



HAL
open science

Étude de la composition biochimique et de la physico-chimie d'un modèle alimentaire à base de protéines de *Parkia biglobosa*

Mamadou Lamarana Souare

► **To cite this version:**

Mamadou Lamarana Souare. Étude de la composition biochimique et de la physico-chimie d'un modèle alimentaire à base de protéines de *Parkia biglobosa*. Alimentation et Nutrition. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK026 . tel-03851501

HAL Id: tel-03851501

<https://theses.hal.science/tel-03851501v1>

Submitted on 14 Nov 2022

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'INSTITUT AGRO DIJON
UMR PAM**

Ecole Doctorale Environnements Santé
Doctorat de Biotechnologies Agro-Alimentaires

Par

SOUARE Mamadou Lamarana

**Étude de la composition biochimique et de la physico-chimie d'un
modèle alimentaire à base de protéines de *Parkia biglobosa***

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 15 juin 2022

Composition du Jury :

Pr. SAUREL Rémi	L'institut Agro Dijon	Président
Dr. SOUCHON Isabelle	INRAE Avignon	Rapporteur
Pr. DEGRAEVE Pascal	Université Lyon 1	Rapporteur
Pr. SIDIME Youssouf	CREVIST- Guinée	Examinateur
Dr. LUBBERS Samuel	L'institut Agro Dijon	Directeur de thèse
Dr. HUSSON Florence	L'institut Agro Dijon	Co-directeur de thèse
Pr. TRAORE Lonseny	UGANC, Guinée	Co-directeur de thèse

Remerciements

Les travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés au sein de l'Institut National Supérieur des Sciences Agronomiques de l'Alimentation et de l'Environnement Institut Agro de Dijon spécifiquement au sein de l'équipe PCAV (Physico-Chimie des Aliments et du Vin) de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) de l' institut de la même ville, dans le cadre d'une bourse d'études en alternance du Service de Coopération et d'Action Culturelle de l' Ambassade de France en Guinée.

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant pour le courage qu'il m'a accordé pour réaliser cette thèse.

Je tiens en plus à remercier Pr. Laurent BENEY et Thomas KARBOWIAK de m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche directeurs respectifs de l'UMR-PAM,

- J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes directeurs de thèse :

Dr. Samuel LUBBERS, Directeur de thèse, Maître de conférences au sein de l'UMR PAM, toute ma gratitude à lui pour m'avoir confié ce projet transversal, passionnant et surtout de m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en abordant cette thèse sur les protéines végétales. J'apprécie à sa juste valeur son enthousiasme, sa capacité d'analyse, ses nombreux conseils scientifiques, ses encouragements qui m'ont permis d'avancer au mieux. Merci beaucoup pour vos qualités humaines et votre soutien levain indispensable. Je garde d'excellents souvenirs pour toute votre bataille diplomatique et vos écrits pour rendre heureux mes séjours en terre française de Dijon chaque fois que le cas se pose. J'ai pris autant de plaisir au cours de cette thèse à vos côtés.

Dr. Florence HUSSON, Co- directrice de thèse Maître de conférences au sein de l'UMR PAM, pour son encadrement et sa contribution à mon travail quotidien, ainsi que pour ses conseils précieux et son aide durant ce projet de thèse. Merci aussi pour votre grande patience et à vos qualités humaines incomparables.

Pr. Lonseny TRAORE, co-directeur de thèse au sein du département génie chimique de l'université Gamal Abdel Nasser de Conakry chaire de technologie alimentaire, pour la qualité de son encadrement, ses nombreux conseils précieux, sa continuelle disponibilité, son soutien et ses encouragements qui m'ont permis d'avancer au mieux dans ce travail.

Remerciements

Mes remerciements s'adressent également à ceux qui me font l'honneur d'accepter la responsabilité d'évaluer le travail de cette thèse : Madame SOUCHON Isabelle et Pr DEGREAIVE Pascal en tant que rapporteurs et Pr GAIANI Claire et Pr SAUREL Rémi en tant qu'examineurs, qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à ce travail et de se réunir pour le juger.

- Je n'oublie pas de remercier tous les stagiaires qui ont contribué à l'avancement de cette thèse : Abir NHIRI, Emeline CHAMBARD, Mathilde DUDOGNON, Raphaël MARTIN,

- Merci à tous mes collègues thésards pour les partages de connaissances et les moments sympathiques : Amel, François, Yanis, Pierre, Dha, Maxime, Julie Mersha,....

- Mes remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui m'ont aidé et ouvert leur porte pendant mes années de thèse à AgroSup Dijon : Bonastre, Bernadette, Chi, Anne-Sophie, Sandy, Camille, Nicolas, Nassredine, Adrien, Alexandra, Jérôme, et encore tous les membres de PMB et PCAV, pour leur implication de près ou de loin dans ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Pr Youssouf SIDIME, Directeur Général de l'Institut Supérieur de Sciences et de Médecine Vétérinaire (ISSMV), de m'avoir accordé une bourse supplémentaire pour réaliser cette thèse et à travers lui tout le personnel de l'ISSMV tous trop nombreux pour être cité ici pour leur soutien et accompagnement.

- Je remercie également tous les amis africains et d'ailleurs qui ont agrémenté mes séjours par des soirées, repas, sorties ou autres. Je tiens à remercier tout particulièrement Amadou Tafsir DIALLO, Sékou KOUYATE, Mousslihoudine Chanfi, UMAR, Mussa, Usama, Hameedullah Khan, Aliyu Isah etc. qui étaient une vraie famille pour moi durant cette thèse.

- Mes derniers remerciements iront évidemment à tous ceux qui forment mon "cocon" familial. Je pense tout d'abord à mes parents sans qui l'enfant que j'étais ne serait pas devenu l'homme que je suis. C'est avec émotion qu'à mon tour je leur dévoile le fruit de mes efforts. J'espère être à la hauteur de leur confiance et leur fierté inconditionnelles. Je tiens également à remercier mes beaux-parents pour leur soutien et leur présence sans faille. Après m'avoir offert leur confiance, ils m'ont également réservé une place de choix dans leur cœur. J'ai

Remerciements

également une pensée émue pour mes frères, mes sœurs, mon beau-frère Mamadou Lamarana Bâ et ma belle-sœur Kadiatou bobo Bâ qui m'ont toujours encouragé.

Un grand merci qui ne suffit pas pour exprimer ma reconnaissance à ma Mère pour ses prières et sacrifices ainsi son accompagnement tout au long de ce projet.

Enfin, aucun mot ne peut exprimer ma reconnaissance à mon épouse, Aissatou Kombé Bah, pour sa présence à mes côtés, pour les sacrifices qu'elle a faits et pour son courage de me supporter tous les jours. Je lui remercie à elle ainsi qu'à nos enfants, Mamadou Saidou, Mamadou Bobo, Kadiatou Bhoie et Mariama Ciré, pour le bonheur qu'ils me procurent au fil des jours. Je vous aime !

Résumé

En Afrique de l'ouest, la graine du Néré (*Parkia biglobosa*) est utilisée en pharmacopée traditionnelle et surtout en alimentation humaine sous forme d'un condiment. Cette légumineuse très riche en protéines et en lipides demeure une source de protéines encore mal exploitée. Notre thèse porte sur la valorisation des graines du Néré pour le développement de nouveaux produits riches en protéines d'origine végétale comme alternative à l'usage du soja comme ingrédient de base. Les objectifs visés ont été : (i) la caractérisation biochimique et physico-chimique d'isolats protéiques issus de farine de graines de Néré en fonction du procédé d'extraction, (ii) la sélection de bactéries lactiques protéolytiques capables de fermenter le jus de Néré, réduire les facteurs antinutritionnels afin d'accroître la biodisponibilité des nutriments, (iii) obtention d'un modèle alimentaire riche en protéines.

A partir d'une farine de graines de Néré, les rendements d'extraction en protéines par extraction en solution aqueuse ont été déterminés en fonction du pH, de la force ionique et de la présence de la matière grasse. Les protéines isolées présentent une solubilité maximale à pH bas 2-3 et pH élevé 8-10. Le profil des protéines par SDS-PAGE est similaire à celui d'autres légumineuses à graines : albumines, globulines et leurs sous-unités.

Les effets de l'utilisation de souches de *Lactobacillus plantarum* sur la réduction des facteurs antinutritionnels et l'amélioration de la digestibilité des protéines contenues dans le jus cru et fermenté de la graine du Néré ont été étudiés. Le traitement thermique réduit considérablement les facteurs antinutritionnels comme les phytates, les tanins, les inhibiteurs de la trypsine. Toutes les souches de *Lactobacillus plantarum* utilisées ont amélioré la digestibilité des protéines (*in vitro*) et contribué, de façon variable, à la réduction des teneurs en facteurs antinutritionnels.

L'aptitude à la gélification thermique des isolats protéiques d'albumines et globulines du Néré a été déterminée en fonction du pH. A pH 7, la concentration minimale pour la formation de gel thermique est comprise entre 100-120g/l. Il apparaît que le développement d'un modèle alimentaire à partir d'isolats de protéines est peu adapté à l'Afrique de l'ouest, car il semble préférable de limiter les pertes de protéines dans un long processus de séparation/purification des fractions protéiques. Ainsi un modèle permettant de maximiser l'utilisation des protéines disponibles dans la graine de Néré a été mis en place. Sur la base de la technique du tofu de soja, des jus de Néré et de soja ont subi un traitement thermique en présence de sels bivalents ($MgCl_2$ et $CaCl_2$) à différentes concentrations. Les échantillons de tofu préparés avec les concentrations 20 et 40 mM de $MgCl_2$ et $CaCl_2$ respectivement, présentaient un coagulum important et permettaient l'obtention d'un type de tofu « ferme ». L'analyse en compression uni-axiale a révélé que la dureté et la cohésion des échantillons sont fonction de la nature et la concentration en sels bivalents, tandis que l'adhésion n'est pas affectée de manière significative. La rhéologie à contrainte imposée a permis d'observer une prédominance du caractère élastique sur le caractère visqueux. La meilleure combinaison a permis d'obtenir un tofu de Néré avec une matière sèche de 30,9 % et des teneurs de 13 % en protéines et 7,2 % en matière grasse.

Les travaux de cette thèse montrent une voie de valorisation des potentialités nutritionnelles de cette légumineuse tropicale et de développement de produits alimentaires de type boisson et tofu destinés à l'alimentation humaine en Afrique.

