Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'émulsion des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	89
Figure 19 : Surface de réponse montrant l'effet des fractions globuline et glutéline solubles sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	91
Figure 20 (a-b) : Surface de réponse montrant l'effet des fractions albumine et glutéline solubles (a), glutéline et prolamine solubles (b) sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	93

Figure 21 (a-b) : Surface de réponse montrant l'effet des fractions albumine et glutéline solubles (a), glutéline et prolamine solubles (b) sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	95
Figure 22 : Degrés d'hydrolyse des hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	97
Figure 23 (a-e) : Activité inhibitrice du radical DPPH en fonction de la concentration en hydrolysat pepsine (a), trypsine (b), alcalase (c) et thermolysine (d) des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i> et en acide gallique (e).....	101
Figure 24 (a-e) : Activité inhibitrice du radical ABTS ⁺ en fonction de la concentration en hydrolysat pepsine (a), trypsine (b), alcalase (c) et thermolysine (d) des protéines des graines de <i>Moringa oléifera</i> et en acide gallique (e).....	105
Figure 25 : Capacité de réduction du Fer des hydrolysats alcalase, trypsine, thermolysine et pepsine des hydrolysats protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	107
Figure 26 : Effets de la concentration en hydrolysats protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i> sur le transport du glucose à travers les membranes cellulaires des levures	109
Figure 27: Effets des hydrolysats protéiques sur la capture musculaire du glucose en absence d'insuline.....	111
Figure 28: Effets des hydrolysats protéiques sur la capture musculaire du glucose en présence d'insuline.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Espèces du genre <i>moringa</i> et leurs pays/regions d'origine.....	6
Tableau II : Noms vernaculaires de <i>Moringa oléifera</i>	7
Tableau III : Bande d'absorption infrarouge caractéristique de la liaison peptidique.	50
Tableau IV : Dispositif expérimental	54
Tableau V : Caractéristiques majeures des protéases sélectionnées au cours de cette étude... 55	
Tableau VI : Composition chimique de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	69
Tableau VII: Composition en acides aminés des graines et des feuilles de <i>Moringa oléifera</i>	70
Tableau VIII : Effet du traitement thermique sur la structure secondaire de l'isolat protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	75
Tableau IX : Teneurs en protéines d'extraction des fractions protéique des graines de <i>Moringa oléifera</i>	83
Tableau X: Effet du traitement thermique sur la structure secondaire des fractions protéiques des graines de <i>Moringa oléifera</i>	84
Tableau XI : Les coefficients et leurs significativités, le coefficient de corrélation multiple ajusté (R^2 ajusté) et la probabilité du modèle.	90
Tableau XII: CP ₅₀ des hydrolysats protéiques et de l'acide gallique sur le radical DPPH·	101
Tableau XIII: CP ₅₀ des hydrolysats protéiques et de l'acide gallique sur le radical ABTS ⁺	105

Résumé

La recherche de nouvelles sources de protéines moins chères présentant des propriétés technofonctionnelles et bioactives intéressantes s'est intensifiée dans le monde. C'est dans cette optique que nous avons analysé les caractéristiques structurales, les propriétés fonctionnelles et bioactives des protéines des graines de *Moringa oléifera*, légumineuse dont les protéines sont encore sous exploitées. Pour atteindre cet objectif, nous avons préparé un isolat protéique à partir de la farine délipidée des graines de *Moringa oléifera*. Nous avons également fractionné les protéines de ces graines en fonction de leur solubilité différentielle. Puis, il a été question d'évaluer l'influence du traitement thermique et de la composition protéique sur quelques propriétés technofonctionnelles de l'isolat protéique. Enfin, il s'est agi d'analyser quelques propriétés antioxydantes et hypoglycémiantes des hydrolysats protéiques de ces protéines.

Il ressort qu'à 25°C, la conformation feuillet- β est majoritaire dans l'isolat protéique (35,48 %) et dans les fractions albumine (48,98 %), globuline (51,01%), glutéline (34,2%) et prolamine (34,06%). Les traitements thermiques induisaient des modifications de la structure secondaire de l'isolat protéique ainsi que le core hydrophobe ([feuillet- β + hélice- α]) des fractions. L'isolat protéique était plus soluble (94,44 %) à 25°C. Les fractions albumine et glutéline étaient plus solubles à 80°C (56,93 %) et à 70°C (81,86 %) respectivement. Seule la fraction glutéline présentait des propriétés émulsifiantes élevées à toutes les températures de traitement. La composition protéique a également affecté de manière significative les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique. L'augmentation de la glutéline soluble améliorait la solubilité. De même, l'augmentation de la globuline soluble améliorait la capacité émulsifiante. Après hydrolyse enzymatique des protéines à l'aide de quatre protéases, l'hydrolysat thermolysine s'est montré plus efficace à piéger les radicaux DPPH ($CP_{50}=0,74$ mg/mL) et ABTS ($CP_{50}=0,15$ mg/mL) et à chelater le Fer (74,3 eq. μ g catéchine/mg d'hydrolysat) comparativement aux autres. L'hydrolysat trypsine a entraîné une meilleure capture du glucose par les cellules non insulino-dépendante (32,63 %). L'hydrolysat alcalase a présenté une meilleure captation du glucose en absence d'insuline (34,6 %), tandis que l'hydrolysat thermolysine favorisait plus la captation du glucose en présence d'insuline (58,18 %). Ces résultats révèlent que les protéines des graines de *Moringa oléifera* peuvent servir d'ingrédient protéique et sont de bons candidats pour la formulation des peptides thérapeutiques.

Mots clés : *Moringa oléifera*, composition protéiques, propriétés technofonctionnelles, peptides bioactifs.

Abstract

Research toward cheaper protein sources with interesting technofunctional and bioactive properties has been intensified worldwide. Also, the knowledge on how food processing conditions and protein composition can modulate individual or food matrix protein functionality is crucial for designing new protein ingredients. In this regard, we prepared protein isolate from defatted flour of *Moringa oleifera*. We also fractionate these proteins according to their differential solubility. Then effect of heat treatment and protein composition on some technofunctional properties of *Moringa oleifera* protein isolate have been analysed. Finally the antioxidant and hypoglycaemic properties of *Moringa oleifera* seeds protein hydrolysates was evaluated.

Results showed that at room temperature (25°C), the protein isolate is predominantly composed of β -sheet (35.48%). It was the same observation with albumin (48.98%), globulin (51.01%), glutelin (34.2%) and prolamine (34.06%) fractions. Heat treatments induced changes in the secondary structure of the protein isolate as well as the hydrophobic core ($[\beta$ -sheet + helix- α]) of the fractions. The protein isolate was more soluble (94.44%) at 25°C. The albumin and glutelin fractions were more soluble at 80°C (56.93%) and 70°C (81.86%) respectively. At 25°C, the emulsifying capacity of the protein isolate was at its maximum (27.47%) and decreased with increasing temperature. Only the glutelin fraction showed high emulsifying properties at all processing temperatures. The protein composition also significantly affected the physicochemical and functional properties of the protein isolate. Increasing the soluble glutelin improved the solubility. Similarly, increasing soluble globulin improved the emulsifying capacity. After enzymatic hydrolysis of the proteins, the thermolysin hydrolysate was more efficient in scavenging DPPH ($TC_{50}=0.74$ mg/mL) and ABTS ($TC_{50}=0.15$ mg/mL) radicals and in chelating Iron (74.3 eq. μ g catechin/mg hydrolysate) compared to the others. The trypsin hydrolysate resulted in higher glucose uptake by non-insulin-dependent cells (32.63%). Alkalase hydrolysate showed better glucose uptake in the absence of insulin (34.6%), while thermolysin hydrolysate showed higher glucose uptake in the presence of insulin (58.18%). These results indicate that *Moringa oleifera* seed proteins can serve as a cheaper protein ingredient and are good candidates for the formulation of therapeutic peptides.

Keywords: *Moringa oleifera*, protein composition, functional properties, bioactive peptides.

INTRODUCTION

Introduction

Les protéines constituent une source d'azote et d'acides aminés essentiels à l'organisme. Il existe généralement deux sources principales de protéines alimentaires. Ces dernières décennies la tendance vers la consommation des protéines végétales a significativement augmenté en raison des avantages liés à leur production notamment le faible impact environnemental, la durabilité et le faible coût de production ; à ceci s'ajoute le changement du mode alimentaire et du style de vie des consommateurs (Akharume *et al.*, 2021). Dans l'optique de répondre aux besoins des consommateurs, les recherches s'intéressent de plus à plus aux sources de protéines encore peu exploitée pouvant servir comme des ingrédients protéiques lors de diverses formulations (Maryam *et al.*, 2021 ; Djouhou Fowe *et al.*, 2019 ; Mune Mune *et al.*, 2016a). Les ingrédients protéiques sont largement utilisés lors des formulations en raison de leurs avantages nutritionnels et de leurs fonctionnalités, notamment leurs capacités d'émulsion et de moussage, de rétention d'eau, de gélification, d'absorption des graisses et d'épaississement (Maryam *et al.*, 2021). Ces dernières étant principalement l'œuvre des protéines, des travaux de recherche se sont de plus en plus focalisés vers l'isolement et le fractionnement des protéines de diverses sources (Arise *et al.*, 2017). En industrie agroalimentaire, il est plus important de procéder à l'extraction des protéines car les isolats ou concentrats protéiques peuvent être préparés à partir de diverses sources. Ces dernières années, de nombreux travaux de recherches sont effectués sur les propriétés technofonctionnelles des matières protéiques végétales particulièrement les isolats et concentrats protéiques des graines de légumineuses (Ngui *et al.*, 2021) ; ceci est dû au fait que la fonctionnalité des protéines est améliorée avec le concentré de protéines par rapport à la farine ou la farine délipidée qui contiennent des quantités importantes de lipides et de glucides (Ngui *et al.*, 2021 ; Arise *et al.*, 2017 ; Mune Mune *et al.*, 2016b). Tout comme les isolats et concentrats protéiques, il y a un intérêt croissant sur l'utilisation des fractions protéiques comme ingrédient protéique lors des formulations.

Les protéines de graines de légumineuses sont généralement constituées des fractions encore appelées protéines de réserve, notamment les albumine, globuline, prolamine et glutéline ayant une structure et des propriétés différentes (Guéguen *et al.*, 2016). Les fractions albumine et globuline sont majoritaires dans les protéines des graines comparativement aux fractions prolamine et à la glutéline (Guéguen *et al.*, 2016 ; Rui *et al.*, 2011). Ces fractions en raison de leur solubilité dans différents solvants, à savoir dans l'eau, une solution saline, une solution hydroalcoolique et une solution basique (Osborne, 1924) présentent des fonctionnalités différentes comme ingrédient protéique. Des études sur les protéines de germe de blé ont montré que la fraction albumine présentait une capacité d'absorption d'huile et une capacité d'absorption

d'eau élevées par rapport aux fractions globuline et glutéline et à l'isolat protéique. En outre, la fraction globuline présentait des propriétés émulsifiantes élevées tandis que la fraction glutéline avait une hydrophobicité et des propriétés moussantes élevées. La structure secondaire des fractions protéiques était également particulière, les fractions albumine et globuline étaient riches en α -hélice et coude- β , tandis que la fraction glutéline était majoritairement constituée des conformations feuillets- β et des structures irrégulières (Jiang *et al.*, 2015). La connaissance de la composition en protéines et des caractéristiques structurales des protéines alimentaires permet de prévoir leur comportement dans les matrices alimentaires, mais aussi d'élucider leur fonctionnalité en liaison avec les opérations technologiques appliquées (rise *et al.*, 2017). La fonctionnalité des protéines peut être modifiée par des méthodes physiques (traitement thermique, l'extrusion et la préparation, traitement par ultrason, traitement sous haute pression), chimiques (glycosylation, acylation, succinylation, désamination, phosphorylation) ou enzymatiques (hydrolyse enzymatique, fermentation, réticulation enzymatique). Parmi les méthodes physiques, le traitement thermique est la plus utilisée pour modifier les caractéristiques des protéines alimentaires (Nguï *et al.*, 2021 ; Foegeding, 2015). Les autres méthodes physiques présentent certains inconvénients tels que l'efficacité des traitements, les coûts d'investissement des équipements élevés, une consommation d'énergie importante (Akharume *et al.*, 2021). Il importe donc d'étudier l'influence des traitements thermiques sur la composition en protéines et les propriétés technofonctionnelles des protéines des graines de *Moringa oléifera* pour une meilleure exploitation lors des formulations.

En plus de leurs propriétés technofonctionnelles, les protéines des légumineuses après hydrolyse conduisent à l'obtention des peptides ayant des propriétés bioactives multiples (Daliri *et al.*, 2017). Ainsi, de nouvelles voies de valorisation plus prometteuses des protéines des graines de légumineuses comme *Moringa oléifera* ont vu le jour notamment à travers la production des peptides thérapeutiques. Cette dernière décennie a connu un accroissement important des recherches sur les peptides bioactifs ainsi qu'une forte augmentation de leur valeur marchande (Zizzari *et al.*, 2021 ; Daliri *et al.*, 2018). En effet, selon *Verified Market Research* (2021), la valeur marchande des peptides thérapeutiques était évaluée en 2019 à environ 27 milliards de dollars américains et devrait atteindre 51,24 milliards de dollars américains d'ici 2027 (Zizzari *et al.*, 2021). Une telle augmentation significative du marché peut être liée à l'incidence des maladies non transmissibles liées à l'alimentation et des complications qui leurs sont associées. De plus, ces peptides bioactifs font l'objet d'intérêt croissant en industrie agroalimentaire en raison des progrès technologiques et le développement de procédés d'isolement ou de concentration et de leur purification (Zizzari *et al.*, 2021). C'est ainsi qu'au fil des années, un nombre important de peptides ayant propriétés bioactives diverses

(antioxydantes, antihypertensives, antihyperglycémiques, antimicrobiennes, antithrombotiques ...etc.) ont été identifiées à partir des graines de légumineuses comme soja, l'avoine, le haricot, le canola, les lentilles, les petits pois, le pois chiche, le pois bambara, les graines de lin (Maryam *et al.*, 2021 ; Mune Mune *et al.*, 2018). Il existe plusieurs méthodes d'obtention des peptides bioactifs, notamment l'hydrolyse enzymatique, la synthèse chimique, la fermentation avec des cultures de bactéries protéolytiques et l'extraction à partir de sources naturelles (micro-organismes ou plantes) (Sánchez et Vázquez, 2017). Cependant, l'hydrolyse enzymatique constitue le moyen d'obtention des peptides le plus couramment utilisé (Daliri *et al.*, 2018). Une analyse de quelques propriétés bioactives des protéines des graines de *Moringa oléifera* peut sembler intéressante dans la perspective de préparation de peptides bioactifs à partir d'une source de protéines encore sous exploitée.

Moringa oléifera (*Moringaceae*) est une plante qui possède d'importantes valeurs nutritionnelles et médicinales (Makkar et Becker, 1997). Elle est de nos jours cultivée dans toutes les régions tropicales et subtropicales notamment en Afrique, avec la particularité d'être résiliente au changement climatique, aux sols pauvres et moyennement secs (Mughal *et al.*, 1999). Les graines de *Moringa oléifera* contiennent entre 9,17 à 53,36 % de glucides, 14 à 46 % de lipides, et 18,6 à 37,2 % de protéines (Bridgemohan *et al.*, 2014 ; Ijarotimi *et al.*, 2013 ; Abiodun *et al.*, 2012; Compaoré *et al.*, 2011) ; en plus elle contiennent la vitamine A (2,04 %), les vitamines du groupe B notamment la thiamine (0,94 %) et sont riches en minéraux principalement le potassium, le phosphore, le zinc, la magnésium, le sodium et le calcium (Ijarotimi *et al.*, 2013 ; Mbah *et al.*, 2012). Les protéines des graines de *Moringa oléifera* contiennent tous les acides aminés essentiels (Okereke et Akaninwor, 2013), lui conférant ainsi une valeur nutritionnelle élevée (Gopalakrishnan *et al.*, 2016 ; Mune Mune *et al.*, 2016a). En outre, des études sur les propriétés fonctionnelles des graines de *Moringa oléifera* ont été rapportées (Saa *et al.*, 2019). Les graines de *Moringa oléifera* ont également la capacité de réduire le taux de lipides sanguins et la pression artérielle, de réguler le fonctionnement de l'estomac, de protéger le foie contre l'alcool et de renforcer le système immunitaire de l'Homme (Du *et al.*, 2017). De même, González Garza *et al.* (2017) ont rapporté que l'hydrolyse des protéines des graines de *Moringa oléifera* a conduit à l'obtention des peptides présentant des propriétés notamment antioxydantes, antidiabétiques et antihypertensives élevées. Les graines de *Moringa* sont également utilisées et valorisées à travers l'enrichissement des aliments. Par exemple, au Nigeria, elles sont utilisées pour fortifier des formulations alimentaires à base de maïs, de soja et d'arachide (Shiriki *et al.*, 2015) ; et comme fortifiant alimentaire dans le pain, les biscuits, le yaourt, le fromage et dans la préparation de soupes (Oyeyinka et Oyeyinka,

2016). Elles sont aussi utilisées comme flocculant pour la clarification des eaux (Popoola et Obembe, 2013).

Les ingrédients à base de protéines de *Moringa oléifera* n'ont pas encore été introduits à une échelle significative dans les formulations alimentaires en Afrique en général et au Cameroun en particulier. Cela est probablement dû au manque d'informations sur les propriétés structurales, bioactives et fonctionnelles des protéines des graines de *Moringa oléifera*. Plus précisément, des preuves scientifiques relatives à l'influence des traitements thermique sur la structure, la fonctionnalité et la composition protéique (en termes de ration de fraction protéique soluble) des graines de *Moringa oléifera* n'ont pas encore été apportées, il en est de même des activités antihyperglycémiques des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera*. Ceci limite encore l'utilisation des protéines des graines de *Moringa oléifera* en industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Hypothèses :

- ✓ Les protéines des graines de *Moringa oléifera* présentent des caractéristiques structurales et des propriétés physicochimiques et fonctionnelles intéressantes ;
- ✓ La composition protéique influence les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* ;
- ✓ Les hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sont doués des propriétés bioactives intéressantes.

Objectif général

L'objectif général de ce travail était **d'étudier les caractéristiques structurales, les propriétés fonctionnelles et bioactives des protéines des graines de *Moringa oléifera***. Il a été spécifiquement question :

- ✚ D'analyser l'influence du traitement thermique sur l'hydrophobicité, la structure secondaire, la solubilité et les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* ;
- ✚ D'analyser l'influence de la composition en protéines sur l'hydrophobicité, la structure secondaire, la solubilité et les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéiques des graines de *Moringa oléifera* ;
- ✚ D'analyser quelques propriétés antioxydantes et hypoglycémiantes des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera*.

REVUE DE LA
LITTÉRATURE

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur *Moringa oléifera*

I.1.1. Origine et distribution

Moringa oléifera est originaire des régions subhimalayennes du Nord-Ouest de l'Inde. Il aurait été introduit dès la fin du 19^e siècle en Afrique. Les plus vieux spécimens africains connus ont une centaine d'années et proviennent du Sénégal et d'Égypte. En Afrique de l'Est, *Moringa oléifera* aurait été introduit lors de la colonisation britannique par les fonctionnaires de l'administration coloniale dont beaucoup venaient d'Inde (Nigg, 1993).

Le *Moringa* a été largement naturalisé dans d'autres régions tropicales du monde (Figure 1).

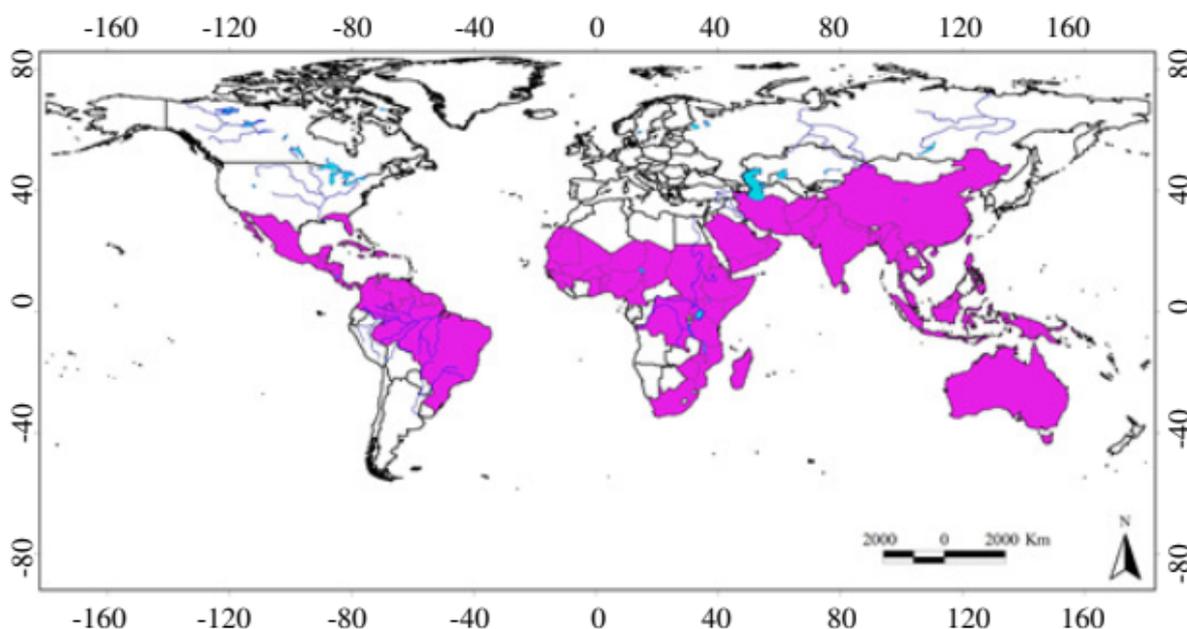


Figure 1: Pays où *Moringa oléifera* a été enregistré comme indigène ou naturalisé (Navie et Csurhes, 2010).

I.1.2. Taxonomie

Moringa oléifera appartient au règne végétal, embranchement des phanérogames, sous-embranchement des angiospermes. Il appartient à la classe des dicotylédones, sous-classe des *dilleniidae*, ordre des capparales, de la famille des *Moringaceae*, du genre : *Moringa*, espèce *Moringa oléifera* Lamarck.

Moringa oléifera Lamarck (Synonyme: *moringa pterygosperma* Gaertner) appartient à la famille mono générique des arbustes et arbres des *Moringaceae* qui comprend environ 13 espèces (Foidl *et al.*, 2001). Les douze autres espèces sont bien connues : *Moringa arborea*, *Moringa borziana*, *Moringa concanensis*, *Moringa drouhardii*, *Moringa hildebrandtii*,

Moringa longituba, *Moringa ovalifolia*, *Moringa peregrina*, *Moringa pygmaea*, *Moringa rivae*, *Moringa ruspoliana*, *Moringa stenopetala* (Fuglie, 2002). *Moringa oléifera* Lamarck est l'espèce la plus largement connue et utilisée (Morton, 1991).

Tableau I : Espèces du genre *Moringa* et leurs pays/régions d'origine (Olson, 2002).

Espèce du genre <i>Moringa</i>	Pays/régions d'origine
<i>Moringa arborea</i> Verdc	Kenya
<i>Moringa rivae</i> Chiov.	Kenya et Ethiopie
<i>Moringa stenopetala</i> Cufod.	Kenya et Ethiopie
<i>Moringa borziana</i> Mattei	Kenya et Somalie
<i>Moringa longituba</i> Engl.	Kenya et Somalie
<i>Moringa pygmaea</i> Verdc.	Somalie
<i>Moringa ruspoliana</i> Engl	Kenya, Ethiopie et Somalie
<i>Moringa ovalifolia</i> Dinter and A. Berge	Namibie et Angola
<i>Moringa drouhardii</i> Jum.	Madagascar
<i>Moringa hildebrandtii</i> Engl.	Madagascar
<i>Moringa peregrina</i> Forssk	Zone arabienne et autour de la Mer Rouge
<i>Moringa concanensis</i> Dalzell and A. Gibb	Région Sub-Himalayenne et Nord-Ouest l'Inde
<i>Moringa oléifera</i> Lam.	Région Sub-Himalayenne et Nord-Ouest l'Inde

I.1.3. Description

Moringa oléifera Lamarck (Synonyme: *Moringa Pterygosperma* Gaertner), est une espèce de petit arbre pérenne, à feuilles caduques, pouvant mesurer jusqu'à 7 à 12 m de haut (Price, 2007). Le tronc est généralement droit, il atteint 1,5 à 2 m de haut avant de se ramifier. Les branches poussent de manière désorganisées et la canopée est en forme de parasol. Les feuilles, alternes et bi ou tripennées, se développent principalement dans la partie terminale des branches. Les fleurs mesurent 2,5 cm de large. Les fruits forment des gousses à trois lobes, mesurant 20 à 60 cm de long. Les graines sont rondes, avec une coque marron semi-perméable (Price, 2007).

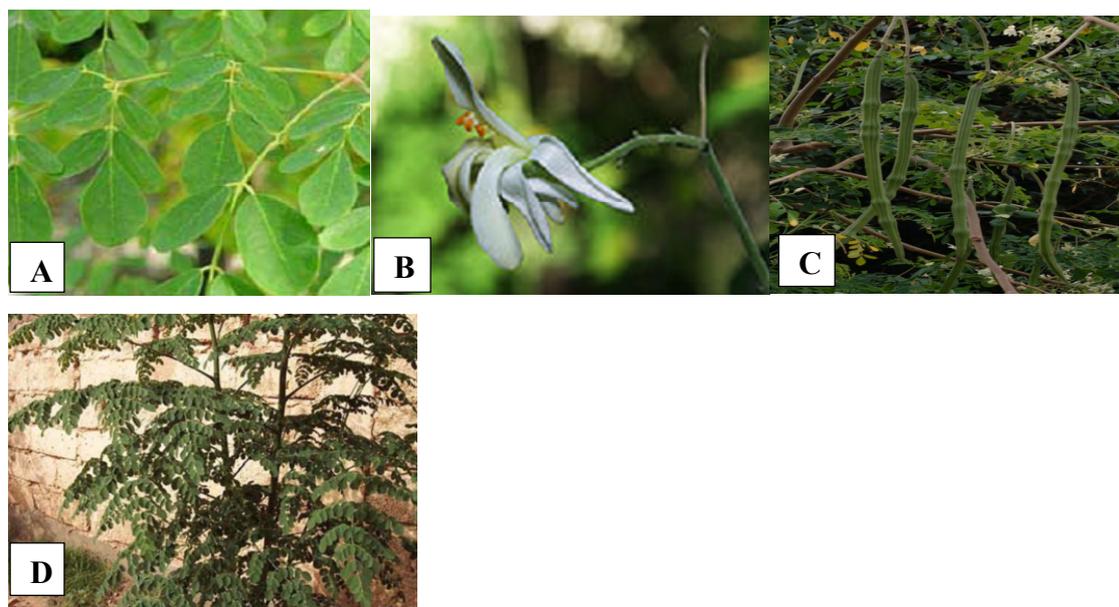


Figure 2: Différentes parties de *Moringa oléifera* : feuilles (A); fleur (B); gousses (C) et plante (D) (Price, 2007).

Tableau II : Noms vernaculaires de *Moringa oléifera* (Fuglie, 2002).

Pays	Noms vernaculaires
Bénin (Fon) :	<i>Yovokpatin, Kpatima</i> (Yoruba) : <i>Ewé ilé</i>
Burkina Faso (Joula) :	<i>Arjanyiri</i> (Moré) : <i>Arzam tigha</i> (“L’arbre du paradis”)
Cameroun (Foufouldé) :	<i>Guiligandja</i> (Mafa) : <i>Gagawandalahai</i>
Côte d’ivoire (Dioula) :	<i>Arjanayiiri</i>
Niger (Hausa) :	<i>Zogala gandi</i> (Zarma) : <i>Windi-bundu</i>
Sénégal (Wolof):	Neverday, <i>Nébédaj</i> , <i>sap-sap</i> (Sérère) : <i>Nébédaj</i>
Tchad (Sara):	<i>Kag n’dongue</i>
Togo (Mina):	<i>Yovoviti</i>
Zimbabwe (Tonga) :	<i>Mupulanga, Zakalanda</i>

I.1.4. Valeur nutritionnelle

Chaque partie de l'arbre *Moringa* (fruits, graines, feuilles, fleurs, écorce et racines) est associée à la présence d'au moins un, ou dans la plupart des cas à un certain nombre de bienfaits (Zaku *et al.*, 2015). Les feuilles sont riches en protéines, minéraux, bêta-carotène et composés antioxydants, qui sont souvent déficients dans les régimes alimentaires des pays en développement (Leone *et al.*, 2015). Les recherches ont permis de découvrir que les parties du

Moringa contiennent de nombreux nutriments essentiels (Fahey, 2005 ; Kasolo *et al.*, 2010). Les feuilles de *Moringa* contiennent des teneurs élevées de vitamine C, de calcium et de potassium, ainsi que des protéines (Zaku *et al.*, 2015). En raison de la présence de plusieurs types de composés antioxydants tels que les flavonoïdes, l'acide ascorbique et les caroténoïdes, les feuilles de *Moringa* sont capables de prolonger la durée de conservation des aliments contenant des graisses (Siddhuraju & Becker, 2003 ; Dillard & German, 2000). Des études récentes sur les graines ont rapporté une teneur en protéines variant de 18,6% (Kawo *et al.*, 2009) à 37,2% (Bridgemohan, Bridgemohan, & Mohamed, 2014). Cependant, l'analyse des graines délipidées de *Moringa oléifera* a montré une teneur en protéines variant de 32% à 62,8% (Govardhan Singh *et al.*, 2011 ; Anwar et Rashid, 2007). Les propriétés nutritionnelles des graines de *Moringa oléifera* peuvent être améliorées par la complémentation avec d'autres aliments riches en acides aminés soufrés ou en lysine. À cet égard, les graines de *Moringa oléifera* peuvent être combinées avec des céréales (riz, maïs, sorgho, millet) pour produire des aliments de complément ayant une balance en acides aminés équilibrée.

En outre, il a été découvert que le *Moringa* possède un groupe de composés uniques contenant du sucre (Fahey, 2005 ; Fahey *et al.*, 2001). Ces composés ont démontré une certaine activité chimiopréventive, en induisant l'apoptose (Brunelli *et al.*, 2010). Les graines de *Moringa oléifera* contiennent entre 9,17% et 53,36% de glucides (Ijarotimi *et al.*, 2013 ; Compaoré *et al.*, 2011a). Les fibres qui sont des glucides non disponibles pour l'organisme représentent environ 24% du poids sec des graines non décortiquées et 3% des graines décortiquées (Bridgemohan *et al.*, 2014). Le profil en mono et disaccharides montre que les graines de *Moringa oléifera* ont de faibles teneurs en glucose (2,57 g/100 g dw), fructose (0,03 g/100 g dw), et saccharose (2,91 g/100 g dw). Ainsi, les graines de *Moringa oléifera* pourraient être utilisées dans l'alimentation des diabétiques (Compaoré *et al.*, 2011a; Compaoré *et al.*, 2011b).

L'espèce possède un niveau particulièrement élevé d'acide oléique (70%), ce qui en fait un excellent hydratant, ainsi qu'une source potentiellement de graisses saine dans l'alimentation (les autres huiles végétales ne contiennent normalement qu'environ 40% d'acide oléique). La teneur en lipides dans les graines de *Moringa oléifera* se situe entre 14% et 46 % sur la base de la teneur en matière sèche (Ijarotimi *et al.*, 2013 ; Abiodun, *et al.*, 2012). On y retrouve une teneur élevée en acides gras polyinsaturés représentant jusqu'à 79% avec une faible teneur en acides gras mono insaturés et saturés (Ijarotimi *et al.*, 2013). Aussi, l'huile des graines de *Moringa oléifera* est une source de certains composés mineurs (phytostérols et tocophérols). Plusieurs études ont examiné le rôle de l'huile de graines de *Moringa oléifera* dans la nutrition

humaine, et cela inclut les caractéristiques physicochimiques de l'huile et sa valeur biologique (Arafat, 2013; Andrade *et al.*, 2011 ; Compaoré *et al.*, 2011a ; Compaoré *et al.*, 2011b ; Anwar & Rashid, 2007 ; Abdulkarim *et al.*, 2005).

Les graines de *Moringa oleifera* contiennent de la provitamine A (2,04%) et les vitamines du groupe B, notamment la B1 ou thiamine (0,94%) (Mbah *et al.*, 2012). Ces auteurs ont montré que la vitamine A joue un rôle clé dans la vision et possède des propriétés antioxydantes sous forme de β -carotène en limitant l'oxydation de molécules telles que la vitamine E. La vitamine E a été retrouvée dans l'huile de graines de *Moringa oléifera* sous forme d'alpha-tocophérol, de gamma-tocophérol et de delta-tocophérol. Les graines de *Moringa oleifera* sont riches en minéraux dont le potassium, le phosphore, le sodium, le zinc, le magnésium et le calcium sont les principaux minéraux (Ijarotimi *et al.*, 2013). Elles ont un rapport Ca/P supérieur à 1, tandis que le rapport Na/K est supérieur à la valeur recommandée (0,60) (Ijarotimi *et al.*, 2013).

I.1.5. Utilisation du *Moringa oléifera*

Moringa oléifera est l'une des plantes les plus utilisées au monde (Palada et Chang, 2003). Toutes les parties de l'espèce sont traditionnellement utilisées à des fins différentes, mais les feuilles sont généralement les plus utilisées (Sivasankari *et al.*, 2014 ; Popoola et Obembe, 2013). *Moringa oléifera* est utilisée en médecine, en alimentation, comme fourrage, pour la clôture, comme bois de chauffage, et comme coagulant et gomme (Agoyi *et al.*, 2014 ; Sivasankari *et al.*, 2014 ; Popoola et Obembe, 2013). L'espèce est surtout utilisée comme médicament traditionnel et comme aliment (Agoyi *et al.*, 2014 ; Sivasankari *et al.*, 2014 ; Popoola et Obembe, 2013).

I.1.5.1. Utilisation alimentaire

Les feuilles de *Moringa* sont ajoutées aux préparations alimentaires (Leone *et al.*, 2015). Les feuilles de *Moringa* sont consommées en salade, en soupe de légumes pour la nutrition humaine (Popoola et Obembe, 2013) et comme fourrage pour l'alimentation animale (Nouman *et al.*, 2014). Les graines sont grillées et consommées comme l'arachide (Popoola et Obembe, 2013). En Inde, les feuilles de *Moringa* ont été transformées en une boisson innovante nommée Zija (Ansari et Kumar, 2012). Le *Moringa* est également utilisé et valorisé à travers l'enrichissement des aliments. Par exemple, au Nigeria, il est utilisé pour fortifier des formulations alimentaires à base de maïs, de soja et d'arachide (Shiriki *et al.*, 2015) ; et comme

fortifiant alimentaire dans l'amala (pâte raide), l'ogi (grau de maïs), le pain, les biscuits, le yaourt, le fromage et dans la préparation de soupes (Oyeyinka et Oyeyinka, 2016).

I.1.5.2. Utilisation médicinale

Le *Moringa* est considéré comme étant doué de plusieurs propriétés médicinales, car toutes les parties ont été rapportées seules ou avec d'autres plantes pour traiter diverses maladies (Pamok *et al.*, 2011). En médecine traditionnelle, les feuilles sont utilisées pour traiter des affections telles que le paludisme, la fièvre typhoïde, les maladies parasitaires, l'arthrite, les gonflements, les coupures, les maladies de la peau, les affections génito-urinaires, l'hypertension et le diabète (Leone *et al.*, 2015). Elles sont également utilisées pour provoquer la lactation et stimuler le système immunitaire (pour traiter les symptômes liés au VIH/SIDA) (Sivasankari *et al.*, 2014 ; Popoola et Obembe, 2013 ; Anwar *et al.*, 2007), ainsi que des stimulants cardiaques et un remède contraceptif. Pour le traitement de ces affections, on peut consommer directement soit les feuilles crues et séchées, soit l'extrait d'une infusion aqueuse (Leone *et al.*, 2015). Les utilisations des feuilles de l'espèce dans le traitement des infections par le VIH et du cancer ont été rapportées par les populations du Nigeria (Popoola et Obembe, 2013). Les écorces sont bouillies dans de l'eau et trempées dans de l'alcool pour obtenir respectivement une décoction et un extrait, qui peuvent être utilisés pour traiter les maux d'estomac (soulager les douleurs d'estomac, les ulcères et faciliter la digestion), la mauvaise vision, les douleurs articulaires, le diabète, l'anémie et l'hypertension (Popoola et Obembe, 2013), les maux de dents, les hémorroïdes, les troubles utérins (Popoola et Obembe, 2013 ; Yabesh *et al.*, 2014). Dans une pratique bien connue des populations Nigérienne, les graines de *Moringa* sont utilisées pour sédimenter les impuretés de l'eau (Popoola et Obembe, 2013). Les racines sont trempées dans l'eau ou l'alcool et bouillies pour obtenir des décoctions et des extraits comme remèdes contre les maux de dents, comme médicaments anthelminthiques et antiparalytiques (Sivasankari *et al.*, 2014 ; Popoola et Obembe, 2013 ; Anwar *et al.*, 2007) et comme stimulant sexuel. Enfin, les fleurs sont utilisées pour produire des substances aphrodisiaques et pour traiter les inflammations, les maladies musculaires, l'hystérie, les tumeurs et l'hypertrophie de la rate (Anwar *et al.*, 2007 ; Yabesh *et al.*, 2014). Les activités contre les maladies ci-dessus ont été confirmées dans plusieurs tests de dépistage et études ethnopharmacologiques (Sivasankari *et al.*, 2014 ; Yabesh *et al.*, 2014 ; Abe et Ohtani, 2013 ; Popoola et Obembe, 2013 ; Pamok *et al.*, 2011).

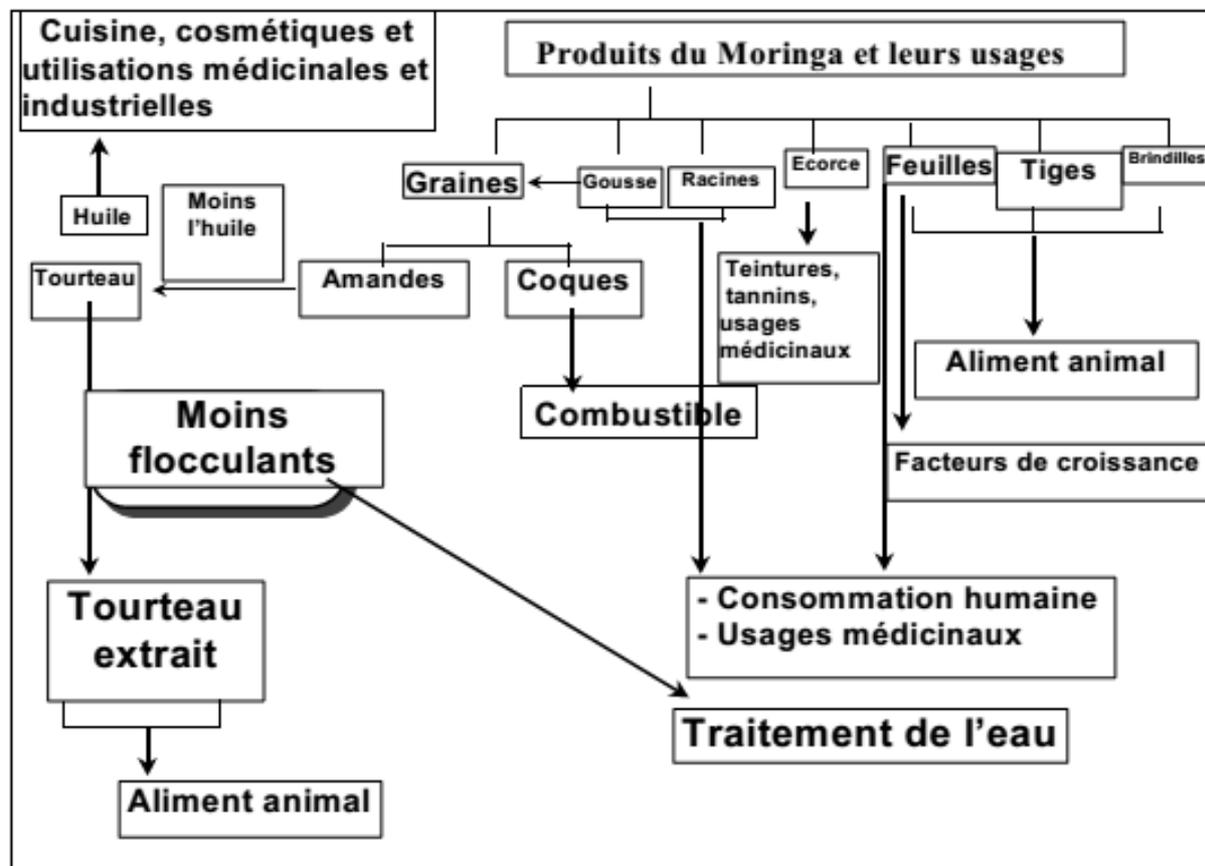
I.1.5.3. Autres utilisations du *Moringa*

En plus d'être consommé par les humains à des fins alimentaires et sanitaires, le *Moringa* est utilisé comme fourrage pour les animaux (Nouman *et al.*, 2014 ; Nouman *et al.*, 2013) et comme coagulant naturel des eaux turbides (Suarez *et al.*, 2003). En fait, la poudre de graines de *Moringa* peut être utilisée pour la purification de l'eau, en remplaçant des produits chimiques dangereux et coûteux comme le sulfate d'aluminium (Popoola et Obembe, 2013). L'espèce est utilisée comme un stimulateur naturel de la croissance des plantes car ses feuilles sont riches en zéatine, une hormone végétale, qui appartient au groupe des cytokinines (Leone *et al.*, 2015). Les extraits de feuilles peuvent stimuler la croissance des plantes et augmenter le rendement des cultures. Par exemple, l'application d'un extrait de feuilles de *Moringa* à 2 semaines après l'émergence et toutes les 2 semaines par la suite, a augmenté significativement les performances de croissance du maïs en termes de hauteur de la plante, de longueur des pousses, de poids frais et sec des pousses (Biswas *et al.*, 2016). Par conséquent, l'espèce serait une espèce très utile pour l'amélioration de la sécurité alimentaire.

L'adéquation de l'huile de graines de *Moringa* comme source d'alimentation en biodiesel a été prouvée, et l'huile pourrait être utilisée comme biodiesel pur ou mélange pétro-diesel sur le moteur (Da Silva *et al.*, 2010). L'huile de *Moringa* a également d'excellentes caractéristiques, ce qui en fait un ingrédient très apprécié dans une variété d'applications, allant de l'huile alimentaire végétale à l'utilisation dans les produits cosmétiques et d'autres applications industrielles telles que le lubrifiant pour les machines fines (*Smallholder Farmers Alliance*, 2015).

Il existe de nombreuses opportunités pour la production de *Moringa* car il a été observé que l'espèce est bien adaptée à tous les types de sols et à une large gamme d'environnements, particulièrement tolérante aux sols pauvres des régions arides et semi-arides (Padulosi *et al.*, 2011 ; Navie & Csurhes, 2010). Outre sa valeur nutritionnelle et médicinale et ses multiples usages, le *Moringa* améliore la sécurité des moyens de subsistance et la diversification des cultures (Gadzirayi *et al.*, 2013), et présente un intérêt considérable pour l'adaptation future de l'agriculture au changement climatique (Padulosi *et al.*, 2011). Au Niger, Tabbo et Amadou (2017) ont constaté que l'introduction de *Moringa oléifera* dans les systèmes agricoles faisait partie des stratégies d'adaptation au changement climatique les plus importantes pour les agriculteurs parmi les ménages ruraux. En fait, l'espèce peut être utilisée comme amendement du sol en tant qu'engrais vert et le gâteau de graines comme engrais fournit également d'importants services écosystémiques (Mridha, 2015). Ces services écosystémiques comprennent le reboisement, dans les cultures en couloirs, le contrôle de l'érosion, la

délimitation, la barrière et le soutien (Mridha, 2015). Le potentiel antiérosif de l'espèce a été démontré par Avakoudjo *et al.* (2013) ; tandis que Noulèkoun *et al.* (2017) ont démontré son aptitude au reboisement des terres de culture dégradées. De plus, le taux d'absorption du dioxyde de carbone (CO₂) par le *Moringa* est cinquante fois plus élevé que celui du cèdre du Japon et vingt fois plus élevé que celui de la végétation générale (Potadar et Patil, 2017 ; Hernandez *et al.*, 2015 ; Villafuerte *et al.*, 2009). À ce titre, l'intégration de l'espèce dans les systèmes agroforestiers atténuera les impacts du changement climatique (Kumar *et al.*, 2017).



La figure 3 : Récapitulatif des diverses utilisations des différents organes de *Moringa oléifera*.

I.1.6. Importance socioéconomique de *Moringa oléifera*

La facilité relative avec laquelle le *Moringa* se propage par des moyens non clonaux et clonaux, et sa faible demande en nutriments du sol et en eau rendent sa production et sa gestion faciles (Paliwal *et al.*, 2011). L'introduction de cette plante dans une ferme qui présente un environnement diversifié peut être bénéfique à la fois pour le propriétaire de la ferme et pour les écosystèmes environnants (Fuglie, 2001). Par exemple, dans l'Ouest du Nigeria, l'analyse de la rentabilité d'une production de *Moringa* à base de feuilles a indiqué un bénéfice net moyen de 59,81 % par hectare et par an provenant de la vente des feuilles (Animashaun et Toye, 2013).

Sinon, la majorité (51,66%) des vendeurs-détaillants pensent que la vente des feuilles de *Moringa* est rentable et même 26,66% d'entre eux affirment qu'elle est deux fois plus rentable que d'autres légumes à feuilles dans le Nord du Cameroun (Madi *et al.*, 2012). Actuellement, le marché international du *Moringa* n'est pas suffisamment développé pour être qualifié de produit de base sur le marché mondial ; par conséquent, les statistiques commerciales des produits du *Moringa* ne sont disponibles que sous une forme agrégée (*Smallholder Farmers Alliance*, 2015). Le marché mondial des produits de *Moringa* est cependant considéré comme substantiel, avec des estimations actuelles de plus de 4 milliards de dollars US par an dans le monde (*Centre for Jatropha Promotion and Biodiesel*, 2014). Si le *Moringa* est utilisé à des fins très diverses, deux produits à base de *Moringa* en particulier se distinguent par leur potentiel commercial : la poudre de feuilles et l'huile en tant qu'ingrédient pour les produits cosmétiques. Au cours des dernières années, une variété de plus en plus grande de produits à base de *Moringa* s'est répandue sur de nombreux marchés et sont désormais disponibles sur la plupart des sites internet d'aliments naturels et dans de nombreux magasins de produits naturels dans le monde entier (*Smallholder Farmers Alliance*, 2015). La poudre de feuilles de *Moringa* peut être vendue simplement ou dans des récipients ou dans des sacs en plastique qui empêchent l'absorption d'humidité. La poudre de feuilles de *Moringa* est également vendue sous forme de thé ou mélangée avec du chocolat. La commercialisation des produits de *Moringa* est encore très informelle et il est difficile d'obtenir des informations fiables sur les volumes de production et les prix (*Smallholder Farmers Alliance*, 2015). Par conséquent, pour exploiter efficacement le potentiel de marché existant, la commercialisation doit se structurer et se formaliser. En outre, il est nécessaire de développer des chaînes de valeur pour l'espèce. En fait, la chaîne de valeur du produit *Moringa*, si elle est correctement développée, offre des opportunités d'investissement considérables, ainsi que des possibilités de création d'emplois, de recettes en devises et de diversification des exportations (Animashaun et Toyé, 2013). Cependant, les producteurs doivent être en mesure d'assurer le respect de la réglementation et des normes internationales, d'offrir un approvisionnement continu et de haute qualité.

I.2. Les protéines végétales

I.2.1. Généralités

Les protéines végétales sont retrouvées dans de nombreux aliments en proportions différentes. Elles proviennent majoritairement des légumineuses, parmi lesquelles notamment les pois (cassés, chiches, petits), haricots (secs), soja, lentilles, fèves. Elles sont également présentes dans les oléagineux (arachide, sésame, colza, amandes, noix, noisettes ...), de même que les céréales (blé, riz, avoine, maïs ...) et les pseudos céréales (quinoa, sarrasin..). Des

protéines végétales sont retrouvées dans les tubercules (pommes de terre, patate douce, manioc), les fruits et les légumes (en quantité négligeable), les champignons, les micros algues (spiruline) et également dans les épices et aromates (Guéguen *et al.*, 2016). Les protéines végétales sont supérieures aux protéines animales d'un point de vue coût et rendement. Cependant, elles présentent souvent des déficiences en certains acides aminés essentiels que l'on peut compenser en exploitant la complémentarité de composition des protéines de diverses sources (Guéguen *et al.*, 2016).

Les protéines de légumineuses sont riches en acides aminés essentiels, particulièrement en lysine. Cependant elles sont relativement pauvres en acides aminés soufrés comme la méthionine et la cystéine, mais également en tryptophane.

Selon les bases de données de l'USDA (*United States Department of Agriculture*), tous les végétaux contiennent les 20 acides aminés standards, dont les 9 acides aminés essentiels (Mariotti et Gardner, 2019). Cette base de données répertorie la valeur nutritive de milliers d'aliments. Parmi les valeurs nous retrouvons la teneur en lipides, protéines, glucides par exemple mais également en vitamines et minéraux.

I.2.2. Classification générale

On distingue selon leurs propriétés de solubilité 4 grandes familles de protéines : les albumines, solubles dans l'eau, les globulines solubles dans les solutions salines, les prolamines insolubles en milieu aqueux et solubles dans les solvants hydroalcooliques (60-70 %, v/v) et les glutélines solubles en milieu très alcalin (pH > 10). Les globulines sont surtout présentes (60-90 % des protéines) dans les graines de dicotylédones (légumineuses, oléagineux) tandis que les prolamines et les glutélines sont les protéines majeures des céréales (80-90 %) (Guéguen *et al.*, 2016).

Les globulines, les prolamines et les glutélines sont des protéines de réserve, qui ont pour fonction de stocker dans la graine le carbone et surtout l'azote mobilisable au moment de la germination. Cette fonction leur confère des caractéristiques très particulières de composition en acides aminés, avec des teneurs anormalement élevées en amides (glutamine, asparagine). Ainsi, dans les prolamines du blé appelées gliadines, les résidus glutamine représentent plus du tiers des résidus d'acides aminés de ces protéines. On note dans les globulines une forte teneur en arginine. Les albumines, en général mieux équilibrées en acides aminés, ont principalement un rôle métabolique (enzymes, transporteurs, protéines de stress. . .), ou un rôle de défense (inhibiteurs d'enzymes, lectines, protéines entomotoxiques, antifongiques, antimicrobiennes...). Cependant, on trouve aussi dans cette famille, et pour certaines espèces

végétales (crucifères, noix...) des protéines majeures, de type 2S, qui ont également une fonction de réserve. Dans les feuilles et les tubercules, les protéines de réserve ne sont pas présentes ; on a principalement des protéines métaboliques, comme par exemple, la ribulose biphosphate carboxylase enzyme majeure du système photosynthétique dans les feuilles (Guéguen *et al.*, 2016).

Ces différentes familles de protéines présentent aussi des différences importantes de structure. Les globulines sont des protéines oligomériques, globulaires et compactes et de poids moléculaire assez élevé. On distingue deux principales familles structurales en fonction de leur coefficient de sédimentation : les protéines de type 11-12S, hexamériques (300-360 kDa) et les protéines de type 7S, trimériques (150-180 kDa). Les protéines 11-12S sont présentes majoritairement dans la plupart des graines de dicotylédones (légumineuses, oléagineux) tandis que les protéines 7S sont principalement représentées dans les graines de légumineuses (pois, soja, haricot, fève. . .). Ces protéines possèdent des appellations différentes suivant les espèces mais présentent au sein de chaque famille de grandes similarités de structure et de propriétés physicochimiques (Guéguen *et al.*, 2016).

Les prolamines des céréales sont des protéines non globulaires, constituées d'une seule chaîne polypeptidique, et possédant un très grand polymorphisme. Les gluténines de blé sont des protéines de très haut poids moléculaire, de 100 kDa à plusieurs millions, constituées de sous-unités reliées entre elles par des ponts disulfures. L'analyse des séquences de prolamines et des sous-unités gluténines fait apparaître l'existence de séquences répétitives très riches en glutamine et proline, dont certaines sont très impliquées dans la maladie cœliaque (Guéguen *et al.*, 2016).

La famille des albumines est très hétérogène ; elle est composée d'une multitude de protéines, souvent mineures quantitativement, de fonctions biologiques très diverses et dont certaines peuvent avoir un impact nutritionnel. On y trouve en particulier les inhibiteurs de protéases susceptibles de se complexer aux protéases digestives, trypsine et chymotrypsine, les lectines dont certaines créent des lésions au niveau intestinal, et certaines enzymes d'oxydo-réduction (lipoxygénase, peroxydases, polyphénoloxydases...) capables de générer des produits d'oxydation au cours des transformations (Guéguen *et al.*, 2016). Il existe environ une dizaine de familles d'inhibiteurs de protéases chez les plantes (Richardson, 1991). Dans le cas des graines de légumineuses, où ils sont les plus représentés, ils appartiennent principalement à la famille des inhibiteurs de type Bowman-Birk et de type Kunitz. On trouve également une forte activité anti-protéases dans les protéines de pomme de terre (potato I, potato II) (Ralet et Guéguen, 1999). Les lectines sont particulièrement présentes dans les graines de légumineuses

(Gulewicz *et al.*, 2014). Leurs effets physiologiques chez l'homme sont dus à leur capacité à interagir avec les glycoprotéines à la surface des villosités intestinales, entraînant une réduction de l'absorption des nutriments ou même des lésions de l'épithélium intestinal. Ces effets sont variables en fonction de leur origine botanique. Comme les inhibiteurs de protéases, les lectines sont résistantes à l'hydrolyse et relativement thermostables. Les traitements thermiques utilisés conventionnellement (cuisson, autoclavage, extrusion) sont cependant, en général, suffisants pour les inactiver (Gulewicz *et al.*, 2014).

Les protéines de réserve de type 2S sont des protéines de faible masse moléculaire (10-15 kDa), globulaires et compactes, souvent thermostables en raison de ponts disulfures intercaténaux. On les trouve en quantité majeure dans les graines de crucifères (colza, moutarde) et les noix (noix du Brésil, noix cajan...). Les homologies de séquence et de structure au sein d'une même classe de protéines (12S, 7S, 2S, prolamines...) expliquent certaines similitudes de propriétés physicochimiques (agrégation, dissociation, température de dénaturation thermique, interactions...), fonctionnelles (gélification, propriétés tensioactives, filmogènes...) ou nutritionnelles entre les protéines homologues de différentes espèces botaniques. Toutefois, même si ces similitudes de comportement existent, il ne faut pas minimiser les différences entre protéines homologues issues d'espèces botaniques différentes. Elles sont dues à des singularités structurales comme des différences de charges, d'hydrophobicité de surface, de glycosylation. Les exemples sont nombreux qui montrent des différences de propriétés entre les prolamines de différentes céréales, entre globulines 2S ou 7S de différentes légumineuses ou d'oléagineux. Ces différences expliquent en grande partie les spécificités d'usage (Guéguen *et al.*, 2016).

Les modifications de la structure native en fonction des conditions de milieu et de traitements induisent aussi des comportements physicochimiques et des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles variables. Il faut prendre en compte l'impact des opérations de fractionnement des matières premières, de mélange des ingrédients, et de formulation et de cuisson de l'aliment. Le fractionnement peut générer des différences de la composition relative en familles protéiques. Les opérations de formulation de l'aliment peuvent (i) modifier la teneur et la composition en protéines dans le produit fini, (ii) favoriser ou non des interactions entre les protéines et d'autres macro et micronutriments. Les traitements thermiques en modifiant la structure des protéines, ont souvent un effet majeur sur leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles. Ils peuvent, par exemple, accroître la susceptibilité à l'hydrolyse de protéines globulaires en rendant plus accessibles les sites de coupure par les protéases digestives (Montoya *et al.*, 2006). À l'inverse, des traitements thermiques trop drastiques peuvent nuire à la digestibilité de certains acides aminés (Sarwar *et al.*, 2012).

I.2.3. Propriétés technofonctionnelles

Les propriétés physiques et chimiques pouvant influencer le comportement des protéines dans les systèmes alimentaires lors du traitement, du stockage, de la préparation et de la consommation sont appelés des propriétés techno-fonctionnelles (Kinsella et Melachouris, 1976). Généralement, ces propriétés sont influencées par la structure des protéines qui détermine les interactions inter et intramoléculaires (Gülseren *et al.*, 2014). Les propriétés fonctionnelles des protéines leur permettent une utilisation avantageuse en technologie alimentaire à des fins d'émulsification, de gélification, d'absorption et de rétention des graisses et de l'eau, de formation de film et d'augmentation de la viscosité des aliments...etc. Ainsi, les protéines d'origine végétale ont très souvent un rôle technofonctionnel essentiel pour conférer à un aliment sa texture et ses caractéristiques organoleptiques.

I.2.3.1. Propriétés physicochimiques

Les protéines sont des polymères d'acides aminés pouvant être liées à des groupements de nature non protéique. En fonction de leur structure et de leur conformation tridimensionnelle, les protéines présentent diverses propriétés physico-chimiques dont la taille, la charge, la solubilité, et l'adsorptivité. Celles-ci déterminent les différents procédés utilisés pour leur séparation différentielle dans divers aliments.

La taille est fonction de la masse moléculaire et surtout du rayon moyen de la protéine. Celle-ci pourra ainsi être globulaire et traverser plus aisément les pores d'une membrane semi-perméable qu'une protéine fibreuse de même masse moléculaire. La charge caractérise le degré d'ionisation des résidus d'acides aminés, elle est fonction des caractéristiques du milieu environnant les protéines. Les protéines auront ainsi, en fonction du pH, une charge globale positive, négative, ou nulle. L'adsorptivité d'une protéine désigne sa capacité à se fixer sur une substance solide apolaire, elle dépend du groupement R des acides aminés constitutifs des protéines (Weil, 1990). Les chaînes latérales chargées établissent des liaisons ioniques inter ou intra chaînes ou avec des molécules d'eau en solution. La nature polaire ou apolaire des chaînes latérales confère à la protéine un caractère hydrophobe ou hydrophile. Ainsi les régions hydrophiles de la protéine établissent des liaisons hydrogènes avec l'eau ou les composés polaires, pendant que les régions hydrophobes interagissent avec les composés apolaires par des liaisons hydrophobes. L'hydrophobicité d'une protéine influence son aptitude à s'adsorber aux interfaces huile/eau ou air/eau en un film continu, et abaisse la tension interfaciale. La charge et la polarité d'une protéine déterminent sa solubilité, sa diffusion et sa dispersion dans l'eau et dans les solvants organiques (Cheftel *et al.*, 1985).

La solubilité d'une protéine est fonction de divers facteurs tels que le pH, la force ionique, la constante diélectrique ou la température. La solubilité d'une protéine est minimale au pH isoélectrique (pHi), on précipitera ainsi différentiellement les protéines en fonction de leur pHi. Les sels neutres, en fonction de leur concentration peuvent avoir un effet dissolvant ou précipitant (relargage). La diminution de la constante diélectrique du milieu, par ajout d'alcool par exemple, augmente les interactions électrostatiques des charges et diminue la solubilité des protéines. La température quant à elle dénature les protéines qui précipitent en fonction des conditions du milieu.

Les molécules d'eau fixées par électrostriction à la surface des protéines par l'intermédiaire de chaînes latérales chargées accroissent le volume de la protéine. Ces caractéristiques intrinsèques influencent le diamètre apparent des protéines et affectent la viscosité de la solution. De plus, les interactions protéines-protéines peuvent favoriser la formation de complexes de grande taille souvent insolubles dans l'eau, de films protéiques ou une agrégation en un réseau ordonné. Les protéines globulaires capables d'association/dissociation présentent de meilleures propriétés agrégatives et filmogènes (Kang *et al.*, 1985).

La disposition dans l'espace des chaînes latérales des résidus d'acides aminés de protéines affecte leur interaction avec les molécules d'eau en solution. Les protéines globulaires, solubles dans l'eau, présentent au contact des molécules d'eau, les chaînes latérales hydrophiles, pendant que les chaînes latérales hydrophobes restent enfouies dans la molécule. Les protéines dépliées seront entièrement au contact du milieu environnant, et pourront en fonction de leur nature hydrophile ou hydrophobe être plus ou moins bien solubilisées dans l'eau, ou diffuser vers les interfaces air/eau ou huile/eau et s'y adsorber en abaissant la tension interfaciale.

1.2.3.2. Propriétés fonctionnelles

Les protéines des graines de légumineuses présentent un ensemble de propriétés fonctionnelles à savoir : texturantes, gélifiantes, émulsifiantes et moussantes utilisées dans l'industrie alimentaire, adhésives et filmogènes pour l'industrie des matériaux et cosmétique. Ces propriétés fonctionnelles sont fonction de la structure et des propriétés physico-chimiques des protéines, dépendantes de l'origine botanique et de la fonction physiologique (Guéguen *et al.*, 2016).

Les propriétés fonctionnelles des protéines de légumineuses sont classées en trois groupes principaux : les propriétés dépendantes d'interaction protéine-eau, protéine-protéine et les propriétés de surface. Ces groupes de propriétés ne sont pas entièrement indépendants, il

existe des propriétés faisant par exemple intervenir les interactions protéine-eau et protéine-protéine.

- **Propriétés d'hydratation**

Elles regroupent les relations de la protéine avec l'eau. Cela recouvre les propriétés d'absorption, de rétention, de mouillabilité, de gonflement, d'adhérence, de dispersion, de viscosité. Ces propriétés sont très dépendantes de la solubilité ou de l'insolubilité de la protéine. Les interactions protéine-protéine favorisent la formation d'agrégats qui peuvent accroître la viscosité d'une protéine, ou rendre les protéines insolubles avec une augmentation de l'absorption d'eau. Une bonne solubilité initiale de la protéine permet une dispersion rapide et complète des molécules ou particules protéiques, qui peut influencer sur la formation des mousses des gels ou faciliter la diffusion de la protéine vers les interfaces air/eau ou huile/eau, en améliorant ainsi son activité de surface (Cheftel *et al.*, 1985).

- **Propriétés de surfaces**

Elles regroupent les propriétés d'interaction des protéines avec d'autres structures polaires ou apolaires en phase liquide ou gazeuse. Cela recouvre les propriétés émulsifiantes et moussantes.

- ✓ **Les émulsions**

Une émulsion est un mélange macroscopiquement homogène mais microscopiquement hétérogène de deux substances liquides non miscibles (qui ne se mélangent normalement pas) comme l'eau et l'huile, l'une sous forme de petites gouttelettes dispersées, l'autre sous forme de phase continue dispersante. Une émulsion possède un aspect macroscopique homogène alors que sa structure microscopique est hétérogène (Leal-Calderon *et al.*, 2007).

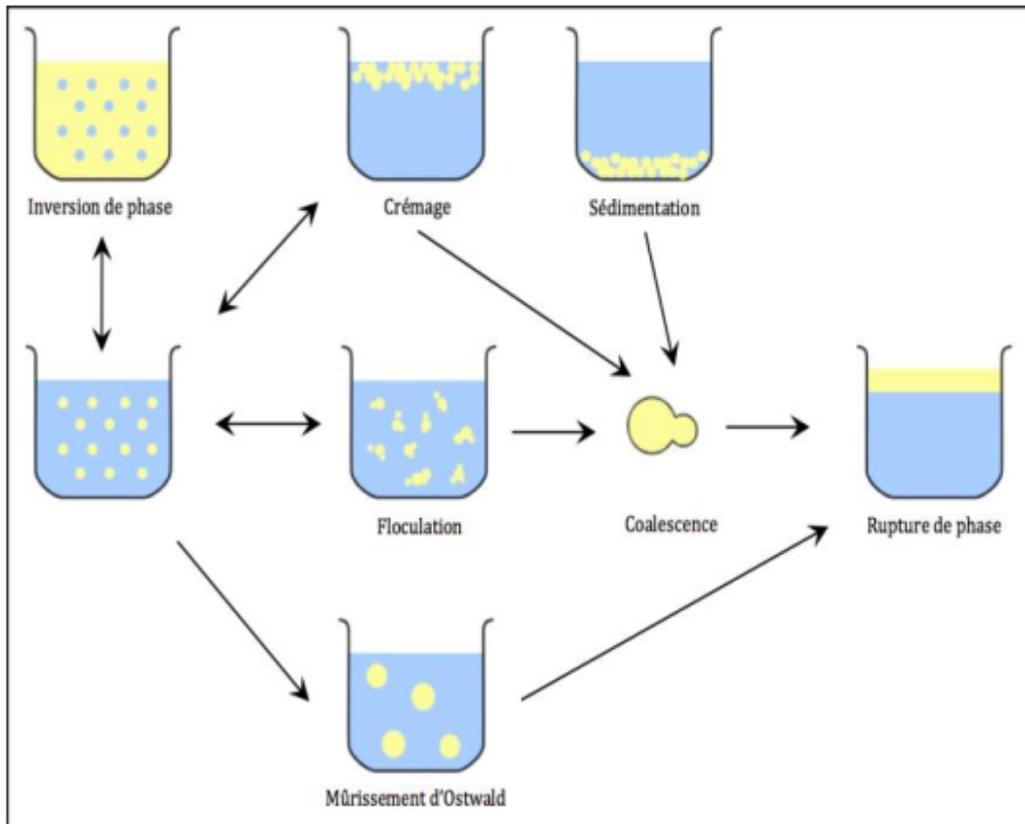
On différencie deux types d'émulsions selon la répartition des différentes phases employées. Une émulsion est dite directe (notée Huile dans Eau) lorsque la phase dispersante est hydrophile et que la phase dispersée est lipophile, alors qu'une émulsion inverse (notée Eau dans Huile) se caractérise par une phase dispersante lipophile et une phase dispersée hydrophile (Leal-Calderon *et al.*, 2007). Lorsque l'émulsion est composée uniquement de deux phases, on la qualifie de "simple". À l'inverse, si le mélange se présente sous plus de deux phases imbriquées les unes dans les autres, le système est désigné comme "multiple" ou est appelée "émulsion d'émulsion". Celle-ci se caractérise par une première émulsion dans laquelle est présente des gouttelettes composées elles même d'une émulsion (Leal-Calderon *et al.*, 2007).

- **Caractéristiques et stabilité des émulsions**

On distingue trois grandes catégories d'émulsion selon la dimension des gouttelettes présentes dans la phase dispersée. En les classant dans l'ordre croissant de taille, on trouve les micro-émulsions, nano-émulsions, et macro-émulsions (Leal-Calderon *et al.*, 2007).

Pour ce qui est de la stabilisation des émulsions, On peut alors dénombrer plusieurs types de phénomènes :

- Des phénomènes conduisant à une augmentation de taille des gouttelettes : **coalescence et mûrissement d'Ostwald** ;
- Des phénomènes liés à la migration des gouttelettes : **crémage et floculation** ;
- Inversion de phase (Leal-Calderon *et al.*, 2007).



✓ Les mousses

Une mousse est définie comme étant une dispersion de bulles de gaz dans une phase continue (liquide, semi-solide ou solide) contenant un surfactant (molécule tensioactive ou structure amphipolaire) soluble. Pour pouvoir former les émulsions et des mousses, les protéines doivent être au contact de l'interface huile/eau ou air/eau, doivent être déplissées, doivent se concentrer et s'étaler rapidement pour abaisser la tension interfaciale.

Avoir des mousses et des émulsions stables nécessite que les protéines puissent former un film épais, cohésif, élastique, continu et imperméable autour de la gouttelette d'huile ou des bulles de gaz. Ainsi, la formation des émulsions et des mousses requiert que les protéines puissent rapidement diffuser vers les interfaces, s'étaler donc être flexibles et pauvres en structures secondaires. Etablir des interactions avec les gouttelettes d'huile et s'associer à l'interface

nécessite que les protéines aient une hydrophobicité élevée, et une bonne séparation sur la molécule entre zones hydrophiles et hydrophobes (Cheftel *et al.*, 1985).

- **Propriétés dépendantes des interactions protéines-protéines**

Les propriétés de structuration regroupent les propriétés d'interaction protéine-protéine. Ces propriétés interviennent lors des phénomènes tels que la gélification ou la texturation.

La gélification est un phénomène qui implique une dénaturation des protéines suivie de leur agrégation pour former un réseau protéique ordonné. Un traitement thermique est indispensable à la gélification, même si l'alcalinisation suivie d'un retour à la neutralité est suffisante pour la gélification des protéines de soja (Hermansson, 1979). Les globulines 11S et 7S des graines des légumineuses, capables de se dissocier et de s'associer par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et d'échanges SH-SS sont les protéines les plus déterminantes dans les phénomènes de gélification ; les globulines 7S étant meilleures que les globulines 11S (Catsimpoilas et Meyer, 1970). Les protéines constituent la base de la structure et de la texture de plusieurs aliments, le plus souvent fabriqués comme la mie du pain ou les gels de soja. Il existe aussi des procédés de texturation qui à partir des protéines solubles conduisent à des structures fibreuses ou ne forment pas de film, possédant une bonne capacité de rétention d'eau et pouvant garder ces propriétés au cours du chauffage. Des films protéiques ont pu être obtenus par coagulation thermique du lait de soja au Japon. La texturation des protéines sous forme de granules ou de morceaux secs, fibreux et poreux est réalisée par extrusion thermoplastique utilisant des températures et pressions élevées, de même que d'intenses forces de cisaillement. C'est le procédé le plus utilisé actuellement. Généralement la texturation conduit à des produits masticables, qui sont utilisés pour remplacer ou diluer les viandes. Les interactions hydrophobes et les échanges SH-SS sont très impliqués dans les phénomènes de texturation, le déplissement de la protéine étant indispensable (Guéguen & Lemarié, 1996).

I.2.3. Utilisation des protéines comme ingrédient alimentaire

L'utilisation des protéines végétales dans la formulation alimentaire est de plus en plus augmentée dans de nombreux pays développés en raison de leurs propriétés fonctionnelles prometteuses et du coût élevé des protéines d'origine animale (Ghribi *et al.*, 2015). Par conséquent, ce sont les besoins de formulation qui ont créé une demande accrue pour des ingrédients fonctionnels capables de générer et de stabiliser des aliments de composition complexe et multiphasiques (Guéguen *et al.*, 2016). Les protéines végétales présentent un intérêt multiple en permettant l'obtention d'une qualité nutritive des aliments grâce à leurs acides aminés et en agissant comme ingrédients fonctionnels lors de leurs incorporations dans

diverses formulations (Guéguen *et al.*, 2016). Les protéines agissent comme ingrédients fonctionnels pour mieux maîtriser le procédé de formulation, la texture et/ou la stabilité physique de l'aliment (Guéguen *et al.*, 2016). Ainsi, elles contribuent à des propriétés telles que l'aptitude au fouettage, l'émulsification, le moussage, la rétention d'eau, la gélification, etc. De plus, elles conservent, voire améliorent, les caractères sensoriels des aliments en contribuant à l'aromatisation, vu leur aptitude d'interagir avec les composés aromatiques, et au brunissement des aliments (Aluko, 2018).

Les fonctionnalités d'une protéine peuvent être influencées par plusieurs et différents facteurs extrinsèque ou intrinsèque (température, pH, composition en acides aminés, structure, etc.) aussi bien que par le processus de traitement (broyage, ultrasons, etc.) (Aluko, 2018) d'où la nécessité de bien étudier la protéine et le système alimentaire qui servira comme une matrice d'incorporation.

Les protéines végétales peuvent être utilisées dans plusieurs filières de l'agroalimentaire dont les plus connues le secteur des produits carnés et celui des produits laitiers. Vu le coût croissant des sources de protéines traditionnelles, les industriels utilisent des protéines de soja dans les produits laitiers. Il s'est avéré que des isolats protéiques de soja ont pu remplacer le lait écrémé en poudre dans la fabrication du yaourt et ont mené à une augmentation de la viscosité et de la force du gel à un niveau supérieur à celui du lait écrémé en poudre et du caséinate de sodium. A l'avenir, les innovations technologiques pourraient faire évoluer cette situation comme l'illustre l'exemple du « tofu » ou de « l'escalope végétale » qui ont des teneurs proches de celle des aliments d'origine animale. Ainsi, le développement de matières protéiques végétales à haute valeur ajoutée est un réel enjeu pour diversifier les aliments à teneur élevée en protéines végétales (Guéguen *et al.*, 2016).

I.3. Les matières protéiques végétales (MPV)

I.3.1. Les farines

La préparation des farines constitue l'étape initiale pour la préparation des concentrats protéiques. Les farines sont utilisées pour confectionner une bouillie dure, des huiles, des gâteaux et pour la formulation d'aliments de compléments pour les jeunes enfants.

I.3.2. Les concentrats protéiques

Selon les normes *codex alimentarius* (codex Stan 174-1989), les concentrats protéiques sont des produits alimentaires ayant une teneur en protéines comprise entre 65 et 90 %. Ils sont préparés surtout à partir des graines de légumineuses plus précisément de soja, le niébé, le voandzou. Il s'agit d'éliminer ou de réduire toute substance non protéique dans la farine afin de

concentrer des protéines. Il existe trois méthodes de préparation des concentrats protéiques : méthode par lavage acide, dénaturation à la chaleur et lavage avec une solution aqueuse alcoolique (Mune Mune *et al.*, 2008).

I.3.3. Les isolats protéiques

Selon les normes du codex alimentarius (codex Stan 174-1989), les isolats protéiques sont des produits alimentaires ayant une teneur en protéines supérieure ou égale à 90 %. Leur production se fait à partir des graines riches en protéines telles que le soja, les lentilles etc. Les graines sont d'abord transformées en farine délipidée ou non selon la teneur de la graine en lipides. Selon Cuq (2006), les étapes de la préparation des isolats protéiques sont :

- **Extraction des protéines** : elle consiste à mélanger la farine avec un milieu d'extraction constitué d'un agent alcalin (hydroxyde de sodium) dilué. Dans ces conditions, la majorité des protéines se solubilisent ainsi des sucres et d'autres substances. Le pH de la solution doit être compris entre 7,5 et 9,0.
- **Séparation solide-liquide après extraction** : il s'agit d'éliminer les particules insolubles (fragments de graines et les déchets).
- **Précipitation des protéines** : elle se fait par chauffage à environ 80 °C ou par précipitation au pH isoélectrique.
- **Traitement de l'extrait protéique**: il a pour but d'éliminer certaines impuretés telles que les phytates (par chromatographie d'échange d'ions). Les substances phénoliques (en utilisant le carbone activé) et les composés de faibles poids moléculaire (par ultrafiltration ou par centrifugation).
- **Séparation et lavage des extraits protéiques** : les protéines précipitées sont séparées du surnageant par filtration ou par centrifugation. Le précipité est par la suite lavé (re-suspension dans l'eau et ré-centrifugation) pour éliminer certaines impuretés.
- **Le séchage** : il se fait à l'étuve pour éliminer l'eau.

I.3.4. Les procédés d'extraction des protéines

D'après Lorient Denis (1987), il existe trois principales méthodes d'extraction de ces composés de manière sélective, sans solubiliser la fraction protéique majeure. Et chaque méthode produit un type de concentrat particulier, avec des caractéristiques distinctes et des utilisations spécifiques. Ces méthodes sont connues comme :

- Le procédé de lavage avec une solution hydroalcoolique ;
- Le procédé de lavage à l'acide ;
- Le procédé de dénaturation à la chaleur /lavage à l'eau.

Les composés solubles sont d'abord les glucides (mono ; di- et oligosaccharides), les composés azotés de faible poids moléculaire, et les minéraux. Leur élimination s'effectue suivant la "théorie d'extraction par le solvant" en 3 points à savoir : la diffusion du solvant dans la farine, la dissolution des composés, et leur passage dans la phase liquide. La diminution de l'indice de solubilité des protéines est due à leur dénaturation par la variation de pH, l'alcool ou la chaleur. Les concentrats provenant d'un lavage à l'alcool conservent la plupart de leurs propriétés fonctionnelles, et souvent les oligosaccharides qui causent la flatulence sont enlevés par les différents solvants.

I.3.4.1. Procédé de lavage avec une solution hydro-alcoolique

Le procédé est basé sur l'habilité de solutions aqueuses d'alcools faiblement aliphatiques (méthanol, éthanol, isopropanol) d'extraire la fraction de sucres solubles de farines sans solubiliser les protéines. La concentration optimale de l'alcool dans ce procédé est de 60%. Le matériel de départ est constitué de farines entières ou délipidées, et le procédé consiste en plusieurs étapes :

- ✓ **Extraction solide-liquide** : elle peut être effectuée continuellement (des préparations à grande échelle, dans des unités qui ont des capacités de plus de 5000 tonnes/an) ou entièrement. La farine blanche permet d'extraire plus de sucres que la farine grillée, car le grillage rends les sucres moins solubles par liaison aux protéines (réaction de maillard) ou par caramélisation. Le résultat de ces réactions de condensations est que les sucres ne sont plus extractibles par le solvant, ils demeurent dans le produit baissant ainsi sa concentration en protéines.
- ✓ **Enlèvement et récupération du solvant de l'extrait liquide** : l'alcool est enlevé de l'extrait liquide par évaporation et distillation, puis est ramené à la bonne concentration.
- ✓ **Desolvatisation du solide** : effectué après l'extraction en utilisant les vapeurs surchauffées d'un mélange hydroalcoolique qui est appliqué au concentrat. Tout excès d'eau est enlevé par séchage avec de l'air chaud.
- ✓ **Moudrage** : le concentrat obtenu est rendu en poudre.

I.3.4.2. Procédé de lavage à l'acide

Le procédé est basé sur la dépendance de la solubilité des protéines au pH. Une solution aqueuse d'acide est additionnée à la farine de sorte à garder le pH dans la région isoélectrique. Il est ainsi possible d'extraire les sucres sans solubiliser la majorité des protéines. Ce procédé utilise un solvant non-flammable, non explosif, non toxique et moins cher : l'eau. Ceci est aussi un désavantage au procédé car la séparation du solide et du solvant est plus difficile et moins complète due au fait que les farines absorbent une quantité considérable d'eau et gonflent. La

procédure utilise un équipement capable d'effectuer l'extraction, d'extraire le solvant et sécher le concentrat. L'extrait liquide contient les sucres, les minéraux, la fraction de protéines solubles au pH isoélectrique utilisé.

I.3.4.3. Procédé de dénaturation à la chaleur / extraction à l'eau

Dans ce procédé, les protéines des farines utilisées sont d'abord rendues insolubles par dénaturation thermique utilisant la chaleur humide. La farine obtenue est traitée avec de l'eau chaude qui dissout les sucres. Le procédé utilise un équipement semblable à celui du lavage à l'acide.

I.3.5. Facteurs influençant l'extraction des protéines

Deux étapes sont déterminantes dans la préparation des matières protéiques végétales en milieux aqueux : la solubilisation et la précipitation des protéines (Cuq, 2006). Lors de ces procédures, plusieurs facteurs physicochimiques influencent la structure et leur solubilité notamment le pH, la température, la force ionique, les types de sels et de solvants (Ogunsina et al., 2010). Le choix de la combinaison est fonction de la rentabilité économique, du rendement et de la teneur en protéine maximale du concentrat protéique. De nombreuses études ont contribué à définir les intervalles à chacun de ces paramètres où l'extraction des protéines est optimale.

Le solvant utilisé lors de l'extraction des protéines est généralement l'eau car elle est moins chère et non toxique, en plus de ses propriétés d'extraction (Cuq, 2006). La présence de sel (force ionique) joue un rôle prépondérant, en effet, elle permet une meilleure solubilisation et une récupération efficace des protéines (Ogunsina et al., 2010). Les concentrations de NaCl (0,5 M), et de Na₂SO₃ (0,25 %) ont été utilisées avec succès dans l'extraction des protéines de plusieurs légumineuses (Ogunsina et al., 2010). En effet, les graines de légumineuses sont majoritairement constituées des fractions d'albumine et de globuline qui sont solubles dans les solutions de faible concentration en sel (Ogunsina et al., 2010 ; Mune Mune et al., 2008). Ainsi, pour limiter l'oxydation des protéines, lesquelles peuvent interagir avec les lipides et affecter les propriétés fonctionnelles l'extraction peut s'effectuer avec le Na₂SO₃ (Lqari et al., 2002). La force ionique a un effet sur l'intensité des interactions électrostatiques entre les chaînes protéiques dénaturées, sur l'absorption de l'eau, le gonflement et la solubilité des protéines. Le pH peut impacter sur la charge nette des protéines et modifier les forces d'attraction et de répulsion des protéines affectant ainsi les interactions protéines- protéines et protéines-solvant (Ogunsina et al., 2010). Les pH neutres ou basiques sont utilisés pour l'extraction des protéines de graines de légumineuses. Le pH 9,9 est optimal pour le *Vigna Subterranea (L) Verde* (Mune

Mune *et al.*, 2008), pendant que le pH 12 est optimal pour *Psophocarpus tetragonolobus* (Bello et Okezie, 1989). Les particules de tailles inférieures à 500 µm sont plus efficaces pour l'extraction des protéines de *Rosa Rubiginosa*, que celle des particules de taille comprises entre 500µm et 1000µm. Les rapports solide /liquide compris entre 1/10 et 1/20 sont utilisées pour l'extraction de diverses légumineuses (Mune Mune *et al.*, 2008 ; Moure *et al.*, 2001). En outre plusieurs solvants sont utilisés dans le recouvrement des protéines. Chavan *et al.* (2001) ont éliminé près de 70 % de composés non protéiques du concentrat de *Lathyrus Maritimus L.* avec des lavages à l'éthanol et à l'acétone.

I.3.6. Utilisation des matières protéiques végétales en industrie agroalimentaire

Les concentrats et les isolats protéiques des légumineuses ont une bonne qualité nutritionnelle, mais pauvres en acides aminés soufrés (Guéguen *et al.*, 2016). Ainsi, il est conseillé de les associer avec d'autres sources de protéines telles que les céréales qui sont riches en acides aminés soufrés (Guéguen *et al.*, 2016). L'utilisation des concentrats et des isolats protéiques est diversifiée. Ils entrent dans la formulation de plusieurs produits de consommation courante :

- Les MPV peuvent être utilisées afin d'améliorer l'apport protéique des populations en augmentant la teneur en protéines assimilables dans le régime alimentaire. À cet effet, on augmente la teneur en protéines du régime ou la qualité protéique des protéines du régime, ou les deux. On doit noter qu'augmenter la quantité et/ou la qualité des protéines d'un régime alimentaire n'aura pas d'efficacité si les besoins énergétiques ne sont pas satisfaits (Guéguen *et al.*, 2016).
- Pour atteindre un degré de complémentation appréciable dans la qualité protéique des régimes pauvres en lysine ou en méthionine+ cystéine ou en tryptophane, la protéine de complémentation devrait contenir respectivement au moins 5,8 % de lysine assimilable ou 2,5 % de méthionine+cystéine assimilable ou 1,1 % de tryptophane assimilable (Guéguen *et al.*, 2016).

Plusieurs MPV étant disponibles à cette fin, le choix des MPV devrait se porter sur des produits qui ont été transformés de façon à optimiser à la fois la contribution nutritionnelle et la rentabilité économique (Guéguen *et al.*, 2016).

I.4. Procédés de modification des protéines

Selon Akharume *et al.* (2021), les protéines peuvent être modifiées par trois principales approches :

- ✓ L'approche physique qui inclue les traitements thermiques, la cuisson-extrusion et des technologies dites émergentes parmi lesquelles on peut citer les ultrasons, les hautes pressions hydrostatiques, les micro-ondes, le chauffage ohmique, la lumière pulsée, les traitements électriques à hauts voltages (TEHV) ;
- ✓ L'approche chimique telle que la glycosylation, l'acylation-succinylation, la désamination et la phosphorylation ;
- ✓ L'approche enzymatique par hydrolyse enzymatique, fermentation ou réticulation enzymatique.

I.4.1. L'approche physiques de modification des protéines

Les approches de modification des protéines qui impliquent l'application de certaines forces pour changer la structure des protéines, qu'elles soient isolées ou intégrées à une matrice alimentaire, peuvent être classées comme des méthodes physiques. En général, ces techniques conduisent à une réduction et à une redistribution de la taille des protéines, à leur dépliage, à leur désagrégation ou à une dénaturation permanente de leur conformation (Akharume *et al.*, 2021).

➤ Traitements thermiques

Le traitement thermique est l'une des techniques de transformation largement utilisées pour modifier les aliments protéinés (Sharif *et al.*, 2018). L'énergie thermique est la principale contrainte de traitement dans la cuisson, le rôtissage, le séchage et l'extrusion à haute température. En résumé, le traitement thermique provoque une mobilité thermique des chaînes peptidiques qui pourrait conduire à une rupture des interactions hydrophobes inter et intramoléculaires en plus des liaisons électrostatiques, hydrogènes et disulfures lorsqu'il est effectué à une température supérieure à la dénaturation de la protéine ; ainsi, il y a un dépliage initial réversible mais ensuite le dépliage devient permanent surtout à des températures plus élevées. Cette dénaturation permanente s'accompagne de la perte des structures secondaires et tertiaires des molécules de protéines (Zink *et al.*, 2016 ; Sun-Waterhouse *et al.*, 2014). Habituellement, lorsque cela se produit, le core hydrophobe de la protéine est exposé et il y a une nouvelle augmentation de la réticulation via les interactions hydrophobes, hydrogènes et les liaisons disulfures/sulphydryles (Zink *et al.*, 2016 ; Mession *et al.*, 2015). Par conséquent, l'application contrôlée de la chaleur pourrait être utilisée pour modifier la structure des ingrédients protéiques alimentaires et par conséquent pour améliorer certaines propriétés fonctionnelles (Peng *et al.*, 2016 ; Sun-Waterhouse *et al.*, 2014). Ces fonctionnalités dépendent

d'une combinaison judicieuse de la température de chauffage, de la vitesse de chauffage, de la concentration ionique et du pH de la solution protéique (Zink *et al.*, 2016). Il a été bien rapporté que le traitement thermique de certaines protéines végétales peut améliorer leur gélification protéique (Sun & Arntfield, 2011), leurs propriétés émulsifiantes (Peng *et al.*, 2016), et leur digestibilité (Rehman et Shah, 2005) ; mais pas leur solubilité protéique (Sun Waterhouse *et al.*, 2014 ; Nowak-Wegrzyn et Fiocchi, 2009 ; Mondoulet *et al.*, 2005 ; Davis *et al.*, 2001).

➤ **Cuisson - extrusion**

La cuisson par extrusion est un procédé thermomécanique qui combine une chaleur élevée, un cisaillement élevé et une pression élevée pour provoquer la cuisson, la stérilisation, le séchage, la fusion, le transport, le pétrissage, le soufflage, la texturation et le formage du produit alimentaire (Chen *et al.*, 2011). Dans l'application des protéines, la cuisson par extrusion est particulièrement appliquée pour texturer les protéines d'origine végétale (SPI, gluten de blé et PPI) connues sous le nom de protéines végétales texturées (TVP) pour être utilisées comme analogues de la viande (Chiang *et al.*, 2019). Les conditions d'extrusion de courte durée et de haute intensité ont un impact sur la fonctionnalité des protéines végétales telles que la solubilité, la texture, l'émulsion et les propriétés de gélification. La plupart des protéines végétales sont extrudées (double vis) à une température de cuisson (zone avant la filière) comprise entre 130 et 170°C, une plage de teneur en humidité moyenne à élevée de 30 à 70 % (base humide) et une vitesse de vis de 150 à 160 tr/min (Chiang *et al.*, 2019 ; Chen, Wei, & Zhang, 2011). Une filière de refroidissement est utilisée dans l'extrusion de protéines pour éviter l'expansion de l'extrudat après la cuisson (Samard, Gu, & Ryu, 2019 ; Chen *et al.*, 2011). Une extrusion à forte teneur en humidité (50 à 80 %) est préférable pour produire des TVP présentant des caractéristiques semblables à celles de la viande, tandis qu'une extrusion à faible teneur en humidité (<30 %) entraînerait une protéine plus dure et moins soluble (Chen *et al.*, 2011). Au-delà de la teneur en eau, une combinaison de différents paramètres de processus tels que la force de cisaillement, l'énergie mécanique, la température du baril, la vitesse de la vis et le taux d'alimentation peut avoir un impact sur la qualité des protéines végétales texturées produites principalement par extrusion. Les fusions fibreuses sont généralement produites à une température de 140 à 180°C et à une teneur en humidité de 60 à 80 %, mais pas à une température inférieure à 130°C (Cheftel *et al.*, 2009). Cependant, la structure fibreuse se dérègle à l'extrémité de la filière et il faudra utiliser une filière de refroidissement pour maintenir la température de la filière en dessous de 100°C et 75°C pour l'extrusion à faible et forte teneur en humidité, respectivement (Zhang *et al.*, 2019).

I.4.2. Techniques chimiques de modification des protéines

Les modifications chimiques sont obtenues à partir de réactions des protéines avec des agents chimiques dans lesquelles il y a rupture ou formation de nouvelles liaisons qui altèrent l'intégrité des structures protéiques d'origine (Cuq, 2006). Habituellement, cette approche exploite la réactivité des chaînes latérales des protéines (telles que les chaînes amino, carboxyle, disulfure/sulphydryle, imidazole, indole, phénolique et thioester) dans une réaction chimique pour moduler les propriétés biophysiques et la fonctionnalité des protéines (Cuq, 2006). L'objectif est de changer la charge nette de la protéine en substituant le groupe ϵ -amino ou d'autres groupes amino et hydroxyle de certains résidus d'acides aminés (Panyam et Kilara, 1996). Les protéines modifiées chimiquement auraient montré une meilleure fonctionnalité par rapport aux molécules natives. Cependant, la commercialisation des techniques de modification chimique est limitée par la production de sous-produits chimiques toxiques, le coût, les consommateurs et les préoccupations réglementaires (Zhang *et al.*, 2018 ; Sun-Waterhouse *et al.*, 2014) et ainsi, la modification chimique est une technique de modification moins favorisée dans l'industrie alimentaire, d'autant plus que les tendances sont aux produits clean label.

- **Acylation et succinylation**

L'acylation est une technique de dérivation chimique, qui a été largement appliquée pour modifier les propriétés fonctionnelles des protéines végétales et la réaction implique le transfert d'un groupe acyle aux groupes amino ou hydroxyle des résidus d'acides aminés (Aryee *et al.*, 2018). L'acylation des protéines est exprimée avec une nomenclature différente selon l'agent acylant et le groupe amino/hydroxyle auquel l'agent acylant est attaché. L'acylation qui implique le transfert du groupe succinyle, généralement de l'anhydride succinique, au résidu lysine (groupe ϵ -amino) de la protéine est considérée comme une succinylation (Qazi *et al.*, 2019). Lorsque le groupe acétyle (généralement issu de l'anhydride acétique) est attaché aux résidus de la protéine, le processus est alors décrit comme une "acétylation", tandis que l'utilisation de l'anhydride maléique est appelée "maléylation" (Das Purkayastha *et al.*, 2016). L'acylation des acides gras, qui implique la fixation d'acylCoA dérivés d'acides gras à chaîne courte, moyenne et longue de manière covalente aux résidus de protéines, tire également son nom de processus de l'acide gras utilisé. Par exemple, la "palmitoylation" fait référence à la fixation de l'acide palmitique (C16:0) au résidu cystéine des protéines (Rioux, 2016).

- **Désamination**

La désamination chimique, différente de la désamination enzymatique, fait référence à la réaction des protéines avec un acide/alcalin fort ou doux à une température élevée,

accompagnée d'une perte de molécule d'ammoniac (Hamada et Swanson, 1994). En général, la désamidation implique la conversion des groupes amides δ - (asparagine) ou γ - (glutamine) en groupes carboxyliques (acides α - et γ -aspartique et glutamique) avec la libération d'ammoniac (Li *et al.*, 2010). Le taux de désamidation est influencé par la température, le pH, l'activité de l'eau, la séquence d'acides aminés et la présence d'un catalyseur non ionique (Li *et al.*, 2010). Le degré de désamidation est mesuré par le rapport entre l'ammoniac libéré pendant les réactions de désamidation et l'amide total de la protéine (Cabra *et al.*, 2007 ; Hamada et Swanson, 1994). Une désamination alcaline ou acide douce (diluée) est généralement préférée car la dénaturation des protéines et l'hydrolyse élevée des peptides sont associées à une forte désamidation alcaline/acide et surtout à cause de la difficulté de commercialisation (Hamada et Swanson, 1994).

I.4.3. Techniques biologiques/enzymatiques de modification des protéines

L'application contrôlée d'enzymes protéolytiques et non protéolytiques pour modifier les propriétés structurales d'une protéine constitue les techniques de modification enzymatique. En fonction de la fonctionnalité recherchée, la modification enzymatique peut être appliquée pour décomposer ou construire la structure d'une protéine afin d'obtenir la fonctionnalité souhaitée (Cuq, 2006). Les enzymes protéolytiques (telles que la pepsine, la papaïne, la trypsine et l'alcalase) sont utilisées pour cliver les liaisons peptidiques dans la séquence d'acides aminés primaires de la protéine afin de modifier la fonctionnalité (Buchert *et al.*, 2010). Les enzymes non protéolytiques (telles que les transglutaminases [TG]) quant à elles sont utilisées dans la modification enzymatique de la protéine via la réticulation de la protéine pour construire la structure de la protéine et augmenter les propriétés texturales (Buchert *et al.*, 2010). Les enzymes clivent ou agissent sur la protéine à des sites spécifiques. Par exemple, la trypsine clive les résidus basiques comme la lysine et l'arginine ; la chymotrypsine clive les résidus aromatiques comme la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, tandis que la TG microbienne réticule la protéine sur ses résidus de glutamine et de lysine (Akharume *et al.*, 2019 ; Gaspar et de Góes-Favoni, 2015 ; Ma *et al.*, 2005). Généralement, la modification enzymatique est préférée à la modification chimique en raison du temps de réaction rapide, de la spécificité des enzymes et des conditions de réaction douces (Buchert *et al.*, 2010).

➤ Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des protéines implique une réaction catalytique entre les enzymes protéolytiques et les substrats protéiques qui conduit au clivage des liaisons peptidiques et à la scission du substrat en peptides à chaîne courte et en acides aminés de plus

faible poids moléculaire (Eckert *et al.*, 2019 ; Bučko *et al.*, 2016). Le processus d'hydrolyse enzymatique est mieux réalisé au pH optimal et la température de l'enzyme d'essai et du substrat doit être surveillée/contrôlée pour le pH et la température afin d'obtenir les résultats souhaités, c'est-à-dire une fonctionnalité ou un rendement amélioré. Par exemple, une réduction excessive du pH pendant l'hydrolyse qui pourrait inactiver l'enzyme pourrait être évitée en ajoutant la base appropriée pour ajuster le pH au niveau optimal (Aluko, 2018). Les différents facteurs qui influencent l'hydrolyse enzymatique des protéines comprennent le type d'enzyme, la nature du substrat protéique, le rapport volumique enzyme/substrat, les conditions du procédé (pH, température et pression) et la disponibilité/absence d'inhibiteurs protéolytiques (Ahmadifard *et al.*, 2016).

Après l'hydrolyse enzymatique, les propriétés structurales de la protéine sont modifiées et certaines particularités cachées, comme l'hydrophobicité enfouie, sont révélées (Eckert *et al.*, 2019). Il a été rapporté qu'une hydrolyse limitée (DH < 10%) peut améliorer la fonctionnalité de la protéine et éviter l'amertume associée à une hydrolyse étendue (Eckert *et al.*, 2019).

➤ Fermentation

La fermentation a traditionnellement été utilisée pour améliorer le profil nutritionnel, le profil sensoriel, les effets sur la santé et la durée de conservation des produits alimentaires en augmentant la biodisponibilité et la bioaccessibilité des composés bioactifs (isoflavones, vitamines B1 et B2, vitamines E et C) ainsi que la réduction des facteurs antinutritionnels indésirables (Xing *et al.*, 2020 ; Frias *et al.*, 2005 ; Granito *et al.*, 2002). Cependant, le regain d'intérêt pour la fermentation a été étendu au développement d'ingrédients protéiques végétaux améliorés et de produits protéiques à base de plantes. La fermentation a été appliquée pour réduire le goût d'acacia des isolats de protéines de pois/lupin (El Youssef *et al.*, 2020 ; Shi, 2020 ; Schindler *et al.*, 2011), augmenter la texture du fromage végétalien (tofu) (Li *et al.*, 2017), développer un yaourt végétalien avec une synergie réduite (Yazici *et al.*, 1997), et augmenter le profil nutritionnel du lait végétal (Tangyu *et al.*, 2019). La fermentation est une application contrôlée de microorganismes bénins pour provoquer la transformation d'une matière alimentaire en produits utiles en exploitant la croissance et le métabolisme de ces microorganismes (Shiferaw et Augustin, 2019). La plupart des micro-organismes utilisés pour la fermentation des aliments d'origine végétale sont différentes souches de bactéries lactiques, de levures, de champignons et de bacilles (Tangyu *et al.*, 2019 ; Prinyawiwatkul *et al.*, 1997). Généralement, il existe deux techniques de procédé pour la fermentation alimentaire : la fermentation à l'état solide (SSF) et la fermentation submergée (SMF). Dans l'état solide, la

fermentation est réalisée en l'absence ou en quantité limitée d'eau libre, ce qui permet de disposer de substrats concentrés pour les micro-organismes et de déchets bien gérés contrairement à la SMF qui est réalisée en présence d'un volume d'eau élevé (Singhania *et al.*, 2009).

L'application de la fermentation pour améliorer les ingrédients protéiques végétaux est principalement appliquée pour améliorer la farine protéinée à partir de laquelle des ingrédients supplémentaires tels que les concentrés et les isolats de protéines sont développés. D'autres applications de la fermentation aux protéines végétales sont destinées au développement de produits protéinés tels que le fromage végétal, le yaourt végétal, les laits et les boissons à base de plantes.

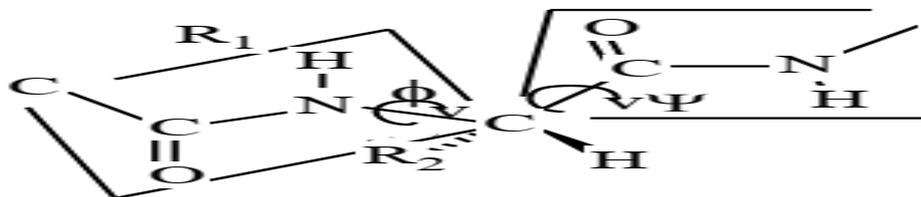
I.5. Analyse structurale des protéines

Les techniques d'extraction et de purification peuvent avoir un impact sur la qualité des protéines au niveau moléculaire et, par conséquent, réduire leur pouvoir biologique.

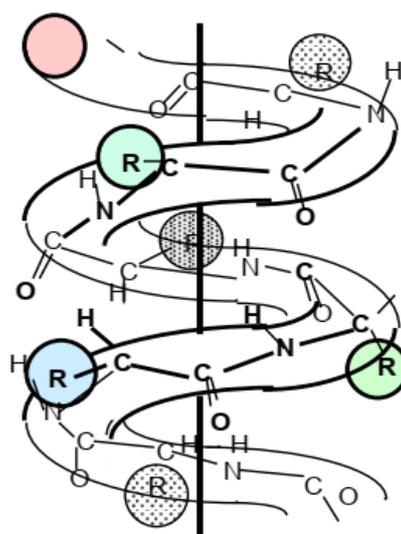
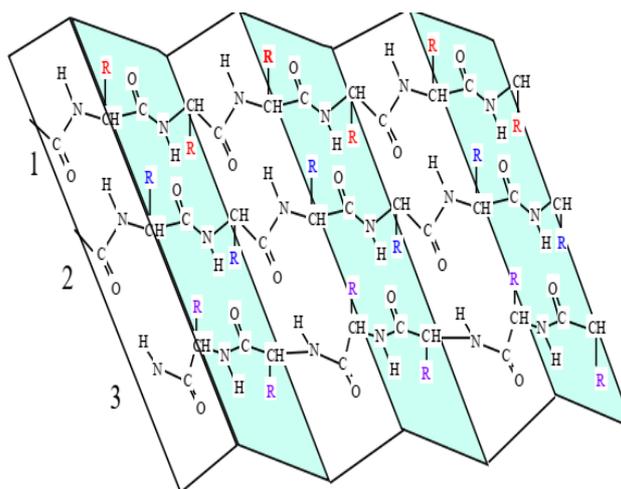
➤ Différents niveaux de structuration des protéines

D'après Cuq (2006), on identifie, chez les protéines, quatre niveaux structuraux : **primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire**.

La structure primaire correspond à la succession linéaire des acides aminés liés l'un à l'autre par une liaison dite « peptidique ».



La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale. Il en existe trois grandes catégories selon l'échafaudage des liaisons hydrogène, et ainsi, selon le repliement des liaisons peptidiques : il s'agit des hélices- α et feuillet β .

Hélice- α Feuillet β

La structure tertiaire est définie comme le repliement tridimensionnel de la protéine et dépend de la structure primaire. Normalement, les zones hydrophobes sont localisées au cœur de la protéine, tandis que les résidus hydrophiles sont en contact avec la phase aqueuse. La structure tridimensionnelle des protéines est intimement liée à sa fonction. Lorsque cette structure est détruite, voire simplement modifiée, la protéine est dénaturée et son activité disparaît.

La structure quaternaire est caractérisée par l'association d'au moins deux chaînes peptidiques, par des liaisons covalentes, des ponts hydrogène et/ou par des interactions hydrophobes et électrostatiques. Ce complexe peut être constitué de sous-unités équivalentes ou distinctes et former des dimères, trimères, tétramères etc. Parmi les protéines végétales, on distingue deux catégories : les homoprotéines, formées seulement par des acides aminés (albumines) et les hétéroprotéines, protéines fixées à des composés non protéiques appelés groupes prosthétiques (ovalbumine, caséine, lipoprotéines).

➤ Techniques d'analyse structurale

Il existe plusieurs techniques d'analyse structurale basées sur la capacité d'adsorption des acides aminés qui constituent les protéines. Les signaux obtenus sont spécifiques du repliement secondaire ou tertiaire.

La spectroscopie Infrarouge : Cette technique est basée sur les bandes d'absorption particulières que présentent les protéines en spectroscopie infrarouge (Surewicz *et al.*, 1993). De ces bandes, celle caractérisant la liaison amide I, entre et 1600 et 1700 cm^{-1} , est particulièrement sensible aux variations de la structure secondaire des protéines. En effet, la nature de la liaison hydrogène entre les groupements carbonyles ($\text{C}=\text{O}$) et amines ($\text{N}-\text{H}$) de la chaîne polypeptidique, détermine la géométrie du squelette polypeptidique, qui est elle aussi déterminée par la fréquence des bandes infrarouges (Surewicz *et al.*, 1993). Puisque la protéine

est habituellement constituée de différentes structures secondaires telles que l'hélice α , les feuillets β , le coude β et de structure irrégulières, la bande amide I est alors composite et constituée de plusieurs signaux superposées (Surewicz *et al.*, 1993).

Le dichroïsme circulaire (DC) : technique très reconnue pour la mesure des modifications structurales des protéines (Cuq, 2006). Cette méthode repose sur la capacité des chromophores chiraux (optiquement actifs), d'adsorber différemment la lumière circulairement polarisée à gauche et à droite (Cuq, 2006). Les avantages de cette technique sont la simplicité, la rapidité et les faibles quantités d'échantillon nécessaires pour chaque analyse. L'étude par DC dans le proche UV est souvent utilisée pour définir la structure tertiaire des protéines. Cependant, le signal est parfois trop faible pour donner des informations significatives. C'est pourquoi cette technique est associée à la fluorescence (Cuq, 2006).

La fluorescence : c'est une émission lumineuse générée suite à l'excitation d'une molécule (fluorophore) par absorption d'un photon (Cuq, 2006). Elle est suivie par l'émission spontanée de la même lumière. En effet, pendant un très court moment, la molécule qui adsorbe le photon, se trouve dans un état excité (singulet). Le retour à un état énergétique plus bas (état fondamental), va caractériser la fluorescence. La fluorescence des protéines est liée à l'absorbance des acides aminés aromatiques : tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Cependant, chez les protéines contenant les trois acides aminés, la fluorescence émise est souvent dominée par la seule contribution du tryptophane qui a une absorbance et un rendement d'émission plus importants que les deux autres résidus aromatiques (Cuq, 2006). La fluorescence est une technique largement utilisée pour l'étude de la structure tertiaire des protéines et en particulier pour l'analyse de leur processus de dénaturation (Cuq, 2006).

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) : c'est une technique qui a été très développée au cours des dernières années, pour l'étude de la stabilité thermique des protéines (Privalov, 1979). La stabilité d'une protéine peut être définie comme étant sa capacité à conserver la structure tridimensionnelle d'une chaîne polypeptidique dans des conditions extrêmes (température, pH, agents chimiques, etc.). La DSC fait partie des techniques permettant de déterminer la résistance de la structure des protéines à la température, tout en mettant en évidence leur processus de déstructuration (Cuq, 2006). L'analyse de la variation de la chaleur spécifique (C_p) fournit des informations sur l'état natif de la protéine et sur les états intermédiaires qui apparaissent au cours du processus de dénaturation par la température (Cuq, 2006).

I.6. Protéolyse et peptides bioactifs

I.5.1. Protéolyse

De par leurs multiples fonctions ou activités, les peptides intéressent particulièrement les industriels des secteurs de l'alimentaire, de la cosmétique ou de la pharmacie. En effet, dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés pour leurs propriétés nutritionnelles, sensorielles mais également fonctionnelles (Lemaire *et al.*, 2021). Jouant un rôle essentiel dans la qualité et la structure des aliments, le terme de « nutrifonctionnalité » est aujourd'hui employé pour caractériser de telles molécules (Daliri *et al.* 2018). Les secteurs de la cosmétique et de la pharmacie s'intéressent également aux peptides pour leurs activités biologiques ou physiologiques. Les peptides alimentaires présentent des activités biologiques spécifiques en plus de leur valeur nutritionnelle établie (Hernández-Álvarez *et al.*, 2013 ; Mine *et al.*, 2010). Les peptides bioactifs sont de petites séquences d'acides aminés dérivées des protéines alimentaires qui possèdent des propriétés physiologiques potentielles au-delà de leur nutrition normale et adéquate (Udenigwe et Aluko, 2012). Ces peptides sont inactifs lorsqu'ils se trouvent dans les protéines mères, mais une fois libérés, ils peuvent présenter diverses activités biologiques (López-Barrios *et al.*, 2014 ; Udenigwe et Aluko 2012). Par conséquent, une protéolyse est nécessaire pour libérer le peptide de la protéine mère. Cela peut se faire par digestion enzymatique de la protéine *in vivo* ou *in vitro*. La digestibilité protéique *in vitro* des protéines végétales détermine le niveau de digestion (hydrolyse) par la protéinase utilisée pour produire les peptides bioactifs (Marambe *et al.*, 2013). Par conséquent, pour une digestion réussie des protéines *in vitro*, les conditions externes telles que le pH, la température, le temps et la concentration doivent être prises en compte de manière majeure et adéquate (Moyano *et al.*, 2015). Un autre facteur à considérer est la spécificité des protéases digestives et de l'enzyme ciblée qui sont responsables de la pathogenèse des maladies chroniques. Cette spécificité (qu'il s'agisse d'une conformation ouverte ou repliée) détermine leur activité et leurs interactions avec les substrats (protéines végétales) et les peptides bioactifs (dans le cas des enzymes ciblant les maladies) de manière compétitive ou non compétitive. Ainsi, la digestion enzymatique des protéines implique la décomposition des longues chaînes polypeptidiques en chaînes plus courtes qui pourraient s'insérer dans le site actif spécifique des enzymes métaboliques liées à la maladie. Selon Agyei *et al.* (2018), il existe trois principales approches pour la préparation des peptides bioactifs :

- l'approche classique qui consiste à sélectionner une source de protéine puis effectuer les expérimentations ;
- l'approche bioinformatique qui consiste à rechercher et à choisir des peptides bioactifs d'intérêt dans des bases de données protéiques, procéder *in-silico* aux combinaisons avec les protéases puis d'effectuer des expérimentations ;
- l'approche intégrée qui met commun les deux premières approches.

Les peptides découverts peuvent être produits soit par synthèse chimique, soit par hydrolyse enzymatique ou chimique (Agyei *et al.*, 2018). Cependant, la synthèse chimique présente beaucoup de désavantages. Cette méthode est très coûteuse, entraîne des problèmes de racémisation des acides aminés et nécessite des produits réactionnels dangereux pour la santé et l'environnement d'où l'impossibilité de valoriser les peptides dans les produits de grade alimentaire (Agyei *et al.*, 2018). L'utilisation des enzymes permet un certain contrôle de la réaction d'hydrolyse et de ses produits d'hydrolyse (Marambe *et al.*, 2013). Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques, formant alors un mélange de peptides et d'acides aminés. La composition peptidique des mélanges varie selon la spécificité de la protéase utilisée et les conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse.

Selon les propriétés visées, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut être plus ou moins complète. Une hydrolyse poussée conduit à la génération de peptides solubles de petite taille moléculaire (peptides < 15 acides aminés et proportion en acides aminés libres ≥ 20 %). Elle permet l'obtention d'hydrolysats utilisables dans les formulations diététiques, dans les milieux de culture pour microorganismes ou possédant potentiellement des peptides bioactifs. Une hydrolyse limitée permet quant à elle d'obtenir des peptides de plus haute taille moléculaire (peptides > 15 acides aminés et proportion en acides aminés libres < 10 %) aux propriétés fonctionnelles intéressantes (Hernández-Álvarez *et al.*, 2013 ; Mine *et al.*, 2010).

I.5.2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est spécifique pour chaque protéase, dans des conditions opératoires données. De plus, les préparations enzymatiques commerciales sont composées de plusieurs fractions actives. C'est pourquoi il est important de quantifier l'activité protéolytique des enzymes. Il existe deux méthodes pour le faire :

- ✓ par dosage de l'azote soluble après digestion de protéines de référence (hémoglobine ou caséine dénaturée) (Adler-Nissen, 1986) ;
- ✓ par dosage des chromophores libérés suite à l'hydrolyse des substrats synthétiques (Mullally *et al.*, 1997).

Le premier type de mesure est le plus utilisé du fait que la plus grande partie des enzymes commerciales est caractérisée par cette méthode.

I.5.3. Les méthodes de contrôle du procédé de protéolyse enzymatique

Le paramètre de contrôle du procédé de protéolyse, le plus pratique et le plus convenable, celui qui représente assez bien l'évolution du procédé, est le degré d'hydrolyse (DH) (Adler-Nissen, 1986). Le DH représente le degré d'avancement de la protéolyse et il est défini soit comme étant le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre total et initial de liaisons peptidiques, soit comme étant le ratio entre l'azote non protéique et l'azote total (Rutherford, 2010). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le DH :

- **La méthode à l'acide trichloracétique (TCA)** : l'azote non protéique libéré au cours de l'hydrolyse protéolytique est mesuré (Margot *et al.*, 1997) ;
- **La méthode à l'acide tri-nitro-benzène-sulfonique (TNBS) ou à l'ortho phtal (di)-aldéhyde (OPA)** : ces méthodes utilisent des composés spécifiques qui réagissent avec les groupements aminés en formant des chromophores quantifiables (Batista *et al.*, 2010 ; Achouri *et al.*, 1998) ;
- **La méthode du pH-Stat** : cette technique est basée sur le maintien du pH constant par titration continue et automatique des protons libérés au cours de l'hydrolyse (Jacobsen *et al.*, 1957).

I.5.4. Peptides bioactifs

Les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse des protéines alimentaires ont un potentiel multifonctionnel. Ils agissent comme des antioxydants (Thammarat *et al.*, 2015 ; Alashi *et al.*, 2014), antidiabétiques, antiathérosclérotique et antidyslipidémants (Malomo 2015), anti-inflammatoires, antihypertenseurs (Ajibola *et al.*, 2013 ; Ruiz-ruiz *et al.*, 2013), antimicrobiens (Paul et Somkuti, 2010), antithrombotique (Sarmadi et Ismail, 2010). La bioactivité des peptides dérivés de protéines végétales alimentaires dépend des facteurs tels que le degré d'hydrolyse (Onuh *et al.*, 2013), la teneur en protéines (Mundi et Aluko, 2014), la solubilité des

protéines (He *et al.*, 2013a), la conformation structurale (He *et al.*, 2013b), l'hydrophobicité (He *et al.*, 2013c) et la composition en acides aminés (Girgih *et al.*, 2011).

✓ **Les peptides antioxydants**

Certains hydrolysats protéiques ont la capacité de réduire la vitesse d'auto-oxydation des lipides des aliments. En effet, ils ont la capacité de chélater les métaux lourds et d'accélérer la décomposition des hyperoxydes, molécules possédant des radicaux libres nécessaires aux phénomènes d'oxydation (Thammarat *et al.*, 2015). Alashi *et al.*(2014) ont rapporté que les peptides antioxydants étaient constitués de 5-16 acides aminés et possédaient des acides aminés hydrophobes en N-terminal et les acides aminés proline, histidine et tyrosine dans leur séquence. Cependant, la relation structure – activité antioxydante des peptides n'a toujours pas été mise en évidence.

✓ **Les peptides anti-ACE**

Un groupe très important de peptides est celui des inhibiteurs de l'enzyme convertissant, d'une part, l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur et, d'autre part, dégradant la bradykinine, un vasodilatateur. Cette enzyme est nommée l'ACE (Angiotensin I-Converting Enzyme) (Patil *et al.*, 2015). Ainsi, l'ACE permet d'augmenter la pression sanguine. En inhibant l'activité de l'ACE, les peptides anti-ACE sont considérés comme des molécules intéressantes pour traiter l'hypertension mais aussi toutes les maladies cardiovasculaires qui y sont liées (Patil *et al.*, 2015). De nombreux travaux ont montré que le nombre d'acides aminés de ces peptides est généralement compris entre 2 et 12 mais que leurs propriétés moléculaires sont différentes selon la nature de la protéine d'origine (Patil *et al.*, 2015).

✓ **Les peptides antimicrobiens.**

A ce jour, plusieurs centaines de peptides antimicrobiens différents ont été isolés. Bien qu'ils diffèrent par leur taille et leur séquence, ces peptides possèdent deux caractéristiques communes ; ils sont polycationiques et leur structure active est amphiphile. Ces peptides sont divisés en deux classes : les peptides cycliques et les peptides linéaires (Fosgerau et Hoffmann, 2015). Ces peptides agissent soit en créant des perturbations au niveau des échanges membranaires du microorganisme suite à la formation de ponts ioniques et à la perméabilisation de la membrane, soit en atteignant une cible spécifique intracellulaire qui active l'autolyse de la bactérie (Mohanty *et al.*, 2016).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1- Matériel végétal

Les fruits de *Moringa oléifera* (environ 3 000 g) ont été récoltés sur différents arbres dans un même champ au mois de Juin 2019, dans la localité d'Ezezang (4°15'N and 11°25'E), Arrondissement d'Obala, Département de la Lékié, Région du Centre, Cameroun. Ils ont ensuite été séchés à l'ombre pendant deux semaines, puis dépelliculés pour l'obtention des graines (Figure 4). La plante *Moringa oléifera* Lamarck a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun en comparaison sous le numéro 8573/SRF/Cam.



Figure 4 : Graines sèches de *Moringa oléifera*.

(Photographiées par BAKWO, 2019)

II.2. Méthodes

La méthodologie générale utilisée dans le cadre de ce travail est présentée sur la figure 5. Les fruits récoltés ont été triés, séchés et dépulés pour obtenir les graines. Ces dernières ont été broyées et tamisées pour l'obtention de la farine de 500 μm de granulométrie. La farine obtenue a été délipidée à froid par lavage avec un système solvant hexane-éthanol. Un isolat protéique a été préparé à partir de la farine délipidée. Les protéines de ces graines ont été aussi fractionnées en fonction de leur solubilité différentielle dans les solvants. Par la suite, il a été question d'évaluer l'influence du traitement thermique et de la composition protéique sur quelques propriétés technofonctionnelles de l'isolat protéique. Enfin, il s'est agi d'hydrolyser les protéines des graines de *Moringa oléifera* et d'analyser quelques propriétés antioxydantes et hypoglycémiantes des hydrolysats obtenus.

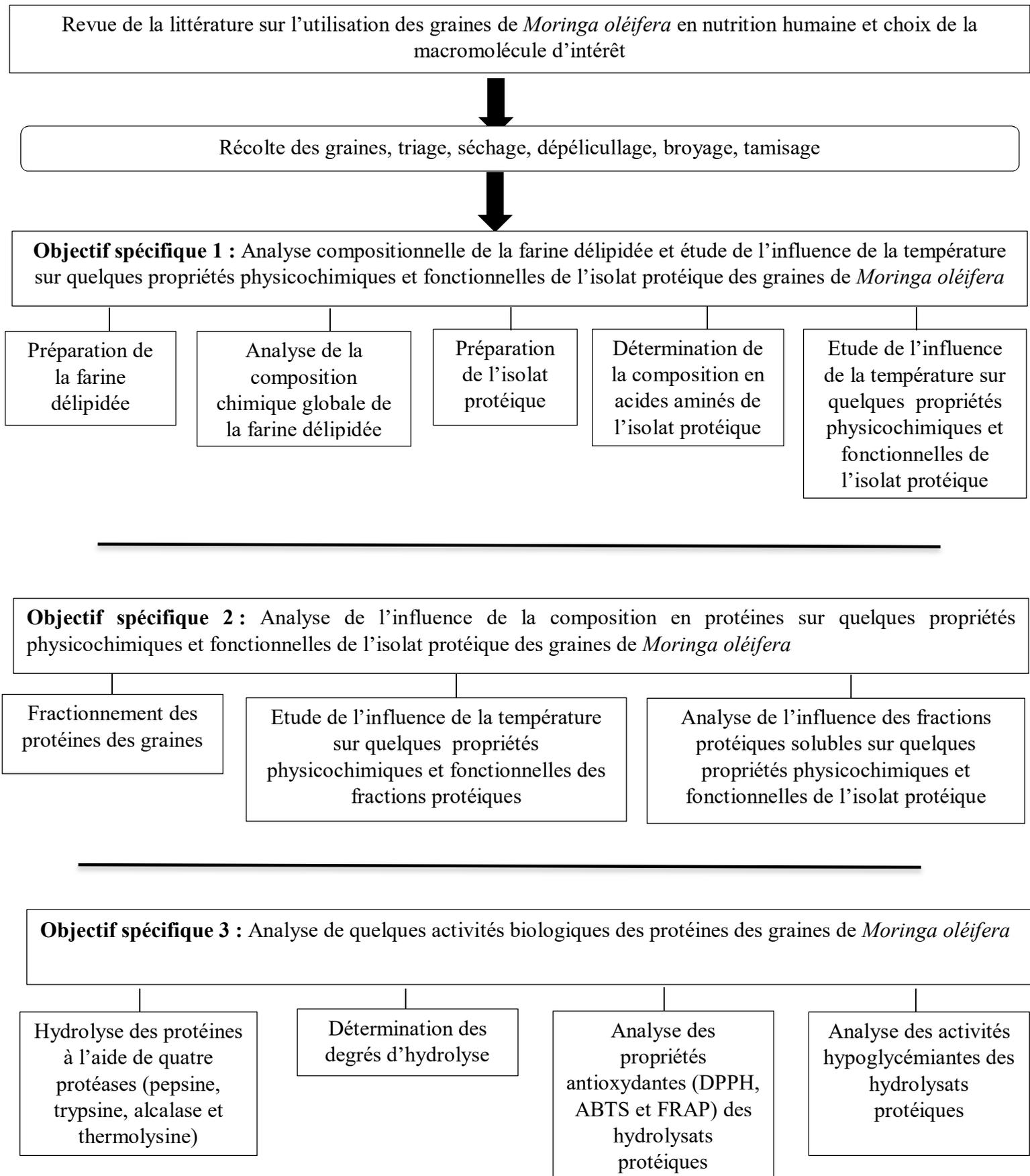


Figure 5: Méthodologie générale du travail effectué sur les protéines des graines de *Moringa oléifera*.

II.2.1. Préparation de la farine délipidée des graines de *Moringa oléifera*

Principe

La méthode est basée sur l'élimination des composés lipidiques non polaires ou faiblement polaires (Liu, 1997).

Mode opératoire

Les graines sèches de *Moringa oléifera* ont été broyées à l'aide d'un moulin à meule de marque SEMAP (France). La farine a été tamisée à l'aide d'un tamis de marque *Fischer Scientific* (France) de diamètre de mailles de 500 µm. Une masse de 300 g de farine a été suspendue dans 900 mL du mélange hexane-éthanol (rapport 1/1, v/v). Le mélange a été agité pendant 30 min à température ambiante du laboratoire à l'aide d'un agitateur magnétique, laissé au repos jusqu'à l'apparition de deux phases bien distinctes puis filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman N°1. Le culot obtenu a été resuspendu dans 900 mL du mélange hexane-éthanol dans les mêmes conditions et traité comme précédemment décrit. Le culot obtenu a été séché à température ambiante du laboratoire pendant 24 heures. La farine délipidée obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamis de diamètre de mailles de 200 µm, puis pesée à l'aide d'une balance électronique 10⁻³ près de marque *Metler Toledo* (Switzerland) et conservée dans des sacs en polyéthylène à -80°C pour les manipulations ultérieures. La figure 6 ci-dessous présente la procédure de la délipidation de la farine des graines de *Moringa oléifera*.

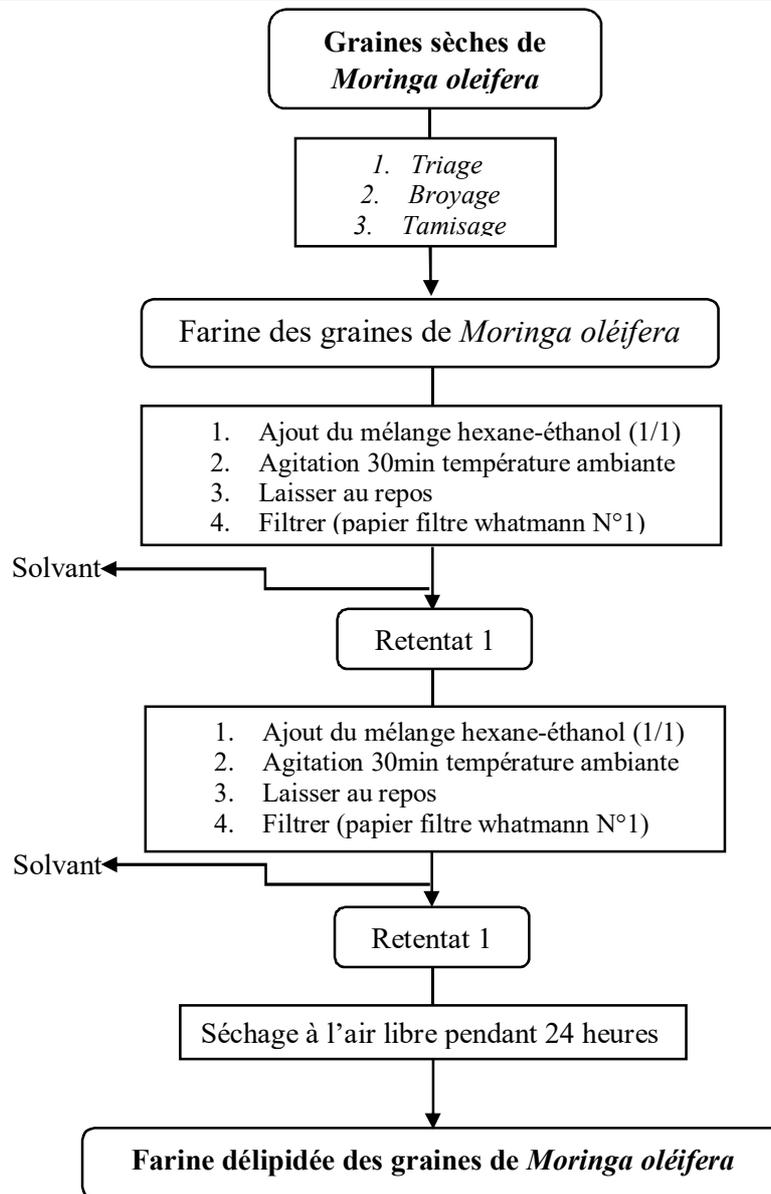


Figure 6 : Procédure de délipidation de la farine des graines de *Moringa oleifera*.

II.2.2. Préparation de l'isolat protéique des graines de *Moringa oleifera*

II.2.2.1. Détermination des conditions optimales d'extraction et de précipitation des protéines des graines de *Moringa oleifera*

Dans le but de solubiliser le maximum de protéines et de déterminer le pH-isoélectrique (pH de précipitation), plusieurs expériences préliminaires ont été effectuées notamment :

- ✓ l'étude du profil de solubilité en fonction du pH (2-12) ;
- ✓ l'étude du profil de solubilité en fonction de la concentration en NaCl (0,1N, 0,17N, 0,3N et 0,4N) ;
- ✓ l'étude du profil de solubilité en fonction du rapport farine délipidée-solvant (1/20, 1/50, 1/80 et 1/100, m/v) ;
- ✓ l'étude du profil de solubilité fonction du temps d'agitation (1h, 2h, 3h et 4h) ;

✓ l'étude du profil de solubilité en fonction de la température (25°C, 35°C, 50°C et 65°C).

▪ **Étude du profil de solubilité en fonction du pH**

La farine délipidée (4,55 g) a été suspendue dans 100 mL d'une solution de NaCl (0,17 N). L'ensemble a été agité à la température ambiante du laboratoire pendant 30 min, puis distribué de façon équitable dans 6 béchers pour un volume de 16 mL chacun. Dans chacun des béchers, le pH a été fixé à 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 et 12. Ensuite les béchers ont été agités à la température ambiante du laboratoire pendant 60 min, puis centrifugés à 4000 rpm pendant 30 min, filtrés et le surnageant recueilli. Les protéines solubles dans les différents surnageants ont été dosées par la méthode de Bradford (1975). Le pH auquel les protéines étaient moins solubles a été identifié comme étant le pH isoélectrique pour la précipitation des protéines et le pH auquel les protéines étaient le plus soluble a été retenu comme pH de solubilisation pour la suite de l'expérience.

• **Étude du profil de solubilité en fonction de la concentration de NaCl**

Quatre solutions protéiques 1% (m/v) ont été préparées en suspendant 0,15 g de farine délipidée dans 15 mL des solutions de NaCl dont les concentrations étaient de 0,1 N ; 0,17 N ; 0,30 N et 0,40 N respectivement. Les solutions ont été agitées pendant 30 min, puis le pH a été fixé à 2 (pH de solubilité maximale trouvé). L'expérience s'est poursuivie tel que décrite dans la section II.2.2.1.1. La concentration de NaCl pour laquelle les protéines étaient plus solubles a été retenue comme concentration optimale de solubilisation.

• **Étude du profil de solubilité en fonction du Rapport Solide-Liquide (RSL)**

La farine délipidée a été suspendue dans une solution de NaCl (0,17 N) aux RSL de 1/20 ; 1/50 ; 1/80 et 1/100 (m/v) respectivement et agitée pendant 30 min. L'expérience s'est poursuivie tel que décrite dans la section II.2.2.1.1. Le RSL auquel la solubilité a été la plus élevée a été retenu comme RSL optimal.

• **Étude du profil de solubilité en fonction du temps de solubilisation/extraction**

Cinq solutions protéiques à 1% (m/v) ont été préparées en suspendant 0,15 g de farine délipidée dans 15 mL de NaCl (0,17 N) pour chacune. Les solutions ont été agitées pendant 30 min, puis le pH a été fixé à 2. Par la suite la solubilisation s'est faite pendant 20 ; 60 ; 120 ; 180 et 240 min respectivement. L'expérience s'est poursuivie tel que décrite la section II.2.2.1.1. Le temps d'extraction pour lequel les protéines étaient plus solubles a été considéré comme temps optimal de solubilisation.

- **Étude du profil de solubilité en fonction de la température**

Quatre solutions protéiques 1 % (m/v) ont été préparées dans le NaCl et le pH a été fixé à 2 pour chacune d'elle. Elles ont par la suite été agitées pendant 60 min à différentes températures (25°C ; 35°C ; 50°C et 65°C). L'expérience s'est poursuivie tel que décrite dans le paragraphe étude de la solubilité en fonction du pH. La température pour laquelle les protéines étaient le plus solubles a été considérée comme température optimale de solubilisation des protéines.

II.2.2.2. Préparation de l'isolat protéique dans les conditions optimales

Les protéines ont été solubilisées et précipitées sur la base des résultats des études préliminaires précédemment effectuées. Les paramètres d'extractions étaient les suivants : pH 2, concentration de NaCl : 0,17N, rapport farine délipidée-solvant : 1/20 (m/v), température : 65°C, temps d'agitation : 1h.

La procédure de préparation de l'isolat protéique détaillée comme suit : la farine délipidée (50g) a été suspendue dans 1000 mL de NaCl (0,17N). L'ensemble a été agité à température ambiante du laboratoire pendant 30 min. Ensuite, le pH a été fixé à 2 avec une solution de HCl (4M). La solubilisation s'est faite à 65°C pendant 60 min dans un bain marie de marque *PolyScience (USA)*, puis centrifugé à 3800 rpm pendant 30 min. Le surnageant a été recueilli et le culot a été resuspendu dans 500 mL de NaCl (0,17N) puis il a été procédé comme précédemment décrit. Les deux surnageants ont par la suite été mélangés et le pH a été fixé à 8 pour précipiter les protéines à l'aide d'une solution de NaOH (4M), puis centrifugé à 3800 rpm pendant 30 min. Le surnageant a été versé et le culot a été repris dans 200 mL d'eau distillée. Le pH a été fixé à 8 et l'ensemble a été centrifugé à 3800 rpm (4°C) pendant 30 min. Le culot a été repris dans 50 mL d'eau distillée, le pH a été fixé à 7, l'ensemble a été placé à -80°C, puis lyophilisé. La teneur en protéines de l'isolat a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1990)

Expression des résultats

Le rendement massique de préparation de l'isolat est donné par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{m_i \times \text{TMS}_i}{m_{fd} \times \text{TMS}_{fd}} \times 100$$

Avec :

- ✓ m_i : masse de l'isolat protéique obtenue après lyophilisation ;
- ✓ m_{fd} : masse de la farine délipidée ;
- ✓ TMS_i : teneur en matière sèche de l'isolat protéique ;

- ✓ TMS_{fd} : teneur en matière sèche de la farine délipidée.

Le rendement protéique de préparation de l'isolat est donné par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{P_i \times \text{TMS}_i}{P_{fd} \times \text{TMS}_{fd}} \times 100$$

Avec :

- ✓ P_i : Teneur en protéine de l'isolat ;
- ✓ P_{fd} : Teneur en protéine de la farine délipidée ;
- ✓ TMS_i : teneur en matière sèche de l'isolat protéique ;
- ✓ TMS_f : teneur en matière sèche de la farine délipidée.

II.2.3. Caractérisation chimique globale de la farine délipidée et de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

II.2.3.1. Détermination de la teneur en eau

Principe

La méthode est basée sur la perte en masse des échantillons après étuvage à 105 (± 2°C) jusqu'à élimination complète d'eau libre et de la matière volatile et obtention d'une masse constante (AOAC, 1990).

Mode opératoire

L'échantillon a été introduit dans un creuset en papier aluminium de masse Mo et taré. L'ensemble a été placé dans une étuve à 105°C pendant 48 heures. L'échantillon séché a été refroidi dans un dessiccateur et la masse Ms de l'ensemble a été notée.

Expression des résultats

La teneur en eau des échantillons a été donnée par la relation suivante:

$$\text{Teneur en eau (\%)} = 100 - \text{TMS}$$

Avec TMS qui désigne la teneur en matière sèche (en %).

II.2.3.2. Détermination de la teneur en cendres

Principe

L'incinération complète de la matière organique d'un échantillon permet l'obtention de cendres blanches ou exemptes de carbone, constituées essentiellement de minéraux (AOAC, 1990).

Mode opératoire

L'échantillon de masse a été introduit dans un creuset en porcelaine, préalablement conditionné au four de marque *Heraeus* (Allemagne) à 550°C pendant 2 heures, refroidi et pesé

(M₀). L'ensemble a été placé dans le four à 550°C pendant une nuit. A l'aide des pinces, le creuset en porcelaine a été retiré du four, refroidi dans un dessiccateur, puis pesé. La masse Mc du creuset a été notée.

✚ Expression des résultats

La teneur en cendres des échantillons a été calculée utilisant la formule ci-après :

$$\text{Teneur en cendres (\%)} = \frac{M_c - M_o}{M_e \times \text{TMS}} \times 100$$

Avec TMS : teneur en matière sèche

II.2.3.3. Détermination de la teneur en lipides totaux

✚ Principe

La méthode est basée sur la solubilité différentielle qu'ont les lipides dans certains solvants comme l'hexane ou l'éther de pétrole (AOAC, 1990).

✚ Mode opératoire

L'échantillon (4 g) a été introduit dans une cartouche cellulosique tapissée de papier filtre Whatman N°1, et l'extrémité a été bouchée avec du coton délipidé. La cartouche a été placée dans le Soxhlet. L'extraction de lipides a été effectuée pendant 8 heures à environ 80°C, dans un ballon contenant des billes de verre préalablement conditionné à 105°C et pesé (M₀), dans lequel a été ajouté 200 mL d'hexane. Le ballon a été démonté et le dispositif a été refroidi pendant environ 1 heure. Le solvant a été éliminé sur évaporateur rotatif, le ballon contenant l'extrait huileux a été séché à 65°C pendant 30 min, puis refroidi. Le ballon contenant l'extrait huileux a été pesé (M₁).