Abstract

In West Africa, the seed of Néré (*Parkia biglobosa*) is used in traditional pharmacopoeia and especially in human food as a condiment. This legume is very rich in proteins and lipids and is still a poorly exploited source of protein. Our thesis focuses on the valorization of Néré seeds for the development of new protein-rich products of plant origin as an alternative to the use of soybean as a basic ingredient. The objectives were : (i) the biochemical and physicochemical characterization of protein isolates from Néré seed flour according to the extraction process, (ii) the selection of proteolytic lactic acid bacteria capable of fermenting Néré juice, reducing anti-nutritional factors in order to increase the bioavailability of nutrients, (iii) obtaining a protein-rich food model.

From Nere seed meal, protein extraction yields by aqueous solution extraction were determined as a function of pH, ionic strength and the presence of fat. The isolated proteins showed maximum solubility at low pH 2-3 and high pH 8-10. The protein profile by SDS-PAGE is similar to that of other seed legumes: albumins, globulins and their subunits.

The effects of using *Lactobacillus plantarum* strains on reducing anti-nutritional factors and improving the digestibility of proteins contained in the raw and fermented juice of Néré seed were studied. Heat treatment considerably reduces anti-nutritional factors such as phytates, tannins, trypsin inhibitors. All strains of *Lactobacillus plantarum* used improved protein digestibility (in vitro) and contributed, in a variable way, to the reduction of anti-nutritional factors contents.

The thermal gelability of the protein isolates of albumins and globulins of cowpea was determined as a function of pH. At pH 7, the minimum concentration for thermal gel formation is between 100-120g/l. It appears that the development of a food model from protein isolates is not well suited to West Africa, as it seems preferable to limit protein losses in a long separation/purification process of protein fractions. Thus, a model was developed to maximize the use of the proteins available in the Néré seed. Based on the soybean tofu technique, Nere and soybean juices were heat treated in the presence of bivalent salts ($MgCl_2$ and $CaCl_2$) at different concentrations. Tofu samples prepared with 20 and 40 mM concentrations of $MgCl_2$ and $CaCl_2$, respectively, showed significant coagulum and resulted in a "firm" type of tofu. Uni-axial compression analysis revealed that the hardness and cohesion of the samples were a function of the nature and concentration of divalent salts, while adhesion was not significantly affected. The rheology at imposed stress allowed to observe a predominance of the elastic character over the viscous character. The best combination resulted in a Néré tofu with a dry matter content of 30.9% and protein contents of 13% and 7.2%.

The work of this thesis shows a way to valorize the nutritional potential of this tropical legume and to develop food products such as beverages and tofu for human consumption in Africa.

INTRODUCTION.....	1
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I.1 Généralités sur les légumineuses.....	5
I.2 Intérêt économique des légumineuses	6
I.2.1 Les légumineuses pour l'alimentation humaine.....	6
I.2.2 Protéines	7
I.2.3 Fibres	7
I.2.4 Microconstituants (autres que les micronutriments)	8
I.3 <i>Parkia biglobosa</i> ou Néré	8
I.3.1 Généralités sur <i>Parkia biglobosa</i>	9
I.3.2 Caractéristiques et description botanique de <i>Parkia biglobosa</i>	9
I.3.3 Importance socio-économique et culturelle de <i>Parkia biglobosa</i>	10
I.3.4 Caractéristiques de la gousse de Néré	11
I.3.5 Utilisation de la graine de Néré.....	11
I.4 Caractéristiques des protéines végétales.....	12
I.4.1 Globulines et Albumines :.....	13
I.4.2 Globulines.....	13
I.4.3 Les albumines	14
I.4.4 Composition en acides aminés et qualité des protéines	14
I.4.5 Cas de la graine de Néré.....	16
I.5 Extraction des protéines végétales	16
I.5.1 Broyage.....	17
I.5.2 Délipidation	18
I.5.3 Précipitation acide.....	18
I.6 Paramètres influençant la solubilité des protéines végétales	19
I.6.1 pH du milieu	19
I.6.2 Force ionique.....	19
I.6.3 L'effet du chauffage.....	20
I.7 Mécanisme d'agrégation des protéines globulaires à pH neutre.....	20
I.7.1 Gélification des protéines globulaires	21

I.7.2	Etude du modèle alimentaire tofu	22
I.8	Les facteurs antinutritionnels associés aux protéines végétales	24
I.8.1	Les différents types de facteurs antinutritionnels.....	24
I.9	Digestibilité <i>in vitro</i>	28
I.10	Les procédés permettant d'éliminer les facteurs antinutritionnels (FAN).....	29
I.10.1	Trempage.....	29
I.10.2	Procédés thermiques-extrusion	30
I.10.3	Procédés biologiques.....	30
	STRATEGIE DE LA DEMARCHE DE L'ETUDE	34
II.	MATERIELS ET METHODES.....	37
II.1	Matériel végétal	38
II.1.1	Obtention de la farine de Néré avec et sans tégument	38
II.1.2	Délipidation de la farine de Néré	39
II.1.3	Préparation de la farine de soja	39
II.2	Analyses physico-chimiques des matières premières.....	40
II.2.1	Mesure de la teneur en matière sèche	40
II.2.2	Mesure de la teneur en matière minérale	40
II.2.3	Teneur en lipides extractibles par l'éther de pétrole	41
II.2.4	Mesure de la teneur en protéine par dosage de l'azote total.....	41
II.3	Extraction des protéines du Néré.....	42
II.3.1	Extractabilité des protéines dans la farine de Néré non délipidée et délipidée en fonction du pH et de la force ionique	42
II.3.2	Fractionnement	42
II.4	Caractérisations des isolats de protéines issus de la graine de Néré	45
II.4.1	Solubilité des isolats de globuline et d'albumine du Néré en fonction du pH et de la force ionique	45
II.4.2	Electrophorèse SDS-PAGE	45
II.4.3	Mesures calorimétriques par DSC :	46
II.4.4	Charge de surface par mesure de potentiel zêta :	47
II.5	Gélicification thermique des isolats de protéines de Néré	47

II.6	Préparation des jus de Néré et de soja	48
II.7	Souches bactériennes, milieu de culture et fermentation.....	49
II.8	Dosage de facteurs antinutritionnels dans la farine de Néré.....	50
II.8.1	Extraction des polyphénols totaux dans la farine avec et sans tégument	50
II.8.2	Extraction des Tanins condensés (TCs) :.....	54
II.8.3	Extraction des phytates :	54
II.8.4	Teneurs en inhibiteurs de trypsine.....	55
II.9	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines du jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté	57
II.9.1	Protocole de digestibilité <i>in vitro</i>	57
II.10	Dosage des facteurs antinutritionnels dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de <i>Lactobacillus plantarum</i>	58
II.11	Dosage des peptides dans le jus de Néré fermenté	59
II.12	Détermination de l'agrégation des protéines (Soja et Néré)	59
II.12.1	Etude en tubes avec centrifugation.....	59
II.12.2	Turbiscan	60
II.13	Préparation du tofu.....	61
II.14	Etude des propriétés rhéologiques par Texture Analyser (TA-XT2i).....	62
II.15	Rhéologie à contrainte imposée.....	63
II.16	Analyses statistiques :	66
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	67
	PARTIE I : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE D'ISOLATS PROTEIQUES	68
III.1	Composition des farines de graines de Néré (<i>Parkia biglobosa</i>)	68
III.2	Etude des conditions d'extraction des protéines à partir de la graine de Néré	69
III.3	Caractérisations des protéines des isolats albumines et globulines.....	71
III.3.1	Solubilité en fonction du pH et de la teneur en NaCl.....	71

III.3.2	Analyse des profils SDS-PAGE.....	74
III.3.3	Le potentiel Zêta.....	75
III.3.4	Analyse des profils de thermodénaturation des différents isolats	76
III.4	Aptitude à la gélification thermique.....	78
III.5	Conclusion partielle de la partie 1	81
PARTIE 2 : SELECTION DES BACTERIES LACTIQUES PROTEOLYTIQUES		82
III.6	Facteurs antinutritionnels dans la graine de Néré	83
III.6.1	Polyphénols totaux.....	83
III.6.2	Tanins condensés	84
III.6.3	Acide phytique.....	85
III.6.4	Activité inhibitrice de la trypsine.....	86
III.7	Fermentation du jus de Néré.....	87
III.7.1	Obtention d'un jus microbiologiquement stable	88
III.7.2	Croissance des souches de <i>L. plantarum</i> sur MRS.....	89
III.7.3	Croissance des souches de <i>L. plantarum</i> dans le jus de Néré	90
III.8	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines dans le jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté	92
III.8.1	Digestibilité des protéines du jus de Néré cru et traité thermiquement	92
III.8.2	Digestibilité <i>in vitro</i> du jus de Néré fermenté par les souches de <i>L. plantarum</i>	93
III.9	Facteurs antinutritionnels dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de <i>L. plantarum</i>	95
III.9.1	Polyphénols totaux dans le jus de Néré fermenté par les souches de <i>L. plantarum</i>	95
III.9.2	Tanins condensés dans le jus de Néré fermenté par les souches de <i>L. plantarum</i> ..	96
III.9.3	Acide phytique dans le jus de Néré fermenté par les souches de <i>L. plantarum</i>	98
III.10	Activité protéolytique des souches de <i>L. plantarum</i> sur le jus de Néré fermenté	99
III.11	Conclusion partielle sur la partie 2	100
PARTIE 3 : CARACTERISATION DES GELS DE NERE		101
III.12	Composition chimique des jus de Soja et de Néré	101
III.13	Effet des sels bivalents pour l'agrégation des protéines des jus de Néré et soja.....	103

Sommaire

III.13.1	Etude en tube à essai.....	103
III.13.2	Etude au Turbiscan	105
III.14	Caractérisation rhéologique des tofus de soja et de Néré	109
III.14.1	Matière sèche tofu Soja et Néré à concentrations différentes de sels bivalents ..	109
III.14.2	Caractérisation rhéologique des tofus de soja et de Néré	111
III.15	Conclusion partielle partie 3	116
IV.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	118
V	BIBLIOGRAPHIE	123