✚ Expression des résultats

La teneur en lipides totaux a été calculée à l'aide de la relation suivante :

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \frac{M_1 - M_o}{M_e \times \text{TMS}} \times 100$$

Avec : TMS : Teneur en matière sèche de l'échantillon en fraction décimale.

II.2.3.4. Détermination de la teneur en protéines brutes par la méthode de *Kjeldhal*

✚ Principe

L'échantillon est minéralisé en milieu acide sulfurique en présence de cuivre (II) et d'un catalyseur (oxyde de titane). Dans les conditions de minéralisation, l'azote organique est retrouvé sous forme d'ions ammonium, lesquels sont transformés en ammoniac par passage en milieu alcalin. L'ammoniac ainsi formée est entraînée à la vapeur et le condensât recueilli est dosé par dosage volumétrique acide/base (AOAC, 1990).

✚ Mode opératoire

Un matras témoin ne contenant pas de matériel végétal, mais tous les autres réactifs a été soumis au même mode opératoire. Il a permis d'évaluer les traces d'azote qui proviennent des réactifs.

Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'azote total contenu dans chaque échantillon et en faisant la moyenne des teneurs déterminées selon la formule suivante :

$$\text{Azote total (\%)} = \frac{0,0014 \times V}{P} \times 100$$

Avec :

- ✓ V= Volume en mL de H₂SO₄ (0,1 N) correspondant au dosage de l'ammoniac dans la matière sèche réellement pesée ;
- ✓ P (g)= Poids de la matière sèche minéralisée dans le matras.

Le pourcentage de protéines de chaque échantillon est obtenu en multipliant le pourcentage d'azote par le facteur 6.25.

$$\text{Protéines (\%)} = \frac{6,25 \times 0,0014 \times V}{P} \times 100$$

II.2.3.5. Détermination de la teneur en glucides totaux

Principe

Les glucides totaux ont été déterminés par différence, sachant que la farine contient globalement de l'eau, des minéraux, des glucides, les protéines et des lipides.

Expression des résultats

La teneur en glucides totaux a été déterminée par la relation suivante :

Glucides totaux (% par rapport à la masse sèche) = 100 – (% protéines + % lipides totaux + cendres).

II.2.3.6. Détermination de la composition en acides aminés des protéines des graines de *Moringa oléifera*

Principe

La méthode est basée sur la détermination quantitative de chacun des composés aminés contenus dans un échantillon, après passage de l'hydrolysate acide dans une colonne de résine échangeuse de cations. L'élution successive des composés aminés, la collection des fractions, l'analyse de chaque fraction et l'enregistrement des données sont automatiquement réalisés par l'auto analyseur d'acides aminés (Spackman *et al.*, 1958).

Mode opératoire

L'échantillon (2 mg), a été hydrolysé à 110 °C pendant 24 heures, dans un tube scellé contenant à une quantité raisonnable de la norleucine comme étalon interne, par 0,5 mL d'une

solution de HCl (6 N) ; d'acide trifluoroacétique (2/1, v/v) et d'acide thioglycolique (5 %). L'hydrolysate a été séché, le résidu a été redissous dans un tampon citrate (0,5 ml) et passé à travers un filtre nylon (0,45 µm). Le filtrat a ensuite été déposé au sommet d'une colonne (48×0,175 cm) de résine de type Durrum DC 4A. Les composés aminés ont ensuite été élués par le tampon citrate de sodium de molarité comprise entre 0,2 et 1,10 M, et dont le gradient de pH varie de 2,75 à 10,5. La température de la colonne a été maintenue à 40°C pendant 20 minutes, puis ajustée jusqu'à 65°C. Les dosages spectrophotométriques ont été effectués à 440 nm pour la tyrosine et à 570 nm pour les autres acides aminés (Mune Mune *et al.*, 2016a).

II.2.4. Analyse de l'influence du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

II.2.4.1. Traitement thermique

Une masse de 0,45 mg de l'isolat protéique a été suspendue dans 45 mL d'un tampon phosphate (pH 7 ; 0,01M). Le mélange a été agité pendant 1h à température ambiante. Par la suite, chacune des solutions a été répartie dans 4 tubes contenant 9 mL chacun. Les tubes ont été chauffés à 50°C, 70°C et 80°C pendant 10 min, puis refroidis dans un bain d'eau froide. Les échantillons traités aux températures sus indiquées ont servi pour les expériences ci-après et les données obtenues ont été comparées à celle de l'échantillon non chauffé (traité à 25°C) qui a servi comme témoin (Nguï *et al.*, 2021).

II.2.4.2. Influence du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

➤ Influence du traitement thermique sur la structure secondaire

La structure secondaire des protéines a été analysée par Spectroscopie à Infrarouge à Transformée de Fourier (IFTR).

🚦 Principe

Cette technique est basée sur les bandes d'absorption particulières que présentent les protéines en spectroscopie infrarouge. De ces bandes, celle caractérisant la liaison amide I, entre 1600 et 1700 cm⁻¹, est particulièrement sensible aux variations de la structure secondaire des protéines. En effet, la nature de la liaison hydrogène entre les groupements carbonyles (C=O) et amines (N-H) de la chaîne polypeptidique, détermine la géométrie du squelette polypeptidique, qui est elle aussi déterminée par la fréquence des bandes infrarouges. Puisque la protéine est habituellement constituée de différentes structures secondaires telles que l'hélice α, les feuillets β, le coude β et de structure irrégulières, la bande amide I est alors composite et constituée de plusieurs signaux superposés (Surewicz *et al.*, 1993).

Tableau III : Bande d'absorption infrarouge caractéristique de la liaison peptidique (Kong et Shaoning, 2007).

Désignation	Fréquence (Cm ⁻¹)	Description
Amide A	3300	NH <i>stretching</i>
Amide B	3100	NH <i>stretching</i>
Amide I	1600-1690	C=O <i>stretching</i>
Amide II	1480-1575	CN <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>
Amide III	1229-1301	CN <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>
Amide IV	625-767	OCN <i>bending</i>
Amide V	640-800	<i>Out-of-plane</i> NH <i>bending</i>
Amide VI	537-606	<i>Out-of-plane</i> C=O <i>bending</i>
Amide VII	200	<i>Skeletal torsion</i>

Mode opératoire

L'échantillon (1 mg) préalablement traité aux différentes températures sus-indiquées, a été déposé sur le dispositif d'analyse préalablement calibré par un blanc (spectre au méthanol). Un faisceau lumineux IR a été envoyé à l'échantillon de manière à obtenir un spectre entre les nombres d'onde 400 et 4000 cm⁻¹, suivant 32 scans avec une résolution de 4 cm⁻¹ (Mune Mune *et al.*, 2016b).

Analyse du spectre

Les données ont été analysées par le logiciel Peakfit 4.12 (Systat Software, San José, USA). Les caractéristiques de la structure secondaire des protéines ont été calculées à partir de la bande amide I, par déconvolution et ajustement non linéaire sous forme de pics Gaussiens du spectre original. La correspondance entre les pics obtenus et les structures secondaires des protéines a été effectuée sur la base des résultats de Gang *et al.* (2009), tel qu'il suit : coudes-β: 1660-1700 cm⁻¹; hélix-α : 1650-1656 cm⁻¹; structure irrégulière: 1640-1644 cm⁻¹; et feuillets-β : 1620-1640 cm⁻¹.

Expression des résultats

Le calcul du pourcentage des aires des différents pics a permis de déterminer la composition des diverses structures secondaires de l'isolat protéique des graines et de la poudre des feuilles de *Moringa oléifera*.

➤ Influence du traitement thermique sur l'hydrophobicité

✚ Principe

Il a été démontré que le Bleu de Bromophénol (BPB) se lie sur les mêmes sites hydrophobes des protéines que les sondes fluorescentes. La différence d'absorbance du BPB constitue un supplément comparable aux sondes fluorescentes pour la détermination de l'hydrophobicité des protéines en solution (Chelh *et al.*, 2006).

✚ Mode opératoire

Un volume de 500 µL de chacun des échantillons traités aux températures pré-indiquées a été mélangé avec 200 µL de solution de bleu de bromophénol (1mg/mL). L'ensemble a été agité pendant 10 min à température ambiante du laboratoire, puis centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min. Le surnageant recueilli a été dilué 5 fois avec de le tampon phosphate (pH 7 ; 0,01M) puis l'absorbance a été lue à 595 nm contre un blanc (tampon phosphate) (Mune Mune *et al.*, 2016b).

✚ Expression des résultats

L'hydrophobicité des protéines a été calculée par la formule suivante :

$$\text{Bleu de bromophénol lié } (\mu\text{g/g de protéines}) = 200 \mu\text{g} \times \frac{A_t - A_e}{A_t} \times \frac{1}{M_p}$$

Avec :

- ✓ A_t : absorbance du témoin ;
- ✓ A_e : absorbance de l'échantillon ;
- ✓ M_p : masse de protéine de l'échantillon, calculée à partir de la teneur en protéines et la masse de l'échantillon.

II.2.4.3. Influence du traitement thermique sur quelques propriétés fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

➤ Influence du traitement thermique sur la solubilité

✚ Principe

L'application d'une force centrifuge permet de séparer la fraction de protéine initiale non soluble de celle solubilisée retrouvée dans le surnageant (Babiker, 2004).

✚ Mode opératoire

Un volume de 1 mL de chacune des solutions protéiques préalablement traitées aux températures pré-indiquées a été agité pendant 30 min, puis centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min. Les surnageants ont été recueillis pour le dosage de l'azote total par la méthode de Bradford, 1975.

Dosage des protéines

Principe :

La méthode est basée sur la capacité de fixation des résidus d'acides aminés aromatiques et hydrophobes par le bleu de coomassie en milieu acide (Bardford, 1975).

Préparation des réactifs utilisés :

Le bleu de Coomassie G250 (50 mg) a été suspendu dans 25 mL d'éthanol et agité pendant 30 min. Un volume de 50 mL d'acide orthophosphorique a été ajouté, puis l'ensemble a été agité pendant 10 min, le volume a été complété à 500 mL avec l'eau distillée, et enfin filtré. Le réactif de Bradford obtenu a été conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

Mode opératoire : à 10 µL d'échantillon protéique, ont été ajoutés 490 µL d'eau distillée et 500 µL de réactif de Bradford. L'ensemble a été incubé à l'abri de la lumière pendant 15 min. Les densités optiques des essais ont été mesurées à 595 nm contre un blanc.

Expression des résultats

Les densités optiques obtenues ont été ensuite converties en mg de protéine en utilisant le BSA comme standard.

La solubilité des protéines est donnée par la relation suivante :

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{M_{ps}}{M_e \times \text{TMS} \times \% P} \times 100$$

Avec :

- ✓ M_{ps} : masse de la protéine dans le surnageant ($N \times 6,25$) ;
- ✓ %P : teneur en protéines de l'échantillon ;
- ✓ M_e : Masse de l'échantillon ;
- ✓ TMS : Teneur en Matière Sèche.

➤ Influence du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes

Principe

Une agitation d'un mélange huile/solution aqueuse de protéines (huile dans l'eau) permet la création d'une émulsion constituée de fines gouttelettes sphériques huileuses dispersées dans l'eau. La détermination de la surface interfaciale totale, qui est fonction de la hauteur de l'émulsion permet de calculer les propriétés émulsifiantes (Lawal *et al.*, 2007).

Mode opératoire

Un volume de 4 mL des solutions protéiques aux différentes températures de traitement a été distribué dans des tubes dans lesquelles il a été ajouté 4 mL de l'huile de Soja de marque Jadida. Les tubes ont été passés vortex pendant 1 min à température ambiante du laboratoire.

Pour déterminer la stabilité de l'émulsion, certains tubes ont été chauffés à 80°C pendant 30 min, puis laissés refroidir. Les tubes chauffés et non chauffés ont été centrifugés à 1100 rpm pendant 10 min, puis la hauteur de l'émulsion a été mesurée.

Expression des résultats

La capacité émulsifiante (CE) est donnée par la relation suivante :

$$CE (\%) = \frac{\text{Hauteur de la phase émulsifiante}}{\text{hauteur totale de l'ensemble}} \times 100$$

L'Indice de stabilité de l'émulsion (ISE) est donné par la relation suivante :

$$ISE (\%) = \frac{\text{Hauteur de la phase}}{\text{hauteur totale de l'ensemble}} \times 100$$

II.2.5. Analyse de l'influence de la composition en protéines sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

II.2.5.1. Fractionnement des protéines des graines de *Moringa oléifera*

Le fractionnement des protéines des graines de *Moringa oléifera* a été effectué suivant la méthode d'Osborne et Vogt (1978) modifiée par Makeri *et al.* (2017).

Principe

La méthode est basée sur la solubilité différentielle des fractions protéique dans différents solvants suivie de leur précipitation à leurs pH isoélectriques respectifs préalablement déterminés (Osborne et Vogt, 1978).

Mode opératoire

- Détermination du pH-isoélectrique des fractions protéiques

La farine délipidée (1 g) a été suspendue dans l'eau distillée rapport 1/10 (m/v) puis le pH a été ajusté à 7 à l'aide d'un pH-mètre de marque *Oakton* (Singapour) avec solution de HCl (0,05M). L'ensemble a été agité pendant 1 heure à température ambiante du laboratoire à l'aide d'un agitateur magnétique de marque *Agimatic-S* (*Spain*), puis centrifugé à 3800 rpm pendant 30 min à l'aide d'une centrifugeuse de marque *Eppendorf* (*Germany*) et filtré avec du papier filtre whatman N°1, puis le surnageant a été recueilli. Par la suite, le culot a été repris toujours dans de l'eau distillée au même rapport que précédemment et l'expérience a été reprise de la même manière. Les deux surnageants ont été mélangés (surnageant A). Le culot restant a été récupéré dans 500 mL de NaCl (0,5M) et le pH a été ajusté à 8 avec une solution de NaOH (0,5M). L'expérience a été menée deux fois telle que décrite précédemment et le surnageant B. Le culot restant à l'issue des deux extractions ayant permis l'obtention des surnageants A et B a été suspendu successivement dans l'éthanol 70% (v/v) puis dans une solution de NaOH (0,1N), pH

10 en conduisant l'expérience dans chacun de ces deux solvants tel que décrite précédemment, ce qui a permis de recueillir les surnageants C et D.

Un aliquote (2 mL) de chacun des surnageants A, B et D a été prélevé, puis dilué avec 18 mL d'eau distillée. Par la suite, le pH a été ajusté de 2-12 à l'aide du HCl ou NaOH (0,01M), puis le mélange a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min et la densité optique (DO) du surnageant a été lue à 280 nm contre le blanc (eau distillée) l'aide d'un spectrophotomètre de marque *Shimadzu 1240 (Japan)*. La plus grande turbidité qui correspondait à la DO la plus élevée indiquait le pH isoélectrique de la fraction. C'est ainsi que les pH-isoélectriques des fractions albumine, globuline et glutéline ont été déterminés. Le surnageant issu de l'extraction hydroalcoolique a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Buchi R-100 (France) à une température de 50°C pour évaporer l'alcool, puis lyophilisé pour obtenir la fraction prolamine.

- **Extraction fractions protéiques**

La farine délipidée 50g a été suspendue successivement dans de l'eau distillée, pH 7, rapport 1/10 (m/v) puis dans une solution de NaCl (0,5 M), pH 8, ensuite dans une solution d'éthanol 70 % (v/v) et enfin dans une solution de NaOH (0,5 N), pH 10. Les expériences ont été menées tel que décrites dans le premier paragraphe de la détermination du pH-isoélectrique des fractions protéiques. Les fractions albumine, globulines et glutéline ont été précipitées en fixant le pH à 4, 2 et 6 respectivement. Le surnageant issu de l'extraction hydroalcoolique a été concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Buchi R-100 (France) à une température de 50°C pour évaporer l'alcool. Les quatre fractions protéiques obtenues ont été reprises dans une petite quantité d'eau distillée, le pH a été ajusté à 7. Les fractions ont été lyophilisées à l'aide d'un lyophilisateur de marque *Bioblock Scientific, (Germany)* puis conservées dans les boîtes en polyéthylènes à -80°C. La teneur en protéines des fractions a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1990). Le schéma de fractionnement des protéines de réserve est présenté dans la figure 7.

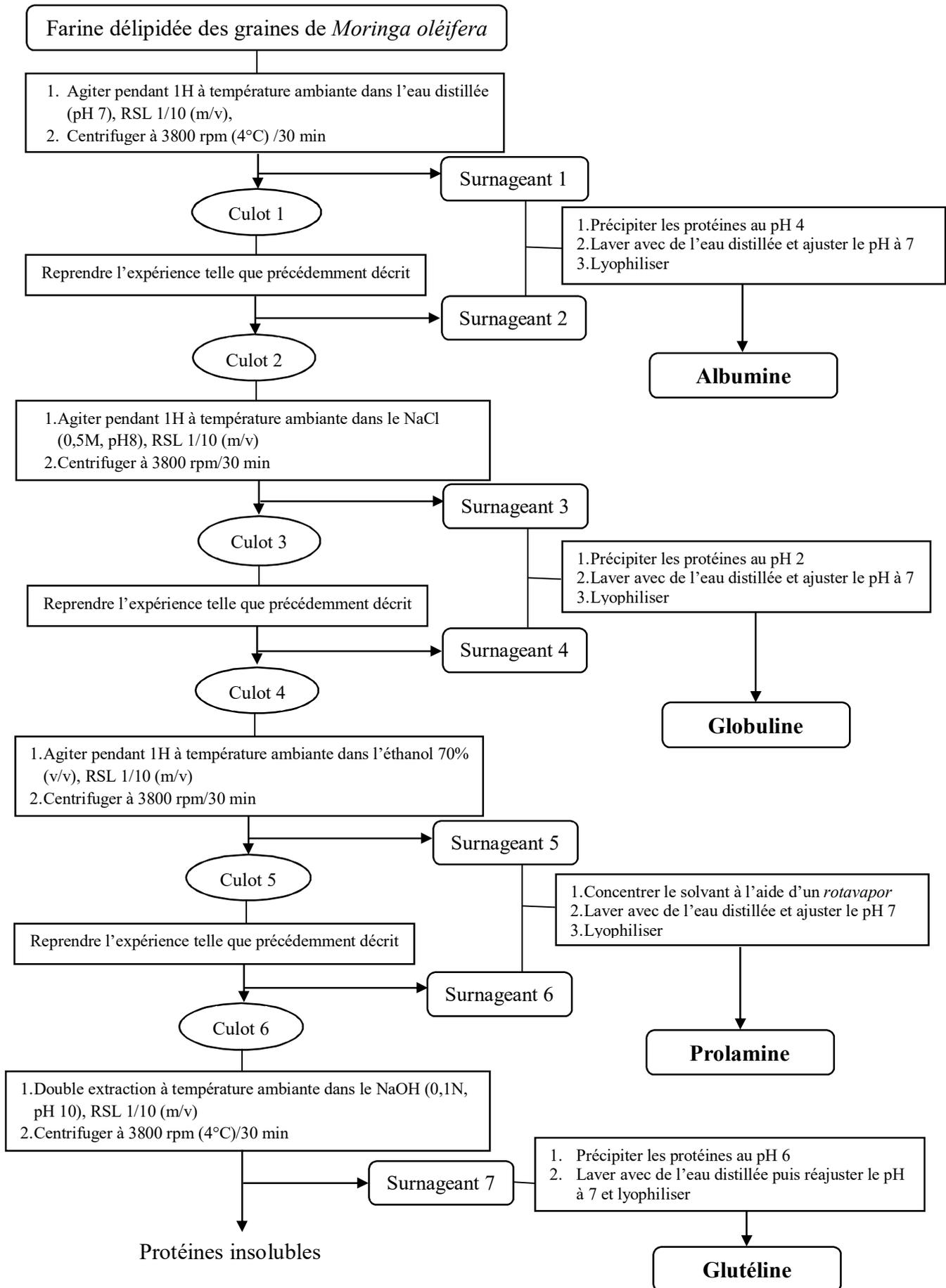


Figure 7 : Procédure de fractionnement des protéines des graines de *Moringa oléifera*.

II.2.5.2. Influence du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

Les différentes fractions protéiques obtenues ont été soumises au traitement thermique tel que décrit dans la section II.2.4.1. Par la suite, l'influence de la température sur la structure secondaire, l'hydrophobicité, la solubilité et les propriétés émulsifiantes des fractions protéiques a été analysée telle que décrit dans les sections II.2.4.2.1, II.2.4.2.2, II.2.4.3.1 et II.2.4.3.2 respectivement.

II.2.5.3. Influence des fractions protéique solubles sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

- **Modélisation**

Les données de l'hydrophobicité, la solubilité et les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique obtenues expérimentalement en faisant varier la température de traitement ont été utilisées comme variables indépendantes et modélisées en fonction du pourcentage d'albumine, de globuline, de prolamine et de glutéline protéiques solubles (tableau IV) en fonction de la température de traitement. Des équations de régression linéaire ont été générées en relation avec les réponses. La technique des moindres carrés a été utilisée pour la détermination des coefficients de régression, et la technique du meilleur sous ensemble basée sur le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) a été utilisée pour le choix des variables appropriées dans le modèle. Les variables dont le niveau de confiance était supérieur à 95 % ont été considérées comme significatives (Myers *et al.*, 2016). Une équation polynomiale de premier ordre a été utilisée pour ajuster les données expérimentales. Le modèle linéaire proposée pour exprimer les réponses était le suivant :

$$Y_i = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4$$

Où Y_i représente l'hydrophobicité, solubilité, capacité d'émulsion et stabilité d'émulsion de l'isolat protéique ;

a_0 représente la constante du modèle ;

a_1 , a_2 , a_3 et a_4 sont les constantes des variables indépendantes (propriétés physicochimiques et fonctionnelles) des fractions de protéines ;

X_1 , X_2 , X_3 et X_4 représentent le pourcentage d'albumine, de globuline, de glutéline et de prolamine solubles à différentes températures de traitement.

Le tableau IV ci-dessous présente le dispositif expérimental.

Tableau IV : Dispositif expérimental

N° Exp.	Fractions protéiques solubles (%) [*]				Variables indépendantes			
	Alb. (X ₁)	Glob. (X ₂)	Glut. (X ₃)	Prol. (X ₄)	Hydrophobicité (µg BBP/g protéines)	Solubilité (g/100g protéines)	EC (%)	ES (%)
1	52,27	36,93	2,78	8,02	0,05	94,49	27,78	22,22
2	52,21	36,97	2,77	8,04	0,06	94,33	27,78	22,22
3	52,28	36,90	2,78	8,04	0,06	94,49	26,67	22,78
4	54,80	35,82	2,06	7,32	1,29	49,68	22,22	21,67
5	54,71	35,94	2,04	7,32	1,29	49,68	22,22	22,22
6	56,65	34,40	1,97	6,98	1,29	49,53	21,67	21,67
7	56,55	33,44	2,43	7,58	0,97	65,38	16,67	16,67
8	56,45	33,55	2,42	7,58	0,96	65,23	16,67	16,67
9	56,57	33,41	2,44	7,58	0,96	65,23	17,22	17,22
10	57,18	33,98	2,27	6,58	0,83	72,24	16,67	16,67
11	57,11	34,04	2,26	6,59	0,83	72,09	16,67	16,11
12	57,08	34,07	2,26	6,59	0,83	72,09	16,66	16,11

Alb. : Albumine ; Glob. : Globuline ; Glut. : Glutéline ; Prol. : Prolamine.

*Fraction soluble (%) = (Quantité de fraction soluble pour 100g d'isolat de protéine x100)/[(Quantité totale de fractions solubles (Alb.+Glob.+Glut.+Prol.) pour 100g d'isolat de protéine)].

II.2.6. Evaluation de quelques propriétés bioactives des protéines des graines de *Moringa oléifera*

II.2.6.1. Hydrolyse enzymatique des protéines des graines de *Moringa oléifera*

Principe

La méthode est basée sur le clivage des liaisons peptidiques et à la scission du substrat protéique en peptides à chaînes courtes et en acides aminés de plus faibles poids moléculaires (Eckert *et al.*, 2019).

➤ Protéases sélectionnées

Les caractéristiques des protéases sélectionnées sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Caractéristiques majeures des protéases sélectionnées au cours de cette étude.

Protéase (producteur) organisme ou microorganisme producteur lot	pH et T° (°C)	Particularités
Pepsine (Laboratoire <i>HIMEDIA</i>) Porcine Extra pur Lot n°9001-75-6	2 <pH<4 35 <T°<40	Endoprotéase digestive du suc gastrique <i>EC Number</i> : 3.4.23.1 Poids Moléculaire : 35 kDa Activité protéolytique : 1 :3000 NF U/mg Aspect : Poudre hygroscopique amorphe de couleur blanche Test microbiologique : 1) E.coli : Absent / 1gm 2) Salmonelle : Absente / 10gm
Trypsine (Sigma Aldrich) Porcine Pancréas Lot n° 9002-07-7	7 <pH< 9 35 <T°<40	Sérine protéase (endoprotéase) digestive du pancréas <i>EC Number</i> : 3.4.21.4 Activité protéolytique : 1 000 - 2 000 BAEE Poids Moléculaire : 23,8 kDa Aspect : Poudre de couleur blanche à jaune clair ou brun clair Test microbiologique : Aucune croissance microbienne détectée Test de mycoplasme de barile : négatif
Alcalase (Sigma Aldrich) <i>Bacillus licheniformis</i> Lot n° 9014-01-1	6,5 <pH< 8,5 55 <T°< 70	Protéase à sérine (endoprotéase) Faible spécificité <i>EC Number</i> : 3.4.21.62 Activité protéolytique : 2,4 UA/g Aspect : liquide de couleur blanche à maronne
Thermolysine (Sigma Aldrich) <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Lot n°9073-78-3	7 <pH< 9,5 65 <T°< 80	Métalloendoprotéase (famille des peptidases M4) thermostable Faible spécificité <i>EC Number</i> : 3.4.24.27 Activité protéolytique : 30 – 350 units/mg protein Poids Moléculaire : 34,6 kDa Aspect : Poudre de couleur blanche à jaune clair ou beige

➤ Hydrolyse des protéines à l'aide de la pepsine

L'hydrolyse des protéines des graines de *Moringa oléifera* à l'aide de la pepsine a été réalisée selon la méthode décrite par Mune Mune *et al.* (2018).

Une solution protéique 10 mg/mL (sur la base de la teneur en protéines) a été préparée en pesant 1,24 g d'isolat protéique qui a été suspendue dans 120 mL d'eau distillée. L'ensemble a été agité pendant 2 h à température ambiante du laboratoire. Par la suite, la suspension a été pré-incubée à 37°C dans un bain marie pendant 30 min et le pH de la suspension a été fixé à 2 à l'aide d'une solution de HCl (1M). Après avoir fixé le pH à 2, la suspension a été laissée au bain marie à 37°C pendant 15 min, puis l'enzyme (pepsine) a été ajoutée sur la base d'un rapport enzyme-substrat de 1/5 (m/m) calculé sur la base de la teneur en protéines du substrat (l'échantillon protéique). Après ajout de l'enzyme, une aliquote du mélange (3 mL) a été directement prélevée, puis suspendue selon un rapport 1/1 (v/v) dans une solution de TCA 20 %. Le reste du mélange a été laissé au bain marie à 37°C sous agitation et pH constat pendant 24 h. Après les 24 h, la réaction a été stoppée en chauffant l'ensemble du mélange à 90°C pendant 10 min. Après refroidissement dans un bain d'eau froide, une aliquote (3 mL) du mélange réactionnel a une fois de plus été prélevée et traitée comme précédemment décrit. Le reste du mélange réactionnel et les aliquotes ont par la suite été centrifugés à 4 000 rpm (4°C) pendant 30 min et les surnageants ont été récupérés. Le surnageant issu de la centrifugation du mélange réactionnel a été lyophilisé puis l'azote a été dosé selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1990), tandis que l'azote a été dosé directement sur les surnageants issus de la centrifugation des deux aliquotes par micro-Kjeldahl.

➤ Hydrolyse des protéines à l'aide de la trypsine

L'hydrolyse des protéines des graines de *Moringa oléifera* à l'aide de la trypsine a été réalisée selon la méthode décrite par Mune Mune *et al.* (2018).

Une solution protéique 10 mg/mL (sur la base de la teneur en protéines) a été préparée et agitée comme précédemment décrit. Par la suite, la suspension a été pré-incubée à 37°C dans un bain marie pendant 30 min et le pH de la suspension a été fixé à 8 à l'aide d'une solution de NaOH (1M). Après avoir fixé le pH à 8, la suspension a été laissée au bain marie à 37°C pendant 15 min, puis l'enzyme (la trypsine) a été ajoutée sur la base d'un rapport enzyme-substrat de 1/5 (m/m) calculé sur la base de la teneur en protéines du substrat (l'échantillon protéique). Après ajout de l'enzyme, une aliquote du mélange (3 mL) a été directement prélevée, puis suspendue selon un rapport 1/1 (v/v) dans une solution de TCA 20 %. Le reste du mélange a été laissé au bain marie à 37°C sous agitation et pH constat pendant 24 h. Après les 24 h, la réaction a été stoppée et la suite de l'expérience s'est déroulée tel que décrit dans la section II.2.6.1.2.

➤ Hydrolyse des protéines à l'aide de l' alcalase

L'hydrolyse des protéines des graines de *Moringa oléifera* à l'aide de l' alcalase a été réalisée selon la méthode de Vastag *et al.* (2014).

Une solution protéique 10 mg/mL (sur la base de la teneur en protéines) a été préparée et agitée comme précédemment décrit dans la section II.2.6.1.2. Par la suite, la suspension a été pré-incubée à 55°C dans un bain marie pendant 30 min et le pH de la suspension a été fixé à 8 à l'aide d'une solution de NaOH (1M). Après avoir fixé le pH à 8, la suspension a été laissée au bain marie à 55°C pendant 15 min, puis l'enzyme (l' alcalase) a été ajoutée sur la base d'un rapport enzyme-substrat de 4% (v/v) calculé sur la base de la teneur en protéines du substrat (l'échantillon protéique). Après ajout de l'enzyme, la suite des expériences s'est déroulée tel que décrit dans la section II.2.6.1.2.

➤ Hydrolyse des protéines à l'aide de la thermolysine

L'hydrolyse des protéines des graines de *Moringa oléifera* à l'aide de la thermolysine a été réalisée selon la méthode décrite par Mune Mune *et al.* (2018).

Une solution protéique 10 mg/mL (sur la base de la teneur en protéines) a été préparée et agitée comme précédemment décrit dans la section II.2.6.1.2. Par la suite, la suspension a été pré-incubée à 70°C dans un bain marie pendant 30 min et le pH de la suspension a été fixé à 8 à l'aide d'une solution de NaOH (1M). Après avoir fixé le pH à 8, la suspension a été laissée au bain marie à 37°C pendant 15 min, puis l'enzyme (la thermolysine) a été ajoutée sur la base d'un rapport enzyme-substrat de de 1mg d'enzyme pour 1g de protéine. Après ajout de l'enzyme, la suite des expériences s'est déroulée tel que décrit dans la section II.2.6.1.2.

II.2.6.2. Calcul degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse a été calculé suivant la formule ci-après décrite par Drago et Gonzalez (2000) :

$$\text{Degré d'hydrolyse (\%)} = \frac{N_2 - N_1}{N_0 - N_1} \times 100$$

Avec :

- ✓ N_0 : l'azote total dans l'échantillon ;
- ✓ N_1 : l'azote soluble dans le TCA (10%) avant hydrolyse ;
- ✓ N_2 : l'azote soluble dans le TCA (10%) après hydrolyse.

II.2.7. Evaluation des propriétés antioxydantes des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera*

Deux mécanismes antioxydants ont été exploités : l'activité antiradicalaire et le pouvoir réducteur.

II.2.7.1. Etude du pouvoir antiradicalaire

Le pouvoir antiradicalaire a été évalué sur 2 radicaux synthétiques DPPH et ABTS

➤ Détermination de l'activité antiradicalaire DPPH

L'activité antiradicalaire DPPH a été déterminée selon le protocole décrit par Oyaizu (1986).

🚦 Principe

La méthode est basée sur la réduction du DPPH en solution alcoolique en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène ce qui conduit à la formation de la forme non radicalaire DPPH-H dans la réaction avec changement de couleur dans le milieu réactionnel du violacé au jaune. La décroissance de l'absorbance à 517 nm, résultant du changement de couleur initiale au fur et à mesure que le radical est piégé est proportionnelle à l'activité de piégeage de l'échantillon.

🚦 Réactifs

- DPPH ;
- Ethanol (95 %) ;
- Acide gallique.

Préparation des échantillons : Les hydrolysats protéiques ont été préparés dans de l'alcool aux concentrations suivantes :

- Concentrations de l'hydrolysat pepsine (mg/mL) : 0,001 ; 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,04 et 0,06.
- Concentrations de l'hydrolysat trypsine (mg/mL) : 5 ; 7 ; 9 ; 11 ; 13 et 15.
- Concentrations de l'hydrolysat alcalase (mg/mL) : 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 ; 11.
- Concentrations de l'hydrolysat thermolysine (mg/mL) : 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4.

🚦 Mode opératoire

A 1,5 mL d'hydrolysat protéique, ont été ajoutés 1,5 mL d'une solution de DPPH (0,15 mM préparé dans l'éthanol (95%)). Le mélange a été agité puis laissé au repos à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 min. Puis l'absorbance a été lue à 517 nm contre un blanc préparé de même manière en remplaçant l'échantillon par l'éthanol. L'acide gallique (1-60 µg/mL) a été utilisé comme référence.

✚ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage du radical DPPH selon la formule suivante :

$$\text{Piégeage du radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorbance blanc} - \text{Absorbance de l'hydrolysate}}{\text{Absorbance du blanc}} \times 100$$

➤ Détermination de l'activité antiradicalaire ABTS (Acide (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique))

L'activité antiradicalaire ABTS a été déterminée selon le protocole décrit par Re *et al.* (1999).

✚ Principe :

En réagissant avec le permanganate de potassium, l'ABTS forme le radical ABTS⁺ de couleur bleue à verte, l'ajout d'un antioxydant réduit ce radical et provoque la décoloration du mélange. Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm et est proportionnelle à l'activité des antioxydants présents dans l'échantillon.

✚ Réactifs

- ABTS ;
- Persulfate de potassium ;
- Tampon phosphate (;
- Acide gallique.

Préparation de la solution d'ABTS: La solution du radical cationique de l'ABTS (ABTS⁺⁺) (7,4 mM) a été préparée en mélangeant 5 mL de la solution d'ABTS avec 88µL de potassium persulfate (140 mM). Le mélange a été laissé au repos pendant 12-14h avant utilisation.

Préparation des échantillons : les hydrolysats protéiques ont été préparés à dans de l'eau distillée aux concentrations suivantes :

- Concentrations de l'hydrolysate pepsine (mg/mL) : 1 ; 3 ; 7 ; 12 ; 21 ; 28.
- Concentrations de l'hydrolysate trypsine (mg/mL) : 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 3 et 5.
- Concentrations de l'hydrolysate alcalase (mg/mL) : 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1.
- Concentrations de l'hydrolysate thermolysine (mg/mL) : 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4.

✚ Mode opératoire

La solution ABTS⁺⁺ a été diluée avec un tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,1 mM) pour une absorbance de 0,7±0,02 à 734 nm. A 10 µL de chaque hydrolysate protéique, a été ajouté 1 mL

de la solution ABTS⁺⁺. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'abri de la
Thèse de Doctorat / Ph.D. en Biochimie rédigée par BAKWO BASSOGOG Christian

lumière, L'absorbance a été lue à 734 nm contre contrôle constitué de la solution d'ABTS⁺. L'acide gallique (0,4-40 µg/mL) a été utilisé comme référence.

✚ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage du radical ABTS selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Activité ABTS antiradicalaire (\%)} \\ &= \frac{\text{Absorbance de l'hydrolysate} - \text{Absorbance du blanc}}{\text{Absorbance du blanc}} \times 100 \end{aligned}$$

II.2.7.2. Etude du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur a été évalué à travers le test de réduction du fer ferrique en fer ferreux selon le protocole décrit par (Oyaizu, 1986).

✚ Principe

Cette technique basée sur la capacité d'une substance à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). L'absorbance du milieu réactionnel à 700 nm est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'échantillon.

✚ Réactifs

- FeCl₂;
- Ferrozine (3-(2-pyridyl) acide-5,6-bis (4-phenyl-sulfonique)-1,2,4-triazine) ;
- Catéchine.

✚ Mode opératoire

A 1 mL d'hydrolysate protéique (33 mg/mL ; 15 mg/mL ; 11 mg/mL et 4 mg/mL respectivement pour les hydrolysats pepsine, trypsine, alcalase et thermolysine), ont été ajoutés 3,7 mL d'eau distillée, 0,1 mL de FeCl₂ (2mM) et 0,2 mL de ferrozine (5 mM). Le mélange réactionnel a été laissé au repos pendant 20 min à température ambiante. L'absorbance a été lue à 562 nm contre un blanc dans lequel l'échantillon a été remplacé par de l'eau distillée. La droite d'étalonnage a été préparée avec la Catéchine (5-100 µg/mL), laquelle a été utilisée comme standard.

✚ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction selon la formule suivante :

$$\text{Activité réductrice (\%)} = [1 - (\text{absorbance de l'échantillon} / \text{absorbance du blanc})] \times 100.$$

II.2.8. Etude des propriétés hypoglycémiantes des hydrolysats protéiques

Les propriétés hypoglycémiantes des hydrolysats ont été évalués à travers la capacité de ces derniers à stimuler la capture périphérique du glucose en utilisant 2 types cellulaires : les cellules non insulino-dépendantes et les cellules insulino-dépendantes.

II.2.8.1. Etude des effets des hydrolysats sur la capture du glucose par les cellules non insulino-dépendantes

Ces effets ont été évalués par le test d'absorption du glucose par les levures selon la méthode de Cirillo (1962).

Principe

Similairement aux cellules humaines, les cellules de levures ont la capacité d'absorber le glucose. Cependant, l'absorption est conditionnée par la présence de composés pouvant la stimuler de façon similaire à l'insuline (insulinomimétiques). L'effet insulinomimétique se matérialise par la diminution du glucose réactionnel, caractérisée par la diminution de l'intensité de la coloration rose indicatrice du glucose, quantifiée par lecture de l'absorbance à 505 nm.

Réactifs

- Solution de glucose.....25 mM
- Kit de glucose (*Chronolab*)
- ✓ Tampon R1
 - TRIS 7,4.....92 mmol/L
 - Phénol.....0,3 mmol/L
- ✓ Enzyme R2
 - Glucose oxydase (GOP).....15000 U/I
 - Peroxydase POD.....1000 U/I
 - 4-Aminophenazone (4-AP).....2,6 mmol/L
- ❖ Etalon Glucose100 mg/dL
- Levure commerciale 10 % (v/v) : la levure commerciale de boulangerie 10 % (v/v) a été préparée dans de l'eau distillée, après broyage et centrifugation à 1500 g/5 min, le surnageant a été recueilli comme suspension de levures.

Mode opératoire

Un volume de 250 L d'hydrolysats protéiques (7; 10 et 12,5 mg/mL) a été mélangé à 1 mL de glucose (25 mM). Le mélange a été pré-incubé à 37 °C pendant 10 min. Par la suite, 25 L de suspension de levure ont été ajoutés et l'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 1 h. Après centrifugation à 1500 g min, le glucose a été dosé à l'aide du kit Fortress selon la

méthode de Trinder (1959) et l'absorbance a été lue à 505 nm. Le control a été constitué en remplaçant le volume d'échantillon par un volume équivalent d'eau distillée.

✚ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentages d'augmentation de la capture de glucose et calculés comme suit :

$$\begin{aligned} & \text{Augmentation capture glucose (\%)} \\ & = \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'hydrolysate}}{\text{Absorbance du contrôle}} \end{aligned}$$

II.2.8.2. Etude des effets des hydrolysats sur la capture du glucose par les cellules insulino-dépendantes

Ces effets ont été évalués par le test d'absorption du glucose par les cellules musculaires selon la méthode d'Al-Awadi *et al.* (1985).

✚ Principe

Les cellules musculaires absorbent le glucose de façon insulino-dépendante, cependant de nombreux composés (insulinosensibilisateurs) ont la capacité de stimuler l'effet de l'insuline ou d'augmenter son efficacité, ce qui augmente l'absorption musculaire du glucose. Cette absorption accrue entraîne une diminution du glucose réactionnel et la diminution de la coloration rose du complexe indicateur du glucose, qui absorbe à 505 nm.

✚ Réactifs

- Tampon Krebs (pH 7,4 ; 4 %) ;
- Glucose (11,1 mM) ;
- Kit de dosage du glucose (Fortress);
- Insuline humaine commercialisée.

Isolement des coupes fines de tissu musculaire isolées à partir des rats : Un rat de souche Wistar a été maintenu à jeun pendant 16 à 18 heures, puis sacrifié par dislocation cervicale et disséquées afin de récupérer le tissu musculaire. Le tissu musculaire de la patte a été rapidement prélevé, puis rincé dans le tampon Krebs. A l'aide des lames, le tissu musculaire a été découpé en petits morceaux le plus finement possible (d'environ 1 mm d'épaisseur).

Lavage des coupes fines de tissu musculaire

Les coupes musculaires ont été lavées 2 à 3 fois avec le tampon Krebs puis récupérées dans des tubes coniques et centrifugées à une vitesse de 500 rpm pendant 5 minutes. Par la suite, le culot a été récupéré, pesé et introduit dans des béchers contenant le tampon Krebs glucosé à 3 g/L (milieu hyper-glycémique).

Mode opératoire

Les coupes fines de tissu musculaire incubées dans le tampon Krebs glucosé en présence des hydrolysats protéiques à différentes concentrations (7, 10 et 12,5 mg/ml). L'incubation a été réalisée dans un incubateur agitateur à 37°C sous agitation constante de 47 tours/min pendant 60 min. L'insuline humaine commercialisée (100 U/mL) diluée de moitié a servi de comme témoin positif.

Plusieurs aliquotes ont été réalisés : le tissu musculaire incubé dans le tampon Krebs contenant du glucose (11,1 mM) ; le tissu musculaire incubé dans le tampon Krebs contenant du glucose (11,1 mM) plus 100 µL d'insuline (100 U/mL) ; le tissu musculaire incubé dans le tampon Krebs contenant du glucose (11,1 mM) plus 100 µL d'insuline (50 mUI) et 1 mL d'hydrolysats protéiques à différentes concentrations (7, 10 et 12,5 mg/ml). Ensuite le glucose restant a été dosé dans chaque aliquotes après 30 et 60 min d'incubation suivant la méthode de Trinder (1959).

Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentages de capture du glucose calculés comme suit :

Capture du glucose (%)

$$= \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'hydrolysate}}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

II.3. Analyses statistiques des résultats

Chaque expérience a été répétée 3 fois. Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse des variances (ANOVA) pour déterminer l'effet des variables indépendantes étudiées sur la variabilité des chaque réponse. L'analyse de la corrélation a été effectuée par la méthode de Pearson. Le seuil de probabilité $p < 0,05$, a été considéré comme statistiquement différent. Les résultats quantitatifs ont été exprimés sous forme de moyennes \pm écart types. Les moyennes ont été comparées par le test One-way ANOVA avec le test de Duncan en *post hoc* descriptif, et rangées en sous-classes homogènes. Le logiciel SPSS (version 16.0 for *Windows*, *SPSS Inc.*, Chicago, IL, USA) a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Les logiciels *Microsoft Excel* 2013 et *STATISTICA* (version 5.5, 2002 by *Statsoft Inc* ; USA) ont été utilisés pour la construction des tableaux et des graphiques. Le logiciel *Peakfit* 4.12 (*Systat Software*, San José, USA) a été utilisé pour l'analyse des résultats de la Spectroscopie Infra Rouge à Transformé de Fourier.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Composition chimique de la farine délipidée de graines de *Moringa oléifera*

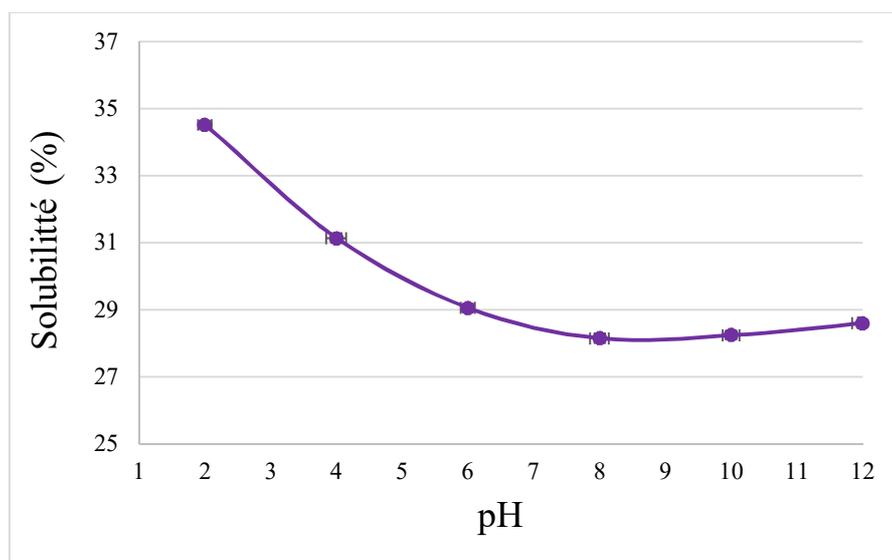
La composition chimique de la farine délipidée des graines est donnée ainsi qu'il suit: glucides totaux (49,15 %), protéines totales (33,53 %), lipides totaux (7,10 %), teneurs en eau (7,06 %) et en cendres (3,16 %). Il en ressort que les glucides totaux et les protéines sont les macromolécules majeures de la farine des graines de *Moringa oléifera*. Les études antérieures sur la farine délipidée de *Moringa oléifera* ont rapporté que les teneurs en glucides totaux et protéines étaient de l'ordre de 9,17- 53,36 % et 32- 62,8 % respectivement (Sa'a *et al.*, 2019).

III.2. Paramètres de solubilisation et de précipitation des protéines des graines de *Moringa oléifera*

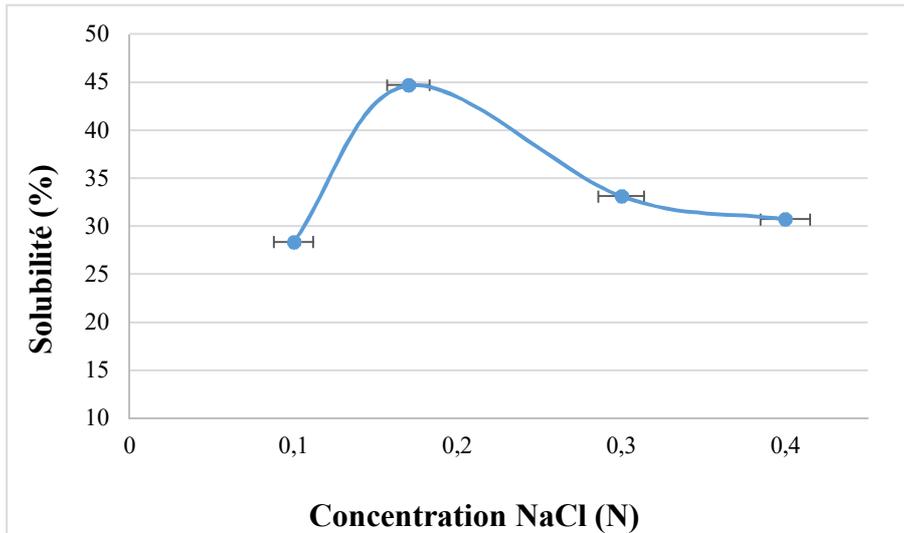
Les conditions et le procédé d'extraction des protéines influencent le rendement protéique, la teneur en protéines et leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles (Arise *et al.*, 2017 ; Zayas, 1997). Deux étapes sont importantes dans la préparation de l'isolat protéique : la solubilisation et la précipitation des protéines. Les paramètres de solubilisation étant nombreux (taille des particules, pH, force ionique, rapport solide-liquide (RSL), temps d'agitation et température), c'est la raison pour laquelle nous avons procédé à un criblage afin de déterminer les meilleures conditions de solubilisation des protéines des graines de *Moringa oléifera* dans l'optique d'optimiser leur extraction.

La figure 8 (a-e) présente respectivement l'influence du pH, de la concentration en NaCl, du temps de solubilisation, du RSL et de la température sur la solubilisation des protéines des graines de *Moringa oléifera*.

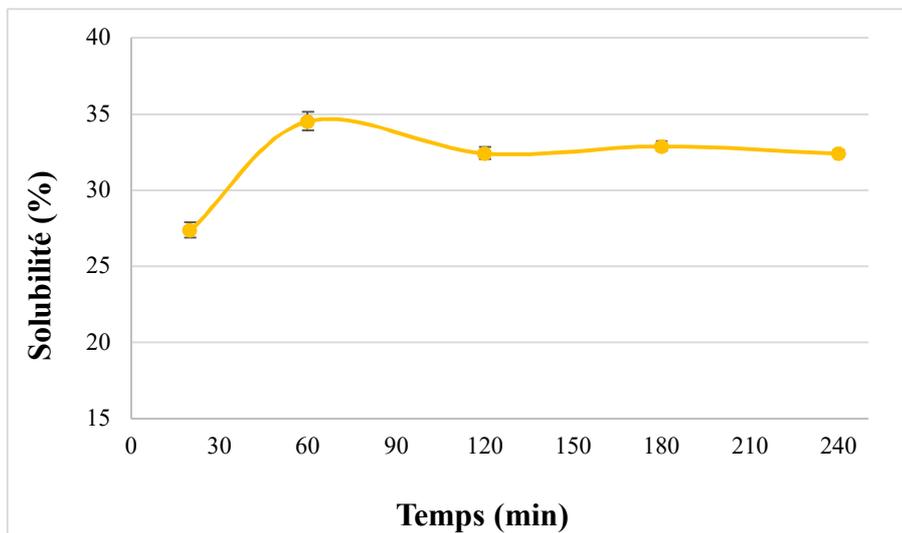
(a)



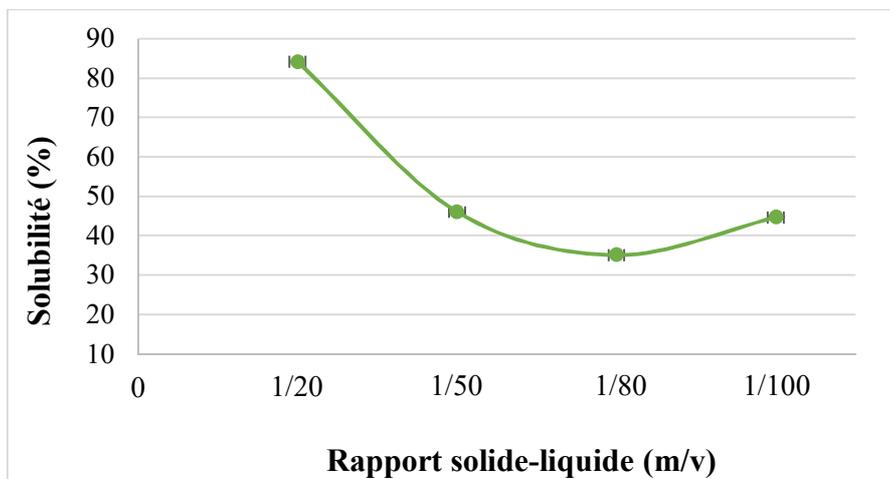
(b)



(c)



(d)



(e)

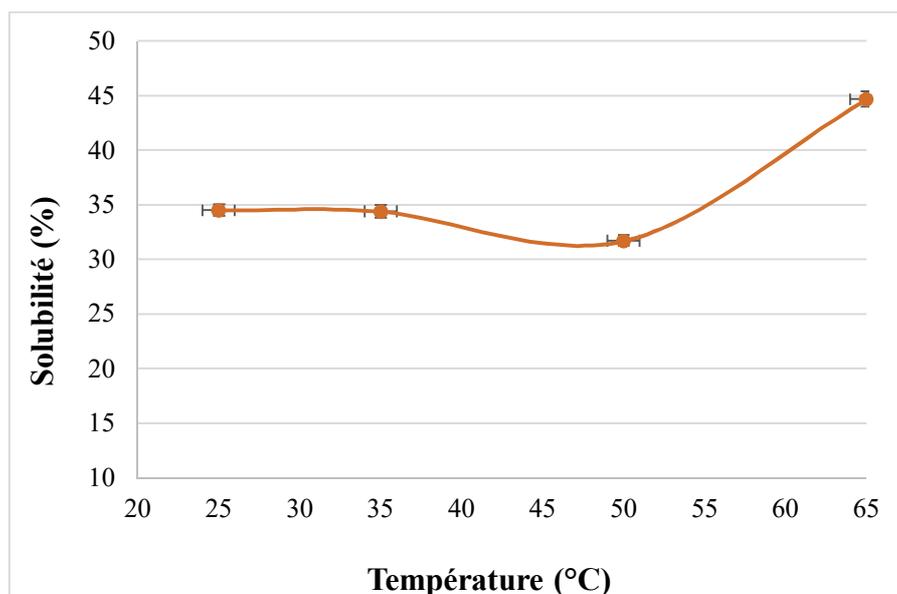


Figure 8 (a-e) : Influence du pH (a), de la force ionique (concentration en NaCl) (b), du temps d'agitation (c), du rapport solide – liquide (RSL) (d) et de température (e) sur la solubilité des protéines.

L'analyse des graphes montre que la solubilité des protéines décroît lorsque le pH augmente pour devenir constante à partir du pH 8. Les protéines sont plus solubles au pH 2 et moins solubles au pH 8. Ainsi, ce dernier a été considéré comme pH isoélectrique des protéines des graines de *Moringa oléifera*.

L'étude de l'influence de la force ionique sur la solubilité des protéines des graines de *Moringa oléifera* a montré que la solubilité augmente lorsque la concentration en NaCl se situe entre 0,1N et 0,2N avec un maximum de solubilité pour une concentration en NaCl de 0,17N. La solubilité commence à décroître lorsque la concentration en NaCl est supérieure à 0,2N. L'analyse de l'influence du temps d'agitation sur la solubilité des protéines des graines de *Moringa oléifera* montre qu'elle augmente au cours des soixante premières minutes, avec un pic à la soixantième minute, puis décroît légèrement jusqu'à la cent vingtième minute et reste constante jusqu'à 240 min.

La solubilité des protéines des graines de *Moringa oléifera* maximale lorsque le RSL est de 1/20 (m/v) puis elle tend à décroître lorsque le RSL augmente jusqu'à atteindre une valeur minimale lorsque le RSL est de 1/80 (m/v) et recommence à croître légèrement lorsqu'on tend vers un RSL de 1/100 (m/v).

La solubilité des protéines des graines de *Moringa oléifera* est constante entre 25°C et 35°C, puis diminue légèrement entre 35°C et 50°C. Au-delà de 50°C, elle tend à croître pour atteindre une valeur optimale à 65°C.

En résumé, il ressort que les conditions optimales pour l'extraction des protéines des graines de *Moringa oléifera* sont les suivantes :

- Concentration de la solution de NaCl : 0,17 N ;
- pH de solubilisation : 2 ;
- Temps d'agitation : 60 min ;
- Rapport solide-liquide : 1/20 (m/v) ;
- Température d'agitation : 65°C ;

Les protéines des graines de *Moringa oléifera* dans le cadre de cette étude ont un pHi égal à 8.

Le pH de solubilisation des protéines de notre étude est similaire à celui rapporté par les travaux de Govardhan *et al.* (2011) sur la farine délipidée des graines de *Moringa oléifera*. Ces auteurs ont rapportés que les protéines étaient plus solubles à pH 2 et moins solubles autour du pH 8.

La concentration en NaCl obtenue dans nos travaux est inférieure à celle obtenue par Jain *et al.* (2019) et de Govardhan *et al.* (2011) avec les graines de *Moringa oléifera*. Ils ont rapportés que les protéines des graines de *Moringa oléifera* sont plus extraites dans une solution de NaCl 0,4 M et 0,75 M respectivement. Govardhan *et al.* (2011) ont rapporté un taux d'extraction des protéines des graines de *Moringa oléifera* variant de 53,28 % à 73,01 % lorsque la concentration en NaCl passe de 0,1 M à 0,2 M. Aussi, ces auteurs ont montré que pour des concentrations en NaCl au-delà de 0,75 M, le taux d'extraction des protéines décroît considérablement, ce qui justifie l'influence de la concentration de NaCl utilisée sur l'extraction des protéines.

Le temps d'agitation optimal pour l'extraction des protéines de notre étude est légèrement supérieur à ceux rapportés par Jain *et al.* (2019) et Govardhan *et al.* (2011) soit 10 min et 20 min respectivement. Ces auteurs ont conclu que les protéines des graines de *Moringa oléifera* étaient plus extraites au cours des 20 premières minutes, ce qui indique que la majeure partie des protéines des graines de *Moringa oléifera* se solubilise sur une période de temps relativement courte. Toutefois, Jyothirmayia *et al.* (2006) ont montré que l'extraction des protéines augmente jusqu'à 35 min puis redevient constante au-delà de 35 min.

Le RSL et la température de solubilisation des protéines des graines de *Moringa oléifera* obtenus durant cette étude ne sont pas éloignés de ceux obtenus par Jain *et al.* (2019). Ils ont rapportés que les protéines étaient plus solubles pour un RSL de 1/20 (m/v) à une température de 55°C. Ces auteurs ont montré que l'augmentation du RSL au-delà de 1/22 n'a pas un effet significatif sur la solubilité des protéines. De même, ils ont rapportés que la solubilisation des protéines augmente significativement entre 40°C et 50°C, puis devient constante entre 55°C et

70°C et chute significativement au-delà de 70°C, probablement suite à la dénaturation des protéines.

Les différences observées entre les paramètres d'extraction des protéines des graines de *Moringa oléifera* obtenus dans cette étude en comparaison avec les résultats obtenus par d'autres travaux peuvent être liées à l'environnement agro écologique de récolte des graines de *Moringa oléifera*.

Les pH de solubilisation et de précipitation des protéines des graines de *Moringa oléifera* sont en contradiction avec les études faites sur d'autres légumineuses comme le pois bambara, le niébé, le haricot, le pois chiche et le soja (Adebowale *et al.*, 2011 ; Ahmed *et al.*, 2011 ; Mune Mune *et al.*, 2008). En effet, les protéines des légumineuses sont généralement solubilisées en milieu alcalin (pH 8-10) et précipitées en milieu acide (pH 4-5,5). Ce comportement des protéines des graines de *Moringa oléifera* peut être lié à ses caractéristiques structurales, physiologiques et sa composition en protéines de réserves. Jerri *et al.* (2012) ont rapportés que les graines de *Moringa oléifera* sont majoritairement constituées de protéines de nature cationique (6,5 kDa), lesquelles ont un pH isoélectrique parfois supérieur à 10.

III.3. Composition chimique globale et teneur en acides aminés de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

La composition chimique de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* est présentée dans le tableau VI ci-après.

Tableau VI : Composition chimique de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

Composition chimique (g/100g, MS)	Farine délipidée	Isolat protéique
Teneur en eau	7,06 ± 0,12 ^{b2}	2,41 ± 0,03 ^{b1}
Cendres	3,16 ± 0,0001 ^{a2}	0,08 ± 0, 3 ^{c1}
Lipides	7,1 ± 0,09 ^b	ND
Glucides totaux	49,15 ± 0,1 ^d	ND
Protéines totales	33,53 ± 0,38 ^{c1}	80,41 ± 0,04 ^{a2}

Dans la même colonne, les moyennes suivies des différentes lettres (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0.05$) différentes.

Les moyennes suivies des nombres (1;2) dans la même ligne sont significativement ($p < 0.05$) différentes.

ND : non déterminé.

La composition en acides aminés des protéines des graines de *Moringa oléifera* est présentée dans le tableau VII ci après :

Tableau VII: Composition en acides aminés des graines et des feuilles de *Moringa oléifera*

	GRAINES (g/100g)	Valeurs de références (FAO/WHO, 1991)
Histidine	2,66	1,9
Isoleucine	3,54	2,8
Leucine	7,17	6,6
Lysine	1,64	5,8
Thréonine	4,09	3,4
Tryptophane	ND	1,1
Valine	7,08	3,5
Méthionine	1,44	
Cystéine	0,67	
Total acides aminés soufrés	2,11	2,3
Tyrosine	1,71	
Phénylalanine	4,97	
Total acides aminés aromatiques	6,68	6,3
<u>Total acides aminés essentiels</u>	<u>35,07</u>	<u>33,9</u>
Acide aspartique+ asparagine	7,99	
Sérine	3,30	
Acide glutamique + glutamine	21,64	
Proline	6,13	
Glycine	12,95	
Alanine	7,07	
Arginine	5,85	
<u>Total acides aminés non essentiels</u>	<u>64,93</u>	

ND : non déterminé

La composition en acides aminés des protéines des graines de *Moringa oléifera* révèle qu'elles sont majoritairement constituées d'acides aminés hydrophobes (37,4 %) et d'acides aminés hydrophiles (36,66 %). Les acides aminés basiques et acides représentent 10,15 % et

14,62 % et tandis que les teneurs en acides aminés soufrés et aromatiques sont de 2,11 % et 12,99 % respectivement (Tableau VII).

Les teneurs en acides aminés hydrophobes et hydrophiles des protéines des graines de *Moringa oléifera* sont supérieures à celles reportées par James *et al.* (2020) sur le pois bambara (19,22 % et 25,82 % respectivement), le haricot rouge (27,55 % et 28,39 % respectivement), le pois chiche (26,83 % et 33,04 % respectivement), et le niébé (27,97 % et 33,77 % respectivement) mais inférieures à celle du haricot vert (45,78 % et 43,84 % respectivement) et des arachides (49,28 % et 47,75 % respectivement). Les acides aminés hydrophobes sont responsables de l'amertume et l'astringence des protéines et peptides (Thammarat *et al.*, 2015).

Les protéines des graines de *Moringa oléifera* ont une teneur en acides aminés basiques supérieure aux acides aminés acides, indiquant que ces protéines sont de nature basique. Ce qui corrobore avec le fait que ces protéines aient un pHi basique. La teneur en acides aminés basiques des protéines des graines de *Moringa oléifera* est supérieure aux données de James *et al.* (2020) sur le pois bambara (6,70 %), le haricot rouge (8,73 %), mais inférieures à celle du pois chiche (10,57 %), du niébé (14,35 %), du haricot vert (17,0 %) et des arachides (19,24 %). Toujours en comparaison aux données de cet auteur, la teneur en acides aminés acides est supérieure à celles du pois bambara (9,0 %), du haricot rouge (10,66 %), du pois chiche (11,81 %), et du niébé (11,46 %), mais inférieure à celle du haricot vert (20,11 %) et des arachides (21,30 %). En technologie alimentaire les goûts acides et *umami* sont généralement associés aux protéines acides alors que les protéines basiques manifestent souvent un goût salé prononcé. Le goût *umami* est attribué aux protéines contenant des acides glutamiques et aspartiques liés avec des ions sodium (Thammarat *et al.*, 2015).

Les protéines de graines de *Moringa oléifera* ont une teneur en acides aminés soufrés supérieure à celle du pois bambara (1,42 %), et du haricot rouge (1,83 %), mais inférieures à celle du pois chiche (2,20 %), du niébé (2,30 %), du haricot vert (6,31 %) et des arachides (4,43 %). Les protéines ayant dans leur séquence des acides aminés soufrés présentent des propriétés antioxydantes intéressantes (Mune Mune *et al.*, 2018).

Pour ce qui est des acides aminés aromatiques, leur teneur dans les protéines de graines de *Moringa* est supérieure à celle de certaines légumineuses comme le pois bambara (5,98 %), le haricot rouge (8,46 %), le pois chiche (9,99 %), du niébé (9,69 %), le haricot vert (12,14 %) et les arachides (12,30 %) (James *et al.*, 2020). La teneur élevée en acides aminés aromatiques implique que ces protéines constituent une source potentielle de composés aromatisés (James *et al.*, 2020).

Les différences observées dans la composition en acides aminés des légumineuses peuvent être attribuées à la nature des protéines, aux techniques de dosages, mais aussi aux conditions agro écologiques.

III.4. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

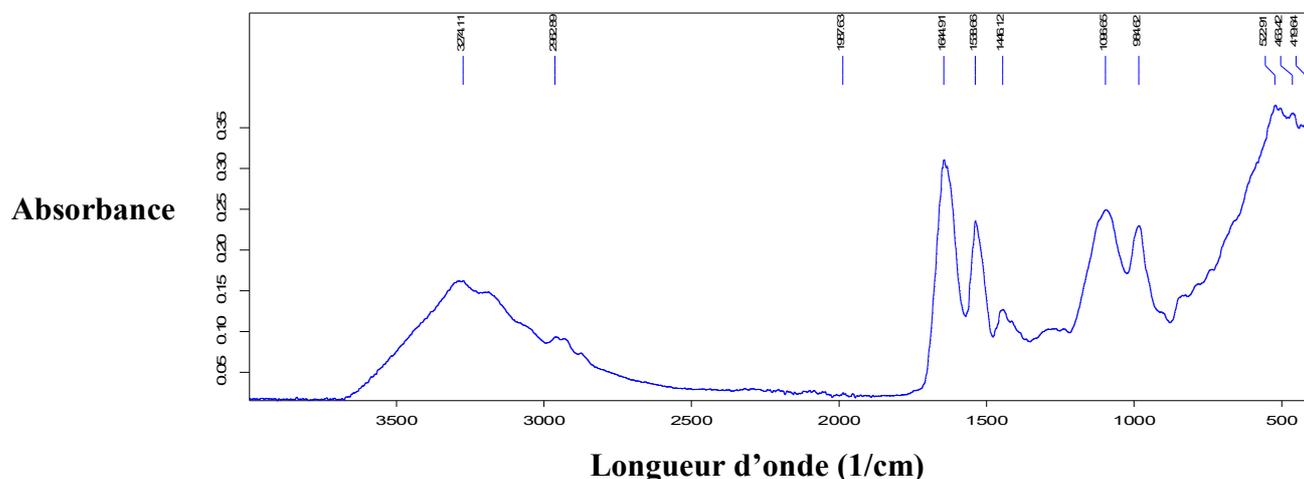
III.4.1. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

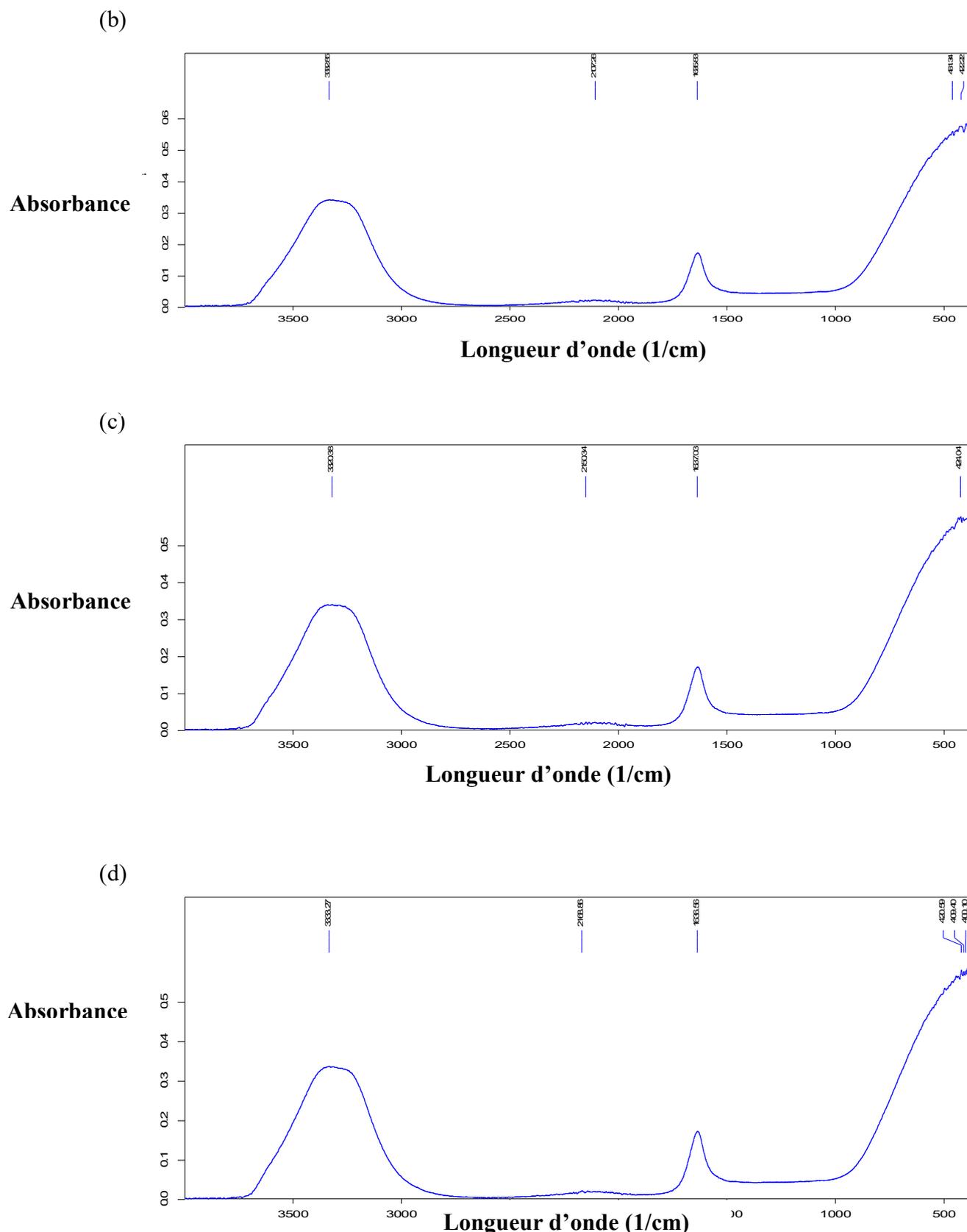
III.4.1.1. Effet du traitement thermique sur la structure secondaire de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

La spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier est l'une des techniques utilisée par plusieurs chercheurs pour la caractérisation de la structure secondaire des protéines des graines de légumineuses (Ngui *et al.*, 2021; Makeri *et al.*, 2017; Mune Mune *et al.*, 2016b).

Les figures 9 (a-d) et 10 (a-d) présentent respectivement les spectres IFTR (Spectroscopie Infra rouge à Transformé de Fourier) et les spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* traité à différentes températures.

(a)

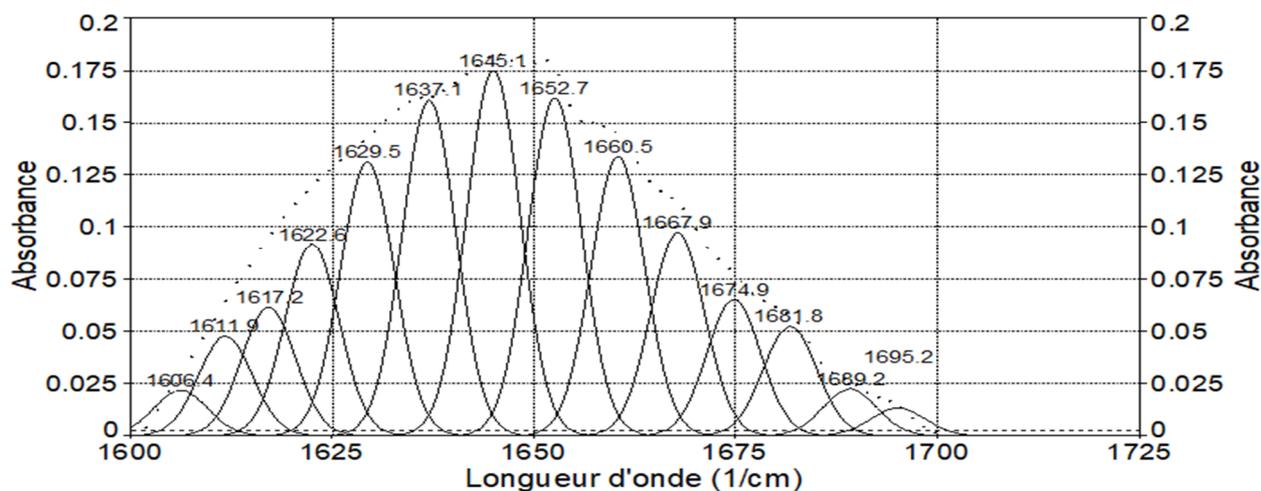




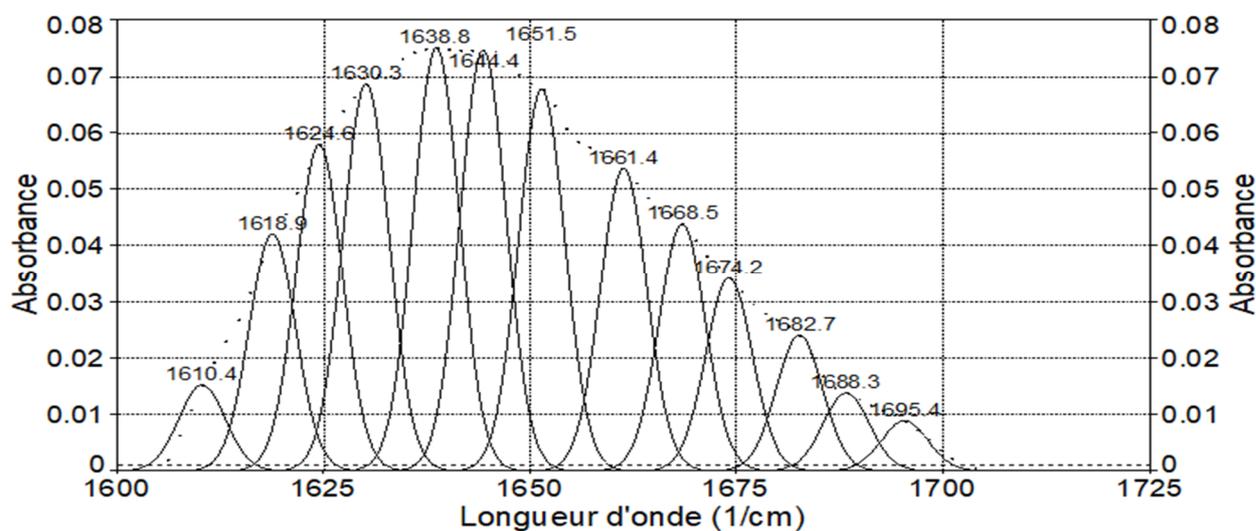
Les chiffres sur les graphes désignent les longueurs d'onde de chaque fragment du spectre

Figure 9 (a-d) : Spectres FTIR de l'isolat protéique à 25°C (a), 50°C (b), 70°C (c), 80°C (d).

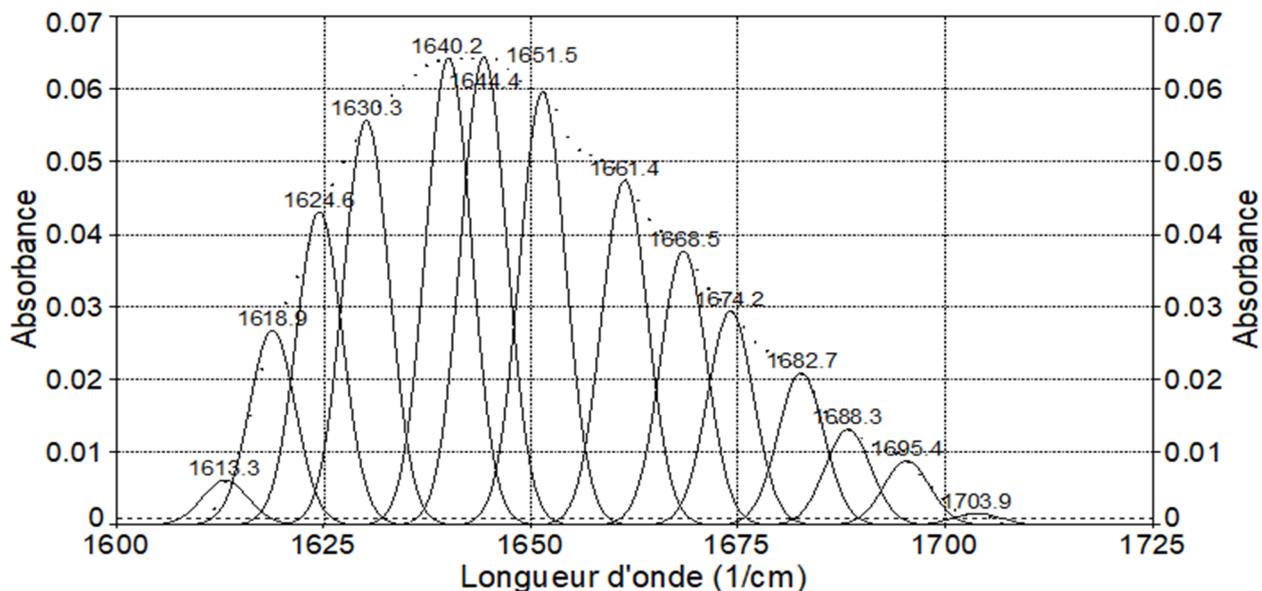
(a)



(b)



(c)



(d)

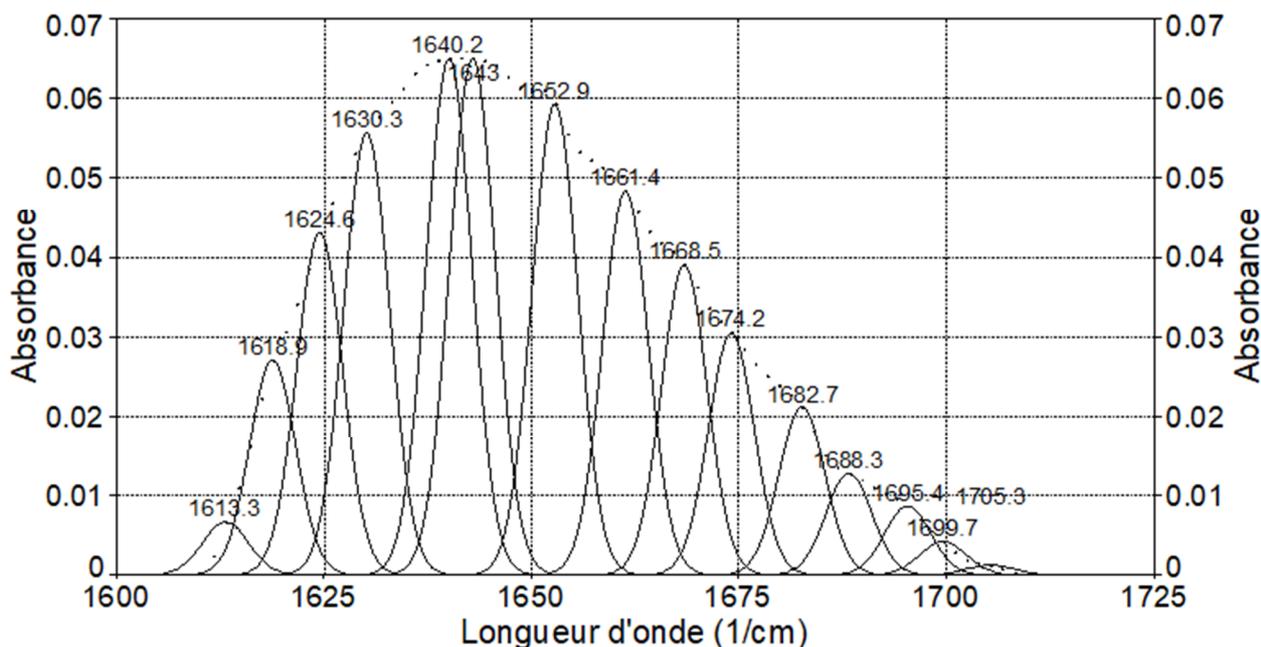


Figure 10 (a-d) : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'amide I de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* à 25°C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d).

L'analyse des pics révèle que ceux observés entre 1650-1656 cm^{-1} sont caractéristiques de l'hélice α tandis que ceux observés entre 1620-1640 cm^{-1} correspondent aux feuillets β -plissés. Les pics observés entre 1660-1700 cm^{-1} représentent le coude- β alors que ceux obtenus entre 1640-1644 cm^{-1} représentent les structures irrégulières (Figures 10 (a-d)). Les pourcentages relatifs des différentes structures secondaires en fonction de la température de traitement sont mentionnés dans le tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII : Effet du traitement thermique sur la structure secondaire de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Composition de la structure secondaire (%)				
Température	Coude- β (%)	Hélice- α (%)	Feuillet- β (%)	Structures irrégulières (%)
25°C	24,82±0,04 ^{d3}	26,81±0,05 ^{a2}	35,48±0,03 ^{c1}	12,88±0,1 ^{c4}
50°C	16,87±0,03 ^{b4}	23,77±0,04 ^{c3}	31,73±0,04 ^{e1}	27,63±0,04 ^{a2}
70°C	24,01±0,03 ^{c2}	12,49±0,01 ^{d4}	43,12±0,03 ^{a1}	20,38±0,03 ^{a3}
80°C	24,44±0,03 ^{b2}	12,29±0,03 ^{c4}	42,79±0,04 ^{d1}	20,47±0,03 ^{a3}

Dans la même colonne, les moyennes suivies des différentes lettres (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0.05$) différentes. Les moyennes suivies des nombres (1;2;3;4) dans la même ligne sont significativement ($p < 0.05$) différentes.

L'analyse de l'influence du traitement thermique sur la structure secondaire révèle qu'avant chauffage (25°C), l'isolat protéique est majoritairement constitué de feuillet- β (35,48 %) tandis que les structures irrégulières (12,88 %) constituent la conformation minoritaire. Les teneurs feuillet- β et Coude- β de notre isolat protéique sont inférieures aux teneurs en feuillet- β (41,11 %) et coude- β (37,97 %) rapportés par Mune Mune *et al.* (2016b) sur la farine délipidée des graines de *Moringa oléifera*, tandis que les teneurs en hélice- α et structures irrégulières sont plutôt supérieures aux teneurs en hélice- α (10,27 %) et structures irrégulières (10,65 %). Cette différence peut être due au stress subit par la protéine et au solvant utilisé durant le processus de préparation de l'isolat, ce qui a provoqué un réarrangement des conformations. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Wang *et al.* (2014) sur l'isolat protéique de soja. Ces auteurs ont montré que l'isolat protéique de soja était majoritairement constitué de feuillet- β (25 %) et minoritairement composé de structures irrégulières (13 %).

L'augmentation de la température a entraîné des variations des différentes conformations de l'isolat protéique. A 50°C, l'on constate une diminution des conformations feuillet- β (de 35,48 % à 31,73 %), hélice- α (de 26,81 % à 23,77%) et coude- β (de 24,88 % à 16,87 %) alors que les structures irrégulières augmentent (de 12,88 %, à 27,63 %), ce qui suggère un repliement de la protéine.

A 70°C, on observe une augmentation en feuillet- β (de 31,73 % à 43,12 %) et coude- β (de 16,87 % à 24,01 %) mais une diminution des conformations hélice- α (de 23,77 % à 12,49 %) et structures irrégulières (de 27,63 % à 20,38 %).

Lorsque la température de traitement est de 80°C, il n'est pas observé une variation importante des différentes conformations, ce qui suggère que la protéine devient stable au-delà de 70°C.

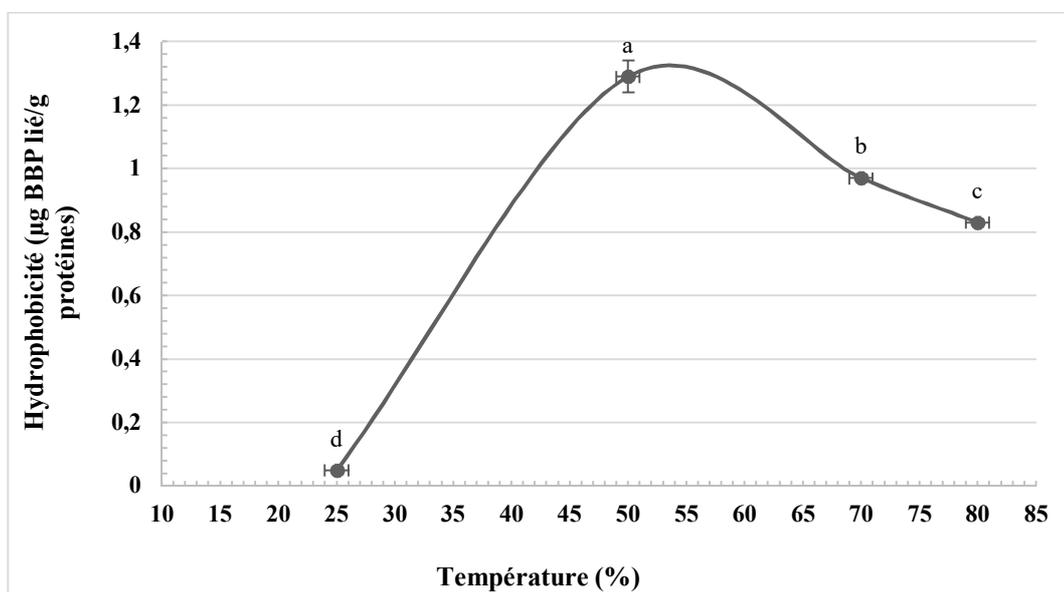
De même, lorsqu'on observe l'influence de la température de traitement sur la variation du core hydrophobe de la protéine [feuillet- β + hélice- α], il ressort que ce dernier diminue lorsqu'on passe de 25°C (62,29 %) à 50°C (55,5 %) puis devient stable entre 70°C (55,61 %) et 80°C (55,08 %), ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle l'isolat protéique a une structure compacte et stable à partir de 70°C. Toutefois, la conformation feuillet- β reste majoritaire quel que soit la variation de température, ce qui prédit de meilleures propriétés émulsifiantes mais une faible digestibilité.

III.4.1.2. Influence du traitement thermique sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

L'hydrophobicité des protéines est un paramètre physicochimique important lié à la conformation des protéines et facilite la compréhension de certaines propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, les propriétés émulsifiantes et moussantes lors des formulations alimentaires. L'hydrophobicité des protéines est influencée par des facteurs intrinsèques (la

composition en acide aminés, la taille et la forme) et extrinsèques (la température, le pH, la concentration en protéine et la force ionique).

L'influence du traitement thermique sur l'hydrophobicité (μg de BBP lié/g de protéines) de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* est présentée sur la figure 11 ci-dessous.



Les valeurs ayant au-dessus les différentes lettres (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différentes.

Figure 11 : Effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique.

Il ressort que l'hydrophobicité de l'isolat protéique est maximale ($1,29 \mu\text{g}$ BBP lié/g de protéines) à 50°C , puis diminue progressivement entre 70°C ($0,97 \mu\text{g}$ BBP lié/g de protéines) et 80°C ($0,83 \mu\text{g}$ BBP lié/g de protéines). L'hydrophobicité l'isolat protéique est faible à 25°C ($0,05 \mu\text{g}$ BBP lié/g de protéines). Ceci peut être dû à une plus grande exposition d'acides aminés hydrophiles à la surface de la protéine, augmentant ainsi les interactions avec le solvant.

En plus, l'étude de la structure secondaire de l'isolat a montré une faible teneur en structure irrégulières (12,88 %) à 25°C , ce qui suggère un faible repliement de la protéine. La forte hydrophobicité de l'isolat protéique à 50°C peut être liée au réarrangement observé dans sa structure secondaire. L'on a constaté une augmentation de la teneur en structure irrégulière (12,88 % à 25°C ; 27,63 % à 50°C) tandis que feuillet- β , hélice- α et coude- β diminuent. Cette observation suggère un repliement de la protéine au cours duquel les acides aminés hydrophiles qui étaient à la surface de la protéine se sont enfouis à l'intérieur de celle-ci, laissant place aux acides aminés hydrophobes qui, conformément aux résultats de la composition en acides aminés sont majoritaires. La diminution de l'hydrophobicité de l'isolat protéique au-delà de 50°C , peut être liée à un déplissement de la protéine illustré par la diminution de la teneur en structure irrégulière et en hélice- α .

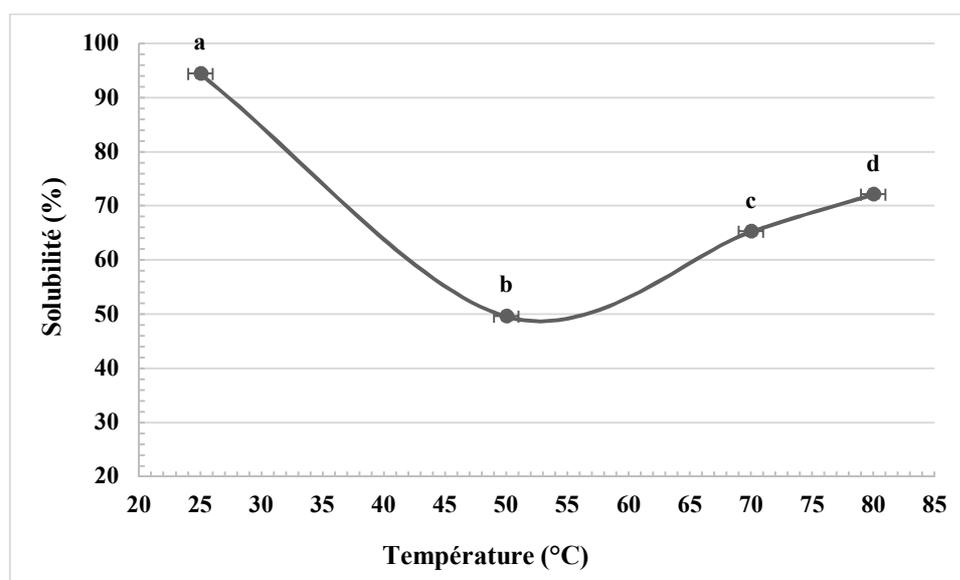
Nos résultats sont contraires à ceux de Ngui *et al.* (2021) qui ont rapportés que l'hydrophobicité de l'isolat protéique de pois bambara était maximale à 25°C et minimale à 50°C. Cette différence peut être attribuée à la nature du matériel végétal, aux compositions en acides aminés et en structures secondaires des échantillons.

III.4.2. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

III.4.2.1. Effet du traitement thermique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

La solubilité d'un ingrédient à divers pH conditionne son incorporation dans les boissons. Elle est aussi utile dans la formulation d'aliments pour enfants, de produits de boulangeries ou de desserts (Cheftel *et al.*, 1985).

La solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* a été étudiée en fonction de la température de traitement tel que le présente la Figure 12 ci -dessous.



Les valeurs ayant au-dessus les différentes lettres (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0.05$) différentes.

Figure 12 : Effet du traitement thermique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

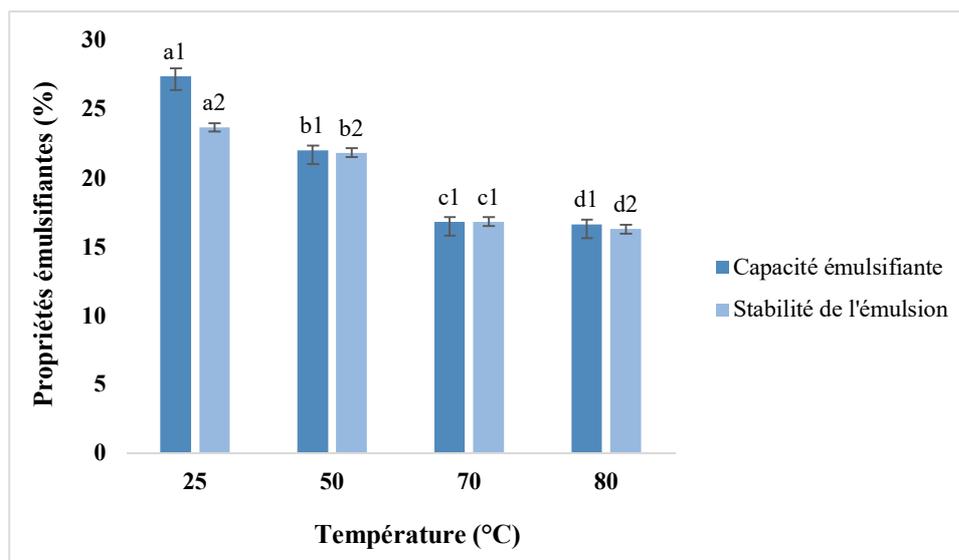
La courbe de la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* est sous forme d'une cloche (forme en U). La solubilité de l'isolat protéique est inversement proportionnelle à celle de l'hydrophobicité. La solubilité est maximale (94,44 %) à 25°C et minimale à 50°C.

On observe que l'augmentation de la température a provoqué une diminution de la solubilité passant de 94,44 % avant le chauffage à 49,63 % à 50°C. Au-delà de 50°C, la solubilité augmente allant de 65,28 % à 70°C à 72,14 % à 80°C. Mune Mune *et al.* (2016b) ont rapporté que la solubilité des protéines globulaire est généralement inversement corrélée à l'hydrophobicité. La forte solubilité de l'isolat protéique peut être due au fait que les acides aminés aromatiques et hydrophobes ne sont pas exposés à la surface, augmentant ainsi l'interaction avec le solvant. Elle peut aussi être liée à la teneur relativement élevée de la conformation coude- β qui donne plus de flexibilité à la protéine (Mune Mune *et al.*, 2016b). La solubilité de l'isolat protéique à des températures élevées indique son utilisation potentielle en industrie alimentaire notamment lors de la formulation des boissons et des produits laitiers.

III.4.2.2. Effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

Les propriétés émulsifiantes des ingrédients protéiques influencent la qualité et la texture de divers aliments tels que les potages et sauces, les produits de boulangerie, les produits laitiers, les produits carnés comme les saucisses, les produits de confiserie et de chocolaterie. Des études ont montré que les propriétés émulsifiantes des protéines sont influencées par des facteurs tels que la température, la concentration en protéines, la solubilité, l'hydrophobicité et la flexibilité moléculaire de la protéine et la présence de composés non protéiques (Mune Mune *et al.*, 2017).

La figure 13 ci-après présente l'effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.



Les histogrammes ayant au-dessus les lettres différentes (a,b,c,d) et les nombres différents (1;2;3;4) sont significativement ($p < 0.05$) différents.

Figure 13 : Effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

L'analyse de la figure 13 ci-dessus révèle qu'à température ambiante (25°C), la capacité émulsifiante de l'isolat protéique est maximale (27,47 %). Après traitement thermique, elle diminue allant de 22,04 % à 50°C à 16,85 % à 70°C puis tend à se stabiliser au-delà de 70°C. La forte capacité émulsifiante de l'isolat à 25°C peut être l'œuvre des acides aminés hydrophobes qui le composent. Li *et al.* (2019) ont rapporté que lorsque la teneur en acides aminés hydrophobes est importante, il y a une plus grande adsorption des protéines à l'interphase huile-eau, ce qui favorise l'émulsion.

La stabilité de l'émulsion de l'isolat protéique a la même allure que la capacité d'émulsion. La forte stabilité de l'émulsion à 25°C peut être liée à sa structure secondaire dans laquelle la teneur en conformation coude- β était élevée avec une faible teneur en structure irrégulières. Mune Mune *et al.* (2016b) ont rapporté qu'une teneur élevée de la conformation coude- β est importante pour la flexibilité de la protéine, ce qui contribue à la stabilisation de l'émulsion.

La variation de la stabilité de l'émulsion avec la température peut être due à un réarrangement moléculaire. Une plus grande stabilité de l'émulsion nécessite un réarrangement moléculaire des protéines qui diffuse à l'interface huile-eau empêchant ainsi la coalescence (Mune Mune *et al.*, 2018).

Il se dégage que les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* suivent la même tendance que la solubilité. Il a été rapporté que les propriétés émulsifiantes des protéines peuvent être influencées par l'hydrophobicité et la solubilité concomitamment ou individuellement. Dans le cas de notre étude, les propriétés émulsifiantes sont influencées par la solubilité et la flexibilité de l'isolat protéique. Adebisi et Aluko (2011), ont rapporté que l'isolat protéique de pois avait de meilleures propriétés émulsifiantes dans des conditions neutres.

Pour des formulations alimentaire nécessitant une capacité émulsifiante élevée, il est indiqué d'utiliser l'isolat protéique à 25°C.

Conclusion partielle

Au terme de cette partie qui consistait à effectuer une analyse compositionnelle de la farine délipidée des graines de *Moringa oléifera* et d'étudier l'influence de la température de traitement sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*, il ressort que :

La farine délipidée des graines de *Moringa oléifera* est majoritairement constituée de glucides totaux et protéines avec une faible quantité de cendres. L'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* est majoritairement constitué de protéines et une faible teneur en cendres. Les acides aminés hydrophobes et hydrophiles représentent près de 70 % de la composition en acides aminés. L'isolat contient tous les acides aminés essentiels en quantité supérieure à celle recommandée par la FAS/OMS. A température ambiante, l'isolat protéique est majoritairement constitué de feuillet- β tandis que les structures irrégulières constituent la conformation minoritaire. L'augmentation de la température de traitement entraîne des variations des différentes conformations de l'isolat protéique. Toutefois, la conformation feuillet- β reste majoritaire quel que soit la variation de température. L'hydrophobicité de l'isolat protéique est maximale à 50°C et minimale à température ambiante (25°C). La solubilité est maximale à 25°C et minimale à 50°C. La capacité émulsifiante de l'isolat protéique est maximale à 25°C, puis diminue après traitement thermique pour se stabiliser au-delà de 70°C. La stabilité de l'émulsion suit la même tendance que la capacité émulsifiante.

III.5. Fractionnement des protéines des graines de *Moringa oléifera*

III.5.1. pH-isoélectrique des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

Les courbes de turbidités des fractions albumine, globuline et glutéline en fonction du pH sont présentés sur la figure 14.

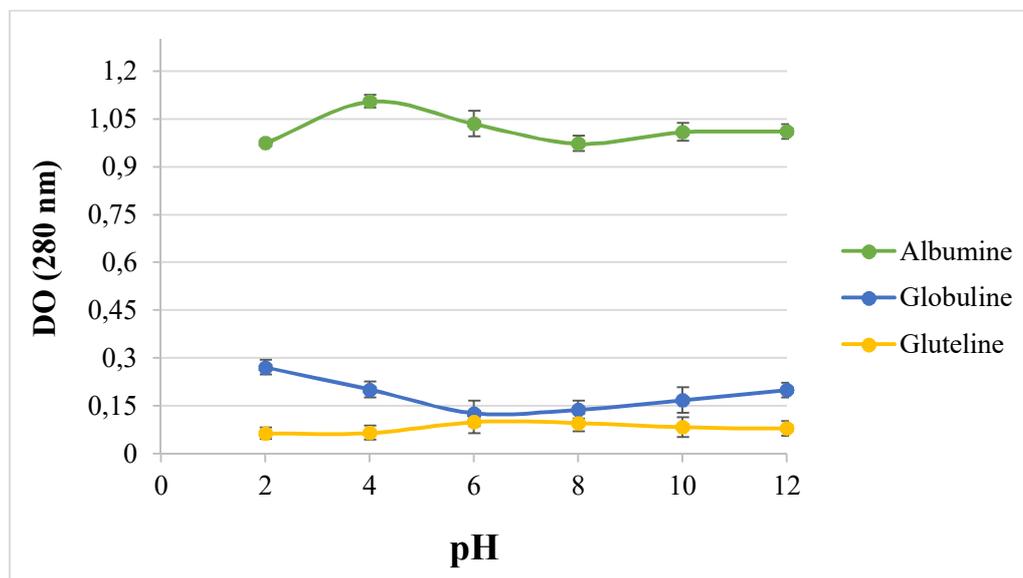


Figure 14: Courbes de turbidité des fractions albumine, globuline et glutéline en fonction du pH.

L'analyse des courbes de turbidité montre que les fractions albumine, globuline et glutéline avaient leur pHi à 4, 2 et 6 respectivement. Dans le cadre de nos travaux, il est à noter que sur les quatre principaux types de fractions protéiques des graines de légumineuses (les albumines, les globulines, les glutélines et les prolamines), deux sont extractibles en milieu acide notamment au pH 4 pour les albumines et au pH 2 pour les globulines. Ce résultat est en accord avec le pH solubilisation des protéines obtenu lors de la préparation de l'isolat protéique tel que mentionné dans la section III.2. Makeri *et al.* (2017) ont rapportés que les pHi_s des fractions albumine, globuline et glutéline du haricot étaient de 4, 3,5 et 5 respectivement ; tandis que les pHi_s des fractions albumine, globuline et glutéline du soja étaient de 3 ; 5 ; 6,5 respectivement.

III.5.2. Teneurs en protéines des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

Les teneurs en protéines des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera* sont présentés dans le tableau IX ci-après

Tableau IX : Teneurs en protéines d'extraction des fractions protéique des graines de *Moringa oléifera*.

	Albumine	Globuline	Prolamine	Glutéline	Résidu
Teneur en protéine (%)	30,49± 0,04 ^b	50,54± 0,03 ^a	2,64± 0,05 ^d	7,62± 0,01 ^c	8,71

Dans la même ligne, les moyennes suivies des différentes lettres (a,b,c,d,e) sont significativement ($p < 0.05$) différentes.

Le tableau ci-dessus montre que les graines de *Moringa oléifera* sont majoritairement constituées de globulines (50,54 %) et d'albumines (30,49 %), les prolamines étant la fraction minoritaire (2,64 %). Il ressort que 91,29 % de protéines sont extractibles avec 8,71 % de protéines non extractibles. Nos résultats sont similaires à ceux de Makeri *et al.* (2017) qui ont rapportés que les protéines des graines de soja et de haricot étaient majoritairement constituées des fractions albumines et globulines.

III.6. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

III.6.1. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés physicochimiques des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

III.6.1.1. Effet du traitement thermique sur la structure secondaire des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

L'effet du traitement thermique sur la structure secondaire des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera* est présenté dans le tableau X ci-après :

Tableau X: Effet du traitement thermique sur la structure secondaire des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*.

Fraction protéique	Composition de la structure secondaire (%)				
	Température	Coude- β (%)	Hélice- α (%)	Feuillet- β (%)	Structures irrégulières (%)
Albumines	25°C	29,71 \pm 0,03 ^{b2}	14,91 \pm 0,6 ^{d3}	48,98 \pm 0,05 ^{b1}	6,4 \pm 0,04 ^{d4}
Globulines		19,68 \pm 0,03 ^{e3}	24,96 \pm 0,04 ^{b2}	51,61 \pm 0,03 ^{a1}	3,75 \pm 0,05 ^{e4}
Glutélines		25,52 \pm 0,05 ^{c3}	12,94 \pm 0,05 ^{e4}	34,2 \pm 0,05 ^{d1}	27,34 \pm 0,04 ^{a2}
Prolamines		33,16 \pm 0,06 ^{a2}	15,91 \pm 0,05 ^{c4}	34,06 \pm 0,05 ^{d1}	16,87 \pm 0,05 ^{b3}
Albumines	50°C	30,21 \pm 0,05 ^{a2}	16,4 \pm 0,04 ^{d3}	46,87 \pm 0,03 ^{b1}	6,52 \pm 0,03 ^{d4}
Globulines		16,92 \pm 0,03 ^{b3}	23,51 \pm 0,05 ^{c2}	44,52 \pm 0,05 ^{c1}	15,04 \pm 0,6 ^{b4}
Glutélines		13,46 \pm 0,05 ^{c3}	31,25 \pm 0,04 ^{b2}	51,91 \pm 0,06 ^{a1}	3,39 \pm 0,06 ^{e4}
Prolamines		11,88 \pm 0,05 ^{d2}	39,9 \pm 0,05 ^{a1}	39,36 \pm 0,05 ^{d1}	8,86 \pm 0,03 ^{e3}
Albumines	70°C	15,61 \pm 0,03 ^{e3}	33,08 \pm 0,05 ^{c2}	37,66 \pm 0,03 ^{b1}	13,65 \pm 0,03 ^{b4}
Globulines		29,92 \pm 0,05 ^{b2}	42,73 \pm 0,05 ^{b1}	23,51 \pm 0,05 ^{d3}	3,84 \pm 0,05 ^{d4}
Glutélines		20,63 \pm 0,08 ^{d2}	57,42 \pm 0,05 ^{a1}	18,74 \pm 0,05 ^{e3}	3,21 \pm 0,06 ^{e4}
Prolamines		44,63 \pm 0,05 ^{a1}	11,77 \pm 0,05 ^{e3}	36,94 \pm 0,05 ^{e2}	6,66 \pm 0,03 ^{e4}
Albumines	80°C	15,6 \pm 0,05 ^{d3}	16,01 \pm 0,03 ^{d2}	56,88 \pm 0,03 ^{a1}	11,51 \pm 0,08 ^{d4}
Globulines		24,95 \pm 0,05 ^{a2}	3,57 \pm 0,05 ^{e4}	51,59 \pm 0,05 ^{b1}	19,88 \pm 0,05 ^{b3}
Glutélines		17,01 \pm 0,5 ^{c3}	27,47 \pm 0,05 ^{a2}	51,56 \pm 0,05 ^{b1}	3,96 \pm 0,03 ^{e4}
Prolamines		13,11 \pm 0,05 ^{e4}	24,27 \pm 0,04 ^{b2}	47,19 \pm 0,06 ^{c1}	15,44 \pm 0,08 ^{c3}

Les moyennes suivies de lettres différentes (a,b,c,d,e) dans la même colonne et à chaque température sont significativement ($p < 0,05$) différentes. Les moyennes suivies de chiffres différents (1;2;3;4) dans la même ligne sont significativement ($p < 0,05$) différentes.

Les résultats de la structure secondaire des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera* montrent qu'à température ambiante, la conformation feuillets- β est majoritaire dans toutes les fractions à des proportions variées comme suit : albumine (48,98 %), globuline (51,01%), glutéline (34,2%) et prolamine (34,06%). Les structures irrégulières ont une faible teneur dans les fractions albumine (6,4 %) et globuline (3,75 %) tandis que dans les fractions prolamine (27,34 %) et glutéline (16,87 %) leurs teneurs sont supérieures à celle de l'hélice- α (12,94 % et 15,91 % respectivement). La teneur relativement élevée en structures irrégulières dans ces deux fractions suggère une structure pliée. Le repliement de ces fractions peut être lié au stress subit lors de l'évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif en ce qui concerne la fraction prolamine d'une part et d'autre part, aux conditions d'extraction (pH et solution basique utilisée) pour ce qui est de la fraction glutéline.

Plusieurs études antérieures ont rapportés que la conformation feuillet- β était majoritaire dans les protéines et fractions protéiques des graines de légumineuses comme le pois bambara, le soja et le *Moringa* (Ngui *et al.*, 2021 ; Makeri *et al.*, 2017 ; Mune Mune *et al.*, 2016b).

L'augmentation de la température de traitement a induit des modifications conformationnelles dans les fractions protéiques.

Dans la fraction albumine, la proportion [feuillet- β + hélice- α] représentant le core hydrophobe de la protéine augmente lorsque la température augmente, allant de 63,27 % à 50°C à 72,89 % à 80°C. La même observation est faite avec les structures irrégulières, suggérant une dénaturation de la fraction albumine lorsque la température de traitement augmente.

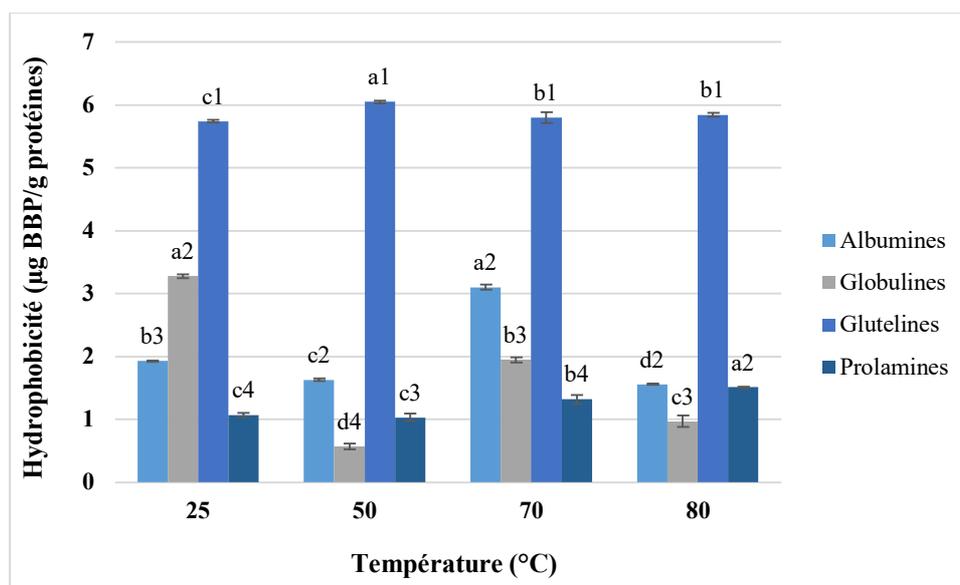
On note par contre dans la fraction globuline, une diminution du core hydrophobe de la protéine lorsque la température de traitement augmente, passant de 68,03 % (à 50°C) à 55,16 % (à 80°C). Il en est de même pour les structures irrégulières, ce qui indique un phénomène d'association/agrégation suivie d'une dissociation de la protéine (Achouri *et al.*, 2012).

En ce qui concerne la fraction glutéline, lorsque la teneur en feuillet- β augmente, on observe une diminution de la teneur en hélice- α . Toutefois, la proportion [feuillet- β + hélice- α] reste au-dessus de 75 % quel que soit la température de traitement, ce qui indique que la glutéline a une structure compacte (Achouri *et al.*, 2012).

Quant à la fraction prolamine, le core hydrophobe de la protéine était élevé à 50°C (79,26 %) et à 80°C (71,46 %) tandis qu'il était inférieur à 50 % lorsque la température de traitement atteint 70°C (48,71 %). A cette température (70°C), la conformation coude- β était majoritaire (44,63 %), ce qui suggère une certaine flexibilité de la protéine, prédisant une meilleure solubilité. Les teneurs élevées en feuillet- β et hélice- α constituent la principale caractéristique des protéines de réserve globulaires (Ellepola *et al.*, 2005).

III.6.1.2. Effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

L'effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera* est présenté la figure 15 ci-après :



Les histogrammes ayant des lettres différentes (a,b,c,d) pour chaque échantillon sont significativement ($p < 0,05$) différents.
 Les histogrammes ayant des chiffres différents (1;2;3;4) à la même température sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 15: Effet du traitement thermique sur l'hydrophobicité des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*.

L'hydrophobicité des fractions protéiques a une tendance quasi équilibrée après traitement thermique. Les fractions globuline (3,28 µg de BPB lié/g de protéine) et albumine (1,93 µg de BPB lié/g de protéine) traitées à température ambiante ont présenté une hydrophobicité significativement plus élevée ($p < 0,05$) en comparaison aux fractions ayant subies des traitements thermiques (sauf pour la fraction albumine chauffée à 70°C ; 3,1 µg de BPB lié/g de protéine). Ce résultat est en contradiction avec le comportement de la fraction prolamine rapporté par les travaux de Ngui *et al.* (2021). Ces auteurs ont rapportés que lorsque la fraction prolamine était soumise à un traitement thermique, il résultait une plus large exposition des résidus hydrophobes à la surface de la protéine, entraînant ainsi une augmentation de l'hydrophobicité.

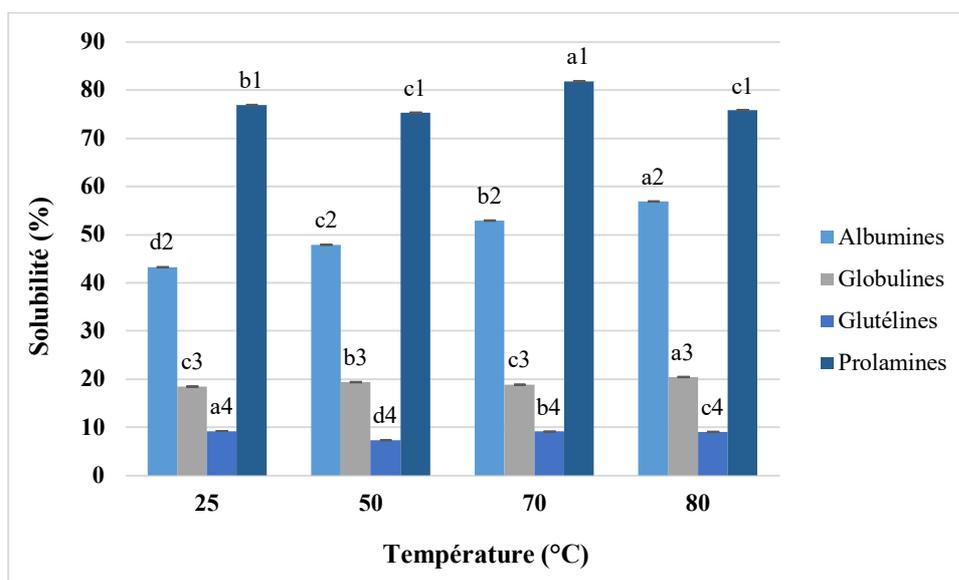
L'hydrophobicité de la fraction glutéline est significativement ($p < 0,05$) supérieure à celle des autres fractions protéiques quel que soit la température de traitement. La forte hydrophobicité de la fraction glutéline peut être due à sa microstructure irrégulière et compacte. En outre, les interactions entre les résidus d'acides aminés polaires entraînent des répulsions électrostatiques à l'origine du dépliement de la protéine avec exposition des acides aminés hydrophobes à la surface de la protéine, provoquant l'augmentation de l'hydrophobicité (Jiang *et al.* 2015). La diminution de l'hydrophobicité pourrait également être liée à la faible exposition des groupes hydrophobes induite par le traitement thermique (Stanciuc *et al.*, 2015).

Une forte hydrophobicité des protéines favorise l'absorption d'huile et les propriétés émulsifiantes qui nécessitent une adsorption à la surface des protéines, mais diminuent généralement la solubilité et les propriétés fonctionnelles qui lui sont associées (Li *et al.* 2019).

III.6.2. Effet du traitement thermique sur quelques propriétés fonctionnelles des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

III.6.2.1. Effet du traitement thermique sur la solubilité des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

La solubilité des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera* en fonction de la température de traitement est présentée sur la figure 16 ci-après.



Les histogrammes ayant des lettres différentes (a,b,c,d) pour chaque échantillon sont significativement ($p < 0,05$) différents.
Les histogrammes ayant des chiffres différents (1;2;3;4) à la même température sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 16 : Effet du traitement thermique sur la solubilité des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*.

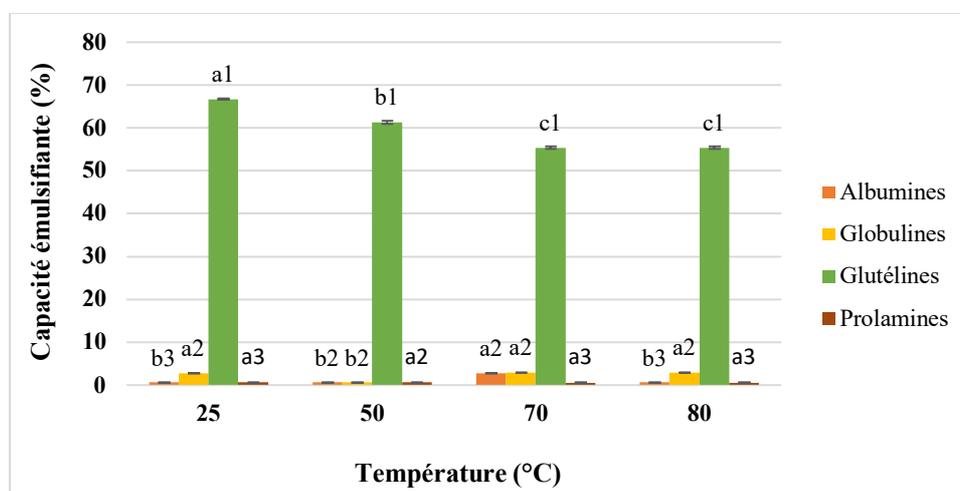
L'analyse de l'influence de la température de traitement sur la solubilité des fractions protéiques montre que la solubilité des fractions albumine et prolamine était fortement influencée par le traitement thermique, tandis que celle des fractions globuline et glutéline était moins sensible à la température. Toutes les fractions ont présenté une solubilité appréciable à 25°C. La fraction prolamine avait la plus grande solubilité à 25°C (76,9 %) tandis que la fraction glutéline présentait la plus faible solubilité (9,21 %). La forte solubilité de la fraction prolamine traitée à température ambiante comparativement à la solubilité des autres fractions est en accord avec sa faible hydrophobicité observée à température ambiante (1,07 μg BBP lié/g de protéines). La fraction prolamine était probablement plus soluble en raison de sa dénaturation

au cours du processus d'extraction, ce qui a favorisée une plus large exposition d'acides aminés hydrophiles au contact avec l'eau environnante.

Après traitement thermique, les fractions albumine et globuline étaient plus solubles à 80°C, pendant que les fractions glutéline et prolamine avaient une forte solubilité à 70°C. La solubilité des fractions albumine, globuline et glutéline étaient inversement corrélée à leur hydrophobicité. Mune Mune *et al.* (2016b) ont rapportés que la solubilité des protéines globulaires est généralement négativement corrélée à leur hydrophobicité. La forte solubilité des protéines peut être attribuée à leur flexibilité mais aussi à la dissociation des oligomères et au dépliement des polypeptides. Elle peut aussi être liée à la teneur élevée en conformation coude- β qui confère une plus grande flexibilité à la protéine (Mune Mune *et al.*, 2016b). La forte solubilité des fractions albumine, globuline et prolamine à des températures élevées montre qu'elles peuvent être exploitées dans la formulation des boissons et produits laitiers.

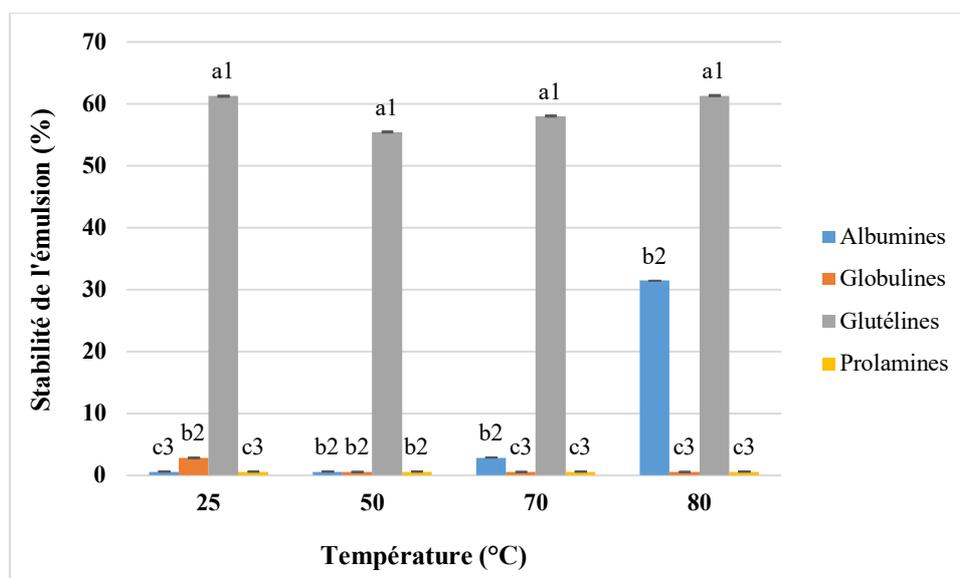
III.6.2.2. Effet du traitement thermique sur les propriétés émulsifiantes des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

Les figures 17 et 18 ci-après présentent respectivement l'effet du traitement thermique sur la capacité émulsifiante et la stabilité de l'émulsion des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*.



Les histogrammes ayant des lettres différentes (a,b,c) pour chaque échantillon sont significativement ($p < 0,05$) différents.
Les histogrammes ayant des chiffres différents (1;2;3) à la même température sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 17 : Effet du traitement thermique sur la capacité émulsifiante des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*



Les histogrammes ayant des lettres différentes (a,b,c) pour chaque échantillon sont significativement ($p < 0,05$) différents. Les histogrammes ayant des chiffres différents (1;2;3) à la même température sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 18 : Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'émulsion des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera*

L'analyse de l'influence de la température de traitement sur la capacité émulsifiante des fractions protéique des graines de *Moringa oléifera* montre qu'à température ambiante, la fraction glutéline présente la capacité émulsifiante la plus élevée (66,73 %) tandis que les trois autres fractions ont des capacités émulsifiantes très faibles. La variation de la température entraîne une diminution de la capacité émulsifiante de la fraction glutéline, alors qu'il n'y a pas de changement important avec les autres fractions. La fraction glutéline a une capacité émulsifiante supérieure à 50 % quel que soit la température. La forte capacité émulsifiante de la fraction glutéline peut être due à sa forte hydrophobicité et à sa structure compacte qui facilite l'adsorption à l'interface huile-eau. Pour des formulations nécessitant une bonne capacité émulsifiante, la fraction glutéline peut être utilisée à température ambiante.

La stabilité de l'émulsion de toutes les fractions suit la même tendance que la capacité émulsifiante sauf pour la fraction albumine où l'émulsion était plus stable à 80°C (31,44 %). Ceci peut être dû à un réarrangement moléculaire induit par la température, prévenant ainsi la coalescence.

Adebiyi et Aluko (2011) ont rapporté que la fraction glutéline des petits pois présentait de meilleures propriétés émulsifiantes à température ambiante.

III.7. Effet de la composition en protéines sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour tester la significativité de la régression. Les résultats sont présentés dans le tableau XI. Il en ressort que le modèle polynomial de premier ordre pour l'hydrophobicité, la solubilité et les propriétés émulsifiantes de l'isolat de protéique des graines de *Moringa oléifera* représentaient significativement ($p < 0,05$) les données. Ainsi, le modèle de premier ordre a été utilisé pour visualiser l'effet des fractions protéiques solubles sur l'hydrophobicité, la solubilité et les propriétés émulsifiantes de l'isolat de protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Tableau XI : Les coefficients et leurs significativités, le coefficient de corrélation multiple ajusté (R^2 ajusté) et la probabilité du modèle.

Coefficients	Hydrophobicité	Solubilité	Capacité émulsifiante	Indice de stabilité de l'émulsion
a₀	43,03*	-247,22*	-85,51*	137,80*
a₁	-0,36*	-3,38*	-	-1,85*
a₂	-0,49*	-	2,68*	-
a₃	-2,14*	67,31*	-	-6,83*
a₄	-	-20,37*	1,64 ⁿ	-
R² ajusté	0,983	0,992*	0,933	0,911
Probabilité	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

*Significatif à 5% ($p < 0,05$).

ⁿNon significatif ($p > 0,05$).

Les graphiques présentant les surfaces de réponse ont été utilisés pour illustrer les effets de deux fractions protéiques (pourcentage de fraction soluble) sur l'hydrophobicité, la solubilité et les propriétés émulsifiantes de l'isolat de protéique des graines de *Moringa oléifera*. Les valeurs des deux autres fractions protéiques solubles ont été fixées à 25°C dans l'équation polynomiale utilisée.

III.7.1. Effet de la composition protéique sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

La figure 19 ci-dessous présente la surface de réponse de l'hydrophobicité de l'isolat protéique en fonction des fractions globuline et glutéline solubles.

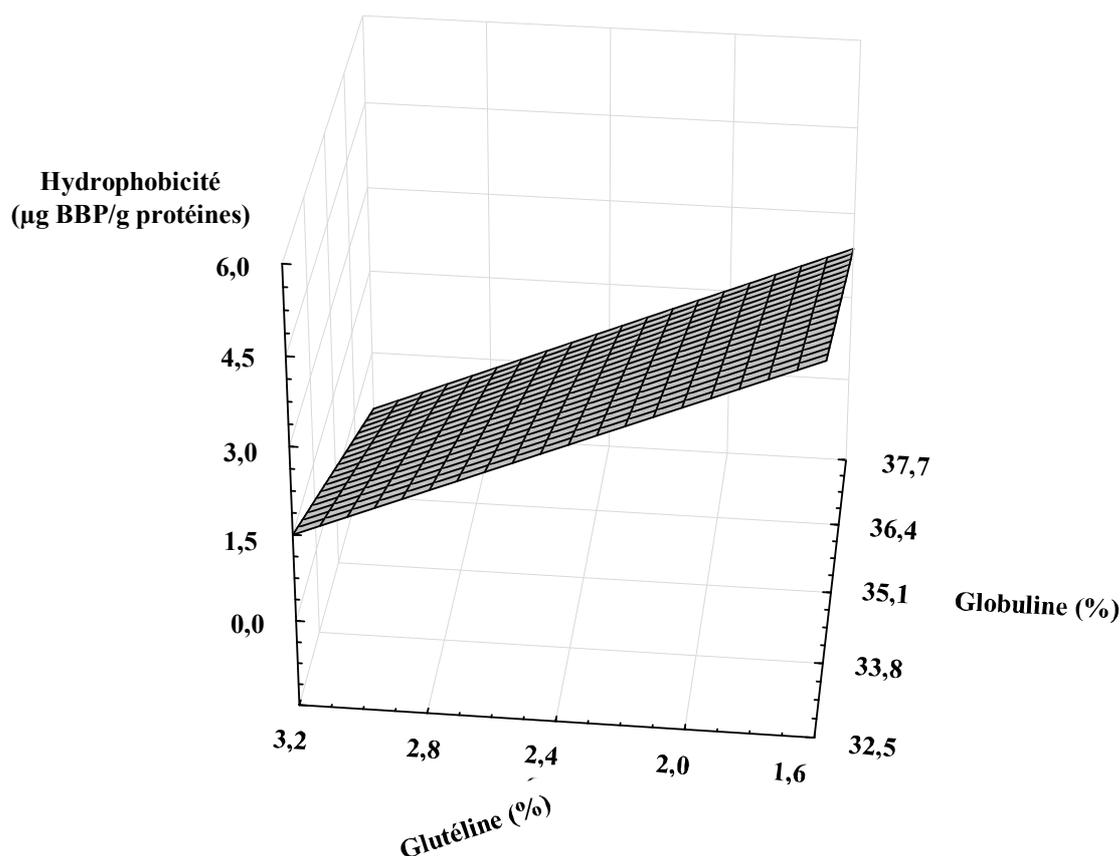


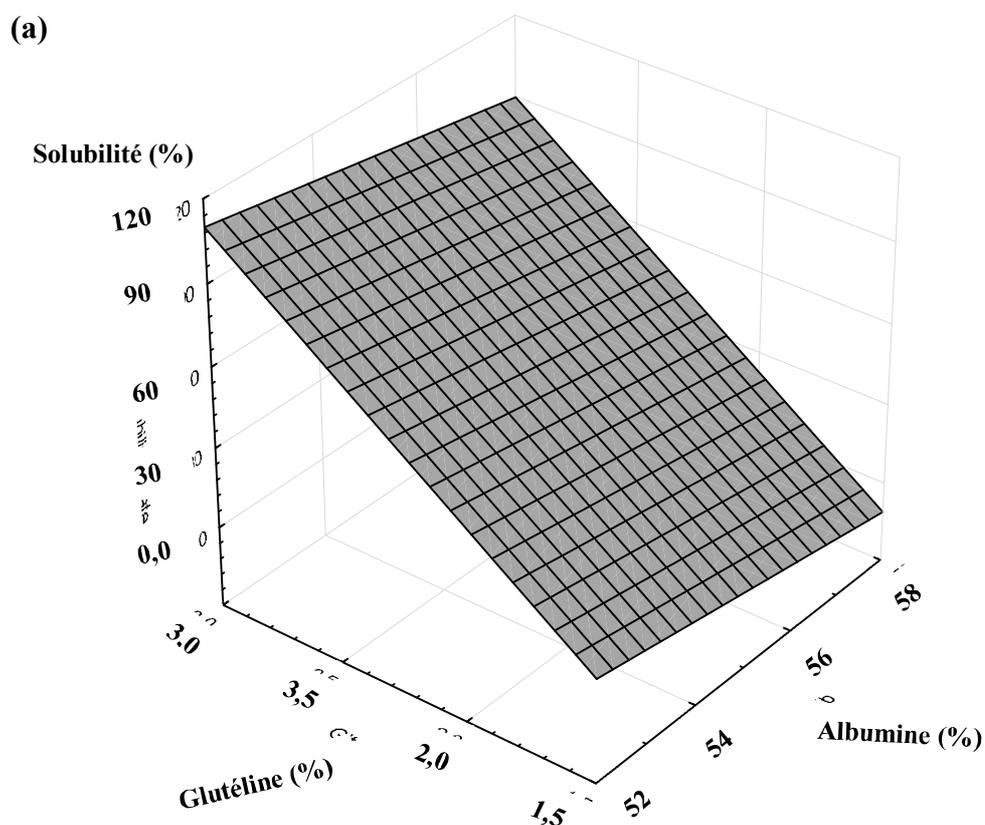
Figure 19 : Surface de réponse montrant l'effet des fractions globuline et glutéline solubles sur l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Il ressort que l'hydrophobicité de l'isolat de protéique des graines de *Moringa oléifera* était significativement ($p < 0,05$) influencée par la variation du pourcentage d'albumine, de globuline et de glutéline solubles (Tableau XI). Une augmentation du pourcentage d'albumine, de la globuline et de la glutéline solubles entraînait une diminution de l'hydrophobicité de l'isolat de protéique. La baisse de l'hydrophobicité de l'isolat était plus importante lorsque le pourcentage de glutéline soluble était élevé, comparativement aux fractions albumine et globuline. La fraction prolamine n'a pas significativement ($p > 0,05$) affecté l'hydrophobicité de l'isolat protéique.

Le traitement thermique a probablement favorisé les interactions hydrophobes entre les protéines, provoquant une diminution l'hydrophobicité. L'hydrophobicité est une propriété physicochimique importante qui affecte les propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, les propriétés émulsifiantes et moussantes. Au cours des formulations alimentaires, il est important d'appliquer un traitement thermique adéquat sur l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* afin de diminuer le ratio de glutéline soluble dans l'optique d'améliorer hydrophobicité.

III.7.2. Effet de la composition protéique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

L'influence de la composition protéique sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* est présentée sur la figure 20 (a-b).



(b)

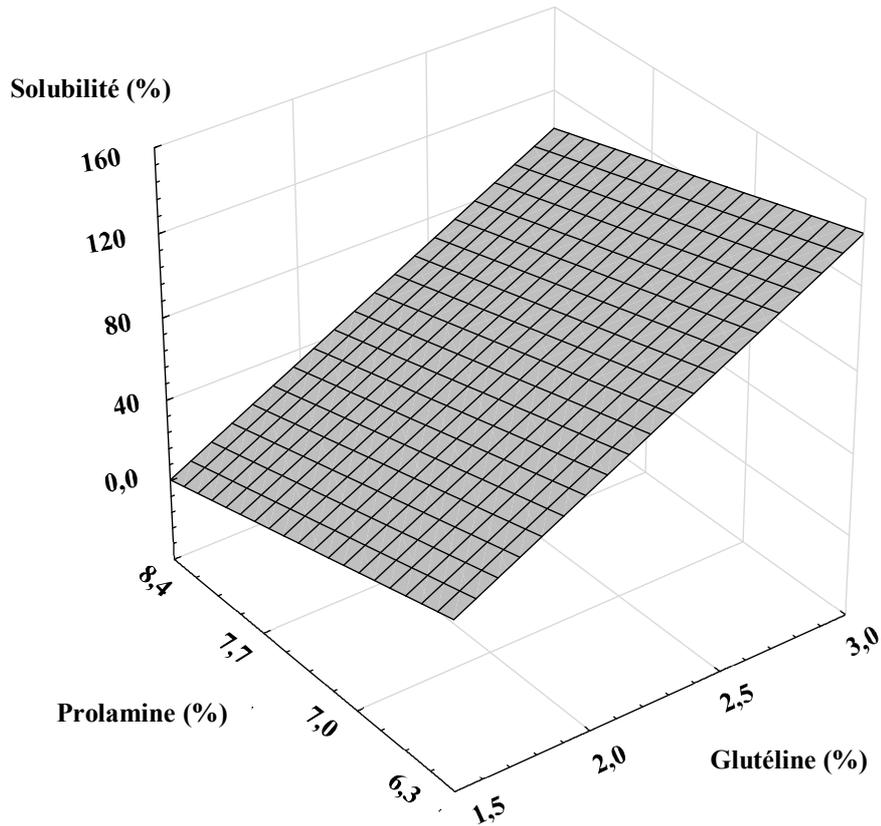


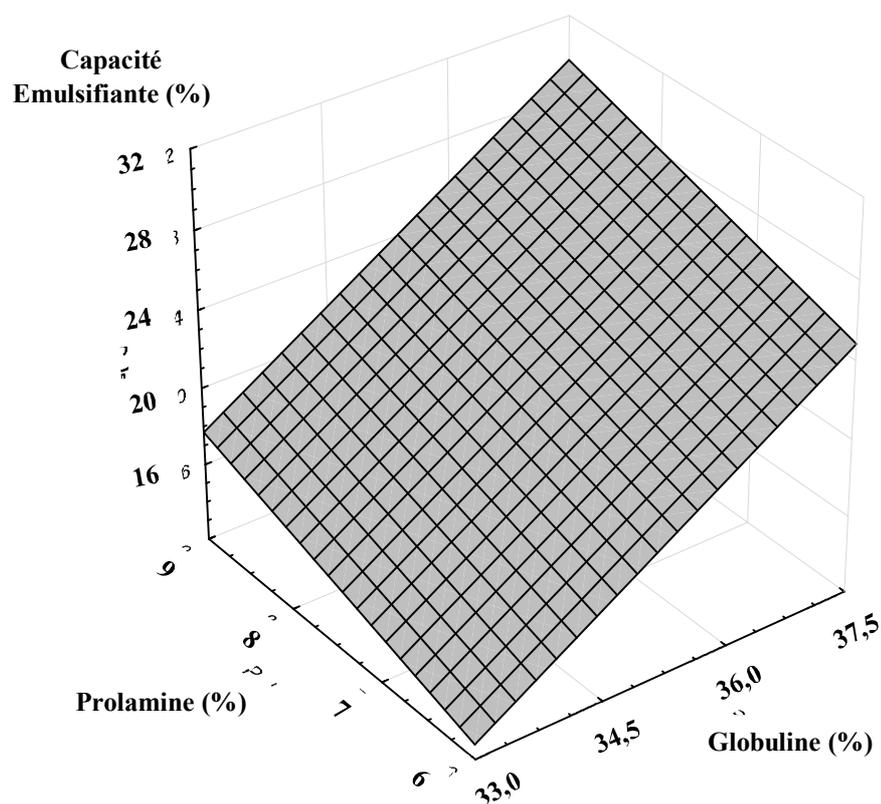
Figure 20 (a-b) : Surface de réponse montrant l'effet des fractions albumine et glutéline solubles (a), glutéline et prolamine solubles (b) sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

La solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* pendant le traitement thermique était probablement un phénomène complexe impliquant des interactions protéine-protéine et protéine-eau. Ceci est dû au fait que l'augmentation de la solubilité était liée à l'augmentation de la glutéline soluble, et à la diminution de l'albumine et de la prolamine solubles. La globuline n'a pas significativement ($p > 0,05$) la solubilité de l'isolat. Le taux d'augmentation de la solubilité était élevé pour la glutéline, et le taux de diminution était élevé pour la prolamine. De plus, la solubilité de l'isolat a probablement impliqué des modifications conformationnelles des protéines puisqu'il y avait une corrélation négative ($r = -0,99$, $p < 0,00$) entre la solubilité et l'hydrophobicité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* après traitement thermique.