Liste des tableaux

Tableau 1: Teneur en protéines, lysine et méthionine des quelques légumineuses comparées à celle d'autres aliments courants (AFSSA, 2007).....	7
Tableau 2 : Composition de la graine de Néré crue et fermentée (Odunfa, 1985)	12
Tableau 3 : Principales classes structurales de protéines de réserve dans des graines de dicotylédones et exemple de nomenclature (Gueguen, 2016).....	14
Tableau 4: Composition en acides aminés (mg/g de protéines) des protéines végétales de diverses céréales, légumineuses et oléagineux (Food and Agriculture Organisation, 1981)	15
Tableau 5: Composition en acides aminés libres du <i>P. biglobosa</i> (g/100g protéines sur matière sèche) (Hassan and Umar, 2005).....	16
Tableau 6 : les différentes classes de protéines végétales issues de légumineuses et utilisables pour le développement des nouveaux produits agroalimentaires (MPV) voisin al 2013.....	17
Tableau 7: Souches <i>Lactobacillus plantarum</i> utilisées dans cette étude	50
Tableau 8 : Préparation des tubes pour le dosage des inhibiteurs de trypsine	56
Tableau 9: Composition proximale de la farine de graine de Néré (g/100 g).....	69
Tableau 10: Composition des suspensions de protéines de Néré.....	78
Tableau 11: Concentration totale en protéines à pH 7 pour obtenir un gel thermique	79
Tableau 12: Résultat de dénombrement sur MRS	89
Tableau 13: Suivi de la fermentation après 24 h à 37°C dénombrement de CFU/ml dans le jus de Néré fermenté.....	90
Tableau 14: Teneur en protéines et matière sèche des jus de soja et Néré	102
Tableau 15: Pourcentage de matière sèche, d'humidité et de protéines dans les tofus de Soja et de Néré à différentes concentrations de sels bivalents.....	110
Tableau 16: Etude de la rhéologie Texture Analyser des tofus soja et Néré ...	112
Tableau 17: résultat de déformation par contrainte des échantillons de tofu	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Figure 1: Graines de Néré mûres dans leurs gousses.....	11
Figure 2: Organigramme de la production de tofu (Joo and Cavender, 2020) ...	22
Figure 3 : déroulement schématique de la démarche scientifique de la thèse .	36
Figure 4 : aspect de présentation des graines de Néré a) graines brutes, b) graines avec tégument, c) graines sans tégument.....	38
Figure 5: Farine de Néré avec tégument (a) ; Farine de Néré sans tégument (b)	39
Figure 6: diagramme de fractionnement des protéines du Néré	44
Figure 7: diagramme de préparation des Jus Soja et Néré	48
Figure 8: Jus de Néré et Soja avant traitement thermique	49
Figure 9: diagramme résumant les étapes fondamentales de la fermentation du jus de Néré.....	52
Figure 10: Diagramme d'extraction des polyphénols par macération à l'ultrason	53
Figure 11: Diagramme d'extraction des tanins dans les farines des Néré par agitation au Méthanol	54
Figure 12 : Schéma des manipulations mises en œuvre pour étudier la digestibilité <i>in vitro</i> des protéines du jus Néré crue traité thermiquement et fermenté.....	58
Figure 13: Solution aqueuse des protéines et mesure de la température du jus	60
Figure 14: moule, étamine lactosérum et tofu obtenu après l'ajout des sels bivalents.....	62
Figure 15: Etapes clés de mesure des propriétés rhéologiques par Texture Analyser (TA-XT2i)	63
Figure 16: Matériel utilisé pour la découpe des cylindres ; Echantillons après passage au RheoCompass Anton Paar	66
Figure 17: Extractabilité de protéines dans la farine de Néré non délipidée en fonction du pH et de la force ionique (0,1 et 0,6 M de NaCl) en gramme de protéines extractibles pour 100 grammes de protéines totales.	70
Figure 18: : Etude de l'extractabilité des protéines totales du Néré délipidée en fonction du pH et de la force ionique (0,1 et 0,6 M de NaCl) en gramme de protéines extractibles pour 100 grammes de protéines totales.	71

Figure 19 : Etude de la solubilité des isolats de globuline de Néré en fonction du pH et de la force ionique (g de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales)	72
Figure 20: Etude de la solubilité des isolats d'albumines de Néré en fonction du pH et de la force ionique (g de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales)	73
Figure 21 : Modèles de SDS-PAGE en condition non réductrice des fractions globuline et albumine de Néré. MW = marqueurs de poids moléculaire ; Glob = isolat de globuline ; Alb = isolat d'albumine ; Leg = principales sous-unités de légumineuses ; Con = conviciline	75
Figure 22: résultat du potentiel Zeta des albumines et globulines du Néré	76
Figure 23: Profil DSC des Albumines et Globulines du Néré	77
Figure 24 : Dosage des polyphénols dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument.....	84
Figure 25: Dosage des tanins dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$	85
Figure 26: Dosage de l'acide phytique dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument.	86
Figure 27: Dosage de l'activité inhibitrice de la trypsine dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument.	87
Figure 28: Photographies d'observation au microscope optique (x1000) d'échantillons de jus de Néré incubés à 37°C pendant 24h après traitement thermique.	88
Figure 29: Echantillons de jus de Néré fermenté par <i>L. plantarum</i> : deux souches de références (Lp-NC8 et Lp-WCFS1 et quatre souches du laboratoire	91
Figure 30: pourcentage de digestibilité <i>in vitro</i> des protéines du jus de Néré avec et sans traitement thermique. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$	93
Figure 31: pourcentage de digestibilité <i>in vitro</i> des protéines du jus de Néré fermenté par les différentes de <i>L. plantarum</i> utilisées.....	94
Figure 32: Dosage des polyphénols dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de <i>L. plantarum</i> utilisées. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$	96

Figure 33: Dosage des tanins dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de <i>L. plantarum</i> utilisées. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$	97
Figure 34: Dosage de l'acide phytique dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de <i>L. plantarum</i> utilisées. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$	98
Figure 35 : Concentration en peptides dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de <i>L. plantarum</i> . Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$	99
Figure 36 : Pourcentage en protéines dans le surnageant et le culot en fonction des concentrations de sels bivalents dans le jus de soja.....	103
Figure 37: Pourcentage en protéines dans le surnageant et le culot en fonction des concentrations de sels bivalents dans le jus de Néré	104
Figure 38: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Néré avec différentes concentrations du sel $MgCl_2$	106
Figure 39: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Néré avec différentes concentrations du sel $CaCl_2$	107
Figure 40: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Soja avec différentes concentrations du sel $MgCl_2$	108
Figure 41: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Soja avec différentes concentrations du sel $CaCl_2$	108
Figure 42: tofu Néré 20 Mm $CaCl_2$ (a) tofu de soja 20 Mm $CaCl_2$ (b).....	110
Figure 43: Courbes de compression uniaxiale du tofu de Néré à 20 mmol de $CaCl_2$	112
Figure 44: Mesures Anton Paar RheoCompass de 3 échantillons tofu Néré 20mM $MgCl_2$ décrivant le comportement rhéologique par déformation	114
Figure 45: : histogramme du module de stockage (G') et de perte (G'') des tofus Soja et Néré avec les concentrations de 20 et 40 mM de $MgCl_2$ et $CaCl_2$	115

Introduction

Pour répondre aux besoins alimentaires de l'humanité d'ici 2050, le système agricole mondial doit à la fois produire plus de nourriture pour une population croissante, fournir des revenus aux populations rurales pauvres qui dépendent de l'agriculture pour leur subsistance, et réduire les impacts environnementaux (Searchinger et al., 2014). La sécurité alimentaire se pose déjà dans la plupart des pays en développement, où la pénurie alimentaire est un problème majeur en raison de l'explosion de la croissance démographique, de la concurrence pour les terres fertiles et de l'instabilité des politiques gouvernementales en matière d'agriculture (Sadik, 1991). Ces pays doivent faire face à la malnutrition protéino-énergétique qui résulte d'un apport insuffisant en protéines de bonne qualité. Le coût élevé des sources de protéines animales telles que la viande, le poisson et les produits avicoles met ces produits hors de portée des populations pauvres. Par conséquent, les sources de protéines végétales, qui sont moins chères et facilement disponibles, sont indispensables pour l'alimentation humaine et animale (El Youssef et al., 2020).

Parmi les sources de protéines végétales, les légumineuses alimentaires sont particulièrement appréciées pour leurs produits riches en nutriments, notamment la graine et, très souvent, la partie végétale (feuilles et gousses) (Dixon and Sumner, 2003). Les légumineuses offrent l'avantage de fournir des protéines avec un coût de production réduit, une facilité de transformation et une efficacité énergétique supérieure à celle fournie par les protéines animales notamment par la présence de glucides (Balogun and Fetuga, 1986). Les avantages nutritionnels des légumineuses ne s'arrêtent pas du fait de leur teneur élevée en protéines. Ces plantes apportent également un complément unique d'acides aminés (tryptophane et lysine, notamment) (Asif et al., 2013). En plus elles offrent une source extrêmement importante de vitamines du groupe B, de fer, de zinc, de magnésium et de calcium (Messina, 1999). Les composés phytochimiques et les fibres alimentaires figurent également parmi les avantages nutritionnels d'une alimentation riche en légumineuses. Il faut souligner que certains de ces composés ont des propriétés antinutritionnelles, notamment d'inhibiteurs d'enzyme, de lectines, de polyphénols et, dans certains cas, de tanins (Odeny, 2007). De tels composés sont souvent associés à une moindre valeur nutritionnelle de la légumineuse, car ils entraînent une diminution de la digestibilité, ainsi que de la biodisponibilité de certains minéraux. Un traitement des graines de légumineuses par des moyens mécaniques ou biologiques (fermentation, par

exemple) ou par la chaleur est souvent nécessaire pour éliminer ces facteurs antinutritionnels (Deshpande et al., 1982) et améliorer la biodisponibilité des protéines et des minéraux.

Les protéines végétales représentent environ 65 % des apports en protéines pour l'alimentation humaine au niveau mondial. Parmi celles-ci, la plus employée notamment comme substitut des protéines animales est le soja. Il associe des propriétés technologiques (fixation de l'eau, liaison, émulsion, texturation...) et nutritionnelles avec une teneur élevée en protéines (40%), très intéressantes, qui ont été particulièrement étudiées. Dans un contexte de sécurisation des apports en protéines pour la population de Guinée Conakry, il serait intéressant d'avoir recours à des produits plus endémiques que le soja. En effet le soja n'a été introduit dans l'agriculture en Guinée qu'assez récemment et il est encore essentiellement destiné à l'alimentation animale. La République de Guinée est riche en ressources végétales non ou mal exploitées qui ont des remarquables qualités nutritionnelles de fait leur teneur en protéines. Ces sources de protéines non conventionnelles peuvent être utilisées à la place de la viande ou comme enrichissant d'autres aliments. Il est donc opportun de s'interroger sur la faisabilité de trouver de nouvelles sources de protéines végétales de production locale en Guinée.

Les fruits de *Parkia biglobosa* (Néré) sont consommés non seulement pour leur pulpe farineuse, mais aussi et surtout pour les graines. Avant d'être utilisées, ces graines sont traitées (bouillies, lavées et fermentées), la méthode exacte variant d'un endroit à l'autre (Urua, 2011). Cette farine de graines fermentées fournit un condiment utilisé en cuisine. Ce condiment certes riche en protéines améliore la diète journalière en protéines mais ne constitue pas pour autant un apport protéique suffisant. Or les graines de Néré présentent une composition en protéines et en lipides comparable à celle du soja (Koura et al., 2014). Ainsi les graines pourraient être une alternative intéressante à l'usage du soja comme ingrédient de base pour le développement de nouveaux produits riche en protéines d'origine végétale : jus végétal, tofu. Néanmoins une utilisation plus large de ces protéines se heurte à des verrous qui concernent les propriétés techno-fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques de cette source protéique. Si de nombreuses études ont porté sur les procédés de décorticage des gousses et la fermentation des graines, il n'existe pas à notre connaissance d'étude portant sur l'utilisation autre que condimentaire d'isolats protéiques issus du Néré. Comme beaucoup de protéines de source végétale, des facteurs nutritionnels sont associés aux protéines ; des traitements spécifiques notamment

thermiques ou fermentaires sont alors nécessaires pour les éliminer. Des procédés thermiques modérés et le recours à une fermentation de type lactique pourraient améliorer ces propriétés (Zare et al., 2012).

L'objectif principal de cette thèse est de concourir à la production de connaissances sur les effets de la fermentation lactique sur la composition biochimique et la physico-chimie de produits protéinés fermentés à base de graines de Néré. Les actions scientifiques cibleront : l'étude de la valorisation des graines du Néré pour le développement de nouveaux produits riches en protéines d'origine végétale.

Les objectifs visés ont été :

(i) La caractérisation biochimique et physico-chimique d'isolats protéiques issus de farine de graines de Néré en fonction du procédé d'extraction. Ce premier objectif étudie plus spécifiquement, les rendements d'extraction en protéines en solution aqueuse et l'extraction des protéines en fonction du pH, de la force ionique et de la présence de la matière grasse, la solubilité des isolats d'albumine et de globuline en fonction du pH et de la force ionique ainsi que le profil SDS-PAGE des isolats protéiques.

(ii) La sélection de bactéries lactiques protéolytiques capables de fermenter le jus de Néré, réduire les facteurs antinutritionnels afin d'accroître la biodisponibilité des nutriments. Ce second objectif s'est focalisé fondamentalement sur les effets de l'utilisation de souches de *Lactobacillus plantarum* sur la réduction des facteurs antinutritionnels et l'amélioration de la digestibilité des protéines contenues dans le jus cru et fermenté de la graine du Néré. Les effets de traitements thermiques sur la réduction des facteurs antinutritionnels comme les phytates, les tanins, les inhibiteurs de la trypsine et l'amélioration de la digestibilité des protéines (*in vitro*) par les souches de *Lactobacillus plantarum* et leur contribution, à la réduction des teneurs en facteurs antinutritionnels ont été étudiés.

(iii) L'obtention d'un modèle alimentaire riche en protéines. Cet objectif est consacré à l'étude de l'aptitude à la gélification thermique des isolats protéiques d'albumines et globulines du Néré en fonction du pH et la concentration en protéines, la mise en place d'un modèle alimentaire permettant de maximiser l'utilisation des protéines disponibles dans la graine de Néré et enfin l'étude des facteurs concourant à l'obtention d'un tofu de Néré.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La tradition alimentaire de nombreuses populations a montré qu'il était possible d'équilibrer un régime végétarien en consommant des graines riches en protéines. Les produits extraits du soja et de l'arachide sont variés et occupent une grande place dans la nutrition azotée des peuples d'Asie et d'Afrique (Rizzo and Baroni, 2018). Dans les pays industrialisés, ces sources de protéines bon marché ont permis le développement de productions animales mais sont maintenant incorporées à de nombreux aliments de l'homme. Les propriétés technologiques des protéines végétales, et l'apparition des aliments diététiques ont contribué à ce développement. D'une façon générale, la teneur en protéines des graines de céréales est faible (10-12% de la matière sèche) comparée aux graines de légumineuses (20-35% de la matière sèche). Les légumineuses à graines sont donc particulièrement intéressantes pour constituer une source de protéines à moindre coût.

I.1 Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses sont des dicotylédones appartenant à la famille botanique des fabacées (*Fabaceae*) qui représente la troisième famille de plantes par le nombre d'espèces à savoir (18 000 référencées), après les composées (astéracées) et les orchidées. La plupart des légumineuses cultivées appartiennent à une des sous familles (les *Faboideae* ou *Papilionoideae*) et plus précisément aux tribus des *Fabeae*, des *Phaseoleae* et des *Trifolieae*. Les *Faboideae* peuvent être des arbres, des arbustes ou des herbes.

En France on connaît environ 376 espèces de légumineuses naturelles ou subspontanées (y compris les légumineuses cultivées en grandes parcelles) soit seulement 2% de la flore mondiale de légumineuses. En Afrique de l'Ouest, les légumineuses (*Fabaceae*) sont connues comme l'une des familles de plantes les plus importantes en termes de nombre d'espèces utilisées, non seulement comme sources d'aliments et de médicaments pour les humains et les animaux, mais aussi comme sources d'autres matériaux tels que le bois de construction, les combustibles, les teintures, les fibres, les gommes et insecticides (Lewis et al., 2005).

Les légumineuses sont caractérisées par :

- ✓ Des fleurs papilionacées (en forme de papillon) pour la plupart des espèces cultivées,

- ✓ Une gousse contenant des graines (la gousse étant le fruit issu de l'ovaire de la fleur), pour la majorité des membres de cette famille, la capacité d'utiliser l'azote atmosphérique (N₂) pour produire ses propres composants protéiques. Cette capacité est permise par la symbiose avec des bactéries du sol fixatrices de l'azote (genre *Rhizobium*) au sein d'organes spécialisés (les nodules) qui se développent sur les racines (Schneider and Huyghe, 2015).

I.2 Intérêt économique des légumineuses

Le coût élevé des protéines animales a suscité l'intérêt vers plusieurs protéines de graines de légumineuses comme potentielles sources de protéines végétales pour l'alimentation humaine et l'alimentation du bétail. Parmi les espèces végétales, les légumineuses à graines sont considérées comme la principale source de protéines alimentaires.

Les légumineuses contribuent de manière importante à la nutrition et la santé grâce à leur contenu élevé en protéines et en acides aminés essentiels, mais aussi parce qu'elles constituent une source de glucides complexes et contiennent plusieurs vitamines et minéraux (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture(FAO), 2018). La famille des légumineuses comprend comme plantes cultivées : le haricot, le pois, la lentille, l'arachide, le soja... La culture des légumineuses vivrières est reconnue comme l'une des meilleures et des moins coûteuses des solutions pour l'alimentation des populations des pays en voie de développement où la consommation des protéines animales peut être limitée pour des raisons économiques, par des facteurs sociaux, culturels ou religieux (Gerard, 1996).

I.2.1 Les légumineuses pour l'alimentation humaine

Les légumineuses fournissent des protéines de qualité, une faible teneur en matière grasse (pour la plupart), une richesse en fibres, et un faible indice glycémique. Elles sont indispensables dans les régimes végétariens et conseillées pour les sports d'endurance. Leur consommation régulière peut aussi contribuer à prévenir des maladies chroniques. Au-delà de leurs propriétés nutritionnelles, les légumineuses sont aussi utilisées par l'industrie comme des ingrédients techno-fonctionnels (Schneider and Huyghe, 2015).

I.2.2 Protéines

La consommation simultanée des protéines issues des légumineuses et des céréales permet un apport en acides aminés soufrés essentiels équilibré et proche de celui des produits animaux. Les protéines de légumineuses sont en effet relativement riches en lysine (un atout) et pauvres en acides aminés soufrés (une faiblesse), alors que les protéines de céréales sont pauvres en lysine et plus riches en acides aminés soufrés. En cela, les légumes secs constituent un complément idéal aux céréales dans une alimentation pauvre ou dépourvue de protéines d'origine animale. Le mélange des protéines de légumineuses avec celles des céréales permet donc de compenser le déséquilibre en acides aminés soufrés. Par exemple, un mélange maïs –haricot (76 et 24%, respectivement) permet de couvrir les besoins azotés d'enfant d'âge préscolaire (Tomé, 2012).

Tableau 1: Teneur en protéines, lysine et méthionine des quelques légumineuses comparées à celle d'autres aliments courants CIQUAL (AFSSA, 2007)

Noms de aliment	Protéines (g/100g)	Lysine (mg/100g de protéine)	Méthionine (mg/100g de protéine)
Haricots rouges cuits à l'eau	9,1	68,90	15,05
Lentilles cuites à l'eau	9,0	70,00	8,56
Lupin, graines cuites à l'eau	15,6	53,33	7,05
Pois cassés cuits à l'eau	8,3	72,53	10,24
Soja, graines cuites à l'eau	16,6	66,75	13,49
Œuf entier cuit à l'eau	12,6	71,75	41,11
Lait entier	3,3	78,89	24,85
Pâtes alimentaires cuites	4,85	22,12	16,13

I.2.3 Fibres

Les légumineuses étant riches en fibres, peuvent contribuer à une augmentation des apports en fibres dans l'alimentation humaine. Il n'existe pas, à l'heure actuelle de recommandations qualitatives concernant ce constituant végétal mais il est généralement indiqué que l'alimentation doit comporter des fibres solubles et insolubles. Les légumineuses sont des sources de fibres insolubles (téguments et parois végétales) mais également solubles (parois végétales et contenu intracellulaire). Les légumineuses

contiennent également des α -galactosides (raffinose, stachyose, verbascose) oligosides hydrosolubles et très fermentescibles (Schneider and Huyghe, 2015).

I.2.4 Microconstituants (autres que les micronutriments)

Les légumineuses contiennent, en dehors des macronutriments (protéines, glucides, lipides et fibres alimentaires) et micronutriments (minéraux et vitamines), de nombreux composés qui jouent souvent un rôle de protection pour la plante. Parmi ces composés, plusieurs ont été longtemps qualifiés de facteurs “antinutritionnels” (FAN), car ils réduisent la biodisponibilité des macro ou des micronutriments et/ou ont des effets délétères lorsqu’ils sont absorbés en grande quantité par les espèces monogastriques.

Parmi ces substances, plusieurs de nature protéique ou glycoprotéique (inhibiteurs de la trypsine et de chymotrypsine, de l’ α -amylase, lectines) sont dénaturées (en totalité ou au moins en grande partie) par les traitements hydrothermiques, dont les traitements classiques de cuisson des légumes secs.

Les oxalates limitent la biodisponibilité des minéraux mais sont présents en très faibles quantités dans les légumineuses par rapport à certains végétaux verts (par exemple épinards).