III.7.3. Effet de la composition protéique sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*

Les diagrammes de surfaces de réponse montrant l'influence des fractions globuline et prolamine et des fractions albumine et glutéline sur la capacité émulsifiante (a) et l'indice de stabilité de l'émulsion (b) sont présentés sur la figure 21 (a-b).

(a)



(b)

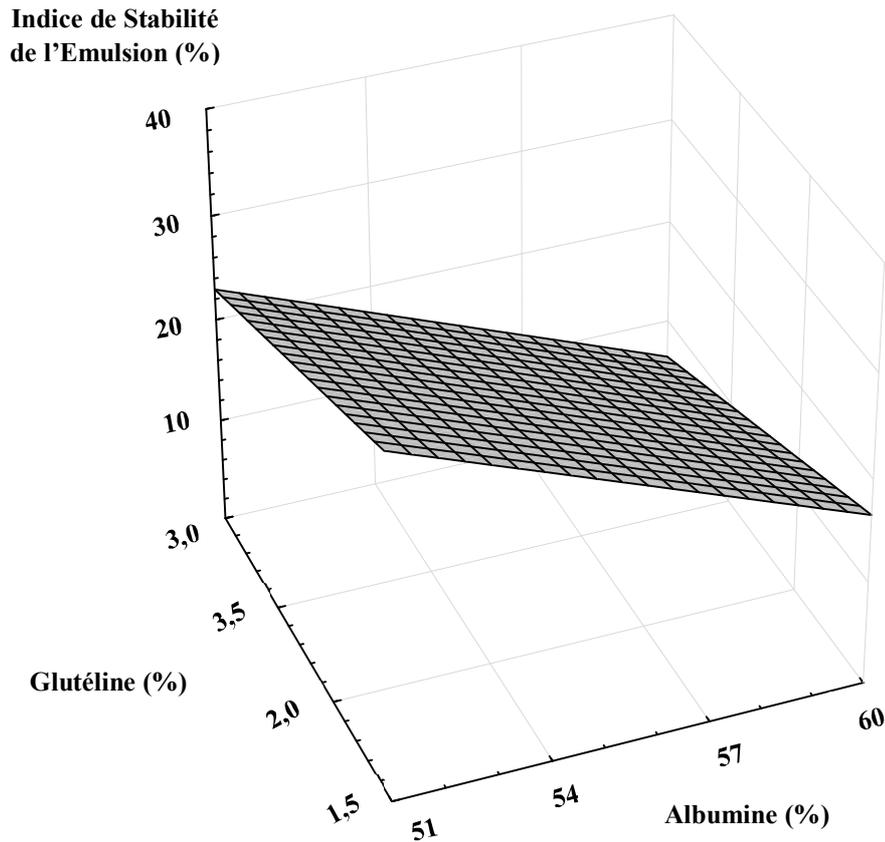


Figure 21 (a-b) : Surface de réponse montrant l'effet des fractions albumine et glutéline solubles (a), glutéline et prolamine solubles (b) sur la solubilité de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Il ressort que la capacité émulsifiante de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* a été significativement ($p < 0,05$) influencée par la variation de globuline soluble. L'albumine, la prolamine et la glutéline n'ont pas significativement ($p > 0,05$) la capacité émulsifiante (CE) de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Le mécanisme de stabilisation de l'émulsion de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* a été différent de celui de la CE, dans la mesure où l'indice de stabilité de l'émulsion (ISE) a été significativement ($p < 0,05$) affecté par l'albumine et la glutéline soluble (Tableau XI). La CE augmente avec le pourcentage de globuline soluble, tandis que l'ISE diminue avec l'augmentation du pourcentage d'albumine et de glutéline solubles (Fig. 22b-22c). L'augmentation de la CE avec la globuline est probablement due à leur structure globulaire et à leur flexibilité moléculaire, car une flexibilité élevée améliore l'adsorption de la protéine à l'interface huile-eau. L'ISE de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* a probablement impliqué l'hydrophobicité et la flexibilité moléculaire en plus de leur solubilité.

Conclusion partielle

L'objectif de cette partie consistait à analyser l'influence de la composition en protéines sur quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Il en ressort que les pHis des fractions albumine, globuline et glutéline étaient de 4 ; 2 et 6 respectivement. La globuline constituait la fraction majoritaire tandis que la prolamine était la fraction minoritaire. A température ambiante la conformation feuillets- β était majoritaire dans toutes les fractions à des proportions variées. Le traitement thermique a induit des modifications conformationnelles dans les fractions protéiques. Le core hydrophobe de la fraction albumine augmentait lorsque la température de traitement augmente contrairement au core hydrophobe de la globuline qui diminuait. Le core hydrophobe de la fraction prolamine était élevé à 50°C et à 80°C mais faible à 70°C. L'hydrophobicité de la fraction glutéline est significativement ($p < 0,05$) supérieure à celle des autres fractions protéiques. La solubilité des fractions albumine et prolamine était fortement influencées par la température tandis que celle des fractions globuline et glutéline était moins sensibles à la température de traitement. Après traitement thermique, les fractions albumine et globuline étaient plus solubles à 80°C, pendant que les fractions glutéline et prolamine avaient une forte solubilité à 70°C. La capacité émulsifiante de la fraction glutéline était plus élevée à température ambiante et tendait à décroître après traitement thermique. Les trois autres fractions avaient des capacités émulsifiantes très faibles à température ambiante. Le traitement thermique ne provoquait pas de changement important. La stabilité de l'émulsion de toutes les fractions suivait la même tendance que la capacité émulsifiante sauf pour la fraction albumine où l'émulsion était plus stable à 80°C. En plus du traitement thermique, la composition en protéine influençait les propriétés technofonctionnelles de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*. Une augmentation du pourcentage d'albumine, de globuline et de glutéline entraînait une diminution de l'hydrophobicité de l'isolat de protéique. La solubilité de l'isolat protéique augmentait avec le taux de glutéline soluble. Le pourcentage de globuline soluble n'a pas significativement ($p > 0,05$) affecté la solubilité de l'isolat. La CE augmente avec le pourcentage de globuline soluble, tandis que l'ISE diminue avec l'augmentation du pourcentage d'albumine et de glutéline solubles.

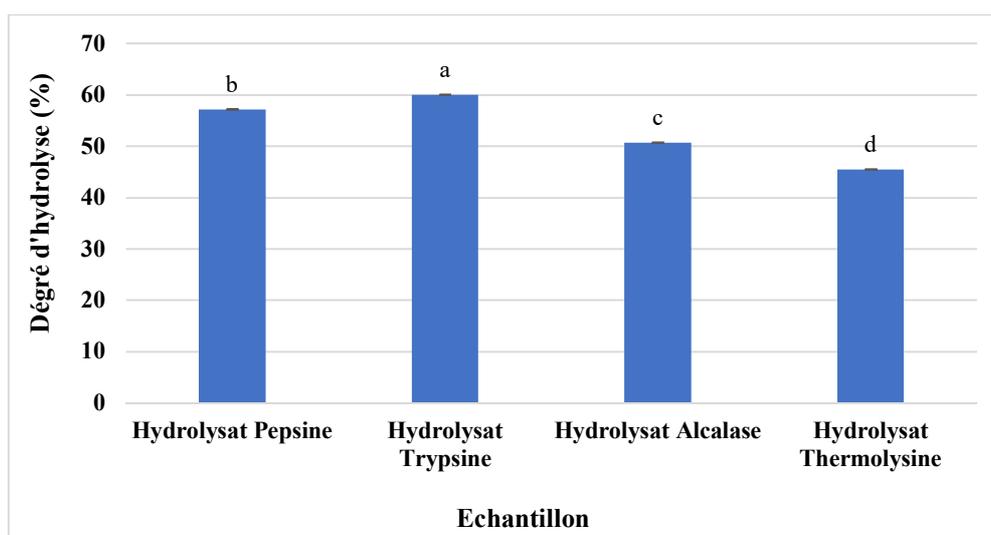
III.8. Analyse de quelques activités bioactives des hydrolysats protéiques issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines des graines de *Moringa oléifera*

III.8.1. Degrés d'hydrolyse des hydrolysats des graines de *Moringa oléifera*

L'évaluation du degré d'hydrolyse a pour objectif de vérifier la quantité de protéines digérée par l'enzyme au cours de l'hydrolyse. Cette dernière étant liée à l'action catalytique de l'enzyme, permet ainsi de suivre la protéolyse (Hsu, 2010).

Les conditions d'hydrolyse telles que la température, le pH, la pression, le temps de réaction ainsi que d'autres facteurs comme le rapport enzyme-substrat et le degré d'hydrolyse ont une influence sur les propriétés chimiques spécifiques des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines (Udenigwe et Aluko, 2012 ; Kilara et Chandan, 2011).

La figure 22 ci-après présente les degrés d'hydrolyse des hydrolysats protéiques issus de l'hydrolyse des protéines des graines de *Moringa oléifera* à l'aide de la pepsine, la trypsine, l'alcalase et la thermolysine respectivement.



Les histogrammes ayant au dessus des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 22 : Degrés d'hydrolyse des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera*

Il ressort de l'analyse de la figure 22 ci-dessus que la trypsine a le plus grand degré d'hydrolyse (60,07 %) suivi de la pepsine (57,14 %), de l'alcalase (50,68 %) et enfin de la thermolysine (45,45 %). Les différentes valeurs des degrés d'hydrolyse obtenues indiquent que ces quatre protéases ont hydrolysé la protéine via des liaisons peptidiques différentes, en

fonction de leurs spécificités, avec production des peptides présentant des compositions et fonctions différentes (Vaštag *et al.*, 2014).

En effet, la spécificité de clivage de la pepsine inclut les peptides comportant un acide aromatique de part et d'autre de la liaison peptidique, surtout si l'autre résidu est également un acide aminé aromatique ou dicarboxylique. Une susceptibilité accrue à l'hydrolyse se produit s'il y a un acide aminé contenant du soufre à proximité de la liaison peptidique. La pepsine clive aussi préférentiellement le côté carboxyle de la phénylalanine et de la leucine, et dans une moindre mesure le côté carboxyle des résidus d'acide glutamique.

La trypsine quant à elle clive les peptides sur le côté C-terminal des résidus lysine et arginine. La vitesse d'hydrolyse de cette réaction est ralentie si un résidu acide se trouve de part et d'autre du site de clivage et l'hydrolyse est arrêtée si un résidu proline se trouve du côté carboxyle du site de clivage.

L'alcalase est une endoprotéase de type sérine qui rompt les liaisons peptidiques des acides aminés non terminaux. L'alcalase pourrait également augmenter le nombre de sites N-terminaux pour l'action de l'exopeptidase.

La thermolysine est une métallo-endopeptidase extracellulaire thermostable (thermophile) contenant quatre ions calcium qui hydrolysent les liaisons protéiques sur le côté N-terminal des résidus d'acides aminés hydrophobes (Voet et Voet, 2004).

Les degrés d'hydrolyse des hydrolysats pepsine et trypsine de notre étude sont supérieurs aux degrés d'hydrolyse des hydrolysats pepsine (29,93 %) et trypsine (10,31 %) des graines de *Moringa oléifera* rapportés par Olusola *et al.* (2018). Le degré d'hydrolyse de l'hydrolysat alcalase est supérieur aux degrés d'hydrolyse des hydrolysats alcalase du potiron (*Cucurbitaceae cucurbita maxima*) (26,94 %) et des tourteaux de courge (41,76 %) rapportés par Vaštag *et al.* (2014) et Vaštag *et al.* (2013) respectivement. Le degré d'hydrolyse de l'hydrolysat thermolysine de notre étude est supérieur aux degrés d'hydrolyse de l'hydrolysat thermolysine des protéines du pois bambara (22 %) et de l'hydrolysat thermolysine des protéines des graines de dattes (11,49 %) rapportés par Mune Mune *et al.* (2018) et par Priyatharini *et al.* (2015) respectivement.

La spécificité de l'enzyme utilisée pour la protéolyse et les conditions d'hydrolyse, ainsi que la nature du substrat protéique, affectent les propriétés physicochimiques des hydrolysats et la libération des peptides bioactifs (Mune Mune *et al.*, 2018). Il a été rapporté que le type de protéase utilisé ainsi que le degré d'hydrolyse obtenu, peuvent affecter l'activité antioxydante des hydrolysats protéiques (Jessika Gonçalves *et al.*, 2018).

III.8.2. Effets antioxydants *in vitro* des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera*

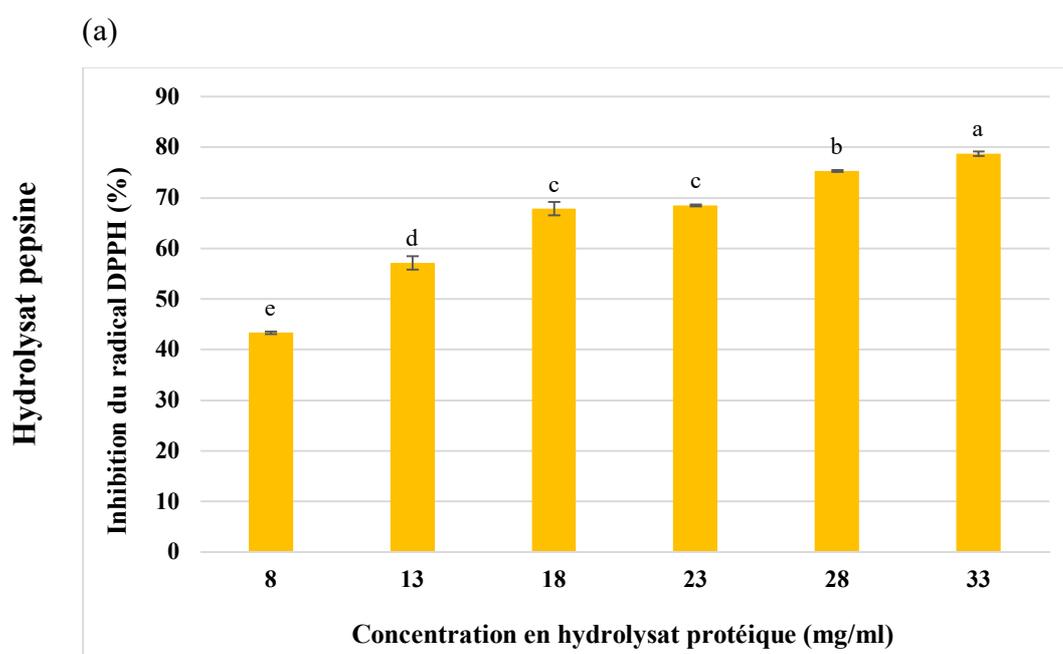
Les propriétés antioxydantes *in vitro* peuvent être déterminées à travers leur capacité *in vitro* à piéger les radicaux libres, à réduire les ions, à chélater les métaux et à inhiber l'oxydation des lipides (Nwachukwu & Aluko, 2018).

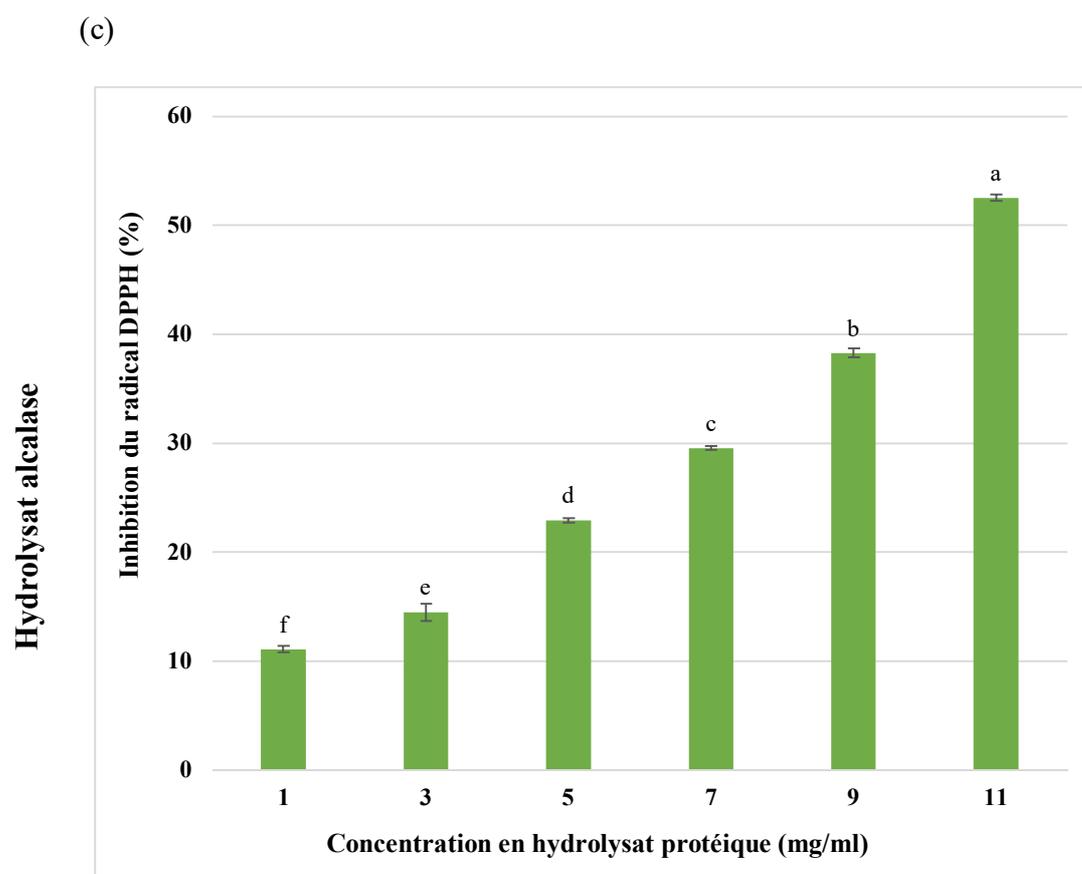
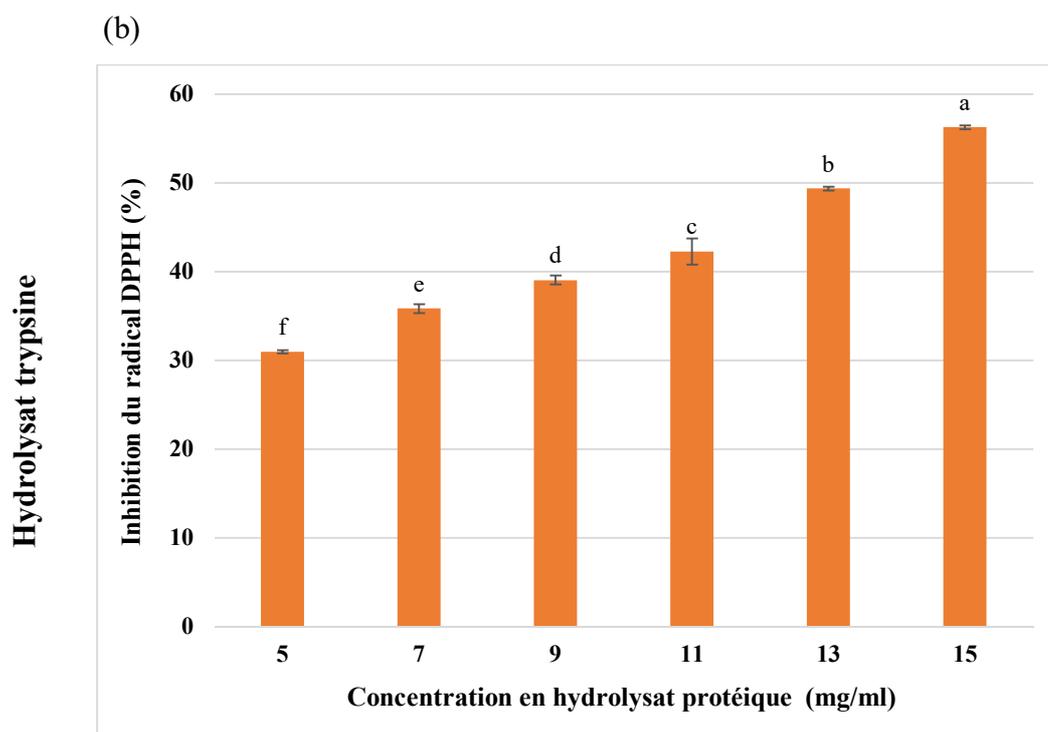
Dans ce travail nous avons choisi 2 mécanismes à savoir : le piégeage des radicaux libres et la réduction des ions.

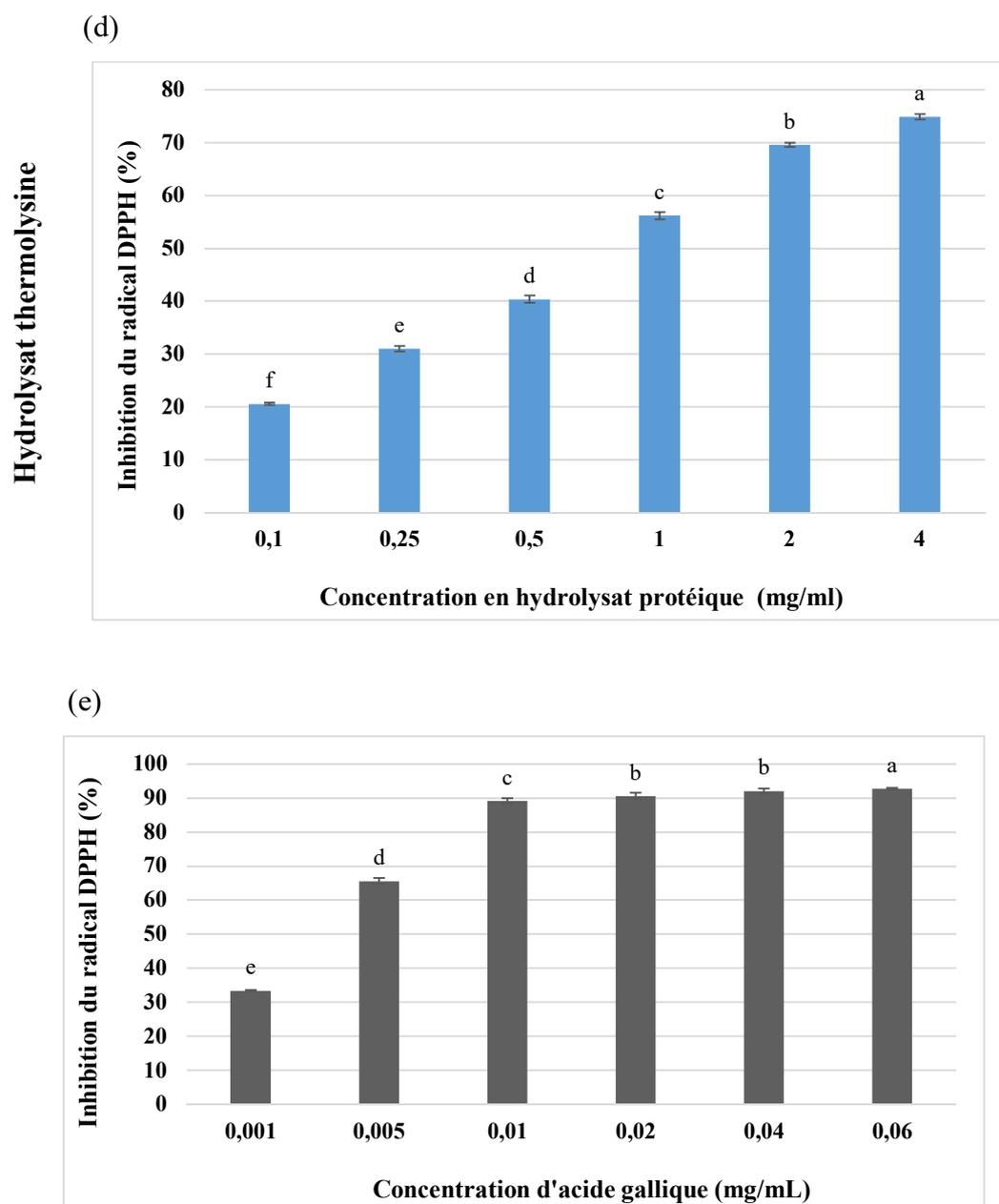
III.8.2.1. Effet des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur le piégeage du radical libre DPPH^{*}

Le radical DPPH^{*} a été largement utilisé comme réactif pour l'étude de l'activité antiradicalaire de diverses substances antioxydantes (Sanchez-Moreno, 2002). Le DPPH est un radical libre stable qui accepte un électron ou un radical hydrogène pour se transformer en une molécule diamagnétique stable.

La figure 23 (a-e) ci après présente l'activité inhibitrice du radical DPPH en fonction de la concentration en hydrolysat pepsine (a), hydrolysat trypsine (b), hydrolysat alcalase (c), hydrolysat thermolysine (d) des protéines des graines de *Moringa oléifera* et en acide gallique (e) comme référence, tandis que le tableau XII présente les concentration de piégeage 50 (CP₅₀) des hydrolysats et de l'acide gallique.







Les histogrammes ayant au dessus des lettres différentes (a,b,c,d,e, f) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 23 (a-e) : Activité inhibitrice du radical DPPH en fonction de la concentration en hydrolysats pepsine (a), trypsine (b), alcalase (c) et thermolysine (d) des protéines des graines de *Moringa oléifera* et en acide gallique (e).

Tableau XII: CP_{50} des hydrolysats protéiques et de l'acide gallique sur le radical DPPH

Hydrolysats	Pepsine	Trypsine	Alcalase	Thermolysine	Acide gallique
CP_{50} (mg/mL) DPPH	$10,03^{c \pm 0,005}$	$13,3^{d \pm 0,04}$	$10,47^{c \pm 0,02}$	$0,74^{b \pm 0,005}$	$0,0021^{a \pm 0,006}$

CP_{50} : Concentration de Piégeage 50

Les chiffres ayant en indice des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

De la figure 23, il ressort que le piégeage du radical DPPH augmente avec la concentration en hydrolysats protéiques. Les pourcentages de piégeage variaient de 43,35%-78,68% ; de 30,97%-56,27% ; de 11,1%-52,53% ; de 20,57%-74,89% respectivement pour les hydrolysats pepsine, trypsine, alcalase et thermolysine.

D'après le tableau XII, l'hydrolysat thermolysine a été le plus efficace ($CP_{50} = 0,74$ mg/mL), suivi de l'hydrolysat pepsine ($CP_{50} = 10,03$ mg/mL), de l'hydrolysat alcalase ($CP_{50} = 10,47$ mg/mL) et de l'hydrolysat trypsine ($CP_{50} = 13,3$ mg/mL). Cependant les différents hydrolysats ont été moins efficaces que l'acide gallique ($CP_{50} = 0,0021$ mg/mL). Plusieurs études antérieures ont rapporté une activité antiradicalaire DPPH concentration dépendante avec les hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera*, de niébé, de canola, de colza et de soja (Olusola *et al.*, 2018 ; Shuangli *et al.*, 2013 ; Cumby *et al.*, 2008 ; Yoshie-Stark, 2008).

Par ailleurs, on observe sur le plan de la sensibilité au radical DPPH que la concentration minimale en hydrolysat nécessaire pour piéger le radical DPPH variait d'un hydrolysat à un autre ; l'hydrolysat thermolysine étant le plus sensible. Zahra *et al.* (2020) ont rapporté que les hydrolysats ayant les acides aminés hydrophobes réagissent plus rapidement avec les radicaux DPPH comparativement aux hydrolysats majoritairement constitués d'acides aminés hydrophiles. Cette sensibilité peut être attribuée à une augmentation des chaînes latérales contenant des acides aminés hydrophobes, ce qui facilite la réaction avec les radicaux libres DPPH.

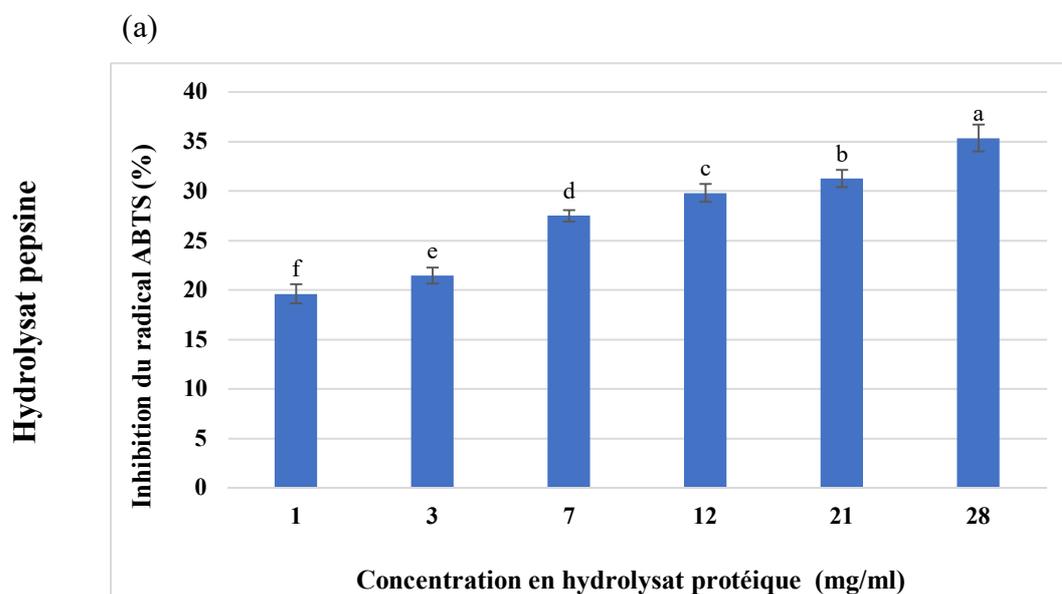
Nos résultats sont en accord avec la composition en acides aminés des protéines des graines de *Moringa oléifera* qui est de 37,4 %. On relève ainsi que l'hydrolysat pepsine dont la sensibilité est plus faible en termes de réaction avec le radical DPPH présente une CP_{50} moins élevée que les hydrolysats alcalase et trypsine. Néanmoins, l'hydrolysat thermolysine reste le plus sensible au radical DPPH et présente la meilleure CP_{50} . Il apparaît donc que le contrôle adéquat des paramètres d'hydrolyse et la sélection de l'enzyme pendant la préparation de l'hydrolysat protéique des graines de *Moringa oléifera* pourraient améliorer l'activité de piégeage du DPPH après l'ingestion orale en accord avec les travaux de Mune *et al.* (2018) sur l'hydrolysat protéique de pois Bambara. Les CP_{50} des hydrolysats pepsine et thermolysine sont en accord avec la spécificité de ces enzymes qui hydrolysent des liaisons peptidiques des acides aminés hydrophobes et aromatiques lesquelles ont une forte réactivité avec le radical DPPH. Les peptides dont la chaîne est composée d'acides aminés hydrophobes et aromatiques peuvent facilement piéger le radical DPPH (Kim *et al.*, 2007).

Les activités antiradicalaires DPPH des hydrolysats pepsine, trypsine et alcalase de notre étude sont plus faibles que celles rapportés par Adeola *et al.* (2014) avec sur les hydrolysats protéiques des graines de canola australien. Les différences observées entre les sensibilités au radical DPPH et les CP₅₀ peuvent être attribuées à la composition en acide aminés, au poids moléculaires, à la taille et à la source de protéine ayant servi à la préparation des hydrolysats protéiques.

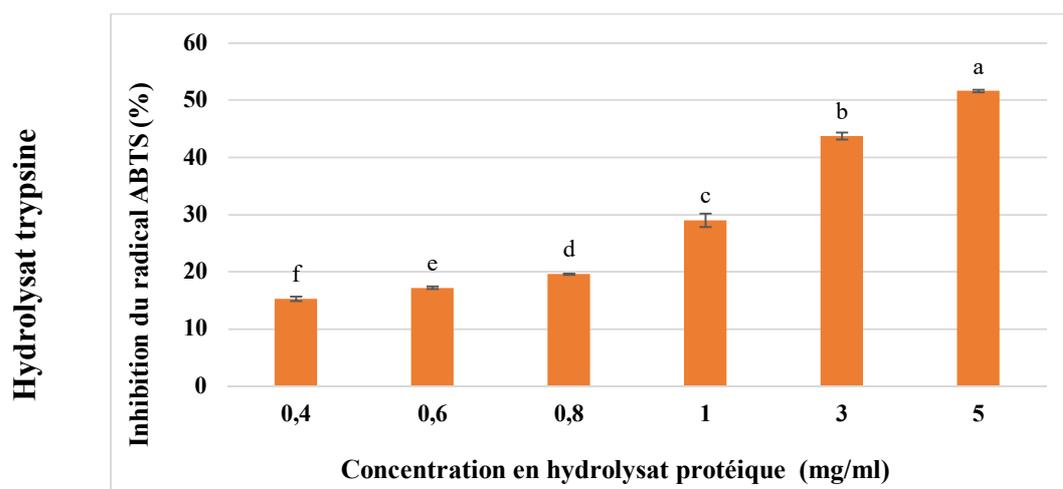
III.8.2.2. Effet des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur le piégeage du radical libre ABTS^{•+}

Tout comme le radical DPPH, le radical ABTS^{•+} est fortement indiqué comme radical pour étudier le potentiel antiradicalaire *in vitro* des antioxydants (Joginder *et al.*, 2015).

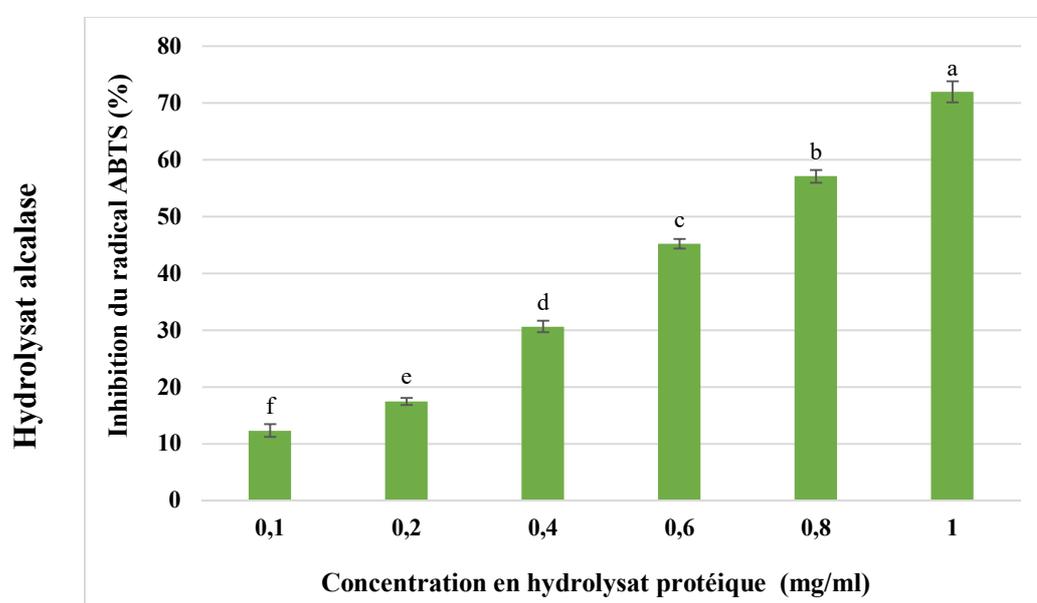
La figure 24 (a-e) présente l'activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} en fonction de la concentration en hydrolysat pepsine (a), hydrolysat trypsine (b), hydrolysat alcalase (c), hydrolysat thermolysine (d) des protéines des graines de *Moringa oléifera* et en acide gallique (e) comme référence, tandis que le tableau XIII présente les concentration de piégeage 50 (CP₅₀) des hydrolysats et de l'acide gallique.



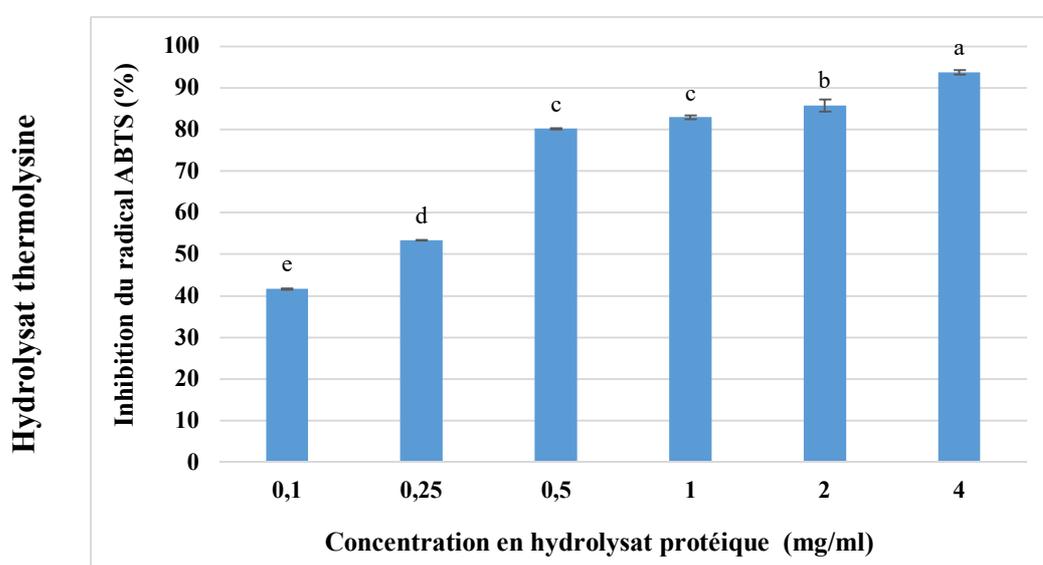
(b)



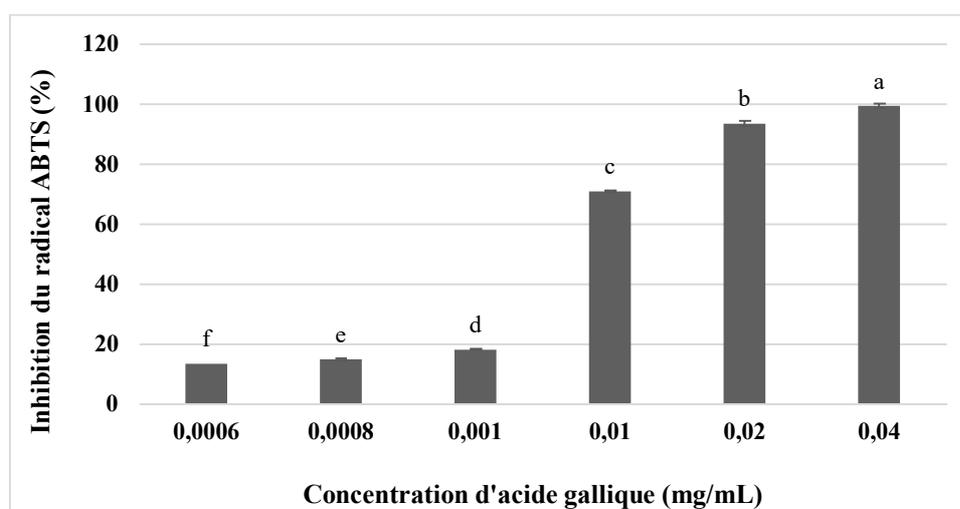
(c)



(d)



(e)



Les histogrammes ayant au dessus des lettres différentes (a,b,c,d,e, f) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 24 (a-e) : Activité inhibitrice du radical $ABTS^{++}$ en fonction de la concentration en hydrolysats pepsine (a), trypsine (b), alcalase (c) et thermolysine (d) des protéines des graines de *Moringa oléifera* et en acide gallique (e).

Tableau XIII: CP_{50} des hydrolysats protéiques et de l'acide gallique sur le radical $ABTS^{++}$

Hydrolysats	Pepsine	Trypsine	Alcalase	Thermolysine	Acide gallique
CP_{50} (mg/mL) $ABTS$	/	$4,47^d \pm 0,003$	$0,63^c \pm 0,005$	$0,15^b \pm 0,001$	$0,0035^a \pm 0,004$

CP₅₀: Concentration de Piégeage 50

Les chiffres ayant en indice des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

De la figure 24, il ressort que le piégeage du radical $ABTS^{++}$ augmente avec la concentration en hydrolysats protéiques. Les pourcentages de piégeage variaient de 19,63%-35,38% ; de 15,29%-51,62% ; de 12,32%-71,93% ; de 41,68%-93,73% respectivement pour les hydrolysats pepsine, trypsine, alcalase et thermolysine.

D'après le tableau XIII, l'hydrolysats thermolysine a été le plus efficace ($CP_{50} = 0,15$ mg/mL), suivi de l'hydrolysats alcalase ($CP_{50} = 0,63$ mg/mL), de l'hydrolysats trypsine ($CP_{50} = 4,47$ mg/mL) et de l'hydrolysats pepsine ($CP_{50} =$ Non déterminé). Cependant les différents hydrolysats ont été moins efficaces que l'acide gallique ($CP_{50} = 0,0035$ mg/mL). Plusieurs études antérieures ont rapporté une activité piègeuse du radical $ABTS^{++}$ concentration dépendante avec les hydrolysats protéiques de canola australien et de curcuma (*Curcuma longa* L.), (Adeola *et al.*, 2014).

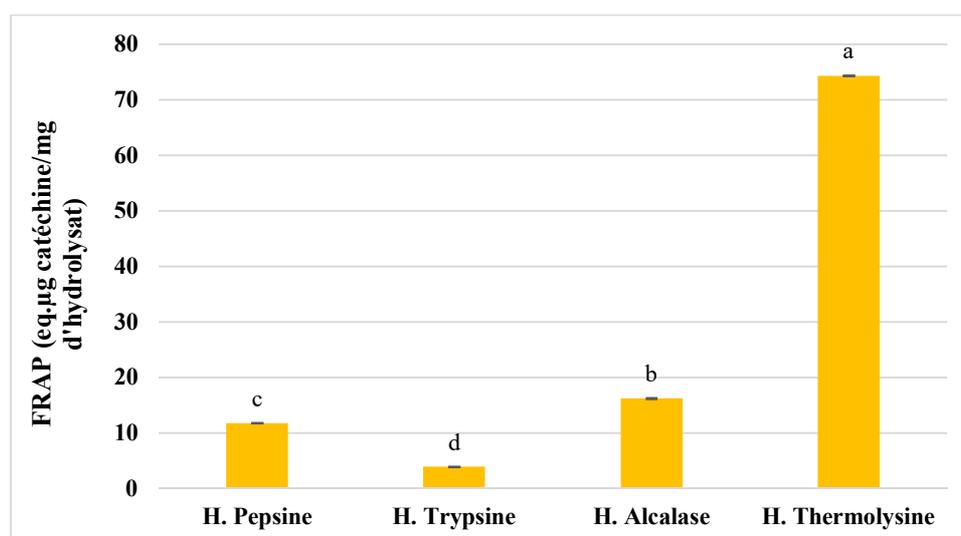
Par ailleurs, observe sur le plan de la sensibilité au radical $ABTS^{++}$, que la concentration minimale en hydrolysats nécessaire pour piéger le radical $ABTS^{++}$ varie d'un hydrolysats à un

autre ; les hydrolysats alcalase et thermolysine étant les plus sensibles. On constate que l'hydrolysate thermolysine a la même sensibilité au radical ABTS^{•+} et DPPH. Les hydrolysats thermolysine et alcalase ont également présenté la meilleure activité antiradicalaire ABTS^{•+}. Zhou *et al.* (2013) ont rapporté que les hydrolysats protéiques du riz préparés à l'aide des protéases d'origine microbienne (*Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis*) ont présenté une capacité de piégeage du radical ABTS^{•+} élevée comparativement aux hydrolysats préparés à l'aide de protéases d'origine non microbienne. Alashi *et al.* (2014) ont rapporté que l'hydrolysate alcalase a une capacité de piégeage du radical ABTS^{•+} élevée comparé aux hydrolysats pepsine et trypsine. Les CP₅₀ des hydrolysats thermolysine, alcalase et trypsine sont en accord avec la spécificité de ces enzymes bien que les mécanismes restent à élucider. Gómez-Ruiz *et al.* (2008) ont rapporté que la Cystéine était l'acide aminé le plus actif lors du piégeage du radical ABTS^{•+} suivie du tryptophane, de la tyrosine et de l'histidine. La capacité de piégeage du radical ABTS^{•+} élevée des hydrolysats protéiques peut être attribuée aux interactions entre les protéines hydrophobes et les radicaux d'ABTS^{•+} hydrophiles (Jarine *et al.*, 2017).

La capacité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS^{•+} est due à leur propension à céder aussi bien les électrons que les atomes d'hydrogènes lors des réactions radicalaires ; et dépend du type de protéase, du degré d'hydrolyse et de la composition en acides aminés des hydrolysats. En considérant que la différence de solubilité entre les radicaux DPPH (liposolubles) et les radicaux ABTS^{•+} (hydrosoluble), la composition des acides aminés a une influence sur l'inhibition de chacun de ces radicaux. En conséquence, ces différences peuvent être attribuées aux acides aminés hydrophobes ou hydrophiles libérés qui augmentent selon le cas la solubilité des hydrolysats soit dans les milieux lipidiques ou aqueux entraînant donc une meilleure chélation des radicaux DPPH et ABTS^{•+} (You *et al.*, 2010).

III.8.2.3. Effet des hydrolysats protéiques sur la réduction du Fe³⁺

Le test FRAP est couramment utilisé pour déterminer la capacité des antioxydants à servir de réducteurs en cédant des électrons au Fe³⁺ pour le réduire en l'ion ferreux divalent plus stable, Fe²⁺ (Nwachukwu et Aluko, 2018 ; Torres-Fuentes *et al.*, 2015 ; He *et al.*, 2012). La figure 25 ci-dessous présente la capacité de réduction du Fer exprimée en équivalent µg de catéchine/mg d'hydrolysats protéiques (Eq. µg catéchine/mg d'hydrolysate) des graines de *Moringa oléifera*.



H. : Hydrolysats. Les histogrammes ayant au dessus des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Figure 25 : Capacité de réduction du Fer des hydrolysats alcalase, trypsine, thermolysine et pepsine des hydrolysats protéique des graines de *Moringa oléifera*.

Il ressort de la figure 25 que les différents hydrolysats sont doués d'un pouvoir réducteur. L'hydrolysats thermolysine a présenté la meilleure activité ($p < 0,05$) avec des FRAP de 74,3 Eq. µg catéchine/mg d'hydrolysats, suivi des hydrolysats alcalase, pepsine et trypsine avec des FRAP de 16,4 ; 11,79 et 3,96 Eq. µg catéchine/mg d'hydrolysats respectivement. Le faible pouvoir réducteur des hydrolysats alcalase, pepsine et trypsine en comparaison à celui de l'hydrolysats thermolysine peut être due à une faible teneur en résidus aminoacyles soufrés dans ces hydrolysats en accord avec la teneur en acides aminés soufrés (2,11 %) des protéines des graines de *Moringa oléifera* de cette étude. Au regard de la composition en acides aminés des protéines des graines de *Moringa oléifera* et de la spécificité des quatre protéases utilisées dans cette étude, il est justifié que l'hydrolysats thermolysine ait une activité réductrice des ions ferriques supérieure à celle de l'hydrolysats alcalase qui est supérieure à celle de l'hydrolysats pepsine et de l'hydrolysats trypsine. La thermolysine est une métallo-endoprotéase qui hydrolyse les liaisons protéiques sur le côté N-terminal des résidus d'acides aminés hydrophobes (Voet et Voet, 2004), produisant ainsi des hydrolysats ayant des résidus aminoacyles acides capables de céder des protons aux ions ferriques, ce qui explique les meilleures propriétés réductrices obtenues avec ces hydrolysats (Udenigwe et Aluko, 2011). Cette justification cadre aussi avec l'activité de l'hydrolysats alcalase qui est aussi une endoprotéase comme la thermolysine, mais de type sérine avec une faible spécificité (Voet et Voet, 2004), d'où le faible pouvoir réducteur des hydrolysats alcalase comparativement aux hydrolysats thermolysine. La pepsine clive aussi préférentiellement le côté carboxyle de la

phénylalanine et de la leucine (Voet et Voet, 2004) produisant des peptides hydrophobes capables de réduire les ions ferriques. La trypsine quant à elle clive les peptides sur le côté C-terminal des résidus lysine et arginine (Voet et Voet, 2004), produisant des hydrolysats avec des résidus aminoacyls chargés positivement, qui ont un faible pouvoir réducteur (Udenigwe et Aluko, 2011). Les résidus aminocyl soufrés ont la capacité de transférer des électrons aux ions ferrique (Fe^{3+}), les réduisant ainsi en ion ferreux (Fe^{2+}) ce qui favorise l'activité antioxydante de l'hydrolysat protéique (Lopez-Barrios *et al.*, 2014 ; Udenigwe et Aluko, 2011). Aussi, Udenigwe et Aluko (2011) ont rapporté que les résidus d'acides aminés acides et soufrés contribuent positivement aux propriétés réductrices des hydrolysats protéiques, tandis que les résidus d'acides aminés chargés positivement, tels que la lysine et l'arginine, ont des effets très faibles. You *et al.* (2010) ont rapporté que les acides aminés hydrophobes, et en particulier les résidus d'histidine, de proline, de méthionine, de cystéine, de tyrosine, de tryptophane et de phénylalanine, peuvent améliorer l'activité antioxydante des hydrolysats par interaction avec les molécules lipidiques et par transfert d'électrons. De plus, Kansci (1996) a rapporté que les groupements phosphates sont essentiel dans le mécanisme de chélation du Fer avec les phosphopeptides de la caséine- β dont les fragments peptidiques (1-25) contenaient 4 résidus phosphoséryls. Cet auteur a rapporté que la fixation du Fer par le peptide (1-25) de la caséine- β se faisait via l'oxygène des groupements phosphates, par coordination avec le Fer (Kansci, 1996).

Nos résultats sont similaires à ceux de Olusola *et al.* (2018) et de Nancy *et al.* (2017) qui ont rapporté que les hydrolysats pepsine des protéines des graines de *Moringa oléifera* avaient une capacité réductrice du Fer plus importante que les hydrolysats trypsine. La même tendance a été rapportée avec les hydrolysats de melon (*Citrullus lanatus*) par Arise *et al.* (2016). Mune Mune *et al.* (2018) ont rapporté que l'hydrolysat trypsine des protéines de pois Bambara avait une activité réductrice du Fer plus élevée que celles des hydrolysats thermolysine et alcalase, ce qui est en contradiction avec les résultats de nos travaux. Cette différence peu être due à la nature et à la composition en acides aminés de l'échantillon, ainsi qu'aux conditions d'hydrolyse qui affectent la taille des hydrolysats et la composition des résidus d'aminoacyls produits, impactant ainsi sur la capacité réductrice du Fer (Shahi *et al.*, 2020).

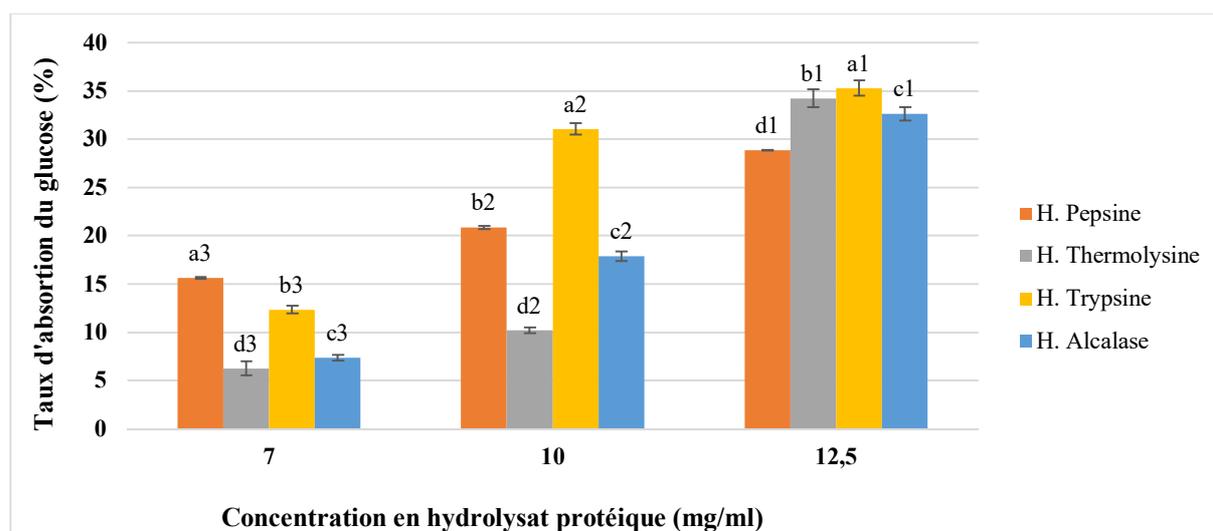
III.8.3. Effets des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur la capture cellulaire du glucose

La régulation du taux de glucose dans le sang du patient diabétique peut prévenir les diverses complications associées à la maladie. Le maintien de la concentration de glucose dans le plasma à long terme dans diverses conditions alimentaires est l'un des processus les plus importants et les plus étroitement régulés observés chez les espèces de mammifères (Sindhu *et al.*, 2018). Les propriétés hypoglycémiantes des hydrolysats pepsine, trypsine, alcalase et thermolysine ont été évaluées par la technique de transport du glucose à travers les membranes cellulaires des levures et les coupes fines de tissus isolées à partir des rats «*Wistar*» en absence ou en présence de l'insuline.

III.8.3.1. Effet des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur la capture périphérique du glucose à travers les cellules non insulino-dépendantes

Le mécanisme de transport du glucose à travers la membrane cellulaire de la levure a été rapporté par plusieurs études antérieures comme méthode *in vitro* pour évaluer l'effet hypoglycémiant, notamment sur la capture non insulino-dépendante du glucose de divers composés et plantes médicinales (Harish *et al.*, 2014 ; Bhutkar et Bhise, 2013 ; Ahmed *et al.*, 2011).

Les résultats de l'effet des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur le transport du glucose à travers les membranes cellulaires des levures sont présentés sur la figure 26.



Par concentration, les histogrammes ayant au dessus des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différents.

Par, type d'hydrolysats, les histogrammes ayant au dessus des chiffres différentes (1,2,3) sont significativement ($p < 0,05$).

Figure 26 : Effets de la concentration en hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur le transport du glucose à travers les membranes cellulaires des levures

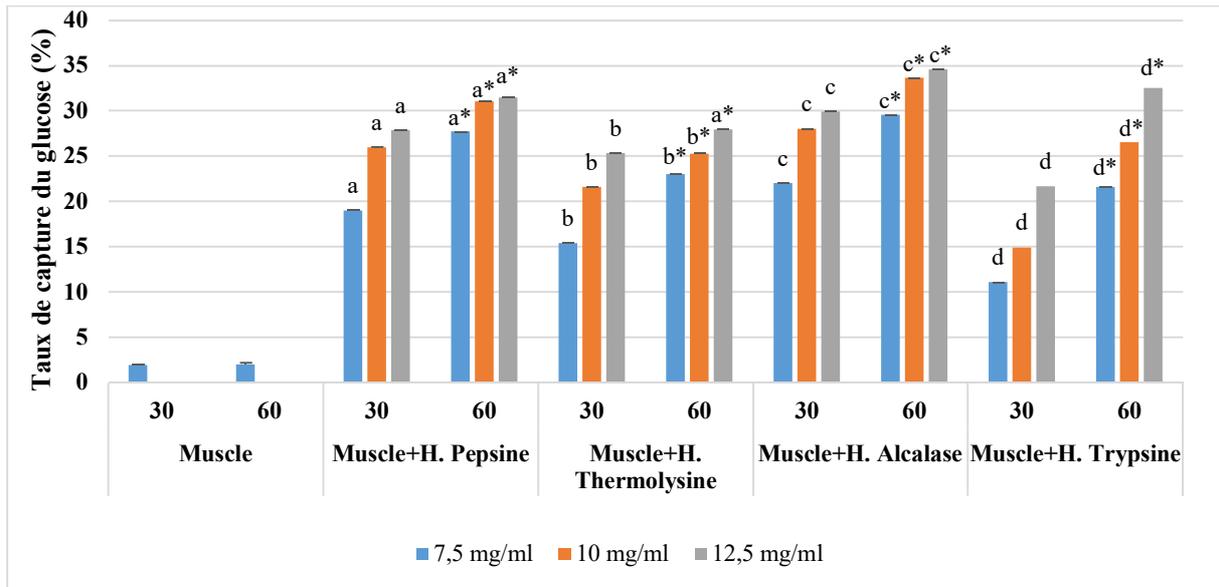
Il ressort de la figure 26 que les différents hydrolysats ont stimulé de façon concentration dépendante l'absorption du glucose à travers les membranes cellulaires des levures ; l'activité varie en fonction de la nature de l'hydrolysats. Les pourcentages d'absorption du glucose variaient de 15,63-28,66% pour l'hydrolysats pepsine, de 06,27-34,24% pour l'hydrolysats thermolysine, de 12,34-35,28% pour l'hydrolysats trypsine et de 07,36-32,63% pour l'hydrolysats alcalase. L'hydrolysats trypsine a présenté la meilleure activité.

Des études antérieures sur les hydrolysats protéiques de soja et des grains de lin ont montré qu'ils favorisaient le transport du glucose à travers les membranes cellulaires des levures (Doyen *et al.*, 2014 ; Roblet *et al.*, 2014). Plusieurs travaux ont rapporté que le transport du glucose à travers les membranes cellulaires des levures était concentration-dépendante (Mangesh *et al.*, 2018 ; Cletus *et al.*, 2018). Plusieurs facteurs peuvent influencer l'absorption du glucose par les membranes cellulaires de levure notamment la concentration de glucose à l'intérieur des cellules ou le métabolisme ultérieur du glucose. Si la plupart du sucre interne est converti facilement en d'autres métabolites, la concentration interne de glucose sera faible et l'absorption de glucose dans la cellule sera favorisée (Gauhar *et al.*, 2018). Ainsi, il est possible que le transport du glucose par les membranes cellulaires de levure en présence d'hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* soit due à la fois à une diffusion facilitée et à un métabolisme élevé du glucose. La capacité des hydrolysats à stimuler la capture non insulino-dépendante du glucose pourrait être due à des effets insulino-mimétiques. En effet de nombreux auteurs ont déjà relevé l'effet insulino-mimétique des peptides bioactifs (Chelliah *et al.*, 2021 ; Shital *et al.*, 2020). Ainsi la capacité de l'hydrolysats trypsine à stimuler la capture cellulaire non insulino-dépendante du glucose s'expliquerait par la nature des peptides obtenus après hydrolyse par cette enzyme qui seraient plus insulino-mimétiques que ceux obtenus suite aux 3 autres hydrolyses. D'autre part, ces effets pourraient également être dus à la capacité des hydrolysats à stimuler la translocation des transporteurs non insulino-dépendants ou à activer la voie de l'AMPK qui est une voie de capture cellulaire du glucose indépendante de l'insuline (Ishikara *et al.*, 2003).

III.8.3.2. Effet des hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sur la capture périphérique du glucose à travers les cellules insulino-dépendantes

➤ En absence d'insuline

Les effets des hydrolysats protéiques sur la capture musculaire du glucose en absence d'insuline sont présentés sur la figure 27 ci-dessous.



H. : Hydrolysat. Les valeurs affectées des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différentes à concentration et à temps d'incubation fixes entre les différents hydrolysats. * $p < 0,05$: différence significative à 60 min par rapport à 30 min pour un même échantillon et à la même concentration.

Figure 27: Effets des hydrolysats protéiques sur la capture musculaire du glucose en absence d'insuline.

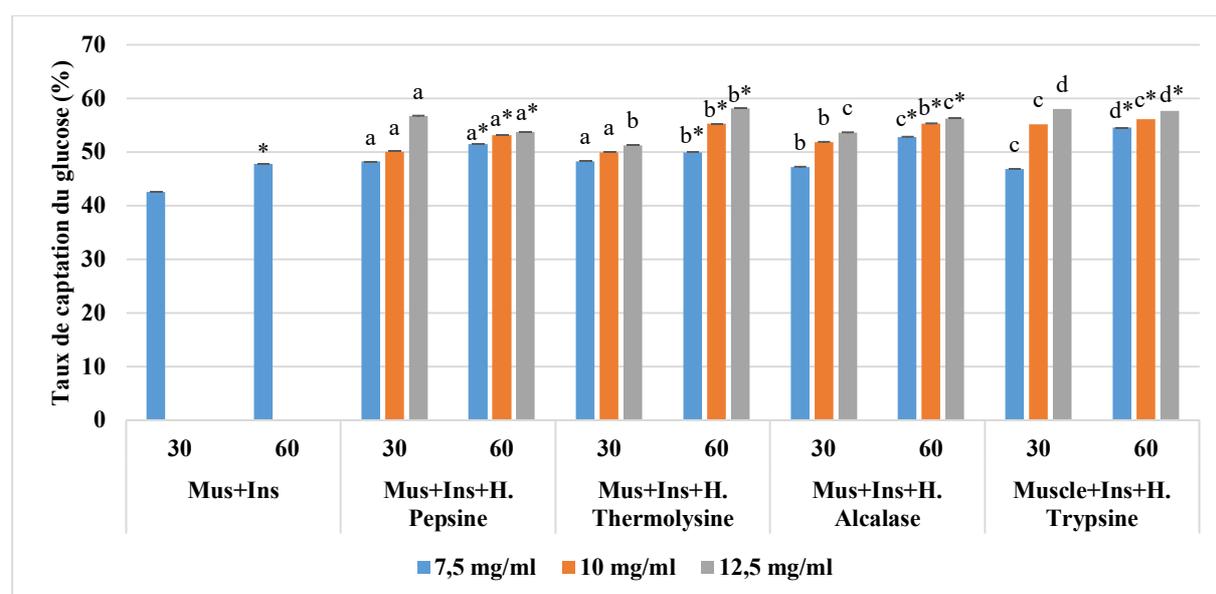
Les résultats de la figure 27 montrent une absorption basale (muscle seul) bien que faible avec des taux d'absorption d'environ 2%. Les différents hydrolysats ont fortement stimulé la capture musculaire du glucose en absence d'insuline, capture qui augmentait en fonction des concentrations croissantes d'hydrolysats. L'hydrolysat alcalase a été le plus efficace avec des taux de capture variant de 22,03% à 29,93% (30 min), puis de 29,55% à 34,6% (60 min) ; suivi de l'hydrolysat pepsine (19,3% à 27,9%, et 27,74% à 34,51% respectivement à 30 et à 60 min) ; de l'hydrolysat trypsine (15,44% à 25,33% et 23,04% à 27,97% respectivement à 30 et à 60 min) et de l'hydrolysat thermolysine (11,11% à 21,72% et 21,59% à 32,54% respectivement à 30 et à 60 min). Il ressort également de cette figure que l'absorption musculaire augmente avec le temps, plus importante à 60 min qu'à 30 min quel que soit l'hydrolysat et pour chacune des concentrations testées.

Des études antérieures ont rapporté une stimulation de la capture du glucose par les coupes fines de tissus musculaire en présence des hydrolysats des graines de lin et de soja (Doyen *et al.*, 2014 ; Roblet *et al.*, 2014). Ces auteurs ont attribué le pouvoir stimulant des hydrolysats sur la capture du glucose aux peptides de faible poids moléculaires (300-400 kDa) ainsi qu'aux peptides cationiques. Cette hypothèse peut justifier les résultats obtenus avec les hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* dans la mesure où des travaux ont déjà montré la présence des peptides cationiques issus de l'hydrolyse des protéines des graines de

Moringa oléifera (Nancy Garcia *et al.*, 2017 ; Ogunsina *et al.*, 2010). La capacité des hydrolysats à stimuler la capture musculaire du glucose en absence de l'insuline vient appuyer l'hypothèse des effets insulinomimétiques de ces hydrolysats comme stipulé suite aux effets sur la capture du glucose par les cellules de levure. En effet, les peptides issus des hydrolysats en mimant l'effet de l'insuline seraient capables de stimuler la translocation des GluT4 et ainsi permettre la capture musculaire du glucose, étant donné que dans le muscle, les principaux transporteurs du glucose sont les GluT4. Ces GluT sont impliqués dans le contrôle du métabolisme cellulaire du glucose et de l'homéostasie énergétique du corps tout entier, lesquels sont fortement associés au diabète en cas de troubles (Gao *et al.*, 2017). Les effets bénéfiques des hydrolysats sur les GluT4 seraient donc en faveur de leur potentielle utilisation dans la prise en charge du diabète.

➤ En présence d'insuline

Les effets des hydrolysats protéiques sur la capture musculaire du glucose en présence d'insuline sont présentés sur la figure 28 ci-dessous.



Mus : Muscle ; Ins : Insuline ; H. : Hydrolysat. Les valeurs affectées des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement ($p < 0,05$) différentes à concentration et à temps d'incubation fixes entre les différents hydrolysats.. * $p < 0,05$: différence significative à 60 min par rapport à 30 min pour un même échantillon et à la même concentration.

Figure 28: Effets des hydrolysats protéiques sur la capture musculaire du glucose en présence d'insuline.