Les phytates, non dénaturés à la cuisson, limitent la biodisponibilité des minéraux, comme le fer et le zinc, qui sont présents en quantité nutritionnellement intéressante dans les graines de légumineuses. Des traitements, tels que la germination ou l’addition de certaines épices (ail, oignon...), semblent améliorer la biodisponibilité de ces minéraux (Schneider and Huyghe, 2015)

Des composés phénoliques, notamment les isoflavones, présents en particulier dans les graines de soja peuvent être considérés comme FAN, car caractérisées de phyto-œstrogènes. Les tanins pourraient être responsables d’une plus faible biodisponibilité des protéines de légumineuses, qui vont en partie complexées avec les tanins (Schneider and Huyghe, 2015).

I.3 *Parkia biglobosa* ou Néré

Les graines du Néré sont riches en protéines et généralement fermentées en un condiment alimentaire appelé soubala (en bambara) qui est utilisé comme exhausteur de goût pour les soupes et ragoûts. Il peut être une source de protéines dans les régimes

très déficitaires en protéines (Dike and Odunfa, 2003; Ikenebomeh and Kok, 1984). Cependant, l'utilisation des graines de Néré crues est limitée par la présence de facteurs antinutritionnels. Pour étendre l'usage des graines de Néré au-delà de sa transformation en soubala, des travaux sont nécessaires pour améliorer la qualité nutritionnelle et l'acceptabilité organoleptique de produits à base de graines de Néré.

I.3.1 Généralités sur *Parkia biglobosa*

Le genre *Parkia biglobosa* (*Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br.) appartient à la famille des *Fabaceae* et plus précisément à la sous-famille des *Mimosoideae* (Bonkougou, 1987). Le *Parkia biglobosa* entre donc dans la grande famille des légumineuses à graines. Le Néré est un ligneux qui se rencontre fréquemment en petites tâches grégaires (Ouédraogo, 1995). Les *Parkia* se reconnaissent par leurs belles inflorescences en boules, à colorations roses ou rouges suspendues à l'extrémité de longs pédoncules et par leurs grappes constituées de longues gousses qui pendent d'un réceptacle en massue (Aubréville, 1950). Le Néré porte aussi les noms de : Nété, Mimosa pourpre, Arbre à farine, Caroubier africain, African locust bean.

I.3.2 Caractéristiques et description botanique de *Parkia biglobosa*

Le Néré est un arbre de 7 à 25 m (Ake Assi and Guinko, 1991). Le fût du Néré est généralement droit et robuste, cylindrique avec des empattements en bourrelets plus ou moins développés. Le tronc, recouvert d'une écorce gris-cendre à gris brun souvent noirâtre, est profondément strié, donnant un aspect écailleux en plaquettes à l'arbre adulte, qui résiste aux feux de brousse (Satabié, 1989)

Les feuilles sont bipennées alternes comportant 6 à 18 paires de pennes (Ouédraogo, 1995). Les inflorescences sont des capitules sphériques pendant à l'extrémité d'un long pédoncule de 10 à 35 cm. Les fleurs sont rouges, brunâtres, gamopétales (pétales soudés) et hermaphrodites. L'arbre rentre en feuillaison en début de saison hivernale (avril, mai) et en floraison entre novembre et janvier. Les fruits sont matures quelques semaines avant la saison pluvieuse (mars à avril).

Le système racinaire du Néré dispose d'une racine pivotante avec un diamètre qui devient moins important plus la racine explore les profondeurs du sol (Breman and

Kessler, 1995). En dehors de la racine pivotante, on rencontre aussi des racines latérales dont la longueur peut atteindre 10 m.

I.3.3 Importance socio-économique et culturelle de *Parkia biglobosa*

P. biglobosa est présent dans 20 pays d'Afrique, de l'Ouest : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal, Sierra Leone, Togo, du Centre : Cameroun, Centrafrique, Tchad, République Démocratique du Congo, de l'Est : Soudan, Ouganda (Shao, 2000).

L'importance du Néré pour les populations d'Afrique soudano-guinéenne, surtout pour les populations rurales, lui a valu les qualificatifs d'espèce à usages multiples (Bonkougou, 1987). Depuis ses racines jusqu'aux feuilles, le Néré arrive à satisfaire des besoins sur le plan alimentaire, dans la pharmacopée traditionnelle, sur le plan commercial et en agroforesterie.

Dans plusieurs sociétés, le Néré est aussi perçu comme symbole de paix, d'harmonie de la vie sociale et du bien-être des communautés. Les produits issus du Néré interviennent dans plusieurs rituels marquant les différentes étapes de la vie dont les naissances, les baptêmes, les mariages, les funérailles (Ouédraogo, 1995).

Au cours de l'année 2012, dans la région des hauts-bassins la vente de la pulpe du Néré, des graines et du soubala (condiment de graines de Néré fermentées), représente 10.5% de la vente totale des produits forestiers non ligneux. La vente des produits du fruit du Néré est connue pour générer des revenus importants pour de nombreuses femmes (Guinko et Pasgo, 1992).

La pulpe de Néré, riche en glucides (60%), se consomme directement ou après délayage à l'eau pour constituer une boisson sucrée (Sacandé and Clethero, 2007). La pulpe est également utilisée dans la préparation de couscous ou de gâteaux après addition de farine de mil, de maïs ou de blé (Bonkougou, 1987; Ki, 1994; Ouédraogo, 1995).

Les graines de Néré sont majoritairement transformées en soubala mais dans certaines provinces (Kéné Dougou au Burkina Faso), les graines grillées sont utilisées comme café.

I.3.4 Caractéristiques de la gousse de Néré

La gousse est composée de la cosse qui représente 43 % de la masse du fruit, de la pulpe représente 39 % ; elle est consommable et des graines 18 % du fruit (Rateau,1995).Chaque gousse peut contenir jusqu'à 23 graines (Figure 1).



Figure 1: Graines de Néré mûres dans leurs gousses

La partie comestible des graines se situe à l'intérieur d'une enveloppe bien plus épaisse et plus dure que celles rencontrées d'ordinaire chez les légumineuses. Un arbre produit en moyenne entre 25 à 100 kg de gousses par an. Ce rendement est variable d'un arbre à l'autre et d'une année à l'autre. La pulpe de la gousse est souvent consommée dans les mois qui suivent la récolte. Très riche en saccharose, elle constitue un excellent aliment énergétique. Le plus souvent, la pulpe est consommée par les propriétaires des arbres et son commerce est bien plus localisé que celui des graines.

I.3.5 Utilisation de la graine de Néré

Son aire de consommation dépasse largement les régions productrices et son usage alimentaire concerne aussi bien les populations rurales qu'urbaines.

La graine de Néré est essentiellement transformée en soubala (soumbara, ou encore netetou). Il s'agit en fait d'une version traditionnelle artisanale du bouillon cube industriel. La préparation est presque exclusivement l'apanage des femmes. Après un long processus de cuisson et décorticage, les graines sont réduites en pâte, modelée en petites formes allongées qui sont enfin mises à sécher au soleil. Au cours du séchage, une fermentation spontanée se met en place à l'origine de composés organoleptiques caractéristiques. Certains acides aminés naturels du soubala, notamment glutamique et

aspartique, jouent un rôle important dans la flaveur des aliments en tant qu'exhausteurs de goût (Dike and Odunfa, 2003).

Tableau 2 : Composition de la graine de Néré crue et fermentée (Odunfa, 1985)

Grammes pour 100 grammes de graines		
	Crue	Fermentée
Eau	7,3	14,8
Protéines	34,6	35
Lipides	21	29
Glucides totaux	32	16,4
Matière minérale	4,3	4,8

Le soubala après fermentation (Tableau 2) conserve une teneur en protéines élevée de 30 à 40 % , en matière grasse 15 à 20 % , en glucides 10 à 15 % , en sels minéraux 4 % et en vitamines (Diawara and al., 2004). Cependant, le soubala en tant que condiment ne peut pas être considéré comme une source de protéine à part entière car il est ajouté aux plats principaux en faible quantité. L'augmentation de la teneur en protéines du plat est donc faible.

I.4 Caractéristiques des protéines végétales

Les protéines végétales alimentaires proviennent majoritairement des graines et sont présentes en quantité importante dans les produits céréaliers (blé), les produits issus du soja (tonyu, tofu), les produits à base de légumineuses (pois, fève, lupin).

On distingue selon leurs propriétés de solubilité 4 grandes familles de protéines :

- Albumines solubles dans l'eau ;
- Globulines solubles dans les solutions salines ;
- Prolamines solubles dans les mélanges hydro-alcooliques (60-70% alcool v/v) ;
- Glutélines solubles en milieu très alcalin (pH10).

Les graines des monocotylédones (blé, ...), contenant entre 5 et 15 % de protéines sont riches en prolamines et glutélines, localisées dans l'albumen. Les graines des dicotylédones (pois...) possèdent entre 15 et 35 % de protéines constituées surtout de globulines situées dans l'embryon.

Les globulines, les prolamines et les glutélines sont des protéines de réserve, qui ont pour fonction de stocker dans la graine le carbone et l'azote mobilisable au moment de la germination. Cette fonction leur confère des caractéristiques très particulières de composition en acides aminés, avec des teneurs très élevées en amides (glutamine, asparagine). Les albumines ont un profil plus équilibré en acides aminés et ont principalement un rôle métabolique (enzymes, transporteurs, protéines de stress...), ou un rôle de défense (inhibiteurs d'enzymes, lectines, protéines entomotoxiques, antifongiques, antimicrobiennes...) (Guéguen et al., 2016a).

I.4.1 Globulines et Albumines :

Les albumines et globulines sont classées selon leurs coefficients de sédimentation suivant la méthodologie de fractionnement développée en 1898 par Osborne & Campbell. Dans la majorité des plantes dicotylédones, les globulines (7S/11S) représentent entre 65 et 80% de l'azote protéique total, tandis que le reste appartient aux albumines (2S) et quelques pourcents d'autres protéines insolubles (Guéguen & Barbot, 1988 ; Kimura et al., 2008). Pour la plupart des légumineuses, les globulines sont des protéines hexamériques (11 S) ou trimériques (7 S) qui ont une structure compacte qui peut les rendre peu accessibles aux enzymes. Les albumines sont des protéines de type 2 S de nature dimérique.

I.4.2 Globulines

Les globulines sont oligomériques et présentent une grande hétérogénéité de structure typique des protéines végétales. Le ratio 11S/7S varie entre les cultivars, par exemple, de 0,5 à 1,7 dans le soja, 0,2 à 1,5 dans le pois, 0,3 à 0,5 dans le haricot.

Ces protéines possèdent des appellations différentes suivant les espèces (Tableau 3) mais présentent au sein de chaque famille de grandes similarités de structure et de propriétés physicochimiques.