Les résultats de la figure 28 montrent que l'insuline à elle seule entraîne déjà une absorption musculaire importante de glucose, absorption plus accrue que celles observées avec les hydrolysats seuls, avec des taux de capture de 42,6 1% et de 47,81 % à 30 et à 60 min respectivement. Les différents hydrolysats ont amélioré la capture musculaire du glucose en

présence d'insuline, avec des effets qui augmentaient en fonction des concentrations croissantes d'hydrolysats ; les taux de capture variaient de 46,88 % à 58,03 % à 30 min et de 50 % à 58,18 % à 60 min. Bien que des différences significatives ont été notées entre certaines concentration en comparant les hydrolysats, elles restent toutes très proches en termes d'activités aux différentes concentrations testées. Comme précédemment observé, en présence d'insuline, l'absorption musculaire augmente avec le temps, plus importante à 60 min qu'à 30 min quel que soit l'hydrolysats et pour chacune des concentrations testées.

Le muscle squelettique est reconnu comme le principal site d'absorption du glucose sous l'action l'insuline après la consommation de glucides chez l'Homme (DeFronzo et Tripathy, 2009). Les effets observés des hydrolysats sur la capture musculaire du glucose pourraient être dus à un possible effet additif de part les effets insulino mimétiques notés précédemment qui s'associeraient à ceux de l'insuline ; ou à un effet potentialisateur de l'action de l'insuline par augmentation de la sensibilité à l'insuline ou du nombre de récepteurs insuliniques stimulant une translocation accrue des GluT4 et par conséquent l'absorption du glucose. En effet, il a été démontré que la translocation du Glut4 des vésicules intracellulaires pour s'accumuler dans la membrane plasmique en réponse à l'insuline dépend fortement de l'activation du récepteur du substrat 1 de l'insuline (Sato, 2014). En outre, les données d'une étude antérieure ont suggéré qu'une stimulation aiguë sur l'absorption du glucose sous l'effet de l'insuline dans le muscle squelettique était liée à l'augmentation de la phosphorylation et de l'activation des protéines clés impliquées dans la translocation de Glut4, telles que Rac1, AS160 et Akt (Röhling *et al.*, 2016). D'autres études ont suggéré que l'augmentation de l'absorption du glucose était due à l'augmentation de la phosphorylation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). L'AMPK fonctionne comme un capteur d'énergie intracellulaire, et il a été démontré que l'activation pharmacologique de l'AMPK favorise le transport du glucose. L'AMPK serait l'une des cibles des principaux médicaments antidiabétiques, tels que les thiazolidinediones et les biguanides, ainsi que des adipokines sensibles à l'insuline, bien que le mécanisme semble être indirect (Vlavcheski *et al.*, 2017 ; Coughlan *et al.*, 2014 ; Hardie, 2011 ; Viollet et Andreelli, 2011 ; Ma *et al.*, 2009). D'autre part, ces effets insulinosensibilisateurs pourraient également être dus à un possible effet bénéfique sur les incrétines ; en effet, Skuratovskaia *et al.* (2021) ont démontré les effets positifs des incrétines sur la sensibilité à l'insuline. De nombreux travaux ont déjà montré les effets bénéfiques des hydrolysats protéiques sur la disponibilité des incrétines. Entre autres travaux, on peut noter ceux de Mojica et de Mejia (2016) sur les hydrolysats pepsine, alcalase, thermolysine et trypsine des protéines du haricot blanc, de Valencia-Mejia *et al.* (2019) sur les hydrolysats pepsine des protéines du haricot commun, de

Mune Mune *et al.* (2018) sur les hydrolysats alcalase et thermolysine des protéines du pois bambara. L'augmentation du taux de capture du glucose sous l'effet synergique de l'insuline et des hydrolysats protéiques montre que ces derniers peuvent contrer la résistance à l'insuline qui est l'un des principaux symptômes du diabète de type 2. Toutefois, la grande complexité des mécanismes et des récepteurs impliqués dans l'absorption cellulaire du glucose, en particulier la voie AMPK lors du traitement par les hydrolysats, nécessite des investigations supplémentaires.

Conclusion partielle

La troisième partie de ce travail avait pour objectif d'analyser quelques activités biologiques des protéines des graines de *Moringa oléifera*. Il a été question d'hydrolyser les protéines à l'aide de quatre protéases (pepsine, trypsine, alcalase et thermolysine), puis de déterminer le degré d'hydrolyse ensuite d'analyser les activités antioxydantes et hypoglycémiantes.

Le degré d'hydrolyse de l'hydrolysate trypsine (60,07 %) > hydrolysate pepsine (57,14 %) > hydrolysate alcalase (50,68 %) > hydrolysate thermolysine (45,45 %). Les différents hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* ont présenté des propriétés antioxydantes par piégeage des radicaux DPPH et ABTS^{•+} et réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺. La meilleure activité antioxydante (antiradicalaire, comme réductrice) a été notée avec l'hydrolysate thermolysine. Les différents hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* ont stimulé la capture périphérique du glucose à la fois par les cellules non insulino-dépendantes et les cellules insulino-dépendantes. L'hydrolysate trypsine a entraîné une meilleure capture cellulaire non insulino-dépendante avec un taux de capture maximum de l'ordre de 35 %. Concernant la capture cellulaire insulino-dépendante, l'hydrolysate alcalase a présenté la meilleure activité avec des taux de capture du glucose maximums supérieurs à 35 % en absence d'insuline et à 55 % en présence d'insuline.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion

Le présent travail de recherche consistait à effectuer une caractérisation structurale et analyser quelques propriétés physicochimiques, fonctionnelles et bioactives des protéines des graines de *Moringa oléifera*.

Il en ressort les conclusions ci-après :

- ✓ L'isolat protéique contient tous les acides aminés essentiels ; et présente des propriétés technofonctionnelles intéressantes qui sont modulées par les traitements thermiques durant les opérations technologiques. L'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera* peut être exploité lors des formulations comme ingrédient protéique.
- ✓ Les propriétés technofonctionnelles des fractions albumine, globuline, glutéline et prolamine influencent soit positivement, soit négativement celles de l'isolat protéique. Ainsi, la composition protéique (le pourcentage de fractions solubles) affecte la fonctionnalité de l'isolat protéique lors des formulations nécessitant des traitements thermiques.
- ✓ Les hydrolysats protéiques des graines de *Moringa oléifera* sont doués de propriétés antioxydantes (pouvoirs antiradicalaire et réducteur). En plus ces hydrolysats ont la capacité de stimuler la capture périphérique du glucose à la fois chez les cellules insulino-dépendantes et non insulino-dépendantes. Les hydrolysats protéiques sont donc de bons candidats pour la prise en charge du stress oxydant, de l'hyperglycémie et des complications qui leurs sont associées.

Perspectives

Dans nos travaux de recherches futures, nous allons :

- ❖ Effectuer une caractérisation moléculaire de l'isolat protéique graines de *Moringa oléifera* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) et analyser la stabilité thermique par calorimétrie différentielle à balayage ;
- ❖ Effectuer une caractérisation moléculaire et analyser la stabilité thermique des fractions protéiques des graines de *Moringa oléifera* ;
- ❖ Identifier et purifier les hydrolysats protéiques obtenus après hydrolyse de l'isolat protéique des graines de *Moringa oléifera*.

REFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ✚ Abe, R. & Ohtani, K. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *Journal of Ethnopharmacology*, 145:554-565.
- ✚ Abiodun, A., Adegbite, A. & Omolola, O. (2012). Chemical and physicochemical properties of *Moringa* flours and oil. *Global Journal of Science Frontier Research*, 12 (1), 13–17.
- ✚ Abdulkarim, M., Long, K., Lai, M., Muhammad, S. & Ghazali, M. (2005). Some physicochemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry*, 93, 253–263.
- ✚ Achouri, A. Nail, V. & Boye, I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, 46, 360- 69.
- ✚ Achouri, A., Zhang, W., & Shiyong, X. (1998). Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Research International*, 31(9), 617-623. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00104-5).
- ✚ Adebisi, P. & Aluko, R. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum L.*) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128 (4), 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>.
- ✚ Adebowale, Schwarzenbolz, U. & Henle, T. (2011). Protein isolates from Bambara Groundnut (*Voandzeia Subterranean L.*): Chemical Characterization and Functional Properties. *International Journal of Food Properties*, 14, 758–775.
- ✚ Adeola, M., Alashi, L., Blanchard, J., Mailer, O., Agboola, A., John Mawson, Rong He, Abraham Girgih & Rotimi E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500–506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.081>.
- ✚ Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier applied science publishers. ISBN: 9780853343868.
- ✚ Agyei, D., Tsopmo, A., & Udenigwe, C. (2018). Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (15), 3463-3472.

- ✚ Agoyi, E., Assogbadjo, E., Gouwakinnou, G., Okou, Y. & Sinsin, B. (2014). Ethnobotanical assessment of *Moringa oleifera* in the Southern Benin (*West-Africa*). *Ethnobotany Research and Applications*, 12, 551-560.
- ✚ Ahmadifard, N., Murueta, C., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A. & Jamali, H. (2016). Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (2), 1279–1284. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2087-6>.
- ✚ Ahmed, F., Sairam, S., Urooj, A. (2011). *In vitro* hypoglycemic effects of selected dietary fiber sources. *Journal of Food Science Technology*, 48 (3), 285-289.
- ✚ Ahmed, S., Ahmed, I., Eltayeb, M., Ahmed, S. & Babiker, E. (2011). Functional properties of selected legumes flour as influenced by pH. *Journal of Agricultural Technology*, 7 (5), 1291-1302.
- ✚ Ajibola, F., Fashakin, B., Fagbemi, N. & Aluko, E. (2013). Renin and angiotensin converting enzyme inhibition with antioxidant properties of African yam bean protein hydrolysate and reverse-phase HPLC-separated peptide fractions. *Food Research International*, 52 (2), 437-444.
- ✚ Akharume, U., Aluko, E. & Adedeji, A. (2021). Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 20,198–224. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12688>.
- ✚ Akharume, F., Xiong, L. & Adedeji, A. (2019). Effects of transglutaminase in product formulation on the physico-textural properties of protein rich extruded snacks. In ASABE Annual International Meeting (P1). *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. <https://doi.org/10.13031/aim.201900306>.
- ✚ Alashi, M., Blanchard, L., Mailer, J., Agboola, S., Mawson, J., He, R., Girgih, A. & Aluko, E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500-506.
- ✚ Al-Awadi, F., Khattar, M. & Gumaa, K. (1985). On the mechanism of the hypoglycaemic effect of a plant extract. *Diabetologia*, 28, 432-434.
- ✚ Alimentarius, C. (1989). Codex General Standard for vegetable protein products (VPP). Codex Stan, 174.

- ✚ Aluko, E. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (2nd ed., pp. 389–412). Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing.
- ✚ Andrade, F., Melo, S., Guedes, D., Novack, M., Santos, C. & Silva, E. (2011). Biological evaluation of crude and degummed oil from *Moringa oleifera* seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, (5), 1003–1006.
- ✚ Animashaun, O. & Toye, A. (2013). Feasibility analysis of leaf-based *Moringa oleifera* plantation in the Nigerian Guinea Savannah: Case study of University of Ilorin *Moringa* plantation. *Agrosearch*, 13 (3), 218-231.
- ✚ Ansari, M. & Kumar, D. (2012). Fortification of Food and Beverages with Phytonutrients. *Food and Public Health*, 2 (6), 241-253. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20120206.09>.
- ✚ Anwar, F. & Rashid, U. (2007). Physico-chemical characteristics of *Moringa oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 39 (5), 1443–1453.
- ✚ AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). (1990). Official methods of analysis.
- ✚ Arafat, M. (2013). Physico-chemical properties of oil produced from *Moringa oleifera*, *Jatropha curcas* and *Carthamus tinctorius L* seeds. *International Journal of Advanced Research*, 1 (4), 181–187.
- ✚ Arise, K., Nwachukwu, D., Aluko, E., & Amonsou, O. (2017). Structure, composition and functional properties of storage proteins extracted from Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces. *International Journal of Food Science & Technology*, 52 (5), 1211-1220. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13386>.
- ✚ Arise, R., Yekeen, A. & Ekun, E. (2016). *In-vitro* antioxidant and α -amylase inhibitory properties of watermelon seed protein hydrolysates. *Environment Experimental Biology*, 14, 163–172.
- ✚ Aryee, A., Agyei, D. & Udenigwe, C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In R. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (2nd ed., pp.27–45). Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing.

- ✚ Avakoudjo, J., Kindomihou, V., Akponikpè, I., Thiombiano, A. & Sinsin, B. (2013). Essences végétales et techniques de restauration des zones d'érosion (dongas) du Parc W et de sa périphérie à Karimama (Nord-Bénin). *Journal of Applied Biosciences*, 69, 5487-5495.
- ✚ Babiker, Elfadil, E., Ibrahim, Fatima, S., Yousif, Nabila, E., El Tinay, Abdullahi, H. (2004). Effect of fermentation on biochemical and sensory characteristics of sorghum flour supplemented with whey protein. *Food Chemistry*, 92 (2), 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.024>.
- ✚ Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., & Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45(1), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019>.
- ✚ Bello, A. & Okezie, B. (1989). Effect of extraction conditions on the extractibility of winged bean (*psophocarpus tetragonolobus (L) DC*) proteins. *Journal of Food Science*, 55 (6), 1656-1657.
- ✚ Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., ... Selinheimo, E. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 113–138. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100841>.
- ✚ Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L. & Milinković, J. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 60, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.005>.
- ✚ Bhutkar, A. & Bhise, B. (2013). *In-vitro* hypoglycemic effects of *Albizzia lebbek* and *Mucuna pruriens*. *Asian Pacific Journal of Tropic Biomedicin*, 3, 866-70.
- ✚ Biswas, K., Hoque, S. and Abedin, A. (2016). Effects of *Moringa* leaf extract on growth and yield of maize. *Progressive Agriculture*, 27 (2), 136-143.
- ✚ Bradford, Edward, G. & Westhaus, Paul. (1975). Effective valence shell interaction in carbon, nitrogen, and oxygen atoms. *Journal of Chemical Physics*, 63, 5416. <https://doi.org/10.1063/1.431348>.

- # Bridgemohan, P., Bridgemohan, R. & Mohamed, M. (2014). Chemical composition of a high protein animal supplement from *Moringa oleifera*. *African Journal of Food Science and Technology*, 5 (5), 125–128.
- # Brunelli, D., Tavecchio, M. & Falcioni, C. (2010). The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF-kB and reduces myeloma growth in nude mice in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1141-1148.
- # Cabra, V., Arreguin, R., Vazquez-Duhalt, R. & Farres, A. (2007). Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the z19 α -zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2), 439-445. <https://doi.org/10.1021/jf061002r>.
- # Catsimpoolas, N. & Meyer, W. (1970). Gelation phenomena of soy globulins I Protein-protein interaction. *Cereal Chemistry*, 47, 220-225.
- # Centre for Jatropha Promotion and Biodiesel (2014). Retrieved from: www.jatrophaworld.org/global_moringa_meet_81.html.
- # Chavan, D. & McKenzie, D. (2001). Functional properties of protein isolate from beach pea *Lathyrus maritimus L.* *Food Chemistry*, 74 (2), 177-187. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00123-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00123-6).
- # Cheftel, J-C., Kitagawa, M. & Queguiner, C. (2009). New protein texturization processes by extrusion cooking at high moisture levels. *Food Reviews International*, 8 (2), 235–275. <https://doi.org/10.1080/87559129209540940>.
- # Cheftel, J-C., Cuq, J. & Lorient, D. (1985). Protéines alimentaires : Biochimie-Propriétés fonctionnelles-valeur-Nutritionnelles-Modification-Chimique.Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- # Chen, L., Wei, M. & Zhang, B. (2011). Chemical cross-linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4), 957–962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.008>.
- # Chiang, H., Loveday, M., Hardacre, K. & Parker, E. (2019). Effects of soy protein to wheat gluten ratio on the physicochemical properties of extruded meat analogues. *Food Structure*, 19, 100102. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.11.002>.

- ✚ Cirillo, Vincent, P. (1962). Mechanism of glucose transport across the yeast cell membrane. *Journal of Bacteriology*, 84 (3). <https://doi.org/10.1128/jb.84.3.485-491.1962>.
- ✚ Cletus, Ukwubile & Jude, Odugu (2018). Evaluation of antibacterial and in vitro antidiabetic activities of *Phyllanthus amarus* Linn. (*Phyllanthaceae*) leaf ethanol extract. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6 (4), 254–258.
- ✚ Chelh, I., Gatelier, P. & Santé-Lhoutellier, V. (2006). A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat science*, 74 (4), 681-683.
- ✚ Chelliah, R., Wei, S., Daliri, M., Elahi, F., Yeon, J., Tyagi, A., Liu, S., Madar, H., Sultan, G. & Oh, H. (2021). The role of bioactive peptides in Diabetes and Obesity. *Foods*, 10, 2220.
- ✚ Compaoré, R., Nikiéma, A., Bassolé, N., Savadogo, A., Hounhouigan, J., Mouecoucou, J. & Traoré, A. (2011). Nutritional properties of enriched local complementary flours. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3 (1), 31–39.
- ✚ Compaoré, R., Nikiéma, A., Bassolé, N., Savadogo, A., Mouecoucou, J., Hounhouigan, J. & Traoré, A. (2011). Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleifera* and Pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3 (1), 64–72.
- ✚ Coughlan, A., Valentine, J., Ruderman, B. & Saha, K. (2014). AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity. *Targets Therapy*, 7, 241–253.
- ✚ Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144–148.
- ✚ Cuq, J. (2006). Technologie des Protéines, Cours, Université de Montpellier, 288pp.
- ✚ Da Silva, V., Serra, M., Gossmann, M., Wolf, R., Meneghetti, R. and Meneghetti, P. (2010). *Moringa oleifera* oil: Studies of characterization and biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 34, 1527-1530.
- ✚ Daliri, M., Lee, B., Oh, D. (2018). Current trends and perspectives of bioactive peptides Critical Review. *Food Science and Nutrition*, 58, 2273–2284.

- ✚ Daliri, M., Oh, D., Lee, B. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6, 32.
- ✚ Das Purkayastha, M., Borah, K., Saha, S., Manhar, K., Mandal, M. & Mahanta, L. (2016). Effect of maleylation on physicochemical and functional properties of rapeseed protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (4), 1784–1797. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2197-9>.
- ✚ Davis, J., Smales, M. & James, C. (2001). How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy*, 56 (s67), 56–60. <https://doi.org/10.1034/j.13989995.2001.00918.x>.
- ✚ DeFronzo, A. & Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type-2 diabetes. *Diabetes Care*, 32, S157–63.
- ✚ Dillard, J. & German, B. (2000). Review Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1744-1746.
- ✚ Djouhou, Fowe C., Nwaga, D. & Fokou, E. (2019). Comparative effect of *Arbuscular Mycorrhizal* fungi and biostimulants on the antioxidant and nutritional potential of *Moringa oleifera*. *Nutrition Food Science International Journal*, 9 (2), 555758. <https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2019.09.555758>.
- ✚ Doyen, A., Chibuiké, C., Udenigwe, Patricia L., Mitchell, M., Rotimi E., Bazinet, L. (2014). Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 145, 66–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.108>.
- ✚ Drago, S. & Gonzalez, R. (2000). Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1 (4), 269-273. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00034-5).
- ✚ Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C., Xie, M. (2017). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of mung bean protein. *Food Hydrocolloid*, 76, 131–140.
- ✚ Du, T., Sun, P., Yan, X., Luo, L., & Dai, H. (2017). A comprehensive study of the *Moringa* seed. *Popular Science & Technology*, 19 (12), 46–49.
- ✚ Eckert, E., Han, J., Swallow, K., Tian, Z., Jarpa-Parra, M., & Chen, L. (2019). Effects of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration on physicochemical and functional properties

- of faba bean protein. *Cereal Chemistry*, 96 (4), 725–741. <https://doi.org/10.1002/cche.10169>.
- ✚ Ellepola, S., Choi, S. & Ma, C. (2005). Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37 (1-2), 12-20.
- ✚ El Youssef, C., Bonnarme, P., Fraud, S., Péron, C., Helinck, S. & Landaud, S. (2020). Sensory improvement of a pea protein-based product using microbial co-cultures of lactic acid bacteria and yeasts. *Foods*, 9 (3), 349.
- ✚ Fahey, W. (2005). *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal: A forum on beneficial trees and plants* 1:5. www.tfljournal.org.
- ✚ Fahey, W., Zalcmann, T. & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51.
- ✚ Famuwagun, A., Alashi, M., Gbadamosi, O., Taiwo, A., Oyedele, J., Adebooye, C., & Aluko, E. (2020). Comparative study of the structural and functional properties of protein isolates prepared from edible vegetable leaves. *International Journal of Food Properties*, 23 (1), 955-970. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1772285>.
- ✚ Farrell, M., Jr., Wickham, D., Unruh, J., Qi, X., & Hoagland, D. (2001). Secondary structural studies of bovine caseins: Temperature dependence of b-casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*, 15, 341–354.
- ✚ Foegeding, A. (2015). Food protein functionality-a new model. *Journal of Food Science*, 80 (12), 2670-2677. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13116>.
- ✚ Foidl, N., Makkar, H. & Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses (45-76). In: Fuglie L. J (editor). *The miracle tree: the multiple attributes of Moringa*. Wageningen: CTA; Dakar: CWS, 177.
- ✚ Fosgerau, K. & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20, 122–128.
- ✚ Frias, J., Miranda, L., Doblado, R. & Vidal-Valverde, C. (2005). Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of lupinus albus l. Var. Multolupa. *Food Chemistry*, 92 (2), 211–220.

- ✚ Fuglie, L. (2002). Noms vernaculaires du *Moringa oleifera* (163-167) In: L'arbre de la vie, les multiples usages du *Moringa* Wageningen: CTA; Dakar: CWS, 177.
- ✚ Fuglie, L. (2001). Introduction to the multiple uses of *Moringa* (7-10) In: Fuglie L J (editor). The miracle tree: the multiple attributes of *Moringa*.-Wageningen: CTA; Dakar: CWS 177.
- ✚ Gadzirayi, T., Kubiku, M., Mupangwa, F., Mujuru, L. & Chikuvire, J. (2013). The effect of plant spacing and cutting interval on growth of *Moringa oleifera*. *Journal of Agriculture Sciences and Applications*, 2, 131-136.
- ✚ Gang, Liu., Ji, Li., Ke, Shi., Su, Wang., Jiwang, Chen., Ying, Liu., Qingrong, Huang. (2009). Composition, secondary structure, and self assembly of oat protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11), 4552-4558.
- ✚ Gao, L., Chen, J., Gao, J., Wang, H. & Xiong, W. (2017). Super-resolution microscopy reveals the insulin-resistance-regulated reorganization of Glut-4 on plasma membranes. *Journal of Cellular Science* 130 (2), 396–405.
- ✚ Gaspar, A. & de Góes-Favoni, S. (2015). Action of microbial transglutaminase (mtgase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chemistry*, 171, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.019>.
- ✚ Gauhar, R., Muhammad, H., Amjad, I., Saif, I., Saba, A., Khair, Z., Ayaz, A., Adeeb, S., Anwar, H. & InJung, L. (2018). *In Vitro* Antidiabetic Effects and Antioxidant Potential of *Cassia nemophila* Pods. *BioMed Research International*, ID 1824790, 6. <https://doi.org/10.1155/2018/1824790>.
- ✚ Gómez-Ruiz, J., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., & Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC-MS/ MS. *European Food Research and Technology*, 227, 1061–1067.
- ✚ González, Garza, G., Chuc Koyoc, A., Torres Castillo, A., García Zambrano, A., Betancur Ancona, D., Chel Guerrero, L., & Sinagawa García, R. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of Moringa seed (*Moringa oleifera*). *Journal of food science and technology*, 54 (13), 4268-4276. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2898-8>.
- ✚ Gopalakrishnan, L., Doriya, K. & Kumar, D. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness* 5:49–56.

- # Govardhan, S., Ogunsina, S. & Radha, C. (2011). Protein extract ability from defatted *Moringa oleifera* Lam. *Ife Journal of Science*, 13(1), 121–127.
- # Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M. & VidalValverde, C. (2002). Nutritional improvement of beans (*phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, 214 (3), 226–231. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0450-5>.
- # Guéguen, J., Walrand, S. & Bourgeois, O. (2016). Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 51, 177-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnd.2016.02.001>.
- # Guéguen, J., Sanchez-Vioque, R. & Mlabat, C. (1999). Les protéines végétales : un réservoir de macromolécules multifonctionnelles. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 6 (6), 498-504.
- # Guéguen Jacques and Lemarié J. (1996). Composition, structure et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In : Gordon, B. (ed), *Protéines végétales*, Paris : Lavoisier Tech Doc, 80-119.
- # Gülseren, I., Guri, A. & Corredig, M. (2014). Effect of interfacial composition on uptake of curcumin-piperine mixtures in oil in water emulsion by Caco-2 cells. *Food & Function*, 5 (6). <https://doi.org/10.1039/c3fo60554j>.
- # Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Kasprowicz-Potocka, M. & Frias, J. (2014) Non-nutritive compounds in *fabacæ* family seeds and the improvement of their nutritional quality by traditional processing-a review. *Poland Journal of Food Nutrition Science*, 64 (2), 75-89.
- # Hamada, S. & Swanson, B. (1994). Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34 (3), 283–292. <https://doi.org/10.1080/10408399409527664>.
- # Hardie, G. (2011) AMP-activated protein kinase - an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Development*, 25, 1895–1908.
- # Harish, M., Ahmed F. & Urooj, A. (2014). *In vitro* hypoglycemic effects of *Butea monosperma* Lam. leaves and bark. *Journal of Food Science Technology*, 51 (2), 308-14. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0496-8>.

- ✚ He, R., He, H., Chao, D., Ju, X., & Aluko, R. (2013a). Effects of high pressure and heat treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein isolate. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (5), 1344-1353.
- ✚ He, R., Alashi, A., Malomo, A., Girgih, T., Chao, D., Ju, X. & Aluko, E. (2013b). Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 141 (1), 153-159.
- ✚ He, R., Girgih, T., Malomo, A., Ju, X. & Aluko, R. E. (2013c). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5 (1), 219-227.
- ✚ He, R., Malomo, A., Alashi, A., Girgih, T., Ju, X. & Aluko, E. (2013). Purification and hypotensive activity of rapeseed protein-derived renin and angiotensin converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Functional Foods*, 5 (2), 781-789.
- ✚ He, R., Ju, X., Yuan, J., Wang, L., Girgih, T., & Aluko, E. (2012). Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*, 49, 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.023>.
- ✚ Hermansson, A. (1979). Soy protein gelation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 272-279.
- ✚ Hernandez, L., Tomes, V., Gonzalez, T., Cabrera, P., Pino, Y. & Gort, G. (2015). Calculation of carbon sequestration and soil fauna associated with *Moringa oleifera* Lam. in living fences. *Centro Agrícola*, 42 (1), 75-81.
- ✚ Hernández-Álvarez, J., Carrasco-Castilla, J., Dávila-Ortiz, G., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque-Peña, J., Jacinto-Hernández, C. & Jiménez-Martínez, C. (2013). Angiotensin- converting enzyme-inhibitory activity in protein hydrolysates from normal and anthracnose disease-damaged *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (4), 961-966.
- ✚ Hsu, C. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122:42-48.
- ✚ Ijarotimi, S., Adeoti, A. & Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science and Nutrition*, 1 (6), 452-463.

- Jacobsen, C. F., Leonis, J., Linderstrøm-Lang, K., & Ottesen, M. (1957). The pH-stat and its use in biochemistry. *Methods of biochemical analysis*, 4, 171-210.
- Jain, A., Subramanian, R., Manohar, B. & Radha, C. (2019). Preparation, characterization and functional properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2093-2104.
- James, S., Nwabueze, T., Onwuka, G., Ndife, J. & Usman, M. (2020). Chemical and nutritional composition of some selected lesser known legumes indigenous to Nigeria. *Heliyon*, 6 (11), e05497.
- Jarine Amaral do Evangelhoa, Nathan Levien Vaniera, Vânia Zanella Pintoa, Jose De J. Berriosb, Alvaro Renato Guerra Diasa, Elessandra da Rosa Zavarezea (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460-467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.046>.
- Jerri, H., Adolfsen, K., McCullough, L., Velegol, D. & Velegol, S. (2012). Antimicrobial sand via adsorption of cationic *Moringa oleifera* protein. *Langmuir*, 28 (4), 2262-2268.
- Jessika, Gonçalves, A., Ruann, Janser, S. & Helia, Harumi, S. (2018). Optimization of the enzymatic hydrolysis of rice protein by different enzymes using the response surface methodology. *Biotechnoly*, 8, 372. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1401-1>.
- Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B. & Zhou, L. (2015). Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *International Journal of Food Properties*, 18 (5), 1059–1074.
- Joginder, S., Akansha, R., Pardeep, K., Pooja, S. & Surekha (2015). Antimicrobial and free radical scavenging activity of selective medicinal plants combination. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (3), 1202-1216.
- Jyothirmayia, T., Prabhakara Raoa, P. & Walde, S. (2006). Nitrogen extractability and functional properties of defatted *Erythrina variegata* flour. *Food Chemistry*, 96 (2), 242-247.
- Kansci, G. (1996). Effets antioxydants de peptides et d'hydrolysats de protéines sur l'oxydation des phospholipides. Exemples de la carnosine, du phosphopeptide 1-25 de la caséine- β et des hydrolysats trypsiques de β -lactoglobuline et de caséine- β . Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Renne, France.

- ✚ Kang, I., Matsumura, Y. & Mori, T. (1985). Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 68, 339-345.
- ✚ Kasolo, N., Bimenya, S. & Ojok, L. (2010). Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 753-757.
- ✚ Kawo, H., Abdullahi, A., Gaiya, A., Halilu, A., Dabai, M., & Dakare, A. (2009). Preliminary phytochemical screening, proximate and elemental composition of *Moringa oleifera* Lam seed powder. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2 (1), 96–100.
- ✚ Kilara, A. & Chandan, C. (2011). Enzyme-modified dairy ingredients. In A. Kilara & R. C. Chandan (Eds.), *Dairy ingredients for food processing* (pp. 317–333). Hoboken, NJ: Blackwell Publishing Ltd.
- ✚ Kim, Y., Je, Y. & Kim, K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from Hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 181, 31-38.
- ✚ Kinsella, E. & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 7 (3), 219–280. <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>.
- ✚ Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39 (8), 549-559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.
- ✚ Kumar, Y., Thakur, K., Sahu, L. & Thakur, A. (2017). A multifunctional wonder tree: *Moringa oleifera* Lam open new dimensions in field of agroforestry in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (8), 229-235.
- ✚ Lawal, O., Adebowale, K. & Adebowale, Y. (2007). Functional properties of native and chemically modified protein concentrates from bambarra groundnut. *Food Research International*, 40 (8), 1003-1011.
- ✚ Leal-Calderon, F., Schmitt, V., & Bibette, J. (2007). *Emulsion science: basic principles*. Springer Science & Business Media, 277pp.

- ✚ Lemaire, M., Ménard, O., Cahu, A., Nogret, I., Briard-Bion, V., Cudennec, B. *et al.* (2021). Addition of dairy lipids and probiotic *L. fermentum* in infant formulas modulates proteolysis and lipolysis with moderate consequences on gut physiology and metabolism in Yucatan piglets. *Frontiers of Nutrition*, 8, 20.
- ✚ Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J. & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (6), 12791-12835.
- ✚ Li, C., Rui, X., Zhang, Y., Cai, F., Chen, X. & Jiang, M. (2017). Production of tofu by lactic acid bacteria isolated from naturally fermented soy whey and evaluation of its quality. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.054>.
- ✚ Li, J., Wang, B., Fan, J., Zhong, X., Huang, G., Yan, L. & Ren, X. (2019). Foaming, emulsifying properties and surface hydrophobicity of soy proteins isolate as affected by peracetic acid oxidation. *International Journal of Food Properties*, 22 (1), 689–703. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1602540>.
- ✚ Li, X., Lin, C. & O'Connor, B. (2010). Glutamine deamidation: Differentiation of glutamic acid and gamma-glutamic acid in peptides by electron capture dissociation. *Analytical Chemistry*, 82 (9), 3606-3615. <https://doi.org/10.1021/ac9028467>.
- ✚ Liu, K. (1997). Chemistry and nutritional value of Soybean components. In: *Soybeans*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1763-4_2.
- ✚ Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J. & Millán, F. (2008). *Lupinus angustifolius* Protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76, 349–356.
- ✚ Lopez-Barrios, L., Gutierrez-Urbe, A. & Serna-Saldívar, O. (2014). Bioactive peptides and hydrolysates from Pulses and their potential use as functional ingredients. *Journal of Food Science*, 79(3): 273-283.
- ✚ Lorient, D. (1987). L'extraction des protéines alimentaires, Campus Universitaire, 2110 Dijon (France).

- ✚ Ma, W., Tang, C. & Lai, L. (2005). Specificity of trypsin and chymotrypsin: Loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. *Biophysical Journal*, 89 (2), 1183-1193. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057158>.
- ✚ Ma, X., Iwanaka, N., Masuda, S., Karaike, K., Egawa, T., Hamada, T., *et al* (2009). *Morus alba* leaf extract stimulates 5'-AMP-activated protein kinase in isolated rat skeletal muscle. *Journal Ethnopharmacology*, 122:54–9.
- ✚ Madi, P., Bourou, S. & Woin, N. (2012). Utilisations et importances socio-économiques du *Moringa oleifera* Lam. En zone de savanes d'Afrique Centrale. Cas de la ville de Maroua au Nord-Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 60, 4421-4432.
- ✚ Makkar, S. & Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agriculture Science*, 128, 311-322.
- ✚ Makeri, U., Sabo M., Roselina, K., Yogeshini, R. & Kharidah, M. (2017). Fractionation, physicochemical, and structural characterization of winged bean seed protein fractions with reference to soybean. *International Journal of Food Properties*, 20 (2), 2220–2236. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1369101>.
- ✚ Malomo, A. & Aluko, E. (2015). A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*, 43, 743-752.
- ✚ Mangesh, B., Somnath, D., Dheeraj, R., Ganesh, W., Sachin, T. (2018). Screening of in-vitro hypoglycemic activity of *Murraya koenigii* and *Catharanthus roseus*. *Ars Pharmaceutica*, 59 (3), 145-151.
- ✚ Margot, A., Flaschel, E. & Renken, A. (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 32 (3), 217-223.
- ✚ Marambe, K., Shand, J. & Wanasundara, P. (2013). *In-vitro* digestibility of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein: effect of seed mucilage, oil and thermal processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (3), 628-635.
- ✚ Mariotti, F. & Gardner, D. (2019). Protein and amino acids in vegetarian diets-A review. *Nutrients*, MDPI, *Vegetarian, Vegan Diets and Human Health*, 11 (11), 2661. <https://doi.org/10.3390/nu11112661>.

- ✚ Maryam, N., Ali, D. & Raffaele, M. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118-106789. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>.
- ✚ Mbah, O., Eme, E. & Ogbusu, F. (2012). Effect of cooking methods (boiling and roasting) on nutrients and anti-nutrients content of *Moringa oleifera* seeds. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(3), 211–215.
- ✚ Messin, L., Chihi, L., Sok, N. & Saurel, R. (2015). Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, 46, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.025>.
- ✚ Mine, Y., Li-Chan, C. & Jiang, B. (2010). Biologically active food proteins and peptides in health: an overview. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*, 3-11.
- ✚ Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, K., Pattnaik, R., Mohapatra, S., Saini, R. (2016). Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties*, 19, 837-846.
- ✚ Mojica, L. & de Mejía G. (2016). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) proteins, their characterization and biological potential. *Food Functional*, 7, 713-727.
- ✚ Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, M., ... Bernard, H. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11), 4547-4553. <https://doi.org/10.1021/jf050091p>.
- ✚ Montoya, A., Lallès, P., Beebe, S., Montagne, L., Souffrant, B., Leterme, P. (2006). Influence of the *phaseolus vulgaris phaseolin* level of incorporation, type and thermal treatment on gut characteristics in rats. *Brazilian Journal of Nutrition*, 95, 116-23.
- ✚ Morton, F. (1991). The horseradish tree, *Moringa pterygosperma (Moringaceae)*: A boon to arid lands. *Economic Botany*, 45 (3), 318–333.
- ✚ Moure, A., Freire, J., Ruiz, D., *et al.* (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72 (2), 145-171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5).

- ✚ Moyano, J., Saénz de Rodrigáñez, A., Díaz, M. & Tacon, A. G. (2015). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 7 (4), 223-242.
- ✚ Mridha, U. (2015). Prospects of *Moringa* cultivation in Saudi Arabia. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 5 (3), 39-46.
- ✚ Mughal, H., Ali, G., Srivastava, S. & Iqbal, M. (1999). Improvement of drumstick (*Moringa pterygosperma Gaertn.*). A unique source of food and medicine through tissue culture. *Hamdard Medecine*, 42, 37-42.
- ✚ Mullally, M., Meisel, H. & FitzGerald, R. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of wey proteins. *International Dairy Journal*, 7 (5), 299-303. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00018-6).
- ✚ Mundi, S. & Aluko, E. (2014). Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin Journal of Nutrition and Food Science*, 2 (1), 1008.
- ✚ Mune, Mune, M., Minka, R., & Henle, T. (2018). Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 250, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.001>.
- ✚ Mune, Mune, A., & Minka, R. (2017). Production and characterization of cowpea protein hydrolysate with optimum nitrogen solubility by enzymatic hydrolysis using pepsin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (8), 2561-2568. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8076>.
- ✚ Mune, Mune, M., Nyobe, C., Bakwo, C. & Minka, S. (2016a). A comparison on the nutritional quality of proteins from *Moringa oléifera* leaves and seeds. *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1213618.
- ✚ Mune, Mune, M., Bakwo, C., Nyobe, E., Minka, S. (2016b). Physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* seed and leaf flour. *Cogent Food and Agriculture*, 2, 1220352.
- ✚ Mune, Mune, M., Minka, R., & Mbome, L. (2008). Response surface methodology for optimisation of protein concentrate preparation from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.)

- Walp]. *Food chemistry*, 110 (3), 735-741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.040>.
- ✚ Myers, Raymond, H., Montgomery, Douglas, C. & Anderson-Cook, Christine, M. (2016). Response surface methodology process and product optimization using designed experiments. *John Willey & Sons*.
- ✚ Navie, S. and Csurhes, S. (2010). Weed risk assessment: Horseradish tree, *Moringa oléifera*. Biosecurity Queensland, Department of Employment, Economic Development and Innovation, Queensland Government. 26 pp.
- ✚ Ngui, S., Nyobe, E., Bakwo, Bassogog, C., Tang, E., Minka, S. & Mune, Mune, M. (2021). Influence of pH and temperature on physicochemical and functional properties of Bambara bean protein isolate. *Heliyon* 7, e07824. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07824>.
- ✚ Nigg, W. (1993). Le *Moringa oléifera*. Etat des connaissances, programme d'investigation complémentaire. *Comité inter africain d'études hydrauliques*, 11.
- ✚ Noulèkoun, F., Lamers, J., Naab, J. & Khamzina, A. (2017). Shoot and root responses of woody species to silvicultural management for afforestation of degraded croplands in the Sudano-Sahelian zone of Benin. *Forest Ecology and Management*, 385, 254-263.
- ✚ Nouman, W., Basra, S., Siddiqui, M., Yasmeen, A., Gull, T. & Alcayde, C. (2014). Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: a review. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38, 1- 14.
- ✚ Nouman, W., Siddiqui, M., Basra, S., Farooq, H., Zubair, M. & Gull, T. (2013). Biomass production and nutritional quality of *Moringa oleifera* as a field crop. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 410-419.
- ✚ Nowak-Wegrzyn, A. & Fiocchi, A. (2009). Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9 (3), 234–237. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32832b88e7>.
- ✚ Nwachukwu, D. & Aluko, R. (2018). Antioxidant properties of flaxseed protein hydrolysates: influence of hydrolytic enzyme concentration and peptide size. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95, 1105–1118.

- ✚ Ogunsina, S., Radha, C. & Sign, V. (2010). Physicochemical and functional properties of full-fat and defatted *Moringa oleifera* kernel flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2433–2439.
- ✚ Okereke, C. & Akaninwor, J. (2013). The protein quality of raw leaf, seed and root of *Moringa oleifera* grown in Rivers State, Nigeria. *Annals of Biological Research*, 4 (11), 34-38.
- ✚ Olusola A., Ekun O., David T., Olorunfemi O. & Oyewale M. (2018). *Moringa oleifera* seed protein hydrolysates: kinetics of α -amylase inhibition and antioxidant potentials. *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 7(9), 190-201.
- ✚ Olson, E. (2002). Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of *Moringaceae* (*Brassicales*). *Systematic Botany*, 27, 55-73.
- ✚ Onuh, J., Girgih, A., Aluko, R. & Aliani, M. (2013). Inhibitions of renin and angiotensin converting enzyme activities by enzymatic chicken skin protein hydrolysates. *Food Research International*, 53 (1), 260-267.
- ✚ Osborne, T. (1924). *The vegetable protein*; 2nd ed.; Longmans Green and Co.: New York, 154 pp.
- ✚ Osborne, D. & Vogt, P. (1978). *The analysis of nutrients in foods*. Academic Press, London, New York, and San Francisco. pp. 47-53.
- ✚ Oyaizu M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- ✚ Oyeyinka, A. & Oyeyinka, S. (2016). *Moringa oleifera* as a food fortificant: recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>.
- ✚ Padulosi, S., Heywood, V., Hunter, D. & Jarvis, A. (2011). Underutilized species and climate change: current status and outlook. In: Yadav, S.S., Redden, R.J., Hatfield, J.L., Lotze-Campen, H. and Hall, A.E. (Eds.). *Crop adaptation to climate change*, 1st edn. Wiley, New York, USA. pp. 507–521
- ✚ Palada, M. & Chang, L. (2003). Suggested cultural practices for *Moringa*. *International Cooperators Guide*". AVRDC Publication Number 03-545:1-5.

- ✚ Paliwal, R. & Sharma, V. (2011). A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): A multipurpose tree with high economic and commercial importance. *Asian Journal of Biotechnology* 3:317-328.
- ✚ Pamok, S., Saenphet, S., Vinitketkumnuen, V. & Saenphet, K. (2011). Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. *Journal of Medicine Plant Research*, 6:139- 145.
- ✚ Panyam, D. & Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (4), 120–125. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10012-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10012-1).
- ✚ Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. & Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, 54, 863–880.
- ✚ Paul, M. and Somkuti, G. (2010). Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37 (2), 173-178.
- ✚ Peng, W., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., Yang, Y. & Hua, Y. (2016). Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocolloids*, 52, 301–310.
- ✚ Popoola, J., Oluyisola, B. & Obembe, O. (2014). Genetic diversity in *Moringa oleifera* from Nigeria using fruit morpho-metric characters and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Covenant Journal of Physical and Life Sciences*, 1, 43-60.
- ✚ Popoola, J. and Obembe, O. (2013). Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (*Moringaceae*) in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 682-691.
- ✚ Potadar, V. and Patil, S. (2017). Potential of carbon sequestration and storage by trees in and around B.A.M. University campus of Aurangabad city in Maharashtra, India. *International Journal of Scientific Development and Research*, 2 (1), 28-33.
- ✚ Price, M. (2007). Le *Moringa*. Note technique-ECHO (revue en 2000, en 2002 et en 2007).
- ✚ Prinyawiwatkul, W., Beuchat, L., McWatters, K. & Phillips, R. (1997). Functional properties of cowpea (*vigna unguiculata*) flour as affected by soaking, boiling, and fungal fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (2), 480-486.

- ✚ Privalov, P. (1979). Stability of proteins small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 33, 167-241. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60460-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60460-X).
- ✚ Priyatharini, A., Abdulrahman, S., Al-Khalifa, Fereidoon, S. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin, *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>.
- ✚ Qazi, H., Jan, N., Ramazan, S. & John, R. (2019). Chapter 8 - protein modification in plants in response to abiotic stress. In T. A. Dar & L. R. Singh (Eds.), Protein modificomics (pp. 171–201). Cambridge, MA: Academic Press.
- ✚ Ralet, M. & Guéguen, J. (1999). Les protéines de pomme de terre : composition, isolement et propriétés fonctionnelles. *Sciences Alimentaires*, 19,147—65.
- ✚ Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- ✚ Rehman, Z. & Shah, W. (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, 91(2), 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.019>.
- ✚ Richardson, M. (1991). In: Rogers L, editor. *Methods in plant biochemistry*. London: 5 Academic Press, p. 261—307.
- ✚ Rioux, V. (2016). Fatty acid acylation of proteins: specific roles for palmitic, myristic and caprylic acids. *Corps Gras, Lipides, John Libbey Eurotext*, 23 (3), <https://doi.org/10.1051/ocl/2015070f>.
- ✚ Roblet, C., Doyen, A., Amiot, J., Pilon, G., Marette, A. & Bazinet, L. (2014). Enhancement of glucose uptake in muscular cell by soybean charged peptides isolated by electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF): activation of the AMPK pathway. *Food Chemistry*, 147, 124–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.108>.
- ✚ Röhling, M., Herder, C., Stemper, T. & Müssig, K. (2016). Influence of acute and chronic exercise on glucose uptake. *Journal of Diabetes Research*, 2868652.

- ✚ Rui, X., Boye, J., Ribereau, S., Simpson, B. & Prasher, S. (2011). Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Research International*, 44, 2497-2504.
- ✚ Ruiz-ruiz, J., Dávila-ortíz, G., Chel-guerrero, L. & Betancur-ancona, D. (2013). Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37 (1), 26-35.
- ✚ Rutherford, S. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International*, 93(5), 1515-1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>.
- ✚ Samard, S., Gu, B. & Ryu, G. (2019). Effects of extrusion types, screw speed and addition of wheat gluten on physicochemical characteristics and cooking stability of meat analogues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (11), 4922–4931. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9722>.
- ✚ Saa, Romuald, W., Fombang, Edith, N., Ndjantou, Elie, B., Njintang, Nicolas, Y. (2019). Treatments and uses of *Moringa oleifera* seeds in human nutrition: A review. *Food Science and Nutrition*, 00:1–9. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1057>.
- ✚ Sánchez, A. & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1 (1), 29-46.
- ✚ Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology International*, 8, 121-137.
- ✚ Sarmadi, B. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31 (10), 1949-1956.
- ✚ Satoh, T. (2014). Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphatases in skeletal muscle and adipocytes. *International Journal of Molecular Science*, 15, 18677-92.
- ✚ Sarwar, G., Wu, C. & Cockell, A. (2012). Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *Brazilian Journal of Nutrition*, 108, 135-332.
- ✚ Schindler, S., Wittig, M., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P. & Berger, R. (2011). Lactic fermentation to improve the aroma of protein extracts of sweet lupin (*Lupinus*

angustifolius). *Food Chemistry*, 128 (2), 330-337.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.024>.

- ✚ Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S. & Najafian, L. (2020). Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted *Bunium persicum* Bioss. press cake. *Heliyon*, 6 (2), e03365.
- ✚ Sharif, H., Williams, P., Sharif, M., Abbas, S., Majeed, H., Masamba, K., ... Zhong, F. (2018). Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants—a review. *Food Hydrocolloids*, 76, 2–16.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.002>.
- ✚ Shi, Y. (2020). Reducing off-flavour in plant protein isolates by lactic acid fermentation. University of British Columbia. Doctoral dissertation.
<https://open.library.ubc.ca/cIRcle/collections/ubctheses/24/items/1.0390970>.
- ✚ Shiferaw, N. & Augustin, M. (2019). Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-27. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1666250>.
- ✚ Shiriki, D., Igyor, M. and Gernah, D. (2015). Nutritional evaluation of complementary food formulations from maize, soybean and peanut fortified with *Moringa oleifera* leaf powder. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 494-500.
- ✚ Shital, P., Ashutosh, G., Kiran, K. & Abhijeet, K. (2020). Plant derived bioactive peptides: A treatment to cure Diabetes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26,955-968.
- ✚ Shuangli, X., Xiaolei, Y. & Anlin, L. (2013). Antioxidant properties of peptide from cowpea seed. *International Journal of Food Properties*, 16, 1245-1256.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2011.582976>.
- ✚ Siddhuraju, P. & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2144-2150.

- ✚ Sindhu, K., Sujith, S., Shynu, M., Suja, R., Juliet, S. & Nair, D. (2018). Anti-hyperglycemic activity of methanolic extract of *Flacourtia Montana* in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharma Innovation Journal*, 7 (7), 22-27.
- ✚ Singhanian, R., Patel, A., Soccol, C. & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44 (1), 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>.
- ✚ Sivasankari, B., Anandharaj, M. & Gunasekaran, P. (2014). An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 408-423.
- ✚ Skuratovskaia, D., Vulf, M., Chasovskikh N., Komar, A., Kirienkova, E., Shunkin, E., Zatolokin, P. & Litvinova, L. (2021). The links of ghrelin to incretins, insulin, glucagon, and leptin after bariatric surgery. *Frontiers in Genetics*, 12, 612501.
- ✚ *Smallholder Farmers Alliance* (2015). *Moringa: Export market potential for smallholder farmers in Haiti*. 71pp.
- ✚ Spackman, Darrel, H., Stein, William, H., Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical chemistry*, 30 (7), 1190-1206.
- ✚ Stanciuc, N., Aprodu, J., Ionița, E., Bahrim, G. & Râpeanu, G. (2015). Exploring the process-structure-function relationship of horseradish peroxidase through investigation of pH and heat induced conformational changes. *Spectrochimica Acta Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 147, 43-50.
- ✚ Suarez, M., Entenza, J., Doerries, C., Meyer, E., Bourquin, L., Sutherland, J., Marison, I., Moreillon, P. & Mermoud, N. (2003). Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 13-20. <https://doi.org/10.1002/bit.10550>.
- ✚ Sun-Waterhouse, D., Zhao, M. & Waterhouse, G. (2014). Protein modification during ingredient preparation and food processing: approaches to improve food processability and nutrition. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (7), 1853-1893. <https://doi.org/10.1007/s1194701413266>.

- ✚ Sun, X. & Arntfield, S. (2011). Gelation properties of salt extracted pea protein isolate induced by heat treatment: effect of heating and cooling rate. *Food Chemistry*, 124 (3), 1011-1016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.063>.
- ✚ Surewicz, Witold, K., Mantsch, Henry, H., Capman, D. (1993). Determination of protein secondary structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*, 32 (2), 389-394.
- ✚ Tabbo, A. & Amadou, Z. (2017). Assessing newly introduced climate change adaptation strategy packages among rural households: Evidence from Kaou local government area, Tahoua State, Niger Republic. *Jàmbá: Journal of Disaster Risk Studies*, 9 (1): a383. <https://doi.org/10.4102/jamba.v9i1.383>.
- ✚ Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C. & Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (23), 9263–9275. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10175-9>.
- ✚ Thammarat, K., Leena, N., Punnanee, S. and Soottawat, B. (2015). Functional and Antioxidative properties of Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*, 22 (4), 1584-1595.
- ✚ Torres-Fuentes, C., Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M. & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.046>.
- ✚ Udenigwe, C. & Aluko, R. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77, R11–R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>.
- ✚ Udenigwe, C. & Aluko, R. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Science*, 12, 3148-3161.
- ✚ Valencia-Mejía, E., Batista, K., Fernández, J. & Fernandes, K. (2019). Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Food Research International*, 121, 238-246.

- ✚ Vaštag, Ž., Popović L., Popović, S. (2014). Bioactivity Evaluation of Cucurbitin Derived Enzymatic Hydrolysates. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8:5. <https://scholar.waset.org/1999.1/9998134>.
- ✚ Verified Market Research. Peptide Therapeutics Market Size, Share, Trends & Forecast, www.verifiedmarketresearch.com/product/peptide-therapeutics-market/ [Accessed January 18, 2021].
- ✚ Villafuerte, L. and Villafurte-Abonal, L. (2009). Data taken from the Forestry Agency of Japan in *Moringa Malunggay* Philippines, *Apples of Gold Publishing, Singapore*, Pg 240.
- ✚ Viollet, B. and Andreelli, F. (2011). AMP-activated protein kinase and metabolic control, *Handb. Exp. Pharmacology*, 203, 303-330.
- ✚ Vlavcheski, F., Naimi, M., Murphy, B., Hudlicky, T. & Tsiani, E. (2017). Rosmarinic acid, a rosemary extract polyphenol, increases skeletal muscle cell glucose uptake and activates AMPK. *Molecules*, 22: E1669
- ✚ Voet, D. & Voet, J. (2004). *Biochemistry* (3rd ed.). *John Wiley & Sons*, pp. 167–168.
- ✚ Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B. & Zhou, L. (2014). Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. *Journal of Chemistry*, 2014.
- ✚ Weil J. (1990). *Biochimie Generale*, edition 6, Masson.
- ✚ Xing, Q., Dekker, S., Kyriakopoulou, K., Boom, R., Smid, E. & Schutyser, M. (2020). Enhanced nutritional value of chickpea protein concentrate by dry separation and solid state fermentation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 59, 102269. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102269>.
- ✚ Yabesh, J., Prabhu, S. & Vijayakumar, S. (2014). An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 774-789.
- ✚ Yazici, F., Alvarez, V. & Hansen, P. (1997). Fermentation and properties of calcium-fortified soy milk yogurt. *Journal of Food Science*, 62 (3), 457-461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04406.x>.

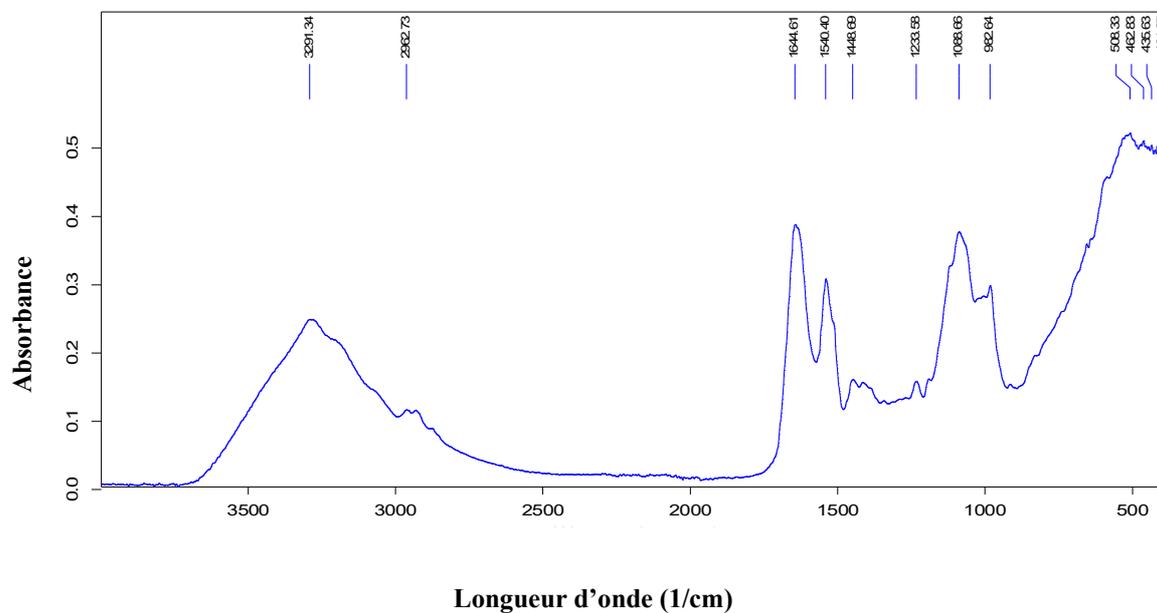
- ✚ Yoshie-Stark, Y., Wada, Y. & Wäsche, A. (2008). Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry*, 107, 32–39.
- ✚ You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. & Yang, B., (2010). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 10 (2), 235-240.
- ✚ Zahra, S., Seyyedeh, Z., Sayyed-Alangi, & Najafian, L. (2020). Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted *Bunium persicum* Bioss. press cake. *Heliyon*, 6, e03365. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03365>.
- ✚ Zaku, S., Emmanuel, S., Tukur, A. and Kabir, A. (2015). *Moringa oleifera*: An underutilized tree in Nigeria with amazing versatility: A review. *African Journal of Food Science*, 9 (9), 456-461. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1346>.
- ✚ Zayas, J. (1997). Solubility of Proteins. In: *Functionality of Proteins in Food*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7_2.
- ✚ Zhang, J., Liu, L., Liu, H., Yoon, A., Rizvi, S. & Wang, Q. (2019). Changes in conformation and quality of vegetable protein during texturization process by extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (20), 3267-3280.
- ✚ Zhang, Q., Li, L., Lan, Q., Li, M., Wu, D., Chen, H., ... Zhang, Z. (2018). Protein glycosylation: A promising way to modify the functional properties and extend the application in food system. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-28. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1507995>.
- ✚ Zhou, K., Canning, C. & Sun, S. (2013). Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT-Food Science and Technology*, 50, 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.002>.
- ✚ Zink, J., Wyrobnik, T., Prinz, T. & Schmid, M. (2016). Physical, chemical and biochemical modifications of protein-based films and coatings: An extensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (9), 1376. <https://doi.org/10.3390/ijms17091376>.
- ✚ Zizzari, T., Pliatsika, D., Gall, M., Fischer, T., & Riedl, R. (2021). New perspectives in oral peptide delivery. *Drug discovery today*, 26 (4), 1097-1105.