Les globulines de type 11S sont hexamériques (300-360 kDa) dénommées glycinine chez le soja, légumine chez le pois et la fève. Les protéines de type 7S, trimériques (150-180 kDa) sont des glycoprotéines dont le nom varie en fonction des espèces : β conglycinine du soja, viciline du pois, phaséoline du haricot vert.

Tableau 3 : Principales classes structurales de protéines de réserve dans des graines de dicotylédones et exemple de nomenclature (Gueguen, 2016)

	Soja	Pois	Lupin	Colza	Tournesol	Lin
Albumin 2s	α - conglycinine	PA1	Conglutine- δ	Napine	SFA	Conline
Globuline 7s	β - conglycinine	Viciline	Conglutine- β	-	-	-
Globuline 11/12s	Glycine	Légumine	Conglutine- γ	Cruciférine	Hélianthinine	linine

I.4.3 Les albumines

Les albumines sont des protéines dimériques. Par exemple pour le pois, l'albumine est composée principalement d'une fraction abondante PA2, qui est un homodimère de polypeptides de 26 kDa ou 25 kDa, et d'une petite fraction PA1 de 11 kDa composée de deux polypeptides de 6 kDa (A Gatehouse et al., 1985). Contrairement aux autres albumines (2S), les dimères PA1 et PA2 ne sont pas liées par des liaisons disulfures (Le Gall et al., 2005). La fraction albumine contient aussi la lectine, inhibiteur de protéase et la lipoxigénase (Le Gall et al., 2007a).

I.4.4 Composition en acides aminés et qualité des protéines

Les valeurs nutritives des différentes protéines alimentaires sont en grande partie déterminées par la concentration et la disponibilité des différents acides aminés essentiels et de l'azote total (Boye et al., 2012). La plupart des protéines d'origine animale fournissent ces acides aminés indispensables dans des proportions équilibrées, mais de nombreuses protéines d'origine végétale fournissent des proportions sous-optimales. Les compositions typiques en acides aminés des protéines végétales provenant de diverses céréales, légumineuses et oléagineux sont présentées dans le tableau 4. L'un des acides aminés indispensables, la lysine, est à une concentration plus faible dans toutes les

principales protéines végétales par rapport aux protéines animales. En outre, les acides aminés contenant du soufre (méthionine et cystine) sont également relativement plus faible proportion dans les légumineuses par rapport aux quantités trouvées dans les protéines d'origine animale telles que les produits laitiers, les œufs et la viande. Les exceptions sont les protéines de soja et de canola qui ont une composition en acides aminés bien équilibrée (tableau 4). La teneur en acides aminés n'est que l'un des facteurs déterminant la qualité nutritionnelle globale des protéines alimentaires. D'autres facteurs, tels que la digestibilité et la disponibilité de la protéine, peuvent également affecter l'utilisation des protéines par l'homme (WHO et al., 2007).

Tableau 4: Composition en acides aminés totaux (mg/g de protéines) des protéines végétales de diverses céréales, légumineuses et oléagineux (Food and Agriculture Organisation, 1981).

	Concentration en acides aminés (mg / g protéine)									
	Blé	Avoine	Mais	Riz	Sorgo	Soja	Lupin	Pois	Pois chiche	Canola
Essentiels										
Arginine	48	50	43	79	34	73	98	102	98	58
Histidine	24	22	28	24	22	26	27	25	28	31
Isoleucine	34	38	38	44	41	46	45	46	46	23
Leucine	69	71	128	86	138	79	74	73	78	71
Lysine	30	37	27	38	21	65	55	81	71	56
Méthionine	16	18	20	22	14	13	8	10	11	21
Cystine	26	24	16	16	16	13	14	12	12	24
Phénylalanine	47	54	50	50	51	50	38	49	60	68
Tyrosine	31	33	39	33	28	32	37	29	31	32
Threonine	30	35	37	34	31	39	38	44	39	44
Tryptophan	11	16	7	27	13	13	10	10	9	13
Valine	46	53	50	60	52	49	42	51	47	55
Non-essentiels										
Alanine	37	42	77	59	87	43	37	44	45	44
Aspartic acid* ²	51	60	64	99	65	119	113	118	121	73
Glutamic acid* ²	309	249	194	199	219	190	227	174	165	181
Glycine	41	41	38	45	31	42	43	44	42	49
Proline	103	115	92	49	84	56	42	42	44	60
Serine	48	43	51	48	43	52	52	47	53	40

I.4.5 Cas de la graine de Néré

Le tableau 5 montre la composition en acides aminés des protéines de graines entières de Néré. Les acides aminés ont été observés comme étant présents en quantités raisonnables par rapport au besoin en acides aminés essentiels définis par FAO/WHO. Le *Parkia biglobosa* possède une quantité appréciable de lysine, d'acides aminés soufrés et d'acides aminés aromatiques ; il est donc idéal pour des applications de fortification avec diverses formulations alimentaires.

Tableau 5: Composition en acides aminés totaux du *P. biglobosa* (g/100g protéines (Hassan and Umar, 2005).

Acides aminés	Graines entières	FAO/WHO/UNU* Profil de référence
Isoleucine	2.40	2.8
Leucine	7.35	6.6
Lysine	6.56	5.8
Cystine	1.23	-
Méthionine	1.62	-
Total AA soufrés	2.85	2.5
Phenylalanine	4.88	-
Tyrosine	3.28	-
Total AA aromatiques	8.16	6.3
Threonine	2.81	3.4
Valine	4.05	3.5
Alanine	3.66	
Arginine	6.80	
Aspartic acid	6.87	
Glutamic acid	14.12	
Glycine	4.71	
Histidine	2.65	
Proline	2.63	
Serine	4.84	

* Moyenne besoin en acides aminés essentiels FAO/WHO/UNU (1991)

I.5 Extraction des protéines végétales

Différents parcours d'extraction / purification permettent l'obtention d'isolats protéiques de qualité variable, dont dépendront leurs propriétés physicochimiques futures (Boye et al., 2010a; Fredrikson et al., 2001; Fuhrmeister and Meuser, 2003a;

Guéguen, 1983; Shand et al., 2007a). Un schéma type d'extraction passe par la fragmentation des graines (broyage, trituration), la délipidation, la séparation des fractions protéiques, le fractionnement et la purification de classe spécifique de protéines (globulines, albumines).

L'extraction des protéines végétales au stade industriel permet de disposer de concentrés et d'isolats dénommés MPV (matières protéiques végétales), issus d'espèces végétales de grande culture de légumineuses et de céréales. Les principales classes sont mentionnées dans le tableau 6.

Tableau 6 : les différentes classes de protéines végétales issues de légumineuses et utilisables pour le développement des nouveaux produits agroalimentaires (MPV) (Voisin et al., 2013)

Classe	Teneur en protéines (N*6,25 sur sec)	Sources végétales disponibles
Farine	50-65%	Soja, lupin, féverole
Concentré	65-90%	Soja, lupin, féverole
Isolat	≥ 90%	Soja, pois,
Protéines de feuilles	88%	Luzerne

Ces concentrés et isolats sont utilisés en agroalimentaire particulièrement pour leurs propriétés fonctionnelles. Ils peuvent être incorporés dans des sauces, produits à base de viande, jusqu'à 30 % du produit fini. Ils servent également à la fabrication d'analogues végétariens de viande (Colot and Louis, 2012; Fredot, 2009).

I.5.1 Broyage

Le broyage mécanique pose le problème des micro-échauffements lors du contact lame-graine, probablement préjudiciable à la structure native des globulines (Koyoro and Powers, 1987). D'autres auteurs préconisent en conséquence un cryo-broyage (O'Kane et al., 2004a). Un trempage au préalable permettrait d'éliminer certains facteurs antinutritionnels, type oligosaccharides (Boye et al., 2010; Fredrikson et al., 2001; Guéguen, 1983). Cependant, des globulines fortement compactées à l'état sec seraient moins sensibles à des dénaturations mécaniques.

I.5.2 Délipidation

Pour une extraction industrielle de globulines à usage alimentaire, la délipidation par solvants (éther de pétrole) sur la farine sèche n'est pas viable économiquement et pose le problème des résidus de solvants dans le produit fini. Par la suite, extraire les globulines à partir d'une farine brute pose le problème de la contamination de la fraction protéique par des lipides ; les interactions lipides-protéines sont dues à la nature de la matière grasse et à leur localisation (Shand et al., 2007). Les lipides associés modifieraient la solubilité dans l'eau et augmenteraient la turbidité des suspensions protéiques (Li et al., 2007). En général, la délipidation permet d'accroître les rendements d'extraction en protéines et aussi d'avoir des fractions plus pures mais on constate aussi des effets négatifs sur la solubilité des fractions isolées des protéines.

I.5.3 Précipitation acide

Les fractions de globulines et d'albumines sont généralement obtenues par précipitation sélective au point isoélectrique. Le choix des conditions d'extraction est fait en prenant en compte l'application industrielle en vue d'obtenir un produit d'intérêt technologique et nutritionnel et pour éviter la présence des lipides et autres composés antinutritionnels.

L'extraction des globulines de graines de légumineuses commence par une solubilisation de la farine de graines dans un tampon alcalin, puis d'une précipitation au pH de minimum de solubilité des protéines, de l'ordre de 4,5-4,8 (Koyoro and Powers, 1987; Shand et al., 2007a).

Dans ce domaine de pH, les interactions entre oligosaccharides de légumineuses et protéines sont réduites (Guéguen, 1983). Cependant la solubilité des globulines peut être altérée par le fait qu'elles soient glycosylées ou phosphorylées (Marcone, 1999). La présence de phytates ou d'oses liés à la protéine modifierait leur charge globale de surface, altérant leur solubilité selon le pH (Fuhrmeister and Meuser, 2003a; Pedrosa et al., 1997). Une acidification trop rapide serait à l'origine de dénaturations ou de dissociations partielles des globulines. Les globulines extraites sont resolubilisées à pH alcalin (>7) par ajout d'une solution de soude. Après dialyse, la suspension protéique est enfin séchée ; l'atomisation est la méthode industrielle la plus employée, malgré des températures élevées potentiellement dénaturantes. Une lyophilisation est préférable à l'échelle du laboratoire.

I.6 Paramètres influençant la solubilité des protéines végétales

La solubilité est la quantité de protéines dans un échantillon qui se dissout dans la solution. Les applications potentielles des protéines peuvent être considérablement élargies si elles possèdent une solubilité élevée. (Kinsella and Melachouris, 1976) ont suggéré que la solubilité des protéines est le facteur le plus important, un excellent indice de leur fonctionnalité. Elle dépend du pH de la solution, de la force ionique et des conditions d'extraction préalables.

I.6.1 pH du milieu

Le degré de solubilité des protéines dans un milieu aqueux est le résultat des interactions électrostatiques et hydrophobes entre les molécules de protéines entre elles et avec l'eau. La solubilité est augmentée si la répulsion électrostatique entre les molécules est supérieure aux interactions hydrophobes (Kinsella and Melachouris, 1976).

Au point isoélectrique (PI), les protéines ont une charge nette nulle, les forces attractives prédominent et les molécules ont la solubilité la plus faible. A des valeurs de pH supérieures ou inférieures au pI la solubilité est accrue. Les interactions protéine-eau augmentent parce que les protéines portent une charge nette positive ou négative. Si on suit la solubilité de la protéine en fonction du pH, on obtient une courbe en forme de V, où le minimum correspond au pI. La solubilité et le rendement d'extraction sont plus importants à un pH alcalin qu'à un pH acide et peuvent être améliorés en augmentant la force ionique du milieu (Zayas, 1997).

La plupart des globulines de légumineuses montrent un domaine de minimum de solubilité à des pH compris entre 4 et 5,5 (Kimura et al., 2008). La solubilité augmente fortement de pH 6 à 7 et atteint de 70 à plus de 90% à des pH alcalins (8-9) (Subirade et al., 1992 ; Lakemond et al., 2003).

I.6.2 Force ionique

Le mécanisme de l'effet de la force ionique sur la solubilité des protéines est mal compris, et implique probablement des phénomènes de solvatation, d'électrostatique, de salage et d'élimination de sel (Kinsella, 1979). Les ions chlorures augmentent la solubilité par répulsion électrostatique après s'être liés aux groupes de protéines chargés positivement. De faibles concentrations de sels neutres à des molarités de l'ordre de 0,5-

1,0 M peuvent augmenter la solubilité des protéines. Dans les solutions salines, la solubilité des protéines augmente initialement (salting in) et après une maximisation de la solubilité, elle commence à diminuer (salting out). Une augmentation de la concentration en sel supérieure à 1,0 M entraîne une diminution de la solubilité des protéines. Les molécules d'eau sont fortement liées au sel et il y a une compétition entre les ions du sel et les molécules de protéines pour les molécules d'eau.

I.6.3 L'effet du chauffage

La structure moléculaire de la plupart des protéines en milieu aqueux est sensible aux changements de température. La solubilité des protéines est influencée par la température et augmente avec la température entre 0 et 40-50 °C. A des températures supérieures à 40-50°C, la solubilité des protéines est inférieure à celle des protéines natives. La dénaturation des protéines entraîne une réduction marquée et irréversible de la solubilité des protéines. Par exemple, l'indice de solubilité de l'azote (ISN) pour les farines de soja, les concentrés et isolats de soja varie de 10 à 90 % selon les conditions de traitement thermique. Les profils de solubilité des protéines sont des indicateurs efficaces du degré de dénaturation des protéines au cours du traitement et sont utilisés pour contrôler les processus d'émulsification, de moussage, d'extraction et de gélification.

I.7 Mécanisme d'agrégation des protéines globulaires à pH neutre

L'agrégation est l'étape qui succède à la dénaturation des protéines globulaires entraînant l'exposition des groupements hydrophobes et des fonctions thiols. Cette étape est dépendante de conditions externes dont le couple chauffage/temps d'incubation, du pH, de la force ionique et de la concentration protéique. A un pH supérieur au pI des protéines et à faible concentration en sel, la dénaturation et l'association de ces protéines génèrent des agrégats solubles (Baussay et al., 2004; Clark et al., 2001; Li et al., 2007a).

Les différentes caractéristiques structurales de ces agrégats (poids moléculaire et taille des particules) sont liées à la nature des interactions intermoléculaires impliquées entre les protéines lors du chauffage (Bryant and McClements, 1998).

La thermodénaturation des globulines végétales (sarrasin, soja, haricot) dans différentes conditions de force ionique, de température de dénaturation, génère des macro agrégats de hauts poids moléculaires (jusqu'au 8×10^6 kDa) avec un diamètre apparent très important (200nm) (Choi and Ma, 2006; Guo et al., 2015; Mori et al., 1982). Dans

certains cas, la formation des macro agrégats est accompagnée d'une précipitation de la matière protéique sous forme de macro agrégats insolubles à force ionique élevée.

I.7.1 Gélification des protéines globulaires

I.7.1.1 Comparaison des différentes propriétés des gels en fonction de l'origine de protéines

La gélification des protéines globulaires est l'étape qui suit la thermodénaturation et l'agrégation de ces protéines. Si la concentration en protéines est suffisante (concentration protéique supérieure à la concentration minimale de gélification thermique $C_{g\ th}$, les agrégats solubles vont s'agglomérer et former un réseau de gel. Ce dernier continue à se développer même au cours du refroidissement. Le processus de gélification est dépendant de plusieurs paramètres comme la concentration protéique, la force ionique et le pH. En fonction des conditions opératoires, on peut obtenir deux types de gels thermiques :

- Des gels fibrillaires (filamenteux) qui sont formés à un pH éloigné du point isoélectrique (pI) des protéines et à haut niveau de répulsions électrostatiques (force ionique faible). Ces gels sont caractérisés par un réseau homogène et une structure fine qui présente un aspect transparent ou translucide. Ce type de structure est dû à l'arrangement linéaire des sous-unités protéiques lors de l'agrégation thermique (Bryant and McClements, 1998; Totosaus et al., 2002). En ce qui concerne les globulines végétales, il a été montré qu'à pH 7,6 et en absence de sel, les agrégats protéiques de soja s'agglomèrent en fibrilles d'une façon similaire à la β lg afin de donner un gel thermique (Renkema, 2004).

- Dans le cas des gels particuliers qui sont formés à une force ionique élevée (faibles répulsions électrostatiques), l'agrégation est accélérée conduisant à la formation d'amas protéiques sphériques et denses. Ces gels présentent un aspect opaque et une structure hétérogène caractérisée par une faible capacité de rétention d'eau et un module d'élasticité faible par rapport aux gels fibrillaires (Nicolai and Durand, 2013).

Afin de suivre la cinétique de gélification et d'évaluer les propriétés structurales des gels formés, plusieurs méthodes ont été utilisées dans la littérature : la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ou à Transmission (MET), la Microscopie Confocale à Balayage laser (MCBL) et la rhéologie aux faibles/grandes déformations.

L'augmentation de la température de chauffage accélère la cinétique de gélification pour différentes concentrations étudiées (25, 50, 76 g/L) et l'augmentation de la force ionique diminue sensiblement la $C_{g\ th}$; la force de gel est dépendante de la concentration protéique selon différentes forces ioniques (0 et 100 mM NaCl) (Pouzot et al., 2004).

I.7.2 Etude du modèle alimentaire tofu

Le tofu est un aliment traditionnel bien connu dans de nombreux pays d'Asie de l'Est (Rossi et al., 2016). Le tofu a été distribué dans le monde entier en raison de sa haute teneur en nutriments et de plusieurs avantages potentiels pour la santé humaine (Li et al., 2012; Yang et al., 2012).

I.7.2.1 Préparation du tofu

La production de tofu à partir de graines de soja sèches est un processus complexe, résumé dans la figure 2, qui implique de multiples opérations unitaires pour produire du lait de soja, qui est ensuite soumis à une coagulation chimique pour former la structure du caillé, à une séparation pour éliminer le lactosérum, avant d'être moulé dans la forme souhaitée et pressé pour extraire davantage le lactosérum (Cai and Chang, 1998). Le tofu type a une composition approximative de 85% d'eau et de 7,5% de protéines (Smith et al., 1960; Tsai et al., 1981).

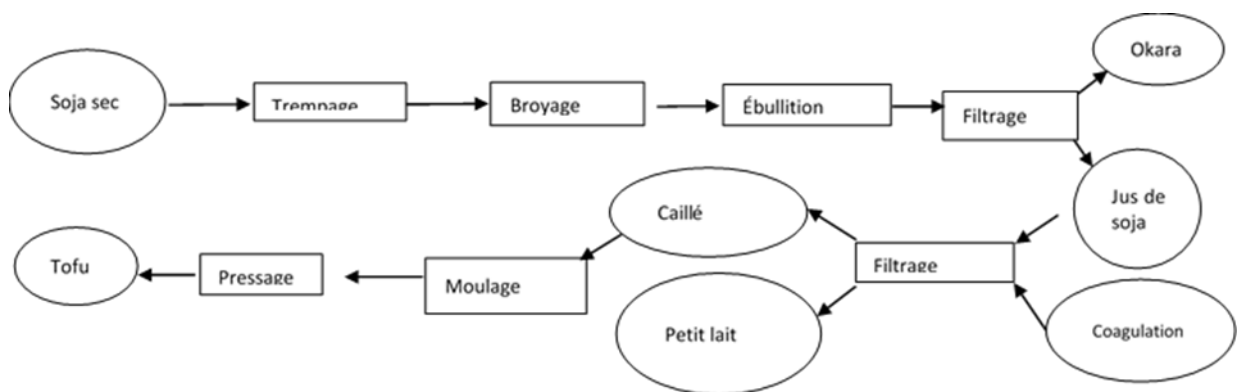


Figure 2: Organigramme de la production de tofu (Joo and Cavender, 2020)

1.7.2.2 Coagulants utilisés :

La coagulation du lait de soja est l'étape la plus importante du processus de fabrication du tofu. Le sulfate de calcium, le chlorure de calcium, le sulfate de magnésium et le chlorure de magnésium sont plusieurs des différents types de coagulants utilisés à l'échelle industrielle pour la préparation du tofu. La coagulation se produit en raison de la réticulation des molécules de protéines du soja avec les cations divalents (Prabhakaran et al., 2006). La coagulation du lait de soja repose sur une relation complexe entre la teneur en matières sèches, la température de cuisson du lait de soja, le volume, le pH et le type de coagulant (Cai and Chang, 1998). L'acidification par le jus de citron ou le vinaigre peuvent être utilisés comme alternatives au sulfate de calcium car ils réduisent le pH du système et permettent aux protéines de s'agréger. Les différents coagulants produisent du tofu avec des propriétés de texture et de saveur plus ou moins spécifiques (Beddows and Wong, 1987; Mullin et al., 2001).