ANNEXES

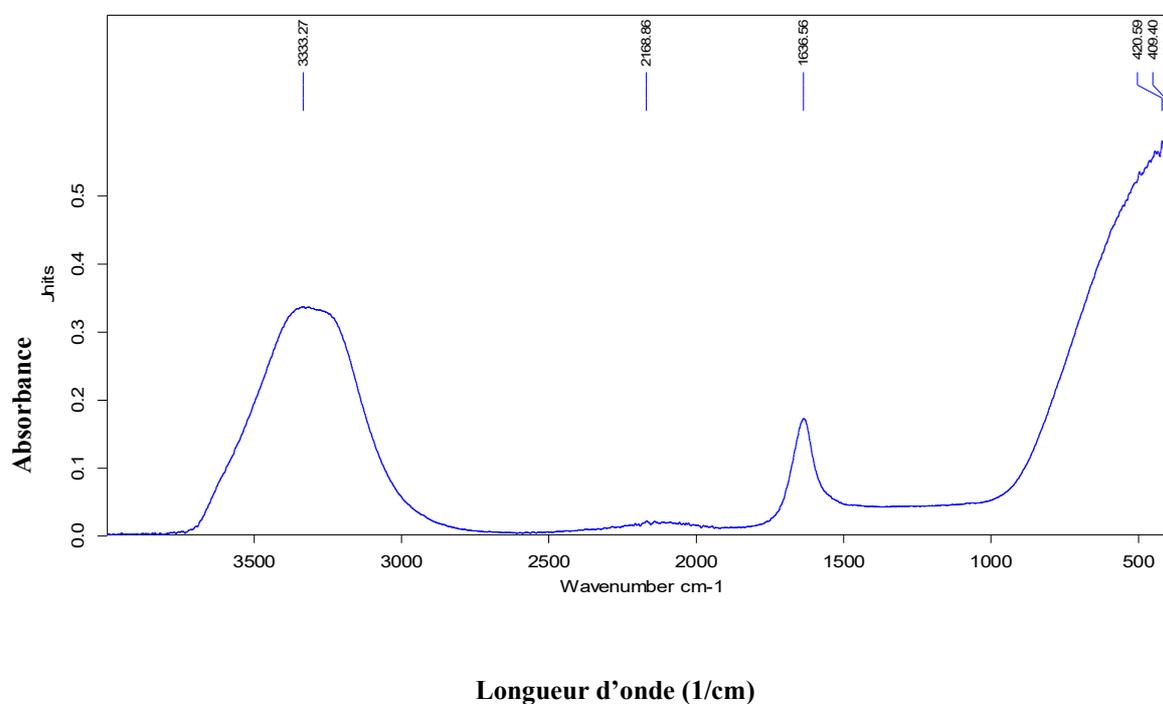
ANNEXES

Annexe 1 : Spectre FTIR de la fraction albumine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)

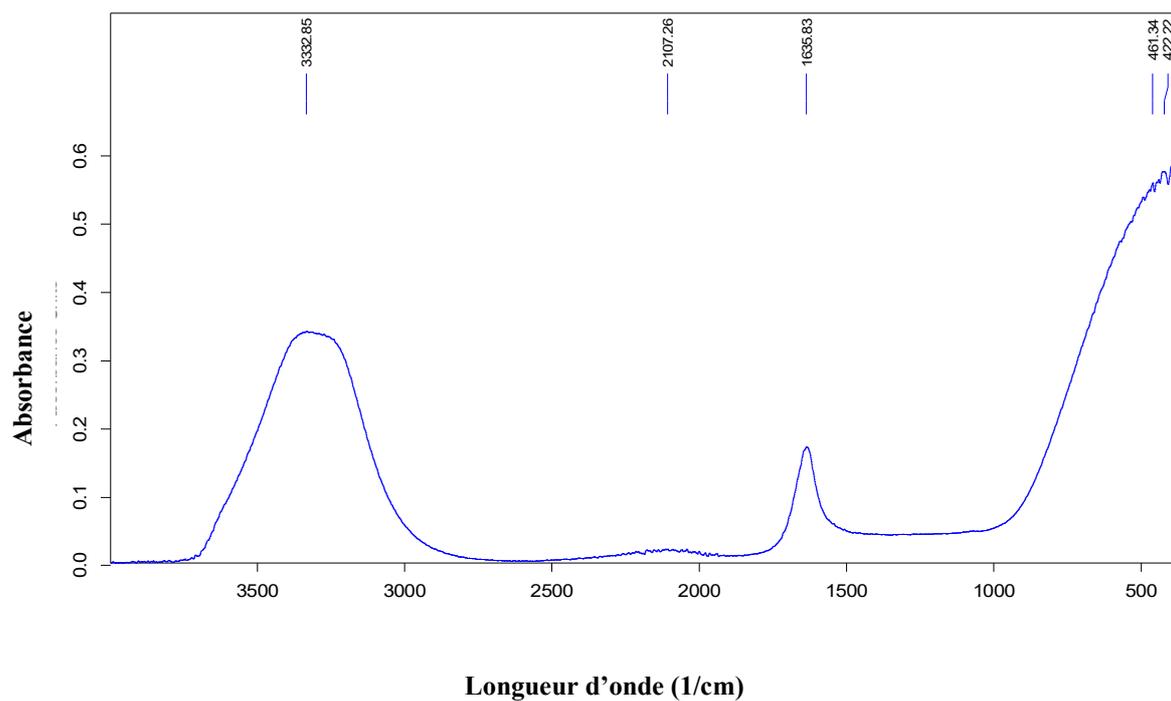
(a)



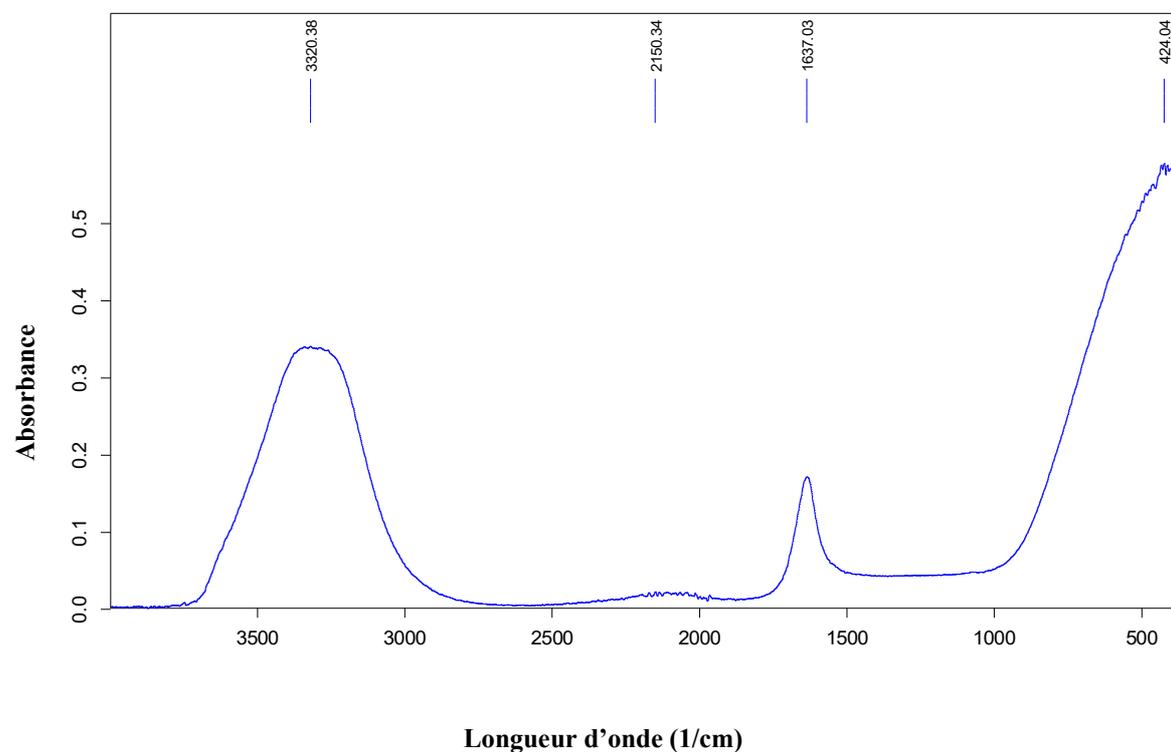
(b)



(c)

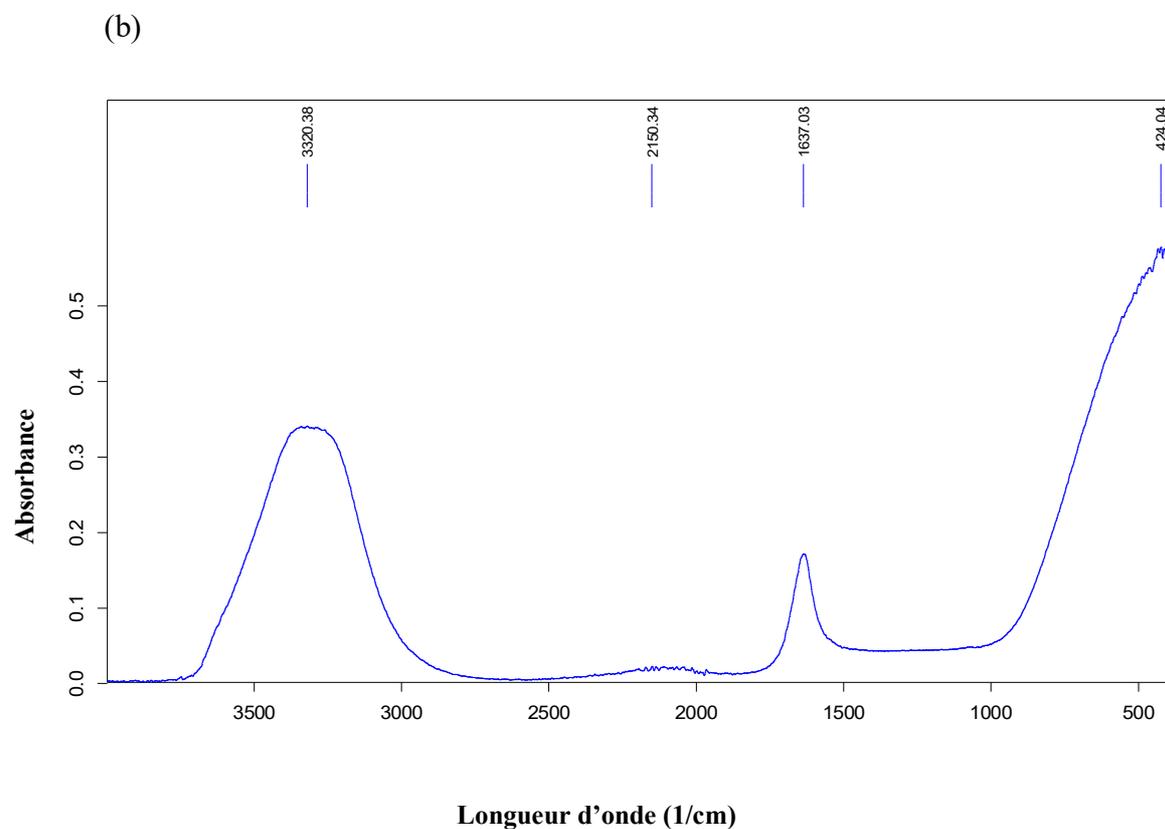
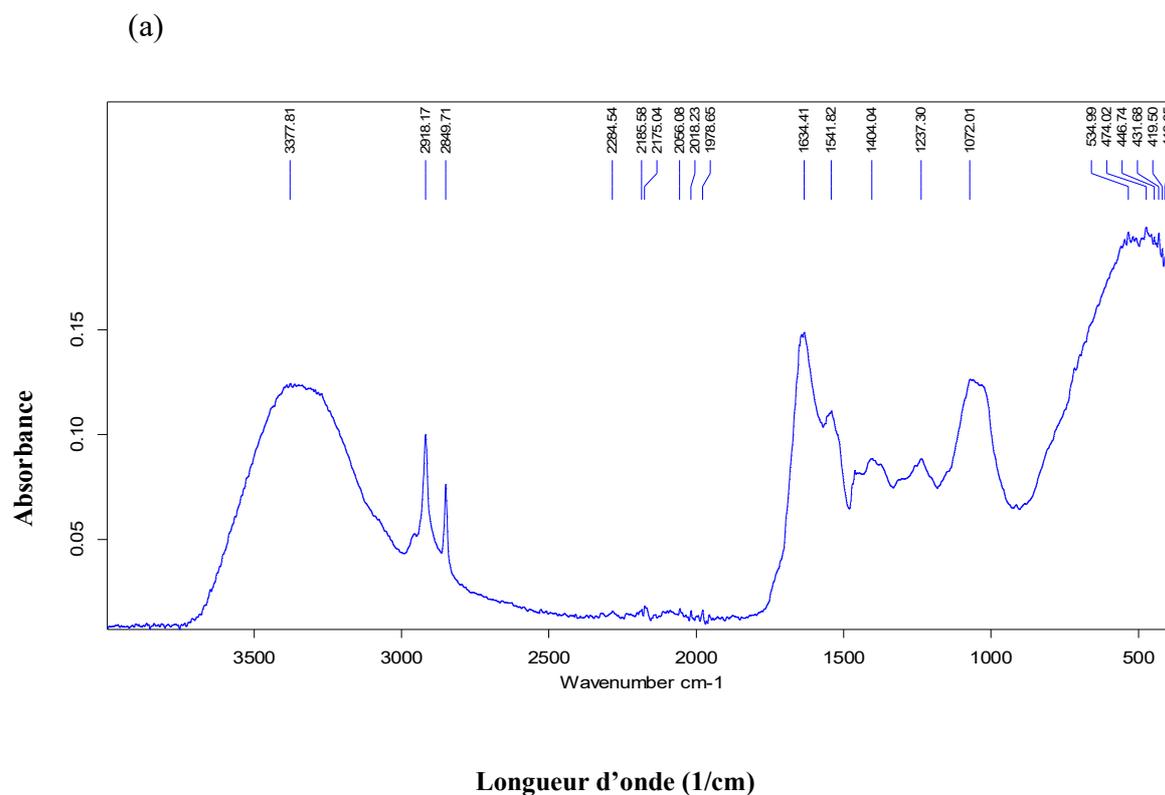


(d)

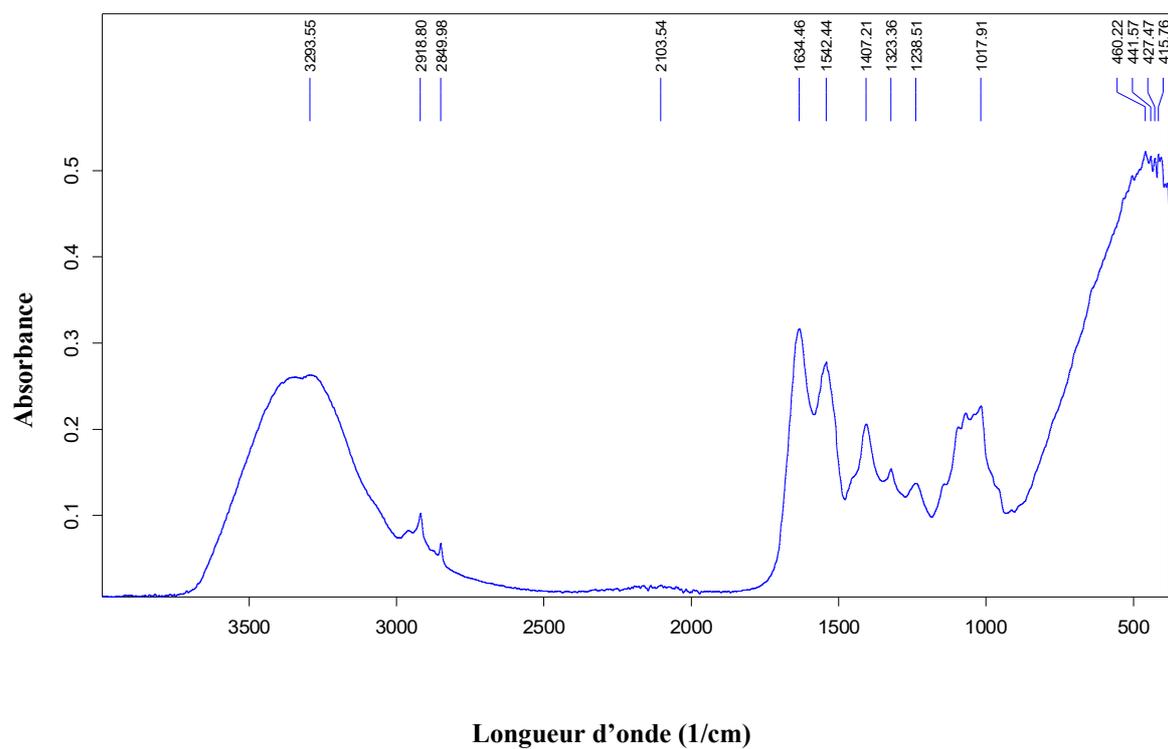


Annexe 2 : Spectres FTIR de la fraction globuline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C

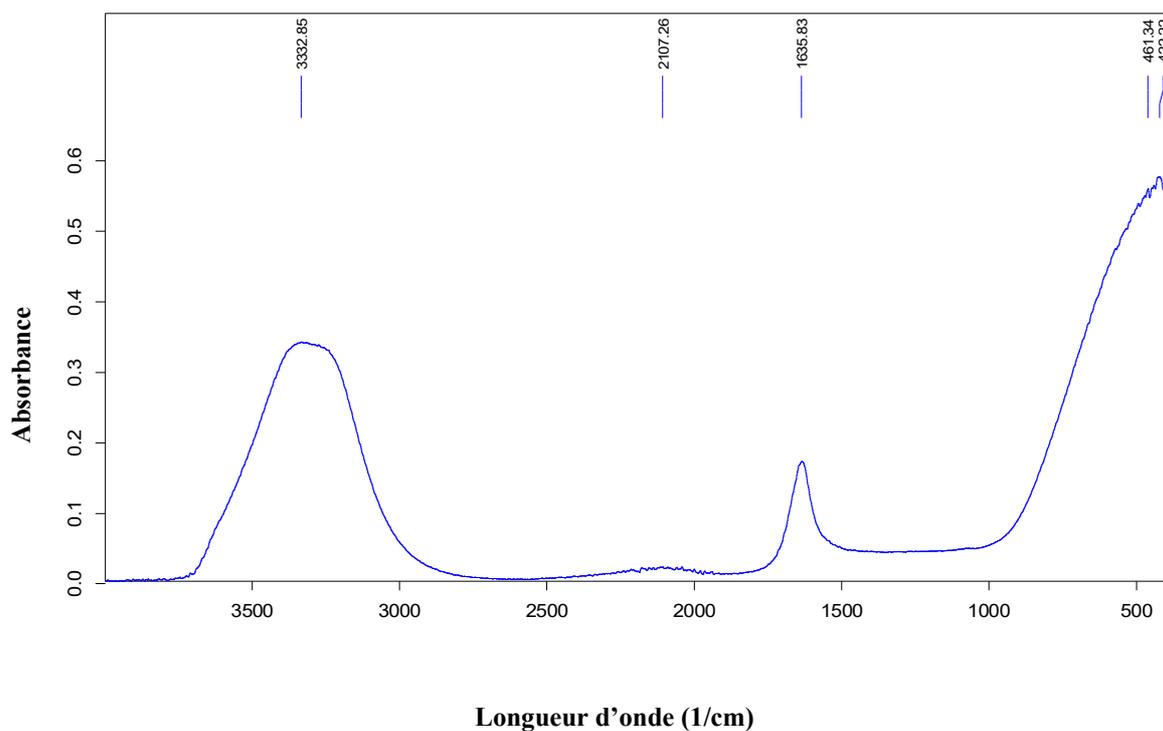
(d)



(c)

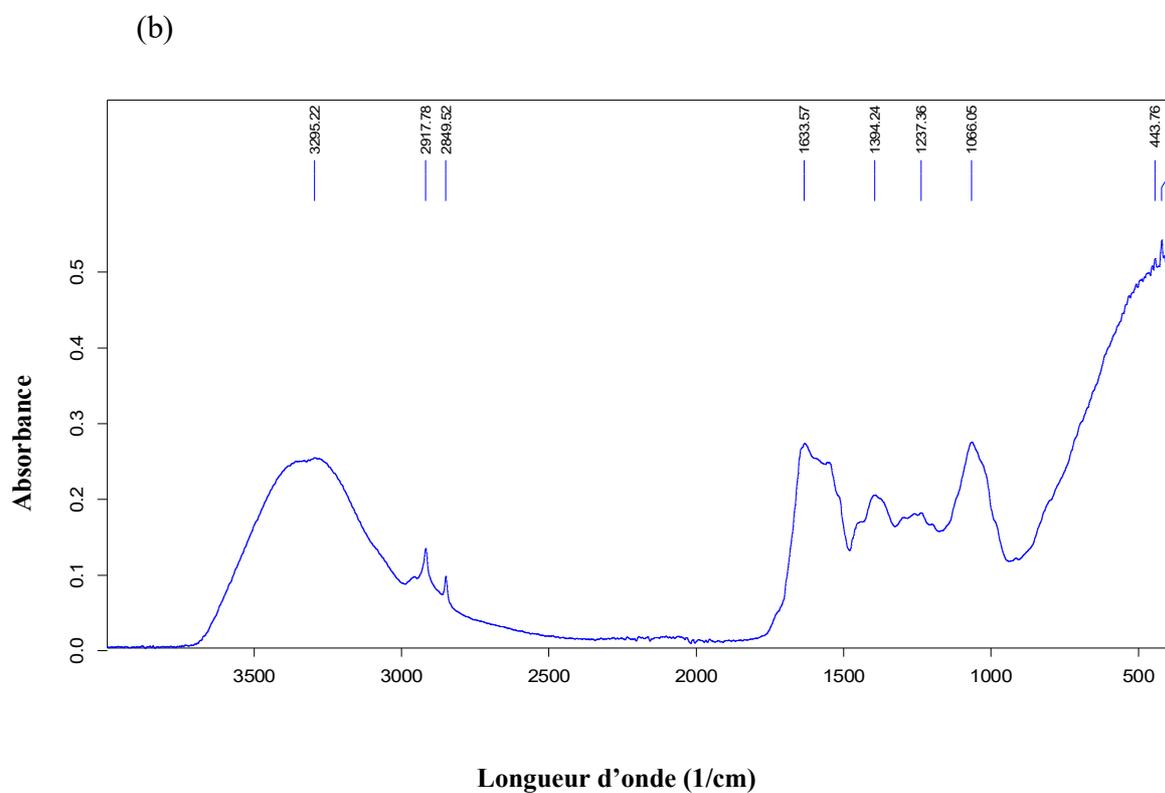
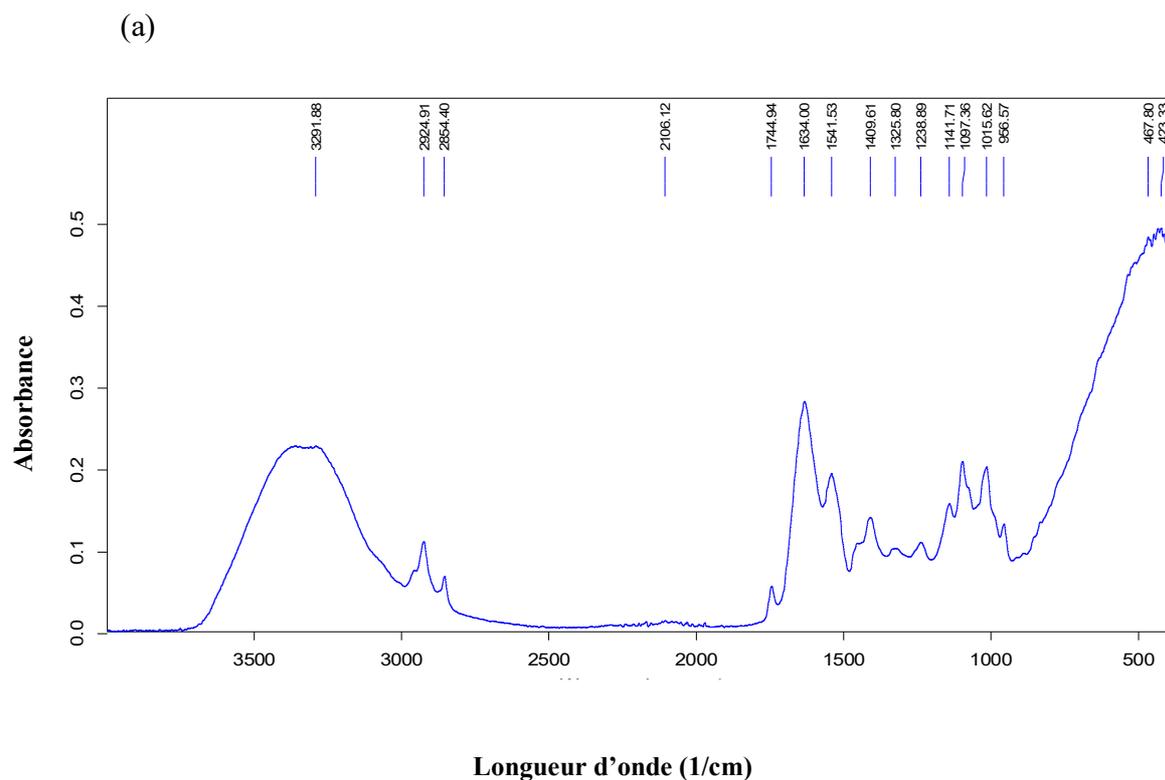


(d)

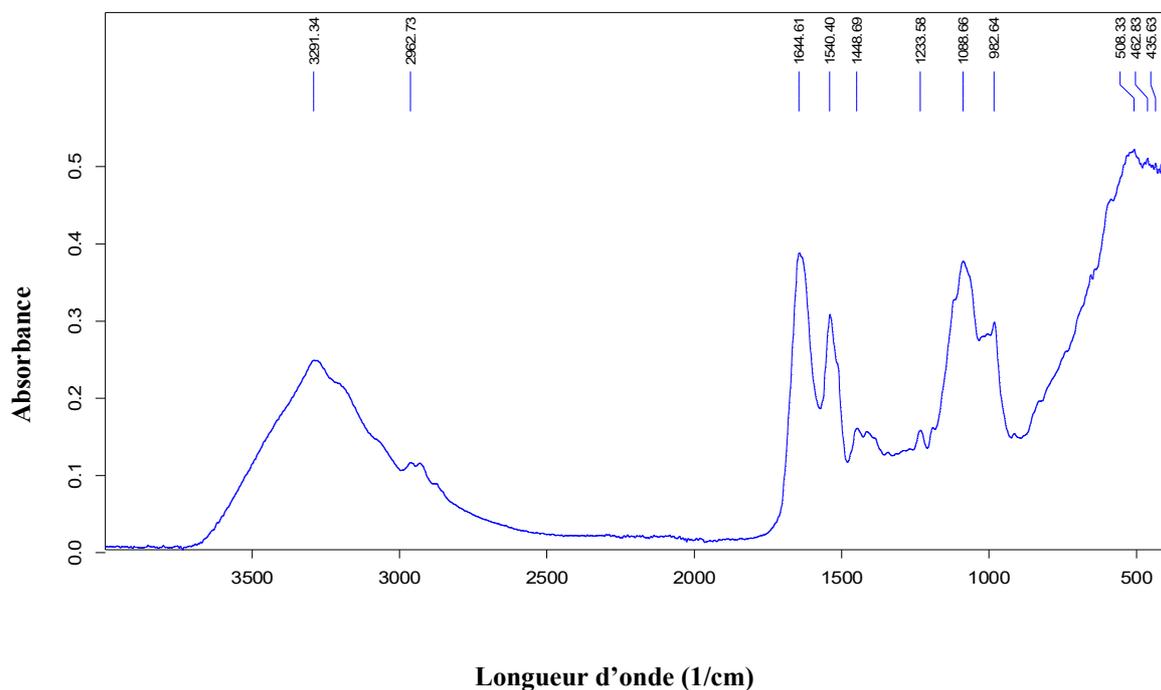


Annexe 3 : Spectres FTIR de la fraction glutéline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C

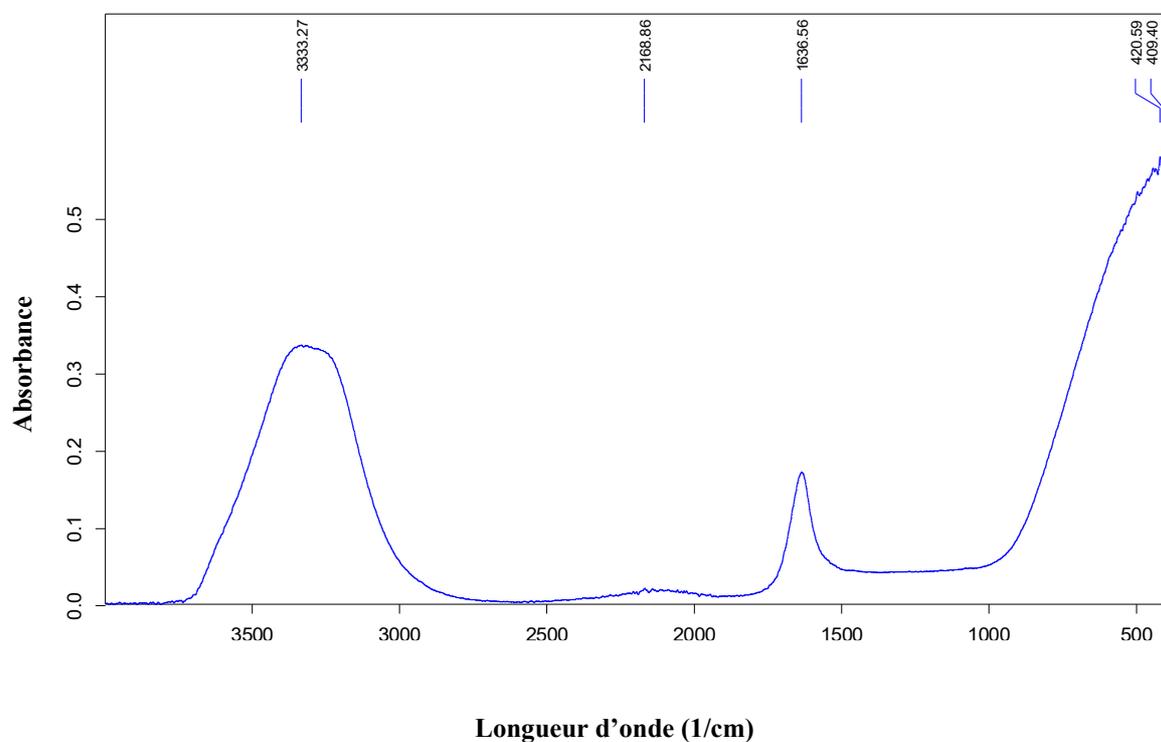
(d)



(c)

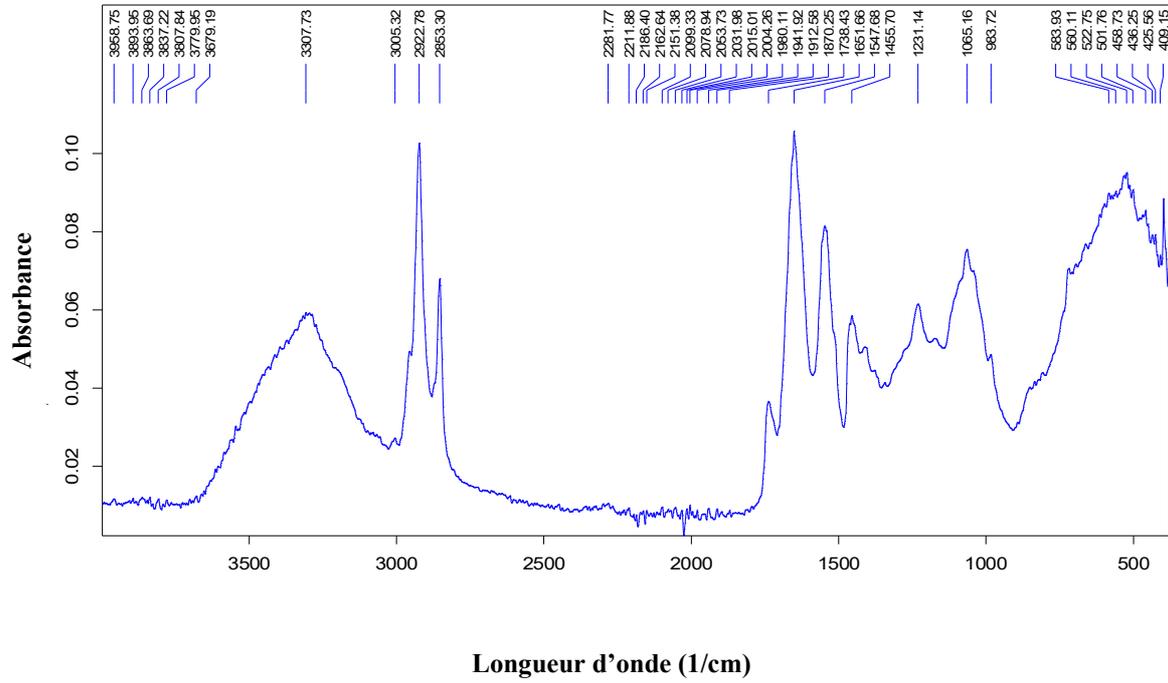


(d)

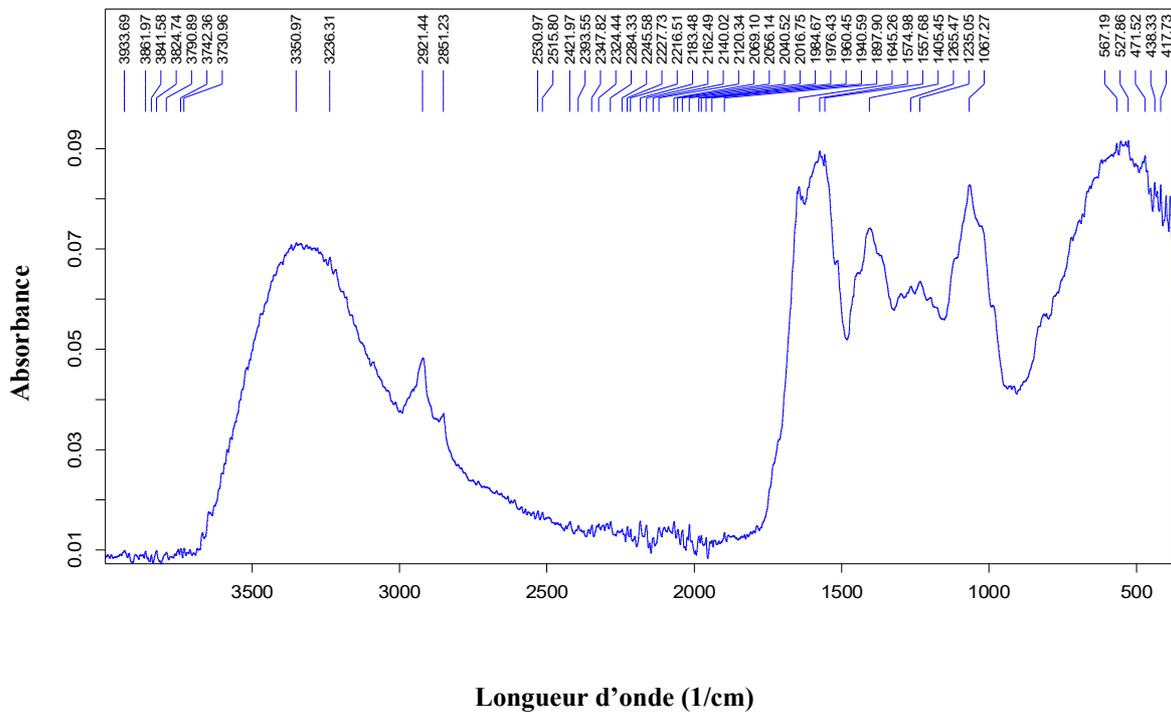


Annexe 4 : Spectres FTIR de la fraction prolamine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)

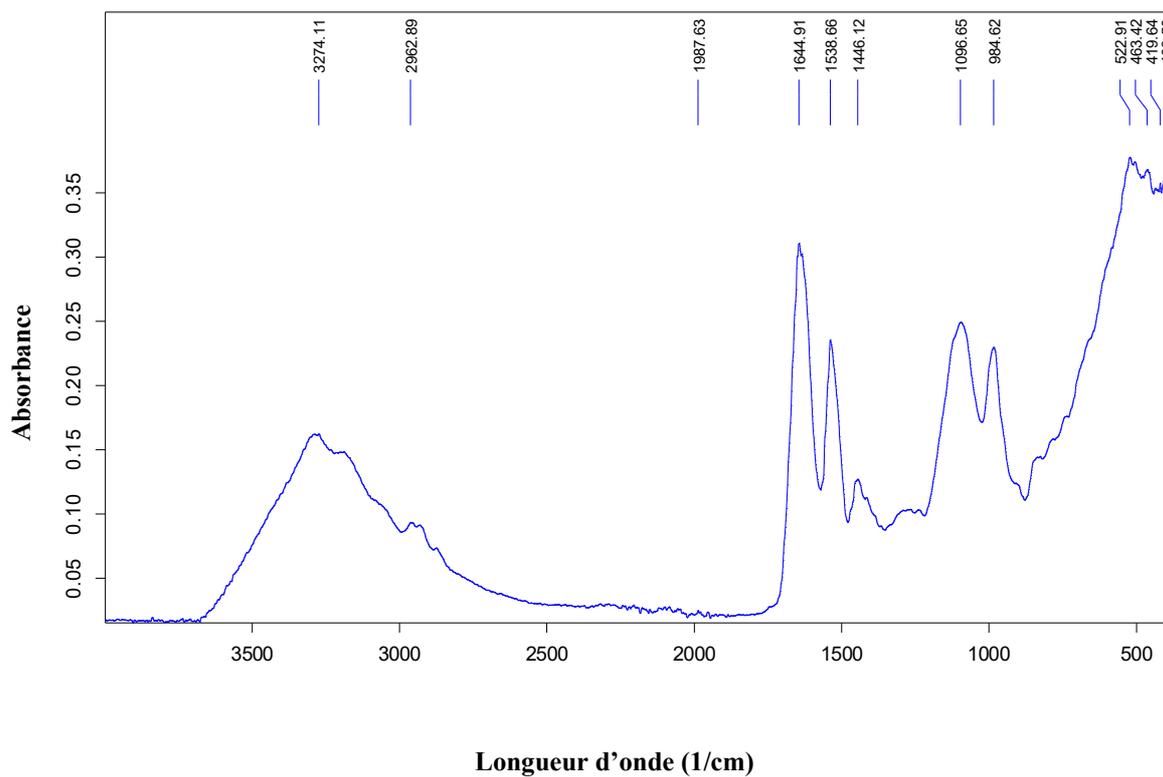
(a)



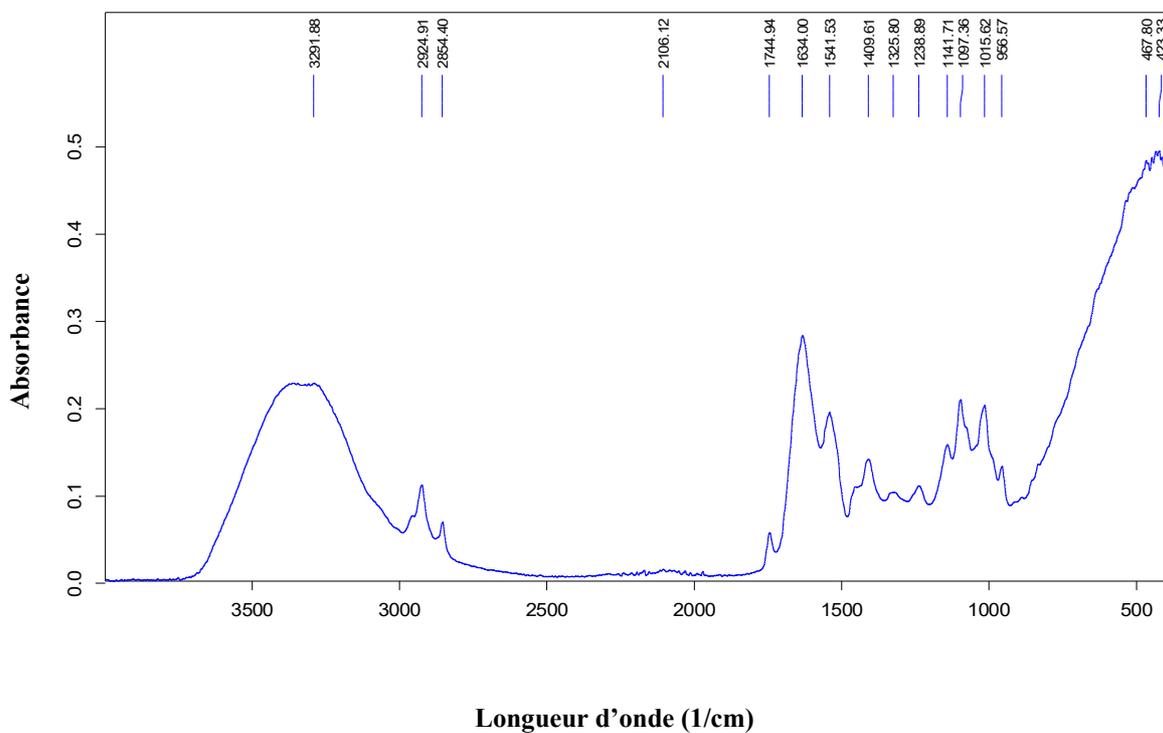
(b)



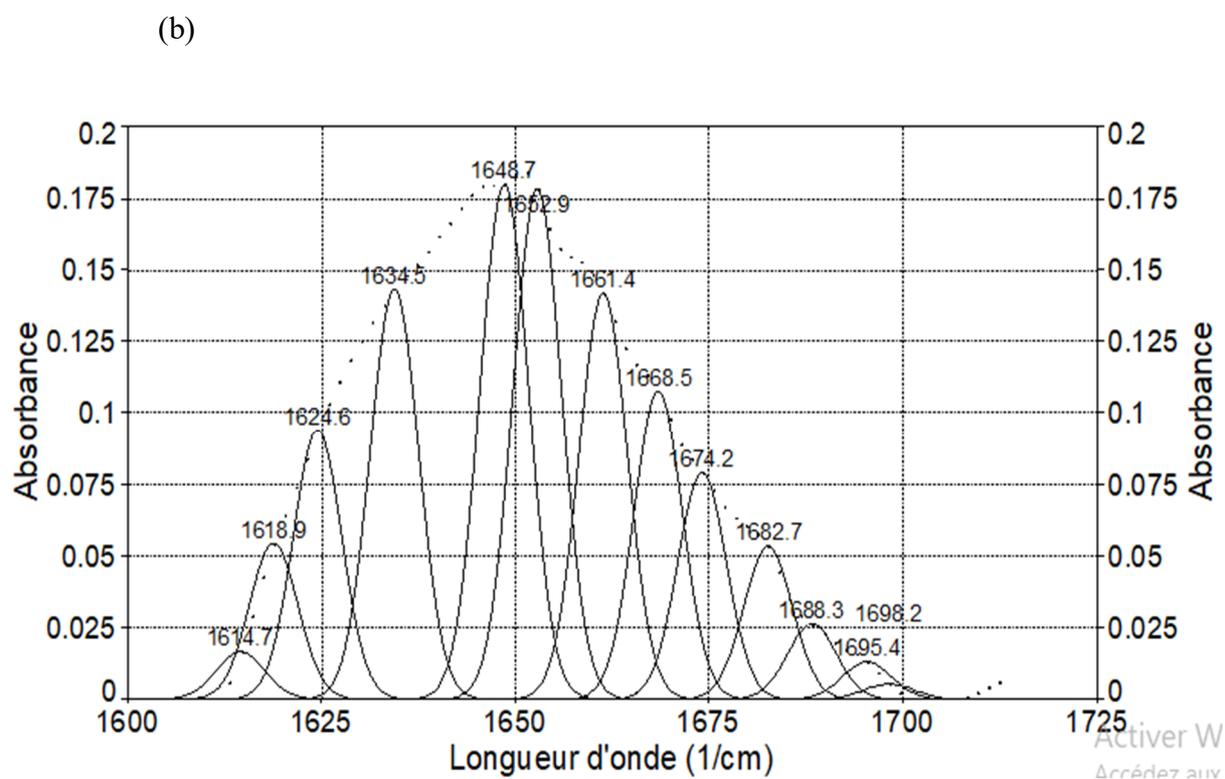
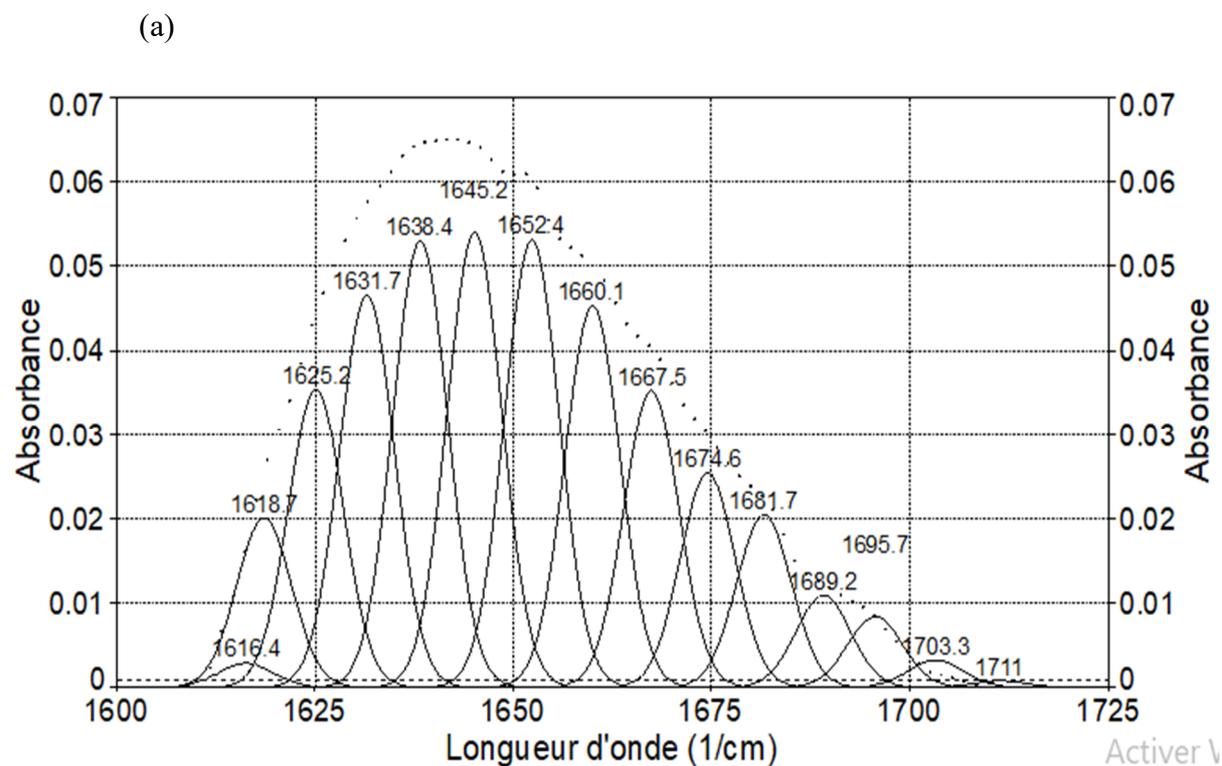
(c)



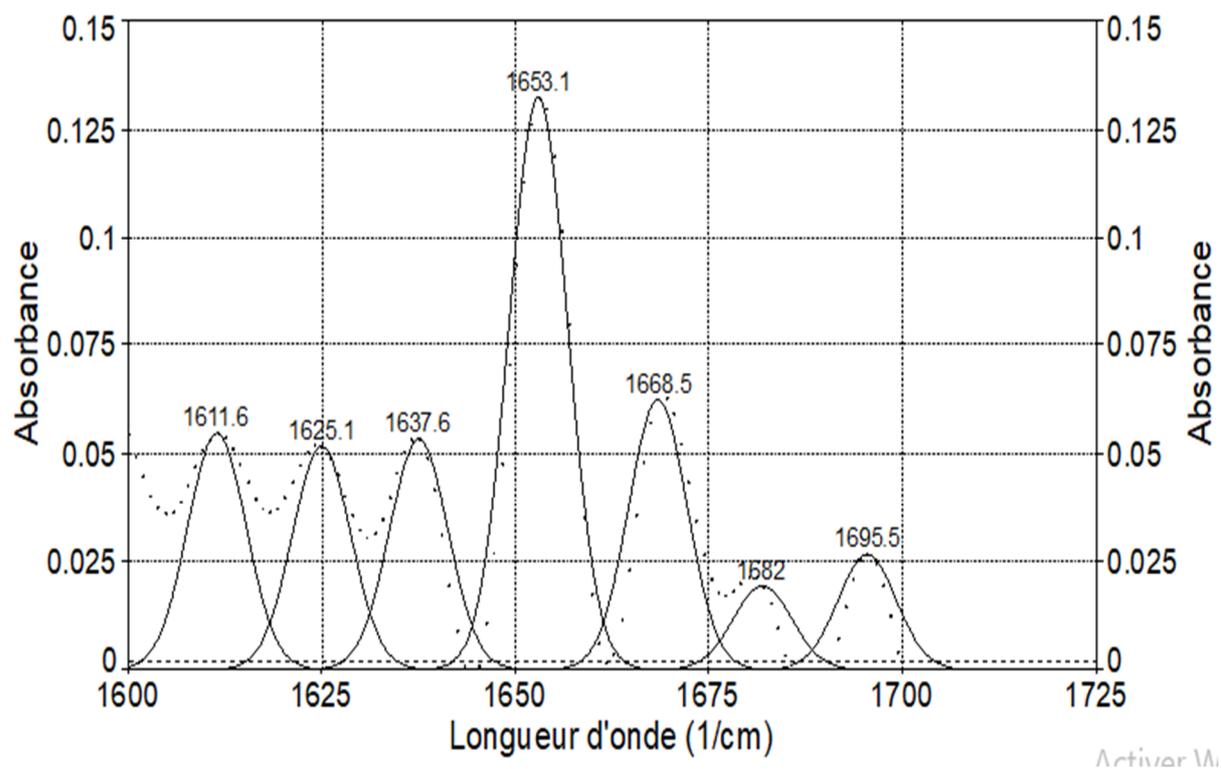
(d)



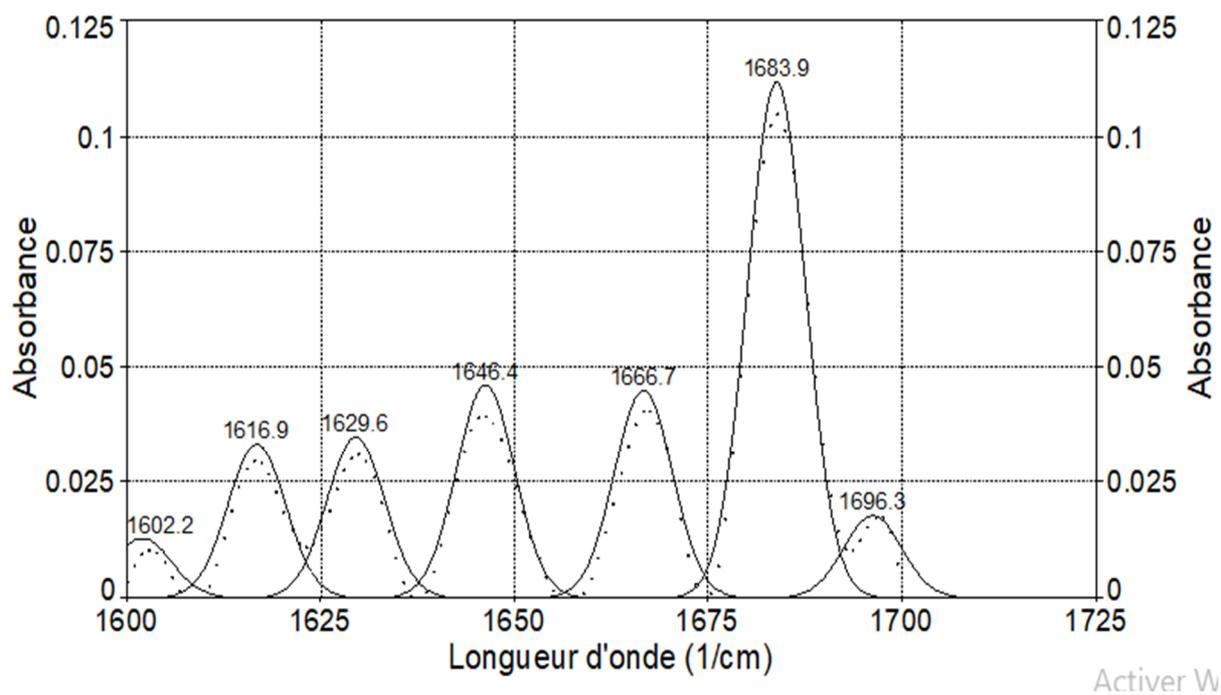
Annexe 5 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'Amide I de la fraction albumine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)



(c)

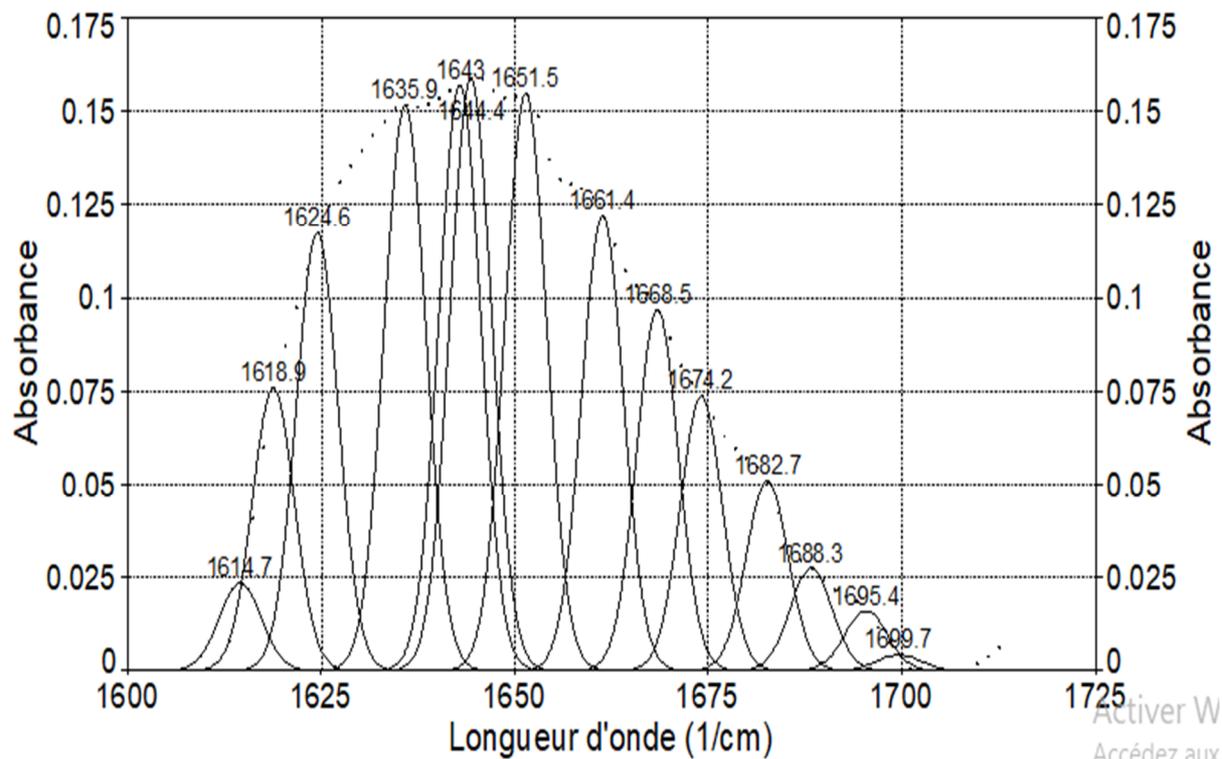


(d)

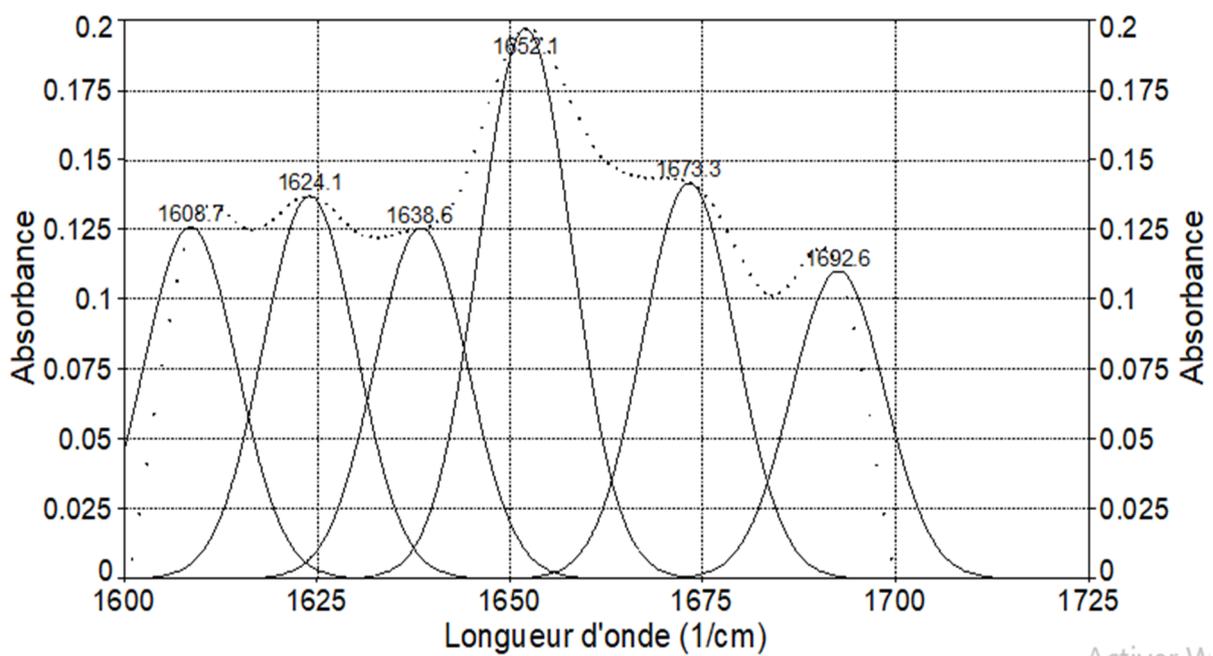


Annexe 6 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'Amide I de la fraction globuline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)

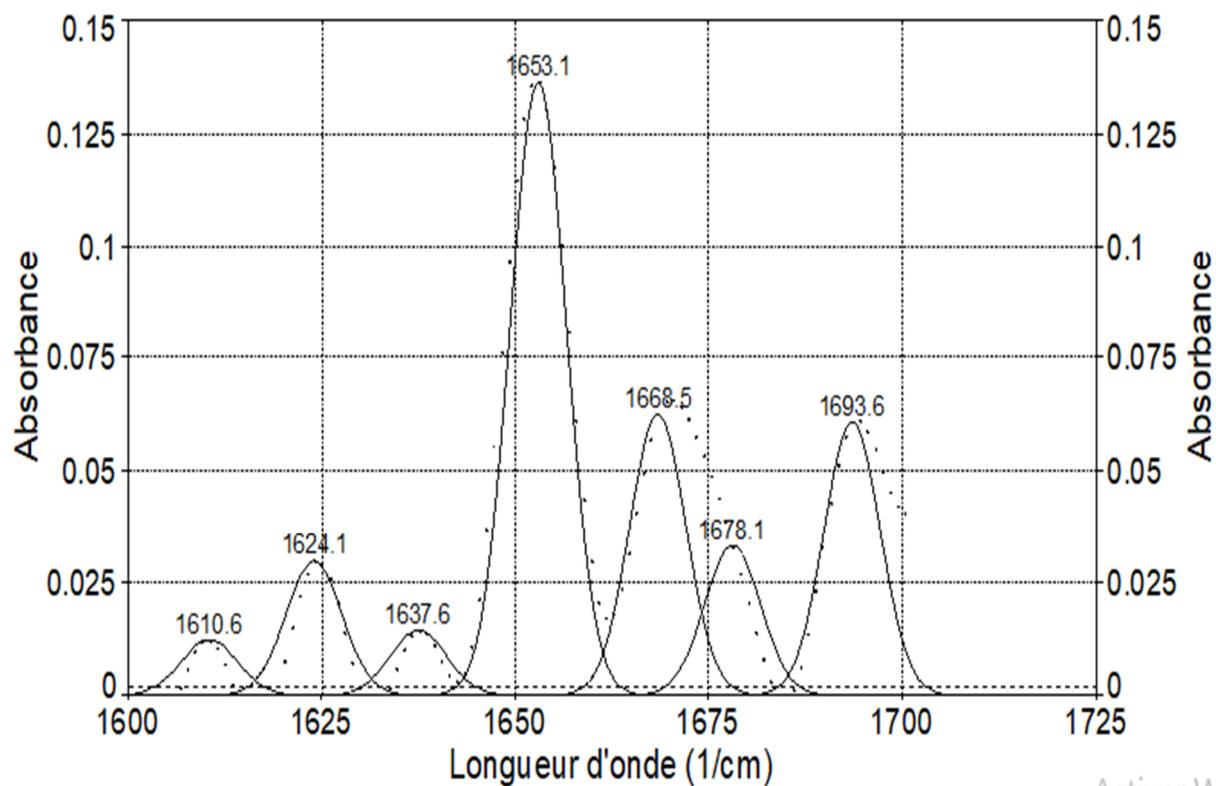
(a)



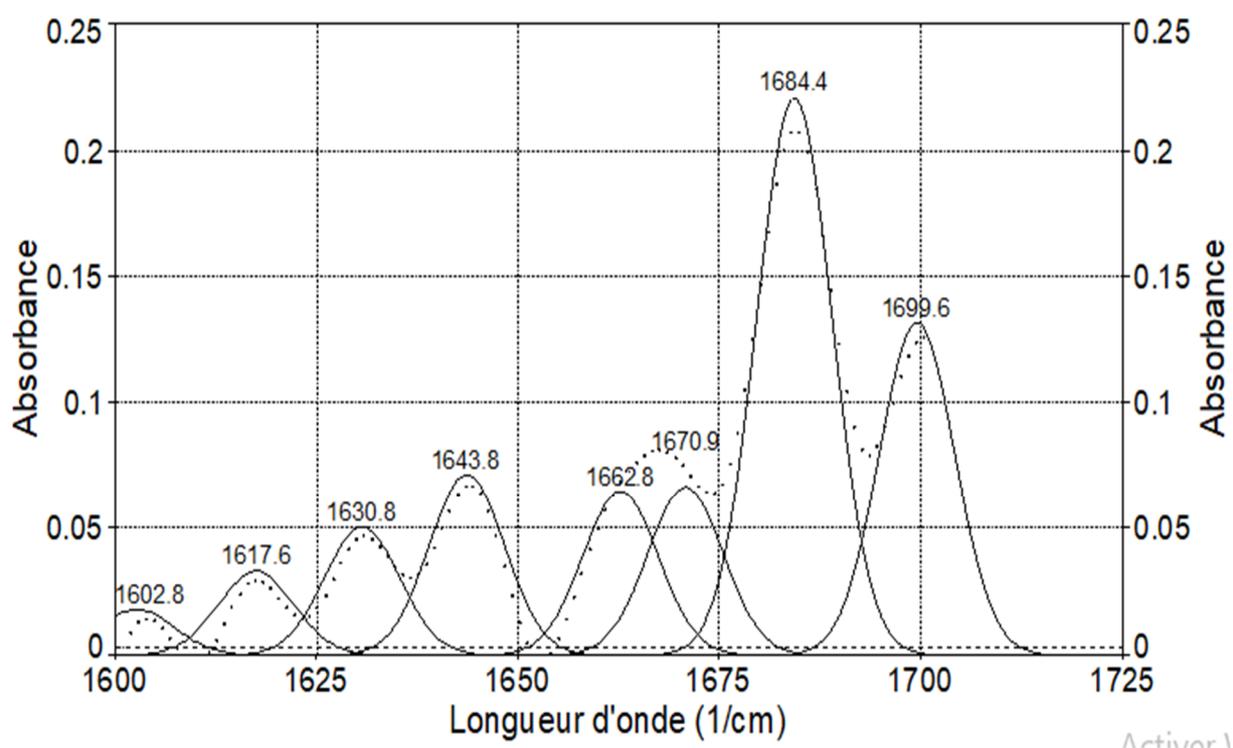
(b)



(c)

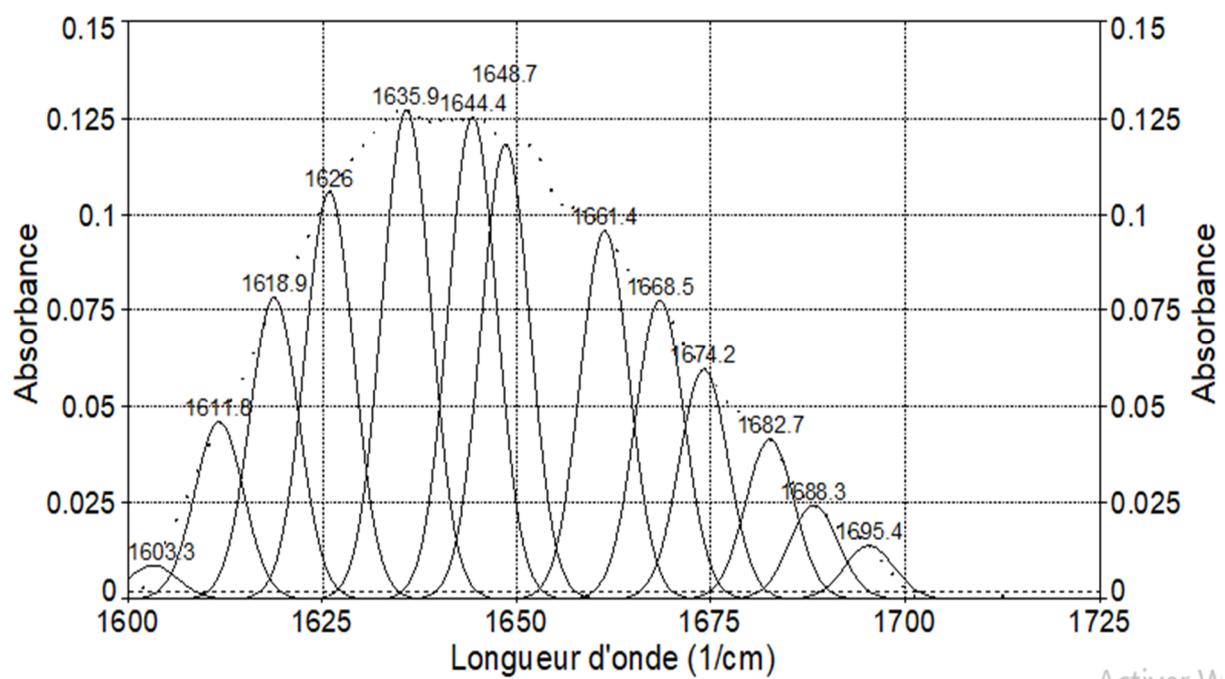


(d)

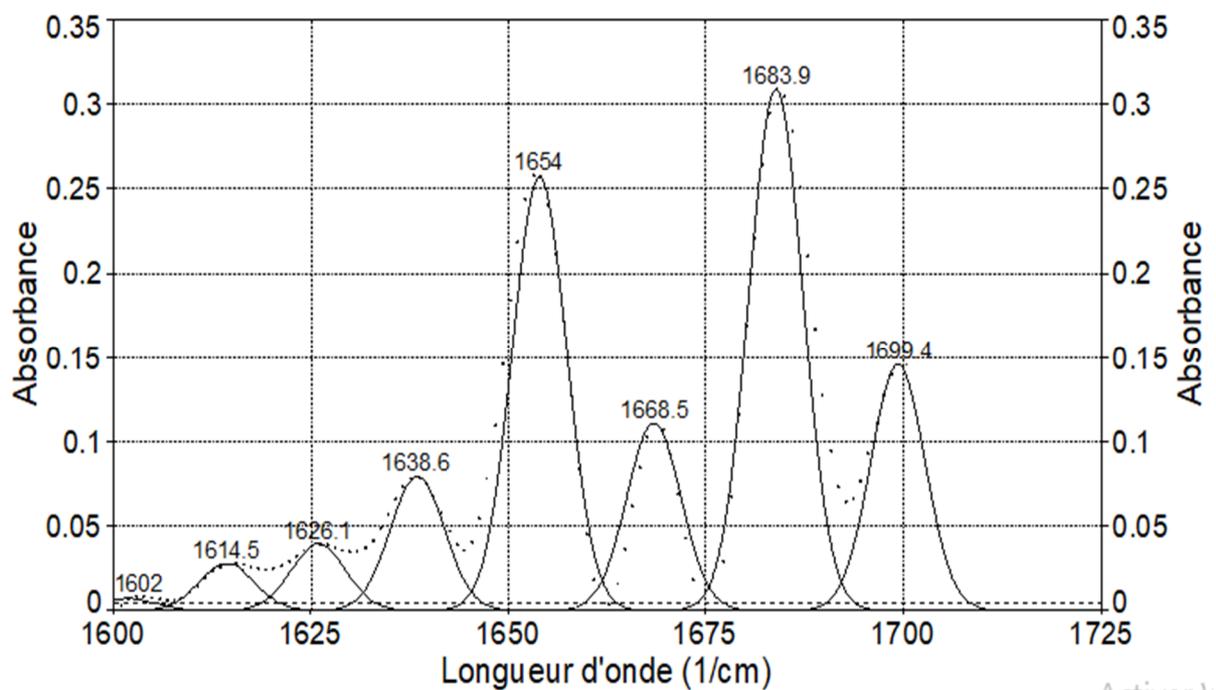


Annexe 7 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'Amide I de la fraction glutéline à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)

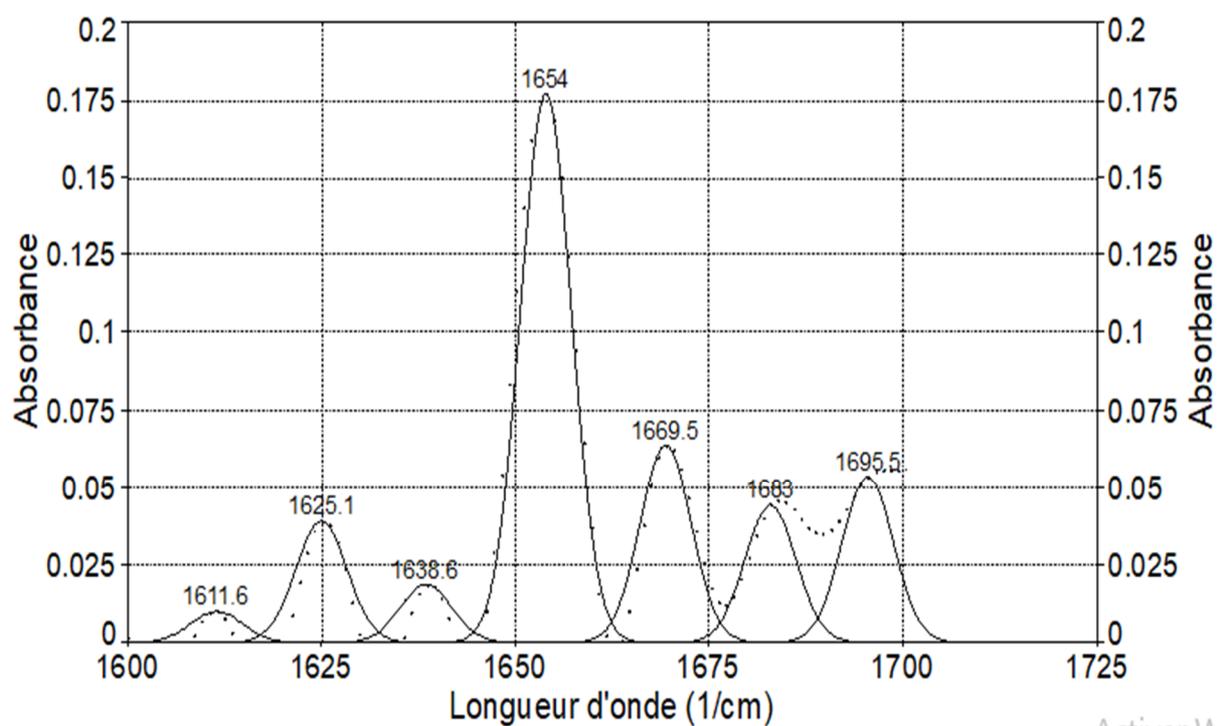
(a)



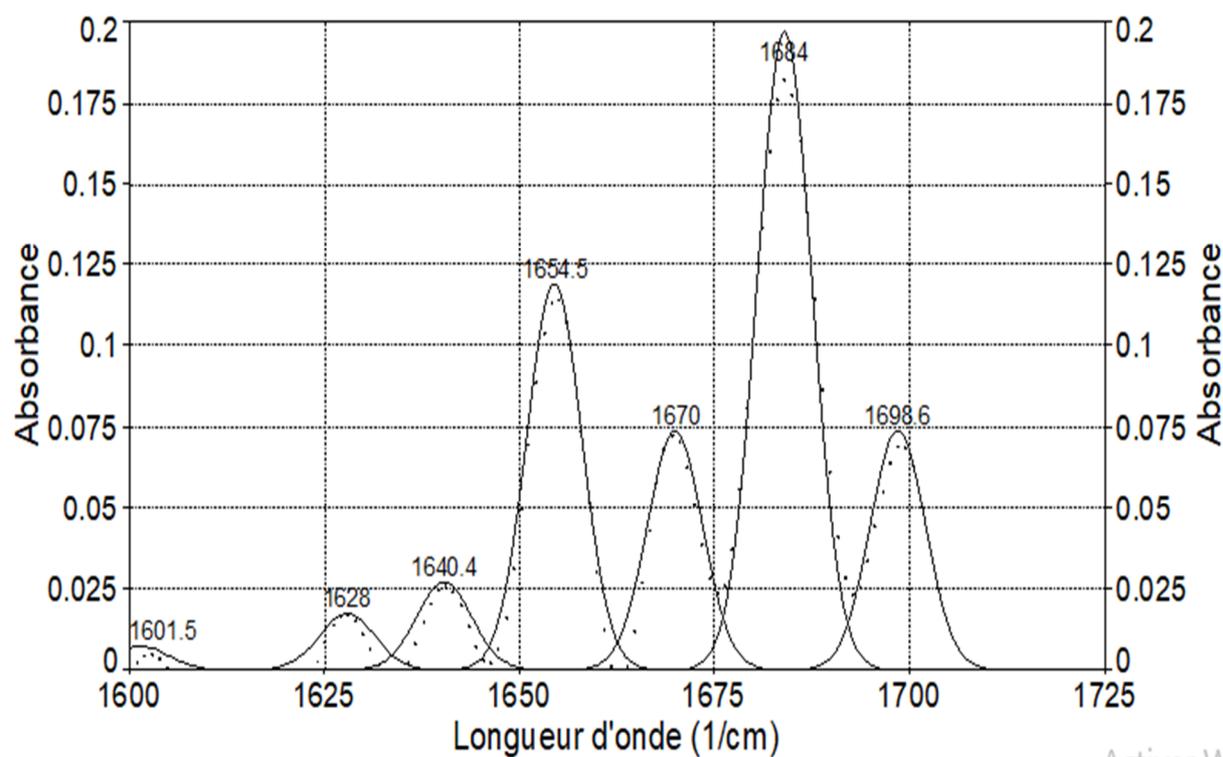
(b)



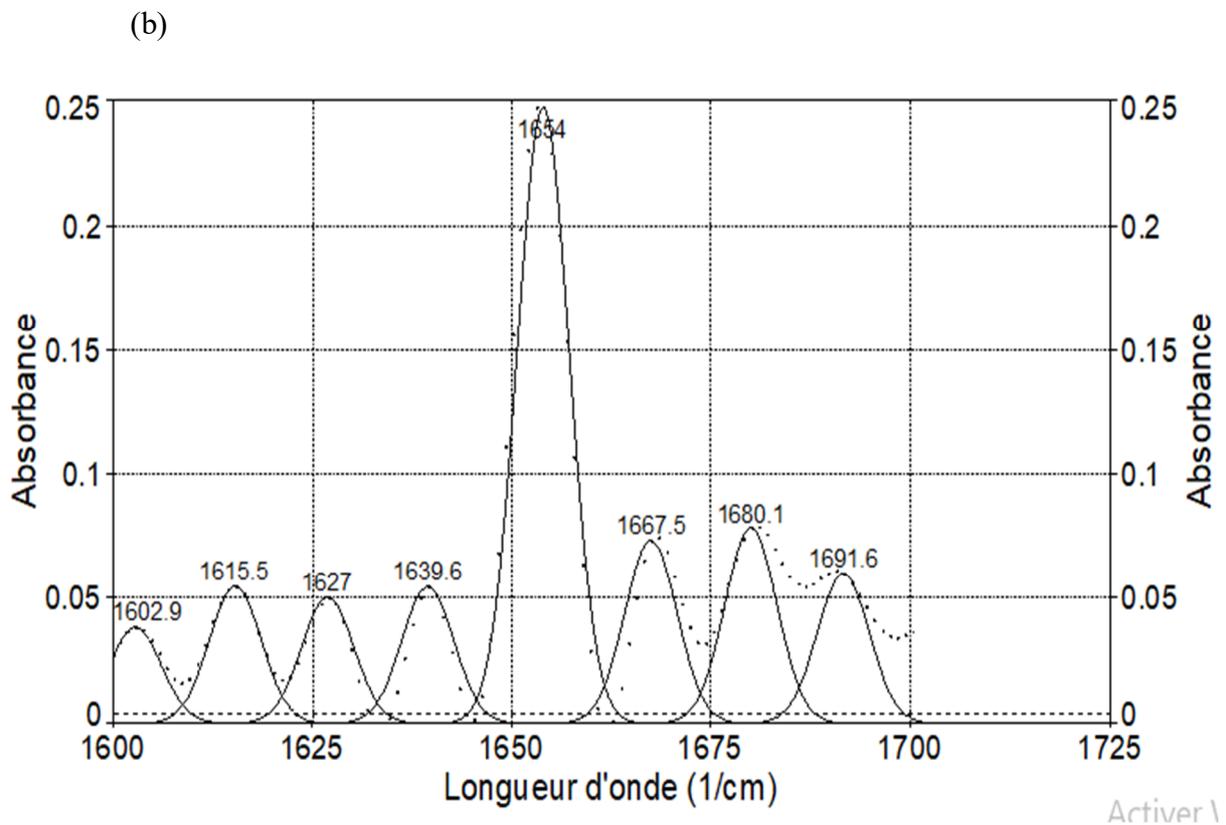
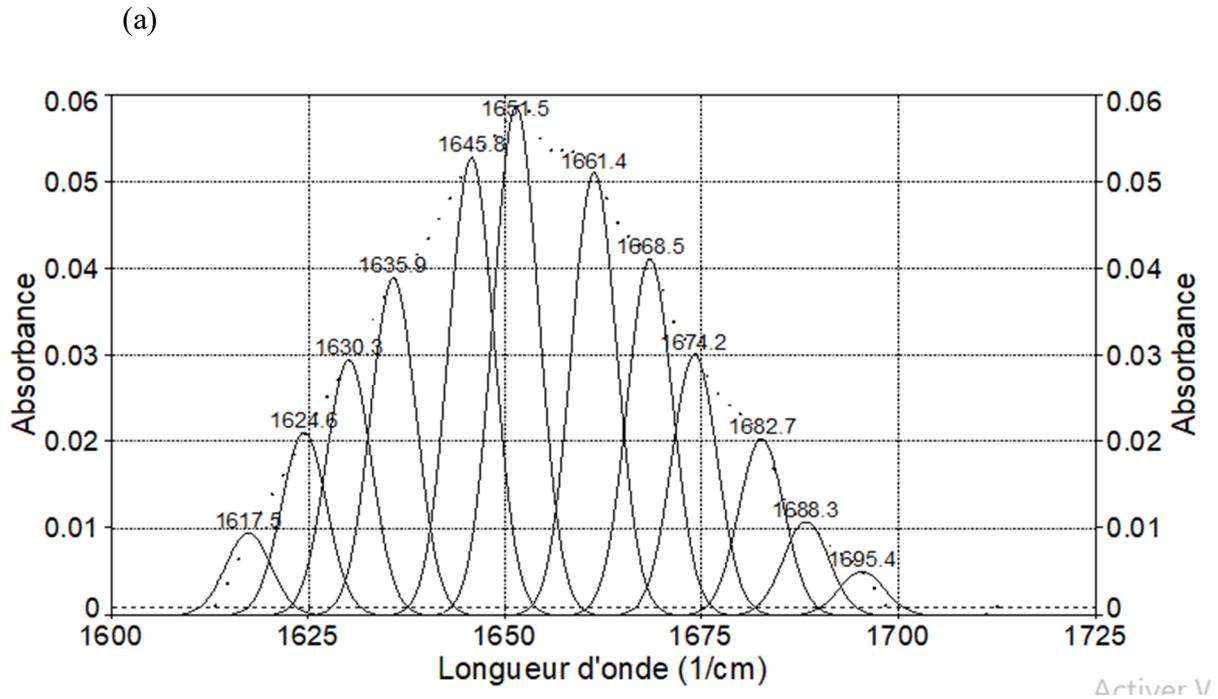
(c)



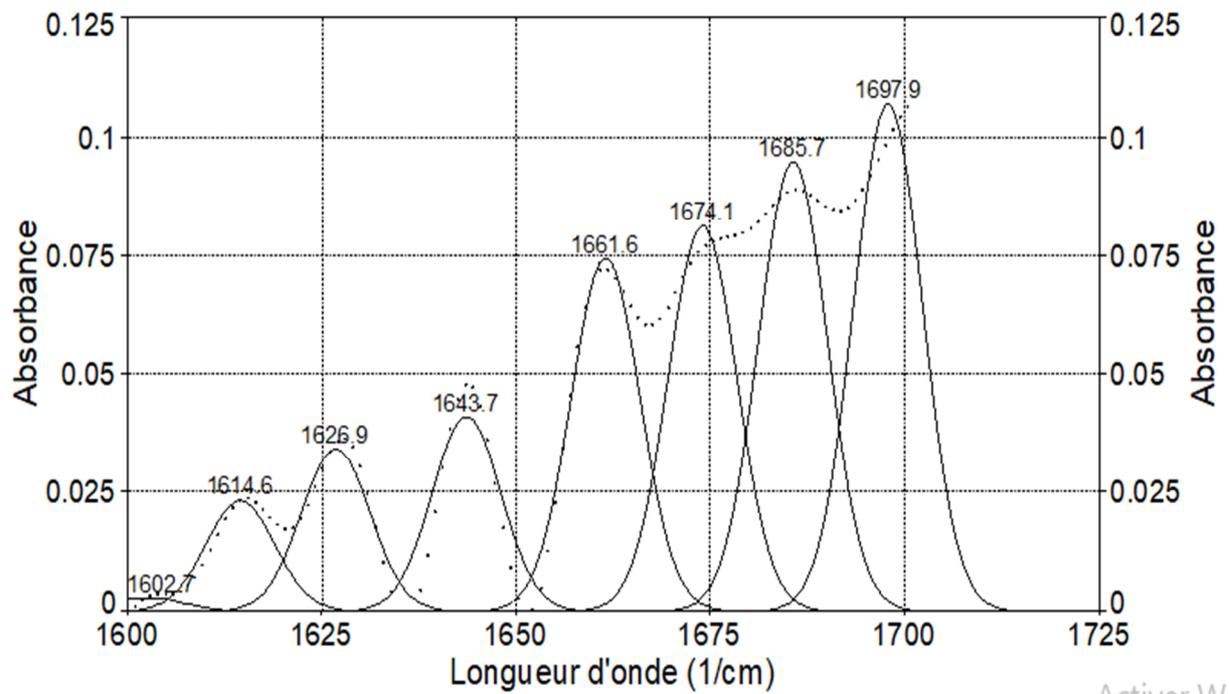
(d)



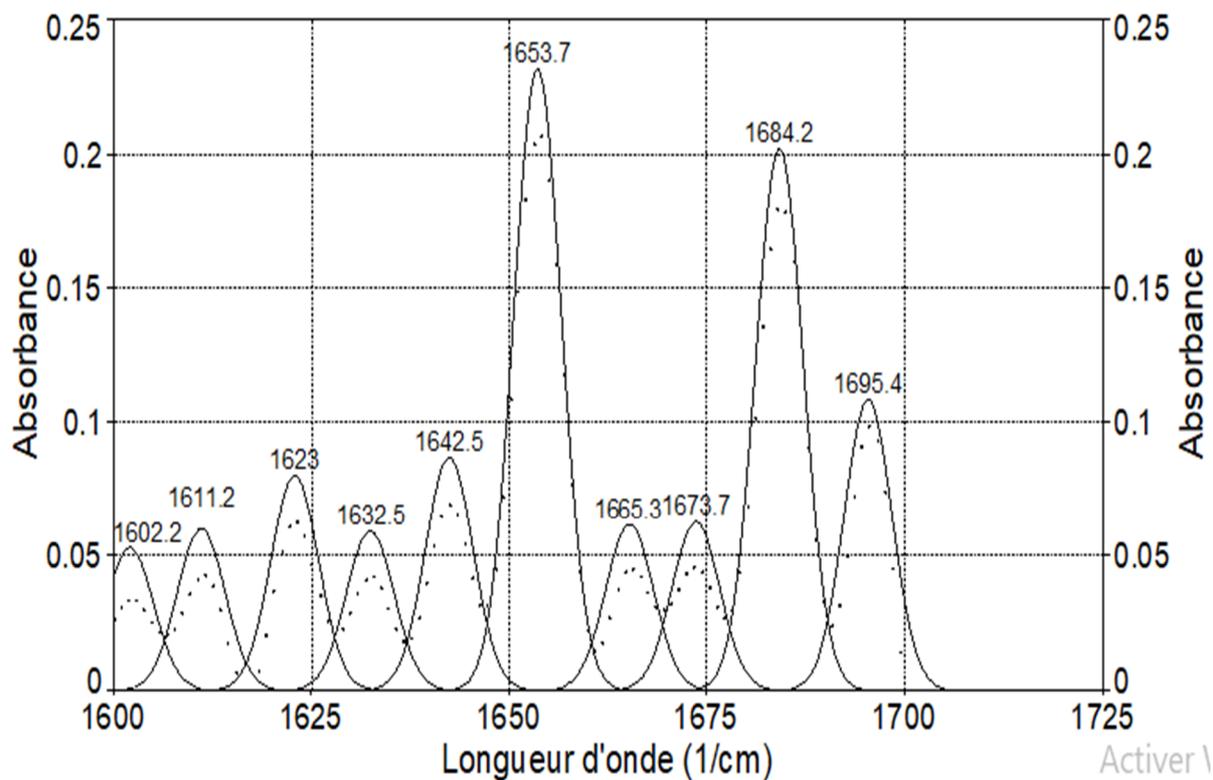
Annexe 8 : Spectres déconvolués de la bande d'absorption de l'Amide I de la fraction prolamine à 25 °C (a), 50°C (b), 70°C (c) et 80°C (d)



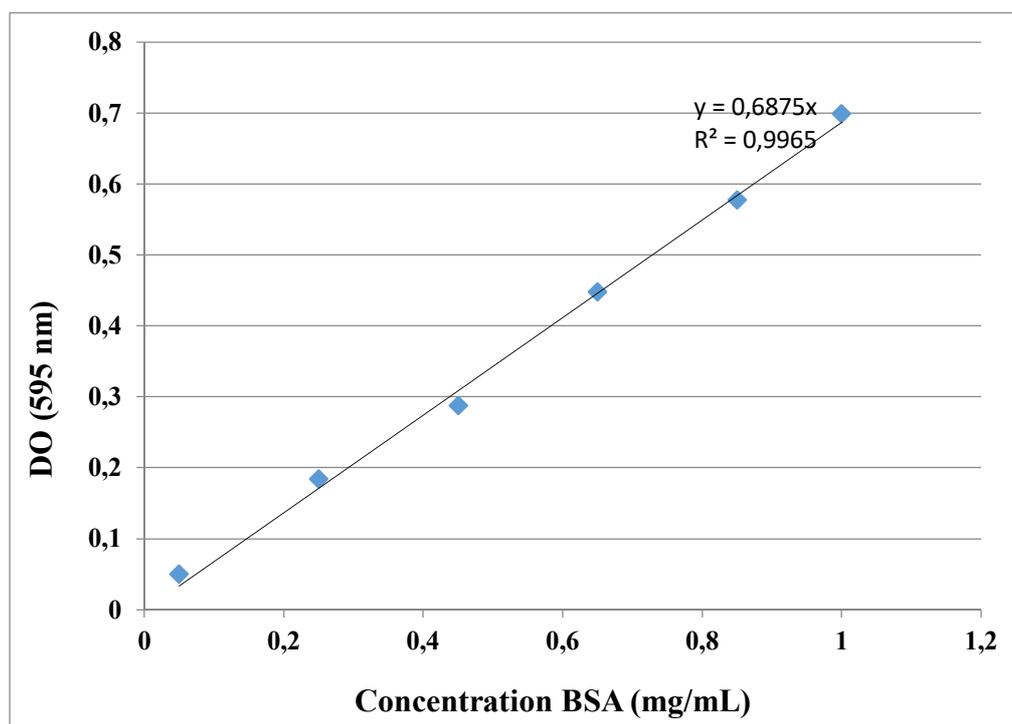
(c)



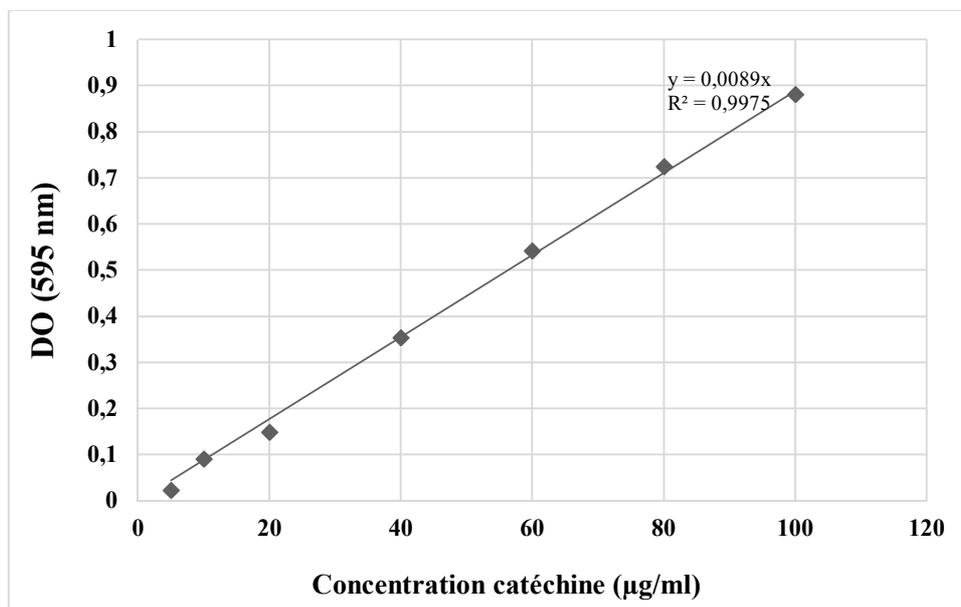
(d)



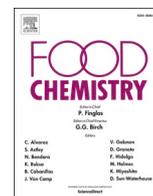
Annexe 9 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford



Annexe 10 : Droite d'étalonnage pour la détermination de la capacité réductrice du Fer



Annexe 11 : Liste des publications



Effect of heat treatment on the structure, functional properties and composition of *Moringa oleifera* seed proteins

Christian Bernard Bakwo Bassogog^{a,b}, Carine Emilienne Nyobe^{a,b}, Simon Pierre Ngui^b, Samuel René Minka^b, Martin Alain Mune Mune^{c,*}

^a Food and Nutrition Research Centre, PO Box 6163 Yaounde, Cameroon

^b Department of Biochemistry, University of Yaounde I, PO Box 812 Yaounde, Cameroon

^c Faculty of Science, University of Maroua, PO Box 814, Maroua, Cameroon

ARTICLE INFO

Keywords:

Moringa oleifera
Protein isolate
Protein composition
Secondary structure
Functional properties

ABSTRACT

Knowledge on how food processing conditions and protein composition can modulate individual or food matrix protein functionality is crucial for designing new protein ingredients. In this regard, we investigated how heat treatment and protein composition influence physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate. Results showed that changes in processing temperature induced modifications in the conformation affecting the hydrophobic core of proteins. Protein isolate was more soluble at room temperature whereas prolamin fraction presented high solubility at 70 °C. Glutelin showed higher emulsifying properties at all temperatures. Protein composition also significantly affected physicochemical and functional properties of protein isolate. Increasing soluble glutelin enhanced solubility while increasing albumin, globulin and glutelin decreased hydrophobicity of the isolate. Likewise, increasing soluble globulin improved emulsifying capacity, and emulsion stability of the isolate was negatively affected by increase in albumin and glutelin. These findings could enhance application of *Moringa oleifera* protein in food formulations.

1. Introduction

Moringa oleifera (Moringaceae) is a valuable plant with important nutritional and medicinal values (Makkar & Becker, 1997). The plant is usually named horseradish tree and is now cultivated in all tropical and subtropical regions, as in Africa, with the particularity to be resilient to climate change, poor and averagely dry soils (Mughal, Ali, Srivastava, & Iqbal, 1999). All parts of this plant are used for food and medicinal uses (Makkar & Becker, 1997). *Moringa oleifera* seed is rich in fat, protein, minerals and vitamins. Protein contains all essential amino acids with high nutritional value (Gopalakrishnan, Doriya, & Kumar, 2016; Mune Mune, Nyobe, Bassogog, & Minka, 2016). *Moringa oleifera* seeds also showed significant effects in reducing blood lipids, blood pressure, regulating the stomach, protecting the liver from alcohol, and enhancing the body's immunity (Du, Sun, Yan, Luo, & Dai, 2017). In addition, hydrolysates from *Moringa oleifera* seed protein isolate showed high bioactive properties, particularly antioxidant, antidiabetic and antihypertensive (Garza et al., 2017). Furthermore, functional properties of *Moringa oleifera* protein were also studied by Mune Mune, Bakwo,

Nyobe, and Minka (2016). Important biological properties in addition to potential adequate functional properties could enhance utilisation of *Moringa oleifera* protein in food and non-food formulations. For this purpose, it is necessary to investigate how *Moringa oleifera* protein behaves under different physico-chemical conditions. It is well known that physicochemical factors such as pH, temperature, and ionic strength significantly influence the protein structure and functional properties. Modifications of these factors arise during food processing and protein extraction. It is then important to be able to predict the functional behaviour of *Moringa oleifera* protein under different physicochemical conditions to enhance its application in foods. Generally seed protein contains fractions (albumin, globulin, prolamin and glutelin) with different structure and properties. These fractions are separated on the basis of their solubility in different solvents namely, water, salt, ethanol and NaOH (Osborne, 1924).

The knowledge of protein composition and structure could be important to elucidate the functionality and application of legumes (Arise, Nwachukwu, Aluko, & Amonsou, 2017). Protein composition which can affect protein functionality may vary among legumes.

* Corresponding author.

E-mail address: martinmune@yahoo.fr (M.A. Mune Mune).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132546>

Received 23 September 2021; Received in revised form 19 February 2022; Accepted 21 February 2022

Available online 24 February 2022

0308-8146/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Generally seed protein contains high albumin and globulin compared to prolamin and glutelin. Protein ingredients are widely used in the food industry due to their specific structure, nutritional benefit, and their needed functionalities including emulsifying and foaming capacities, water-holding, fat absorption gelling, and thickening ability (Maryam, Ali, & Raffaele, 2021; Adedeji, Akharume, Felix, Aluko & Rotimi, 2020). Studies on wheat germ proteins showed that albumin presented high oil absorption capacity and water absorption capacity compared to globulin, glutelin and the protein isolate. In addition, globulin presented high emulsifying properties, and glutelin high foaming capacity and surface hydrophobicity. The structure of protein fractions was also particular, with albumin and globulin containing high α -helix and β -turns secondary structures, while glutelin contained high β -sheets and unordered secondary structures (Wang et al., 2017). Functional properties of protein isolates prepared from grain legumes were also related to secondary structure and surface hydrophobicity in a structure–function relationship presented by Mune Mune, Sogi, & Minka (2017). In another hand, the application of legume proteins in food makes use of processing parameters sometimes involving heat treatment. It is well known that heat treatment influences the structure and functional properties of proteins (Nguï, Nyobe, BakwoBassogog, Nchuaji Tang, Minka, & Mune Mune, 2021).

Most research focused only on the study of the structure, physicochemical and functional properties of plant proteins. Other studies analysed the influence of factors such as pH, temperature, ionic strength, and other processing methods on physicochemical and functional properties of plant proteins. Presently, there is scanty scientific evidence on how protein composition influences physicochemical and functional properties of plant protein isolate or concentrate. Therefore, this study aimed to analyze the effect of processing temperature and protein composition (ratio of Osborne soluble fractions) on the physicochemical and functional properties of protein isolate and fractions of *Moringa oleifera* seed.

2. Material and methods

2.1. Material

Fresh fruits (3,000 g) of *Moringa oleifera* were harvested during May 2019 in a field in the locality of Ezejang (4°15'N and 11°25'E), located at the Center Region of Cameroon. These fruits were then sun-dried for a week to facilitate seed extraction. Seeds obtained (approximately 1,000 g) were weighed, dried in an oven at 50 °C for 72 h, and stored in a polyethylene bag in a dry place until the flour was prepared.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of *Moringa oleifera* seed defatted flour

The dry seeds were sorted and then ground in a milling machine (Semap, France) fitted with a fine sieve of 200 μ m mesh size. The flour obtained was defatted twice using a hexane/ethanol (1:1, v/v) solvent system and a 1:3 (w/v) solid to liquid ratio as described by Mune Mune, Bakwo et al. (2016). The defatted flour was oven-dried at 45 °C, packed in a paper bag, and cold-stored at –80 °C until used.

2.2.2. Extraction of water, NaCl, NaOH, and ethanol-soluble proteins

The extraction of protein fractions was done by sequential solubilisation of 50 g defatted *Moringa oleifera* flour in water, NaCl, NaOH, and ethanol (70%) according to the Osborne & Voegt (1978) procedure. Extraction was repeated twice, then supernatants were pooled and proteins precipitated at their isoelectric point. For determination of the isoelectric point, 2 mL of albumin, globulin, and glutelin extracts were diluted with 18 mL of distilled water and the pH was adjusted between 2 and 12 using 0.01 N HCl or NaOH. The turbidity of the protein solution at pH values between 2 and 12 was scanned at 280 nm using a UV/Vis spectrophotometer and the pH with the highest absorbance taken as the

isoelectric point (pI) of that protein (Makeri, Mohamed, Karim, Ramakrishnan, & Muhammad, 2017). The supernatant from the hydroalcoholic extraction was concentrated using a Buchi R-100 rotary evaporator (French) at 50 °C for prolamin yield. Precipitated protein fractions (albumin, globulin, and glutelin) and the prolamin fraction were washed, then adjusted to pH 7 in distilled water, freeze-dried using a Bioblock Scientific freeze-dryer (Germany) and stored at –80 °C until analysis. Protein content of the fractions was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1990).

2.2.3. Preparation of protein isolate from defatted flour

Preliminary experiments were conducted to determine the isoelectric pH of proteins and the best solubilisation conditions. These experiments concerned the solubility profile as a function of pH (2–12), NaCl concentration (0.1 N, 0.17 N, 0.3 N, 0.4 N), solvent to flour ratio (1/20, 1/50, 1/80, 1/100, w/v), stirring time (1 h, 2 h, 3 h, 4 h) and temperature (25 °C, 35 °C, 50 °C, 65 °C). As shown in Figure S2(a–e), the pH with the lowest solubility was considered as the isoelectric point, the NaCl concentration, solid–liquid ratio (w/v), stirring time, and temperature which led to the highest solubility were used as parameters for protein extraction. Parameters for protein extraction were: pH 2, NaCl concentration 0.17 N, solid to liquid ratio 1/20 (w/v), stirring time 1 h, and solubilisation temperature 65 °C. Protein was then extracted twice at pH 2 under constant stirring, and recovered at pH 8 by centrifugation at 3,800 rpm for 30 min. The extracted protein was washed with distilled water then freeze-dried (Mune Mune et al., 2017).

2.2.4. Proximate composition

Moisture, ash, total lipid, and crude protein (N \times 6.25) content were done according to AOAC (1990). Carbohydrate content was determined by difference.

2.2.5. Heat treatment of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions

Dry powder of protein isolate (0.45 g; 80.41% protein) or Osborne fractions (0.45 g) were dispersed in 45 mL of phosphate buffer (0.01 M, pH7), then stirred for 1 h at room temperature. The aqueous dispersion was separated into five tubes containing 9 mL each, then heated at 50 °C, 70 °C, and 80 °C for 10 min in a water bath and immediately cooled in an ice bath. The heated samples were subjected to further experiments and values were compared with the unheated (control) sample.

2.2.6. Physicochemical properties

2.2.6.1. Surface hydrophobicity. Surface hydrophobicity was determined by the bromophenol blue (BPB) fixation method, as BPB has been shown to bind to the same hydrophobic sites on proteins as fluorescent probes (Chelh, Gatellier, & Sante-Lhoutellier, 2006). Briefly, to 500 μ L of heat-treated protein solutions, 200 μ L of BPB solution (1 mg/mL BPB in distilled water) was added and mixed vigorously. Samples were kept under constant agitation at room temperature for 10 min, and then centrifuged for 15 min at 4,000 rpm. The absorbance of the supernatant (diluted 1:5) was measured at 595 nm against phosphate buffer as blank. A control containing BPB and buffer was also prepared. The amount of BPB fixed by the protein was then calculated as follow:

$$BPB_{bound}(\mu\text{g/g of protein}) = 200\mu\text{g} \times \frac{A_c - A_s}{A_c} \times \frac{1}{W_p}$$

Where, A_c is the absorbance of the control, A_s is the absorbance of the sample and W_p is the amount of protein of the sample.

2.2.6.2. Secondary structure characterization. The secondary structure of the protein in the heat-treated samples and the control was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy (Nguï et al., 2021; Mune Mune, Bakwo et al., 2016). Data were analyzed according to Mune Mune, Bakwo et al. (2016) and the secondary structural features

were calculated from the amide I band by non-linear regression fitting of Gaussian peaks of the original spectra. Peaks assignments were generated using the results of Farrell, Wickham, Unruh, Qi, and Hoagland (2001).

2.2.7. Functional properties

2.2.7.1. Protein solubility. Aliquots of 1 mL of the protein suspension from the heat treatment and the control were stirred for 30 min and then centrifuged at 4,000 rpm for 20 min (Nguu et al., 2021). The supernatants were collected for determination of total nitrogen was undertaken as described by Bradford (1975). Protein solubility was calculated as indicated in equation (1):

$$\text{Solubility}(\%) = \frac{\text{Weight of protein in the supernatant (g)}}{\text{Weight of protein in the sample (g)}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.7.2. Emulsifying properties. Emulsifying capacity (EC) and emulsion stability (ES) at different temperatures were measured according to Lawal (2004). The heat-treated protein solution (4 mL) was mixed with 4 mL of soybean oil to obtain oil to water ratio (OWR) of 1:1 (v/v). The dispersion was then mixed at high speed for 1 min at room temperature, using a magnetic stirrer (Ilkirch, France), then centrifuged at 1,100 rpm for 10 min in an Eppendorf AG (Hamburg, Germany) centrifuge. The emulsifying capacity was derived following equation (2):

$$\text{Emulsifying Capacity} = \frac{\text{Height of emulsifying layer in the tube}}{\text{Height of the total content of the tube}} \times 100 \quad (2)$$

ES was determined by heating the emulsion at 80 °C for 30 min before centrifuging at 1,100 rpm for 10 min and derived as shown in equation (3):

$$\text{Emulsifying Stability} = \frac{\text{Height of emulsifying layer in the tube after heating}}{\text{Height of the total content of the tube before heating}} \times 100 \quad (3)$$

2.3. Statistical analysis

Results are expressed as mean value \pm standard deviation of three different determinations. Means were compared by the one-way ANOVA analysis followed by the Duncan post hoc test. The probability $p < 0.05$ was considered statistically significant. ANOVA was done to analyze the effect of soluble protein fraction on physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* protein isolate. First-order equation was used to fit experimental data. The linear model proposed for the response is given as follow:

$$Y_i = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 \quad (4)$$

Where Y_i are physicochemical and functional properties (surface hydrophobicity, solubility, emulsifying capacity, and emulsion stability) of protein isolate; a_0 is a constant of the model; a_1 , a_2 , a_3 , and a_4 are constants of dependent variables; X_1 , X_2 , X_3 and X_4 represent the percentage soluble albumin, globulin, glutelin, and prolamin, respectively (Table S1). The variables with a confidence levels above 95% were considered significant. The fitted equation was expressed as surface plots.

Data analysis and graphic plotting were done using Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 26.0, SPSS Inc., USA) and STATISTICA™ (version 12.5, 2008, Statsoft Inc., USA) software. Data of the secondary structure were analyzed using Peakfit 4.1.2 software.

3. Results and discussion

3.1. Extraction and isoelectric precipitation of protein isolate and fractions

Albumin, globulin, and glutelin of *Moringa oleifera* seeds had their pI at pH 4; 2, and 6 respectively (Figure S1). At these respective isoelectric points, the proteins were precipitated and recovered from the supernatants to yield the respective fractions after centrifugation. For the preparation of isolate, protein solubilisation and precipitation were analyzed under different conditions (Figure S2a–e). Higher solubilization of protein was observed at pH 2, NaCl concentration of 0.17 N, the solid–liquid ratio of 1/20 (w/v), stirring time of 1 h, and extraction temperature was 65 °C. Protein was less soluble at pH 8 which was considered as the isoelectric point (pI).

3.2. Protein distribution of defatted *Moringa oleifera* seeds

Moringa oleifera seeds contained 30.49% albumin, 50.54% globulin, 7.62% glutelin, and 2.6% prolamin making a complete extractable protein of 91.29% and 8.71% non-extractable protein from the defatted flour. Albumin and globulin were the most important protein fractions while glutelin and prolamin represented minor fractions as reported for winged bean and soybean by Makeri et al. (2017).

3.3. Proximate composition of defatted flour and protein isolate

The proximate composition of defatted flour and protein isolate prepared from *Moringa oleifera* seed is presented in Table 1a. Total carbohydrate (49.15%, dwb) and protein (33.53%, dwb) were the main components of defatted flour. Ash (3.16%, dwb) was also found. Protein (80.41%, dwb) was the main component of protein isolate, which also contained ash (0.08%, dwb). Moisture content on defatted flour and protein isolate was 7.06 %, and 2.41 %, respectively. Previous studies on defatted flour of *Moringa oleifera* seed reported total carbohydrate and protein content varying between 9.17 and 53.36 % and 32–62.8%, respectively (Saa, Fombang, Ndjantou, & Njintang, 2019).

The protein content of *Moringa oleifera* seed protein isolate (80.41%, dwb) was in the same range as those reported for several legumes (Nguu et al., 2021; Arise et al., 2017; Adebowale, 2011; Withana-Gamage, Wanasundara, Pietrasik and Shand, 2011). Therefore, this result suggests a relatively high purity of *Moringa oleifera* seed protein isolate.

Table 1

(a–b): (a) Proximate composition of *Moringa oleifera* defatted flour and protein isolate, and (b) protein distribution in *Moringa oleifera* defatted flour*.

Chemical composition (g/100 g, dwb)	Defatted flour	Protein isolate			
Moisture	7.06 ^{c1}	2.41 ^{b2}			
Ash	3.16 ^{d1}	0.08 ^{c2}			
Lipid	7.10 ^c	ND			
Total Carbohydrates	49.15 ^a	ND			
Protein	33.53 ^{b2}	80.41 ^{a1}			
	Albumin	Globulin	Prolamin	Glutelin	Residue
Rate of total protein (%)	30.49 ^b	50.54 ^a	2.64 ^d	7.62 ^c	8.71

Rate of Total Protein (%) = [total protein (g) of each fraction extracted from 100 g defatted seed flour/total proteins (g) of in 100 g of defatted seed flour] \times 100. Data are means of triplicate determinations; means followed by different letter (a;b;c;d) within the same line are significantly ($p < 0.05$) different.

*Data are means of triplicate determinations; DwB: dry way basis; Means followed by different letter (a;b;c;d) within the same column are significantly ($p < 0.05$) different; Means followed by different number (1;2) in the same line are significantly ($p < 0.05$) different.

3.4. Physicochemical properties

3.4.1. Secondary structure

FTIR spectra showed two major bands at 1,644 cm^{-1} (amide I) and 1,539 cm^{-1} (amide II). The amide I band was further deconvoluted by second derivative using a Gaussian fit of the peaks (Figure S3a–e). The bands were assigned as follows: β -turn: 1,660–1,700 cm^{-1} ; α -helix: 1,650–1,656 cm^{-1} ; irregular structure: 1,640–1,644 cm^{-1} ; and β -sheets or extended structure: 1,620–1,640 cm^{-1} (Mune Mune, Bakwo et al., 2016; Farrell et al., 2001).

The effect of temperature on the secondary structure of *Moringa oleifera* seed protein isolate and fractions is shown in Table 2. Results showed that, when unheated, β -sheets was the predominant secondary structure for protein isolate (35.48%), albumin (48.98%), globulin (51.01%), glutelin (34.2%), and prolamin (34.06%), confirming the data previously reported by other workers (Ngui et al., 2021; Makeri et al., 2017; Mune Mune, Bakwo et al., 2016). The amount of irregular structure was low, except in glutelin (24.34%) and prolamin (16.87%) where it was higher than α -helix conformation, 12.94% and 15.91% respectively, suggesting a folded structure. This may be linked to the strain undergone by the protein during the extraction process which promoted its folding.

Heat treatment induced a variation of the relative content of secondary structure in protein isolate and fractions. For protein isolate, when the temperature reached 80 °C, no significant change was observed, which implies that protein became stable. Nevertheless, β -sheets remained the foremost conformation regardless of the temperature which predicted better emulsifying properties but low protein digestibility. Concerning protein fractions, the [β -sheets + α -helix] proportion of albumin increased with the temperature moving from

Table 2

Effect of temperature on the secondary structure of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions*

	Temperature	Secondary structure composition (%)			
		β -Turn (%)	α -Helix (%)	β -Sheet (%)	Irregular structure (%)
Protein isolate	25 °C	24.82 ^{d3}	26.81 ^{a2}	35.48 ^{c1}	12.88 ^{e4}
Albumin		29.71 ^{b2}	14.91 ^{d3}	48.98 ^{b1}	6.4 ^{d4}
Globulin		19.68 ^{e3}	24.96 ^{b2}	51.61 ^{a1}	3.75 ^{e4}
Glutelin		25.52 ^{c3}	12.94 ^{e4}	34.2 ^{d1}	27.34 ^{a2}
Prolamin		33.16 ^{a2}	15.91 ^{e4}	34.06 ^{d1}	16.87 ^{b3}
Protein isolate	50 °C	16.87 ^{b4}	23.77 ^{c3}	31.73 ^{e1}	27.63 ^{a2}
Albumin		30.21 ^{a2}	16.4 ^{d3}	46.87 ^{b1}	6.52 ^{d4}
Globulin		16.92 ^{b3}	23.51 ^{e2}	44.52 ^{c1}	15.04 ^{b4}
Glutelin		13.46 ^{c3}	31.25 ^{b2}	51.91 ^{a1}	3.39 ^{e4}
Prolamin		11.88 ^{d2}	39.9 ^{a1}	39.36 ^{d1}	8.86 ^{c3}
Protein isolate	70 °C	24.01 ^{c2}	12.49 ^{d4}	43.12 ^{a1}	20.38 ^{a3}
Albumin		15.61 ^{e3}	33.08 ^{c2}	37.66 ^{b1}	13.65 ^{b4}
Globulin		29.92 ^{b2}	42.73 ^{b1}	23.51 ^{d3}	3.84 ^{d4}
Glutelin		20.63 ^{d2}	57.42 ^{a1}	18.74 ^{e3}	3.21 ^{e4}
Prolamin		44.63 ^{a1}	11.77 ^{e3}	36.94 ^{c2}	6.66 ^{c4}
Protein isolate	80 °C	24.44 ^{b2}	12.29 ^{e4}	42.79 ^{d1}	20.47 ^{a3}
Albumin		15.6 ^{d3}	16.01 ^{d2}	56.88 ^{a1}	11.5 ^{d4}
Globulin		24.95 ^{a2}	3.57 ^{e4}	51.59 ^{b1}	19.88 ^{b3}
Glutelin		17.01 ^{c3}	27.47 ^{a2}	51.56 ^{b1}	3.96 ^{e4}
Prolamin		13.11 ^{e4}	24.27 ^{b2}	47.19 ^{c1}	15.44 ^{c3}

*Data are means of triplicate determinations.

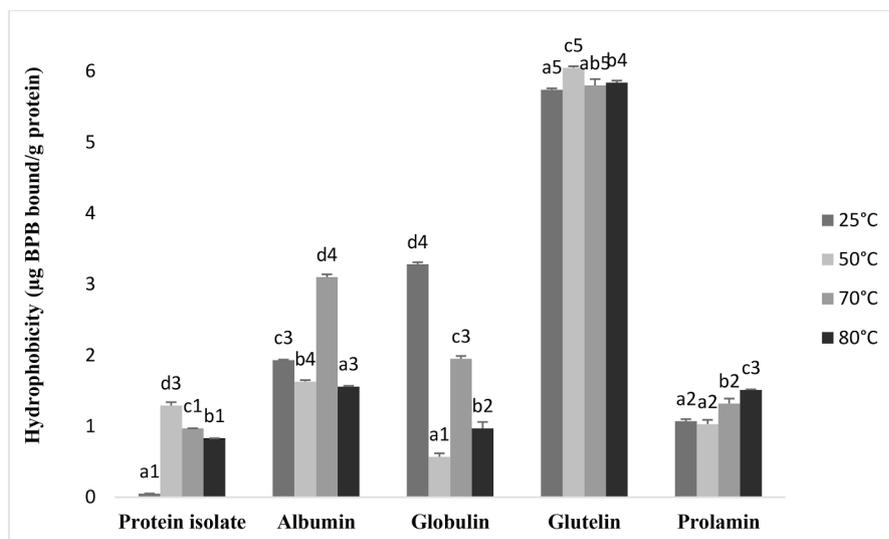
Means followed by different letter (a,b,c,d,e) within the same column and at each temperature are significantly ($p < 0.05$) different. Means followed by different number (1;2;3;4) in the same row are significantly ($p < 0.05$) different.

63.27 at 50 °C to 72.89 at 80 °C. Also, the quantity of irregular structure increased when the temperature increased suggesting the denaturation of albumin. Conversely, [β -sheets + α -helix] proportion of globulin decreased with the temperature moving from 68.03 % at 50 °C to 55.16 % at 80 °C. It was also observed that irregular structure content decreased when moving from 50 °C (15.04 %) to 70° (3.84 %), then increased when the temperature reached 80 °C (19.88%), indicating association/aggregation and subsequent dissociation (Achouri, Nail, & Boye, 2012). For glutelin, it had been observed that when the β -sheets increased, α -helix decreased. The [β -sheets + α -helix] proportion was not under 75 % whatever the temperature, suggesting that glutelin is folded and compact inaccessible protein (Achouri et al., 2012). The [β -sheets + α -helix] proportion of prolamin was high 79.26 % and 71.46 % at 50 °C and 80 °C respectively but decreased (48.71 %) at 70 °C. At this temperature, β -turn (44.63%) was the major conformation, meaning that prolamin was flexible at 70 °C predicting better solubility. High β -sheets and α -helix proportion is the main characteristic of compacted globulin storage proteins, and it was also noticed that anti-parallel β -sheets could be formed in aggregated protein molecules (Ellepolo, Choi, & Ma, 2005). However, the high β -turn proportion was important for protein flexibility, which contributed to the stabilization of the water–oil emulsion, increasing globular protein emulsion capacity (Mune Mune, Bakwo et al., 2016).

3.4.2. Surface hydrophobicity (H_0)

Surface hydrophobicity is important physicochemical parameter which is related to the conformation of protein, and influences functional properties such as solubility, foaming, and emulsifying capacity. Hydrophobicity of protein is influenced by intrinsic factors such as constitutive amino acids, size, shape, and by extrinsic factors such as ionic strength, temperature, pH, and protein concentration. Surface hydrophobicity of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions as affected by heat treatment is presented in Fig. 1a. The unheated protein isolate showed lowest surface hydrophobicity (0.05 μg BPB bound/g proteins), which increased following heat treatment with the maximum after treatment at 50 °C (1.29 μg BPB bound/g protein). Surface hydrophobicity of protein fractions showed balanced trend following heat treatment. The unheated globulin (3.28 μg BPB bound/g protein) and albumin (1.93 μg BPB bound/g protein) fractions exhibited significantly higher surface hydrophobicity compared to the heat-treated ones (except for albumin heated at 70 °C; 3.1 μg BPB bound/g protein). This observation contrasted with the behaviour of the prolamin fraction, where heat treatment favoured exposure of hydrophobic groups on the protein surface with increasing surface hydrophobicity. The glutelin fraction showed significantly higher surface hydrophobicity compared to the protein isolate and the other fractions (5.74 to 6.05 μg BPB bound/g protein). Surface hydrophobicity of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions was probably influenced by several factors such as the primary sequence of protein and amino acid composition, conformation and protein structure. Significant increase in irregular structure content of the protein isolate following heat treatment (Table 2) was probably related to increase in hydrophobicity of protein isolate following heat treatment. Unfolding promoted exposure of hydrophobic amino acids previously buried in the core of the protein. In addition, the high surface hydrophobicity observed for glutelin may be due to the flaky and irregular microstructure. In this regard, the interactions between polar amino acid residues might cause electrostatic repulsion that unfolds the proteins and thus exposing more hydrophobic amino acids to the surface, hence increasing surface hydrophobicity (Jiang et al., 2015). In another hand, reduced surface hydrophobicity could also be linked to the decreased exposure of hydrophobic groups induced by heat treatment as reported by Stanciuc, Aprodu, Ionița, Bahrim, and Răpeanu (2015). In this connection, decrease in α -helix secondary structure was linked to decreased hydrophobicity in protein isolate from grain legumes (Mune Mune et al., 2017). High surface hydrophobicity is beneficial for functional properties such as oil absorption or emulsifying

(a)



(b)

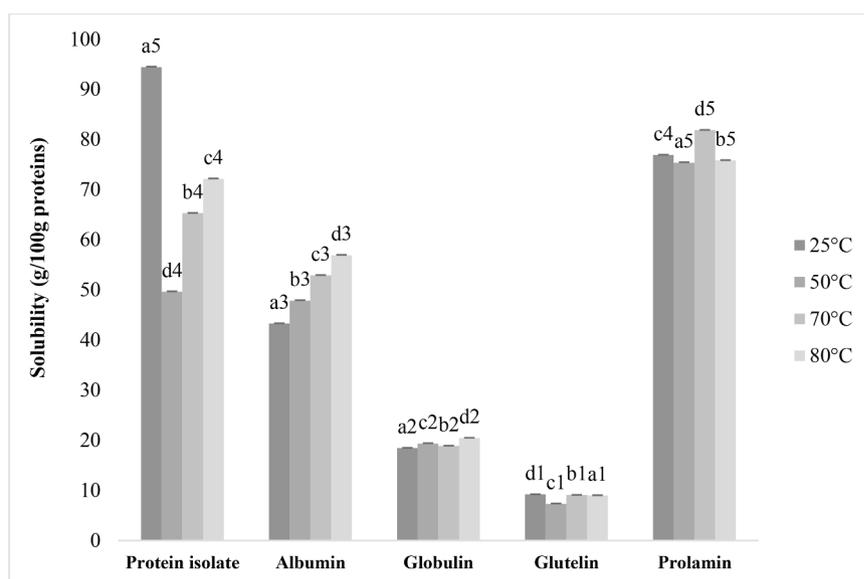


Fig. 1. (a-b). (a) Effect of temperature on the surface hydrophobicity of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions, and (b) effect of temperature on the solubility of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions.

which require adsorption at the surface of the proteins, but generally decrease solubility and related functional properties (Li et al., 2019).

3.5. Functional properties

3.5.1. Protein solubility (S_o)

Protein solubility correlates to foam formation, emulsification, gelation, and in and of itself defines the usability of proteins in liquid foods and beverages (Mune Mune et al., 2017). Figure 1b shows the solubility of protein isolate and fractions at different temperatures starting from 25 °C to 80 °C. The solubility of protein isolate, albumin, and prolamin was extremely sensitive to the temperature, while globulin and glutelin were light-sensitive. The solubility of all samples was appreciable at 25 °C. When unheated protein isolate and prolamin showed high solubility (94% and 76.9% respectively) while glutelin had the lower solubility (9.21%). The higher solubility of the unheated

protein isolate and prolamin compared to unheated glutelin, globulin and albumin was in agreement with their low surface hydrophobicity (0.05 and 1.07 µg BPB bound/g protein respectively for the isolate and prolamin at 25 °C). In this connexion, prolamin was probably highly soluble due to protein denaturation during the extraction process which exposed more hydrophilic amino acids in contact with surrounding water.

After heat treatment, it had been observed that the solubility of protein isolate was low (49.63%) at 50 °C then increased with the temperature to achieve 72.14 % at 80 °C. Solubility of protein isolate at different temperatures was negatively correlated with surface hydrophobicity. Solubility of protein fractions showed that albumin and globulin were more soluble at 80 °C, while glutelin, and prolamin presented higher solubility at 70 °C. Solubility of albumin, globulin and glutelin was negatively correlated with their surface hydrophobicity. Mune Mune, Bakwo et al. (2016) reported similar findings that the

solubility of globular proteins generally correlates negatively with hydrophobicity. The high solubility of protein may be attributed to their flexible form, where hydrophobic and aromatic amino acids are not exposed to the solvent, but also oligomer dissociation and polypeptide unfolding. It can also be linked to the upper amount of β -turn conformation which gives more flexibility to the protein (Mune Mune, Bakwo et al., 2016). The lower protein solubility of glutelin is also in keeping with the upper level of hydrophobic and aromatic amino acids exposed at the surface of its folded compact structure.

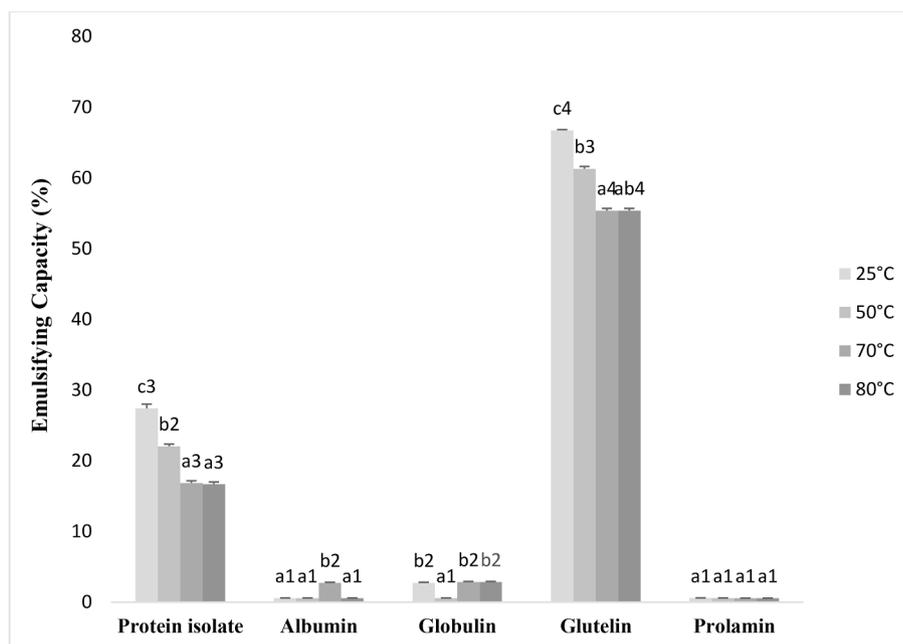
The higher solubility of protein isolate, albumin, globulin, and prolamin at high temperatures indicated their potential practical applications in the food industry including beverages and dairy products.

3.5.2. Emulsifying properties

In the food industry, the evaluation of emulsifying properties is essential to indicate the usefulness of a product as a functional food ingredient in the formulation of a new food product. Previous studies reported several factors such as pH, temperature, protein concentration, solubility, surface hydrophobicity, molecular flexibility of the protein, and the presence of non-protein compounds influence emulsifying properties of protein isolates (Mune Mune et al., 2017).

The effect of processing temperature on emulsifying capacity (EC) and emulsion stability (ES) of protein isolate and fractions is shown in Fig. 2(a & b). At room temperature, glutelin and protein isolate had distinctly higher emulsion capacity (66.73 % and 27.41 % respectively) while the emulsion capacity of albumin, globulin and prolamin was low. The emulsion capacity of protein isolate and glutelin decreased with

(a)



(b)

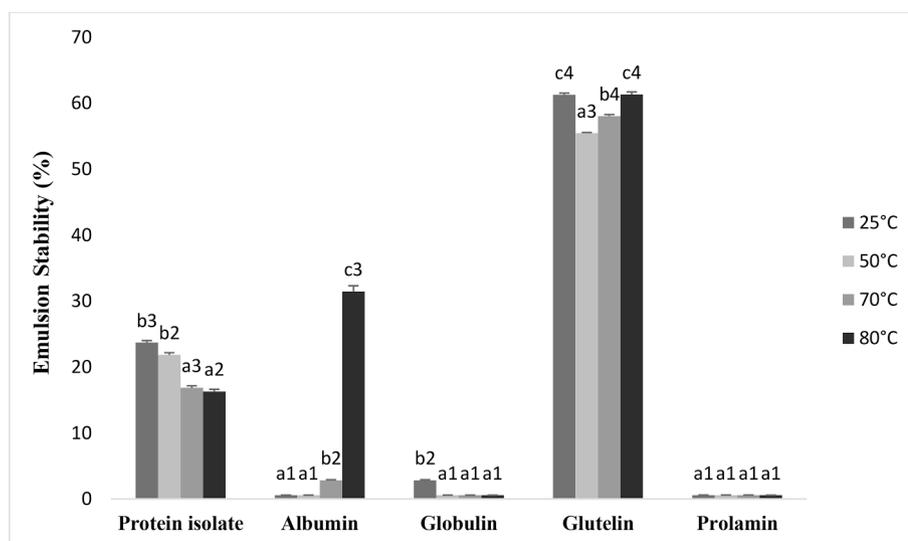


Fig. 2. (a-b). (a) Effect of temperature on the emulsion capacity of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions, and (b) effect of temperature on the emulsion stability of *Moringa oleifera* protein isolate and fractions.

temperature whereas there were no significant changes with albumin, globulin, and prolamin. For formulation, where higher emulsion capacity is needed, protein isolate and glutelin should be used at room temperature.

The emulsion stability of all samples had the same trend as emulsion capacity except for albumin at 80 °C where the current study found higher emulsion stability (31.44 %). Emulsion of protein isolate was more stable (23.70 %) at room temperature, while those of albumin (31.44 %) and glutelin (61.33 %) were more stable at 80 °C. Higher emulsion stability required molecular rearrangement of the adsorbed proteins at the oil–water interface to form a thick layer, which prevents coalescence with low repulsive forces between the proteins (Mune Mune, Bayiga, Nyobe, Bassogog, & Minka, 2018).

Previous research has reported that emulsifying properties can be influenced by surface hydrophobicity and solubility mutually or solely. In the current study, the emulsifying properties of protein isolate were influenced by its solubility and flexibility whereas those of glutelin were affected by the surface hydrophobicity. Adebisi and Aluko (2011) reported that protein isolate and glutelin fraction from pea proteins had better emulsification at neutral conditions. Also, similar results were reported for seed flour and protein concentrate of wonderful cola (*Buchholziacoriacea*) seeds (Ijarotimi, Malomo, Fagbemi, Osundahunsi, & Aluko, 2018).

3.6. Influence of protein composition on physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* protein isolate

3.6.1. Modeling

Surface hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of *Moringa oleifera* protein isolate processed at different temperatures were used as independent variables, and modelled depending on the percentage of soluble albumin, globulin, glutelin and prolamin treated under the same conditions. Linear regression equations were generated relating to the responses. The least-square technique was used to determine regression coefficients, and the appropriate subset of variables for the regression model was determined with the best subset technique based on the adjusted coefficient of determination (R^2 adjusted) and the probability of the model (Myers, Montgomery, & Anderson-Cook, 2016). Analysis of variance was calculated to test the significance of the regression. Results are presented in Table 3. It was observed that the first-order polynomial model for the surface hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of *Moringa oleifera* protein isolate significantly ($p < 0.05$) represented the data, and the R^2 adjusted values were high. On this basis, the first order model was used to visualize the effect of soluble protein fractions on the physicochemical and functional properties of the isolate.

3.6.2. Analysis of response surface plots

Response surface plots were used to illustrate the effects of pair dependent variables on the surface hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of *Moringa oleifera* protein isolate. The other

Table 3

The coefficients and their significance, and the coefficient of determination adjusted (R^2 Adjst).

Coefficient	Hydrophobicity	Solubility	Emulsifying Capacity	Emulsion Stability
a_0	43.09*	-247.22*	-85.51*	137.80*
a_1	-0.36*	-3.38*	-	-1.85*
a_2	-0.49*	-	2.68*	-
a_3	-2.14*	67.31*	-	-6.83*
a_4	-	-20.37*	1.64 ⁿ	-
R^2	0.983	0.992	0.933	0.911
adjusted				

* Significant at 5% ($p < 0.05$).

ⁿ Non significant ($p > 0.05$).

variables were fixed as for the untreated samples. The resulting graphs are presented in Fig. 3(a–d).

3.6.2.1. Surface hydrophobicity of protein isolate. Surface hydrophobicity of *Moringa oleifera* protein isolate was significantly ($p < 0.05$) influenced by the variation in soluble albumin, globulin, glutelin (Table 3). Increase in the soluble albumin, globulin and glutelin produced decrease in surface hydrophobicity of the isolate. The rate of decrease in hydrophobicity was high with glutelin, and low with increasing albumin and globulin (Fig. 3a). Prolamin did not significantly ($p < 0.05$) affect surface hydrophobicity of the isolate. Heat treatment probably promoted hydrophobic interaction of the proteins, which reduced surface hydrophobicity. Surface hydrophobicity is important property which affects functional properties such as solubility, emulsifying and foaming properties. It is then important to manage heat treatment conditions of *Moringa oleifera* protein isolate to decrease the level of soluble glutelin for increasing hydrophobicity.

3.6.2.2. Solubility of protein isolate. Solubility of *Moringa oleifera* protein isolate during heat treatment was probably a complex phenomenon involving protein–protein and protein–water interactions. This is because increase in solubility was related to increase in soluble glutelin, and to decrease in soluble albumin and prolamin. Globulin did not significantly ($p < 0.05$) affect solubility of the isolate. The rate of increase in solubility was high for glutelin, and the rate of decrease was high for prolamin (Table 3; Fig. 3b). Moreover, solubility of the isolate probably involved changes in the structure of the proteins since there was a negative correlation ($r = -0.99$, $p < 0.00$) between solubility and hydrophobicity of *Moringa oleifera* protein isolate following heat treatment.

3.6.2.3. Emulsifying properties of protein isolate. Emulsifying capacity of *Moringa oleifera* protein isolate was significantly ($p < 0.05$) influenced by the variation in soluble globulin. Albumin, prolamin and glutelin did not significantly affect emulsifying capacity (EC) of protein isolate. Emulsion stability of the isolate required different mechanism than EC, since it was significantly affected by soluble albumin and glutelin (Table 3). EC increased with increasing globulin, while ES decreased with increasing albumin and glutelin (Fig. 3b & c). Increasing EC with globulin was probably due to their globular structure and molecular flexibility, since high flexibility enhances adsorption of the protein at the interface. ES of *Moringa oleifera* protein isolate probably involved hydrophobicity and molecular structure of proteins, in addition to their solubility.

4. Conclusion

To increase application of *Moringa oleifera* protein in food and non food formulations, effect of heat treatment and protein composition on the secondary structure, physicochemical and functional properties of protein isolate was analysed. Results clearly showed that globulin and albumin were the most abundant protein fraction in *Moringa oleifera* seeds, and the protein isolate seemed to be relatively high purity when extracted within adequate conditions. The β -sheet conformation was the predominant secondary structure in protein isolate and fraction. The variation of temperature induced conformational modifications resulting in the increase or the decrease of [β -sheets + α -helix] proportion in all samples. Surface hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of the protein isolate were affected by temperature but also by the ratio of Osborne fractions (protein composition). Finally, this research showed that for a better prediction of physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate, it is important to consider composition of soluble proteins, which affect the functionality during food processing.

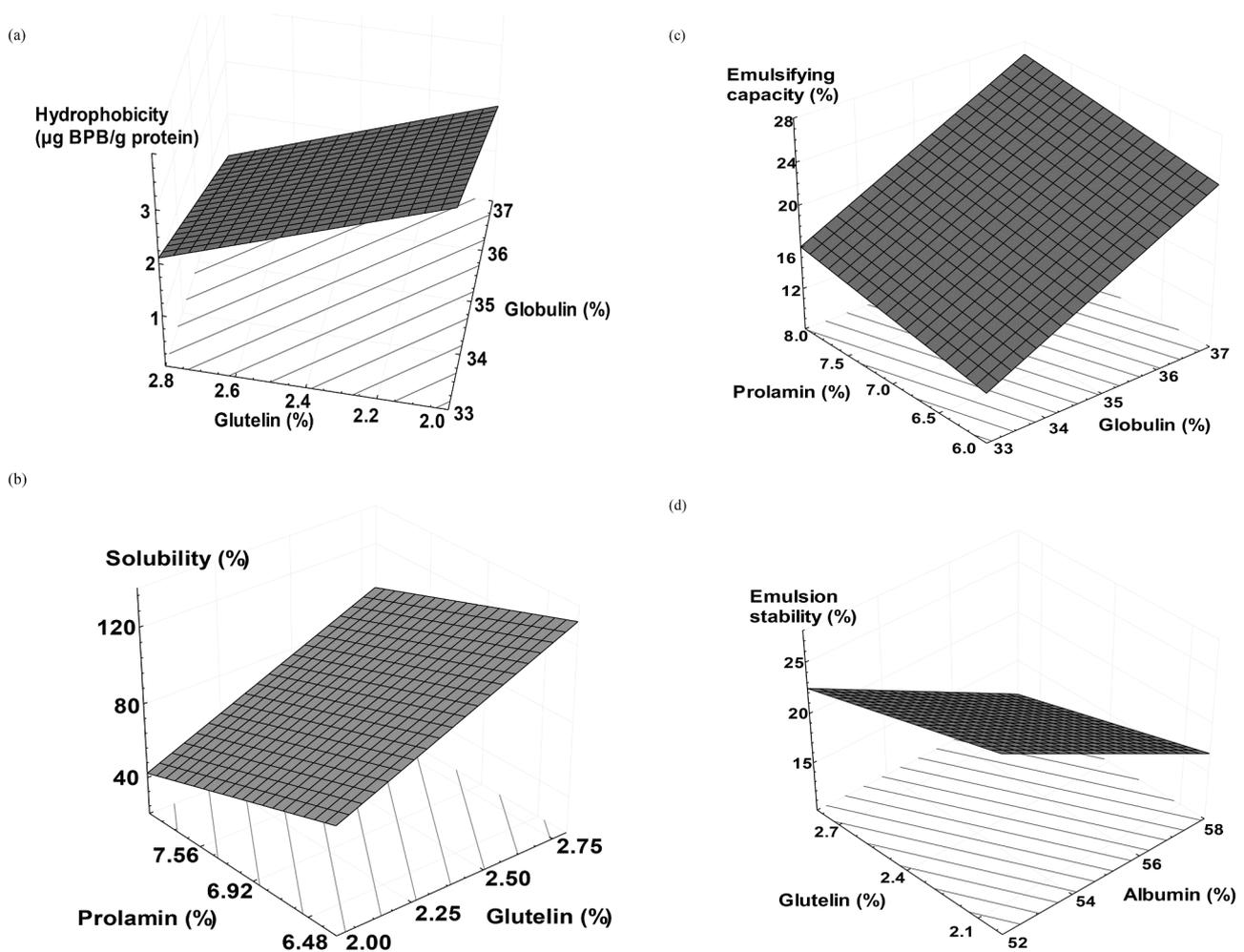


Fig. 3. (a-d). (a) Hydrophobicity of protein isolate depending on soluble glutelin and prolamin, (b) solubility of protein isolate depending on soluble of glutelin and globulin, (c) emulsifying capacity of protein isolate depending on soluble glutelin and albumin, finally (d) emulsion stability of protein isolate depending on soluble glutelin and albumin.

CRediT authorship contribution statement

Christian Bernard Bakwo Bassogog: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Writing – original draft. **Carine Emilienne Nyobe:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Resources. **Simon Pierre Ngui:** Formal analysis, Investigation. **Samuel René Minka:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Writing – original draft. **Martin Alain Mune Mune:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was done with the resources of the Food and Nutrition Research Center, Institute of Medical Research and Studies of Medicinal Plants, Yaounde, Cameroon.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132546>.

[org/10.1016/j.foodchem.2022.132546](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132546).

References

- Achouri, A. Nail, V., & Boye, J.I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, 46: 360–369.
- Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>
- Adebowale, Schwarzenbolz, U., Henle, T. (2011). Protein Isolates from Bambara Groundnut (*Voandzeia Subterranea* L.): Chemical characterization and functional properties. *International Journal of Food Properties*, 14, 758–775.
- Adedeji Akinbode A., Akharume, Felix, U., Aluko, Rotimi, E. (2020). *Comprehensive Review Food Science Food Safety*, 20:198–224. <http://doi: 10.1111/1541-4337.12688>.
- AOAC (1990). Official methods of analysis (15th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists. (USA).
- Arise, A. K., Nwachukwu, I. D., Aluko, R. E., & Amonsou, E. O. (2017). Structure, composition and functional properties of storage proteins extracted from bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 1211–1220. <https://doi.org/10.1111/ijfs.2017.52.issue-510.1111/ijfs.13386>
- Chelh, I., Gatellier, P., & Sante-Lhoutellier, V. (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*, 74(4), 681–683.
- Du, T. T., Sun, P., Yan, Q. X., Luo, X. L., & Dai, H. (2017). A comprehensive study of the Moringa seed. *Popular Science & Technology*, 19(12), 46–49.
- Ellepola, S. W., Choi, S. M., & Ma, C. Y. (2005). Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(1–2), 12–20.
- Farrell, H. M., Jr., Wickham, E. D., Unruh, J. J., Qi, P. X., & Hoagland, P. D. (2001). Secondary structural studies of bovine caseins: Temperature dependence of b-casein

- structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*, 15, 341–354.
- Garza, N. G. G., Koyoc, J. A. C., Castillo, J. A. T., Zambrano, E. A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & García, S. R. S. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(13), 4268–4276.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5, 49–56.
- Ijarotimi, O. S., Malomo, S. A., Fagbemi, T. N., Osundahunsi, O. F., & Aluko, R. E. (2018). Structural and functional properties of Buchholziaceae seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations. *Food Hydrocolloids*, 74, 275–288.
- Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B., & Zhou, L. (2015). Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 1059–1074.
- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) proteinisolate: Effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86(3), 345–355.
- Li, J., Wang, B., Fan, J., Zhong, X., Huang, G., Yan, L., & Ren, X. (2019). Foaming, emulsifying properties and surface hydrophobicity of soy proteins isolate as affected by peracetic acid oxidation. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 689–703. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1602540>
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the Moringa oleifera tree. *Journal of Agriculture Science*, 128, 311–322.
- Makeri, M. U., Mohamed, S. A., Karim, R., Ramakrishnan, Y., & Muhammad, K. (2017). Fractionation, physicochemical, and structural characterization of winged bean seed protein fractions with reference to soybean. *International Journal of Food Properties*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1369101>
- Maryam, N. N., Ali, S. D., & Raffaele, M. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106789. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>
- Mughal, M. H., Ali, G., Srivastava, P. S., & Iqbal, M. (1999). Improvement of drumstick (*Moringa pterygosperma Gaertn.*) – A unique source of food and medicine through tissue culture. *HamdardMedecine*, 42, 37–42.
- Mune Mune, M. A., Bayiga, A., Nyobe, E. C., Bassogog, C. B., & Minka, S. R. (2018). Protein quality, secondary structure and effect of physicochemical factors on emulsifying properties of *Irvingiagabonensis* almonds. *Current Nutrition and Food science*, 14, 1–19.
- Mune Mune, M. A., Sogi, D. S., Minka, S. R. (2017). Response surface methodology for investigating structure–function relationship of grain legume proteins. *Journal of Food Processing and Preservation*. 10.1111/jfpp.13524.
- Mune Mune, M. A., Nyobe, E. C., Bassogog, C. B., & Minka, S. R. (2016). A comparison on the nutritional quality of proteins from Moringa oléifera leaves and seeds. *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1213618.
- Mune Mune, M., Bakwo, C., Nyobe, E., Minka, S. (2016b). Physicochemical and functional properties of Moringa oleifera seed and leaf flour. *Cogent Food and Agriculture* (2): 1220352.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. C. (2016). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments* (4th edition). New York, NY: Wiley.
- Ngui, S.P., Nyobe, C.E., BakwoBassogog, C.B., Nchuaji Tang, E., Minka, S.R., Mune Mune, M.A. (2021). Influence of pH and temperature on the physicochemical and functional properties of Bambara bean protein isolate, *Heliyon*, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07824>.
- Osborne, T. B. (1924). *The vegetable protein* (2nd ed., p. 154). New York: Longmans Green and Co.
- Saa, R.W., Fombang, E.N., Ndjantou, E.B., Njintang, N.Y. Treatments and uses of Moringa oleifera seeds in human nutrition: A review. *Food Science & Nutrition*. 00:1–9. 10.1002/fsn3.1057.
- Stanciu, N., Aprodu, J., Ionița, E., Bahrim, G., & Răpeanu, G. (2015). Exploring the process–structure–function relationship of horseradish peroxidase through investigation of pH- and heat induced conformational changes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 147, 43–50.
- Wang, L., Ding, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Luo, X., ... Chen, Z. (2017). Effect of electron beam on the functional properties and structure of defatted wheat germ proteins. *Journal of Food Engineering*, 202, 9–17.
- Withana-Gamage, T., S., Wanasundara, J., P., D., Pietrasik, Z., Shand, P., J., (2011). Physicochemical, Thermal and Functional Characterisation of Protein Isolates from Kabuli and Desi Chickpea (*CicerArietinum L.*): A Comparative Study with Soy (*Glycine Max*) and Pea (*Pisum Sativum L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1022–1031.