1.7.2.3 Mécanisme de coagulation :

Les coagulants à base de sels minéraux ($MgCl_2$, $MgSO_4$, et $CaCl_2$) reposent sur la combinaison de ces cations avec des groupes phosphate déprotonés de l'acide phytique du lait de soja. Ceci, à son tour, provoque une baisse du pH en raison de la libération des anions chlorure ou sulfate les plus forts qui étaient liés aux cations divalents (Kanauchi et al., 2015). Les coagulants acides, tels que la GDL (glucono delta-lactone), reposent sur la création de conditions acides dues à la formation de l'acide gluconique pendant l'hydrolyse du GDL. Bien que les mécanismes impliqués soient différents, dans les deux cas, le pH de la matrice du lait de soja est abaissé au point isoélectrique (pH 4,5 en moyenne) de la protéine de soja (Kanauchi et al., 2015; Malhotra and Coupland, 2004), en éliminant la charge nette des protéines, ce qui permet d'obtenir des interactions hydrophobes et des réactions d'échange -SH/S-S (Liu et al., 2004) pour faciliter la formation d'un réseau de gel par agrégation de protéines (Kohyama et al., 1995, 1992).

1.7.2.4 Facteurs influençant la coagulation du lait végétal :

La coagulation du lait de soja est le processus clé qui détermine la qualité et le rendement du tofu lors de sa transformation. La coagulation du lait végétal dépend de : la température, de pH, de la force ionique. Les effets de ces différents paramètres ont été présentés précédemment dans le paragraphe I.5.

I.8 Les facteurs antinutritionnels associés aux protéines végétales

I.8.1 Les différents types de facteurs antinutritionnels

Les facteurs antinutritionnels sont des substances, naturelles ou synthétiques, présentes dans l'alimentation humaine ou animale, qui ont un effet négatif sur la valeur nutritionnelle globale en interférant avec des processus tels que la digestion, l'absorption et l'utilisation des nutriments (par exemple, les vitamines et les minéraux) ou qui affectent le taux métabolique de l'organisme ou exercent des effets toxiques directs (Soetan et al., 2014).

Ces composés appartiennent à des classes chimiques très différentes et se manifestent par des effets extrêmement variés. Certains ont un caractère ubiquitaire : les inhibiteurs d'enzymes, les lectines, les polyphénols et les phytates. D'autres sont beaucoup plus spécifiques et ne se rencontrent que dans quelques espèces ou familles végétales : les composés cyanogènes du manioc par exemple.

I.8.1.1 Les phytates

L'acide phytique est présent dans les céréales, les légumes, les noix et les huiles naturelles ; il représente environ 1 % à 5 % en poids et 60 % à 90 % du phosphore total présent dans les graines utilisées dans l'alimentation humaine et animale (Graf and Eaton, 1990; Lolas et al., 1976). L'acide phytique ou acide myo-inositol hexaphosphorique de formule brute $C_6H_{18}O_{24}P_6$, est composé d'un radical inositol estérifié par 6 radicaux phosphates. La localisation des phytates varie avec le type de plante ; dans les graines de légumineuses, l'acide phytique est dispersé dans les cotylédons.

Les phytates se présentent comme les principaux agents chélateurs des graines de légumineuses. Au cours de la digestion, ils forment des complexes avec de très nombreux minéraux (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} ...). Ces complexes sont peu ou pas dissociables *in vivo*. Tous les minéraux n'ont pas la même affinité pour les phytates. La stabilité de ces derniers et leur affinité pour les cations varient ainsi dans l'ordre : $Fe < Ca < Mn < Co < Cu < Zn$ (Erdman, 1979). Pour ces propriétés de chélation, l'acide phytique est considéré comme un agent de désassimilation minérale réduisant la part des éléments minéraux disponibles biologiquement (Chang et al., 1977 ; Davies and

Nightingale, 1975 ; Welch and Van Campen, 1975 ; Guenter et Sell, 1974 ; Oberleas, 1973 ; De Boland et al., 1975).

Les phytates peuvent aussi former avec les protéines des complexes : soit directement en établissant des liaisons de type ionique, soit indirectement par l'intermédiaire d'un cation tel que le calcium, avec les groupements chargés négativement (Wise, 1995). Les complexes formés phytates-protéines, phytates-minérales-protéines entravent la digestion et la biodisponibilité des protéines (Harland and Morris, 1995).

Les phytates peuvent également interagir avec l'amidon, soit directement par la formation de liaison hydrogène avec un groupement phosphate, soit indirectement par l'intermédiaire de protéines ce qui entraîne une diminution de la solubilité et de la digestibilité de l'amidon.

Les phytates inhibent également plusieurs enzymes protéolytiques et amylases, réduisant la biodisponibilité des protéines et amidons mais aussi d'autres microconstituants comme les vitamines (Deshpande and Cheryan, 1984; Singh and Krikorian, 1982).

1.8.1.2 Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols regroupent un ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (Salunkhe, 1990). Au plan nutritionnel, les polyphénols, généralement antioxydants, interviennent dans la prévention des cancers, des maladies cardio-vasculaires et d'autres maladies dégénératives liées au stress oxydant (Chen and al, 2004; Navindra, 2008; Stanley, 2003). Cependant, certaines classes de polyphénols comme les tannins, entraînent un effet néfaste sur la digestibilité des nutriments et notamment des protéines.

1.8.1.3 Les tanins

Les tanins se trouvent couramment dans un grand nombre des espèces végétales supérieures, tant herbacées que ligneuses. Ils peuvent s'accumuler en grande quantité (souvent plus de 10 % du poids sec) dans des organes ou tissus particuliers : écorce, bois,

feuilles, fruits ou racines. Les tanins sont répartis en deux groupes selon leurs structures : les proanthocyanidines (tanins condensés) et les tanins hydrolysables (Haslam, 1989).

Les tanins hydrolysables sont des esters d'acides phénoliques et d'un ose, généralement du glucose. Les acides phénoliques sont soit l'acide gallique dans les gallotannins, soit les acides dérivés de l'oxydation de l'acide gallique dans les ellagitannins. Les tanins condensés, appelés aussi tanins catéchiques ou proanthocyanidines sont des polymères de flavanols (500 à 3000 unités). Les proanthocyanidines sont présentes dans de nombreux produits alimentaires tels que le thé, le cacao, le sorgho ou les gousses de caroube.

Les tanins diffèrent de la plupart des autres composés phénoliques naturels dans leur capacité à précipiter les protéines (Spencer et al., 1988) . Ils se lient par l'intermédiaire de liaisons covalentes aux résidus lysine des protéines après leur oxydation, ce qui provoque une diminution de leur qualité nutritionnelle : baisse de la digestibilité des protéines et blocage de la biodisponibilité de la lysine (Malewiak, 1992). Les résidus de méthionine réagissent également avec les tanins les rendant indisponibles pendant la digestion (Davis, 1981). Ils inhibent aussi les enzymes digestives et réduisent ainsi la digestibilité de la plupart des nutriments, en particulier des protéines et des glucides (Reddy et al., 1985).

1.8.1.4 Les lectines

Les lectines sont définies comme des glycoprotéines de structures hétérogènes possédant au moins un domaine non catalytique par lequel elles se lient de manière réversible à des monosaccharides ou oligosaccharides spécifiques (Van Damme et al., 1998). Elles ont des poids moléculaires élevés de 36000 à 132000 daltons et sont thermostables.

Les lectines sont présentes en forte concentration dans la plupart des graines de légumineuses sèches (lentilles, fèves, pois). Elles se forment au cours de la maturation et disparaissent lors de la germination (Besancon, 1994).

L'ingestion des lectines chez les animaux supérieurs réduit l'efficacité de l'absorption des produits de la digestion. Certaines lectines sont partiellement résistantes à la dégradation des enzymes protéolytique *in vivo* (Nakata and Kimura, 1985). L'action de la lectine sur l'intestin se manifeste par des lésions sévères de la membrane de la

bordure en brosse, une réduction de la taille de villosités, un développement anormal des microvillosités, suivi d'une réduction considérable des capacités de digestion et d'absorption de l'intestin. Les effets des lectines sur la croissance se manifestent surtout par une diminution de l'assimilation de l'azote et de la vitamine B12 (Bruneton, 1987).

1.8.1.5 L-DOPA

La L-Dopa, ou 3,4-dihydroxyphenylalanine, est un acide aminé non protéique, substance intermédiaire dans la synthèse de la dopamine. La L-Dopa a été isolée pour la première fois à partir des graines de *Vicia faba* (Brain, 1976) mais sa présence a été observée chez plusieurs espèces de légumineuses notamment dans le genre *Mucuna* (Dahouda et al., 2009).

Une consommation excessive de produits riche en L-Dopa peut entraîner des effets physiologiques comme une augmentation de la température corporelle, des états de confusion des vomissements et de la diarrhée (Afolabi et al., 1985; Infante et al., 1990).

De plus, il a été montré que les produits d'oxydation de la L-Dopa interagissent avec les résidus sulfhydriles des protéines pour former le complexe 5-S-cysteinyl-dopa conduisant à la polymérisation des protéines. Le complexe 5-S-cysteinyl-dopa peut constituer un des facteurs limitant la digestibilité des protéines (Dossa et al., 1998).

1.8.1.6 Inhibiteurs de la trypsine : mesure de la digestibilité in vitro

Les inhibiteurs trypsiques sont des protéines qui ralentissent l'hydrolyse des protéines alimentaires par les enzymes pancréatiques (trypsine et chymotrypsine) et donc diminuent leur assimilation dans l'organisme (Phillippy, 2003 ; Afssa, 2005). L'inhibiteur de la trypsine est omniprésent dans le règne végétal en quantités variables (Ryan, 1981).

Dans les plantes, les inhibiteurs trypsiques protègent le cytoplasme contre les corps contenant de la trypsine. Ils agissent comme un moyen de défense contre certains micro-organismes et insectes mais leur présence fait baisser la digestibilité des protéines. Leur teneur devrait être réduite ou supprimée par les méthodes de cuisson afin d'améliorer la valeur nutritive des légumineuses (Duhan et al., 1995).

1.9 Digestibilité *in vitro*

Différentes méthodes existent pour quantifier la valeur nutritionnelle des protéines. Certaines se basent sur des études *in vitro* : la valeur biologique, le score d'acides aminés (SAA), la digestibilité des protéines *in vitro*. D'autres nécessitent des études *in vivo* : le coefficient d'efficacité protéique ou l'utilisation nette des protéines (Boye et al., 2012).

Le Score chimique d'Acides Aminés Corrigé de la Digestibilité des Protéines ou PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score, en anglais) est actuellement la méthode reconnue par la FAO/ OMS pour déterminer la qualité nutritionnelle des protéines. Cette échelle est fonction de deux critères : les besoins en acides aminés de l'homme et la digestibilité des protéines *in vivo*. Le PDCAAS est un score obtenu en exprimant la teneur en premier acide aminé limitant indispensable dans la protéine testée en tant que fraction de la teneur en acide aminé correspondant dans un modèle de référence et en le multipliant par la digestibilité fécale réelle de l'azote mesurée dans un essai clinique (Schaafsma, 2012).

Une autre méthode Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS), prenant en compte la digestibilité iliaque, est en cours de développement et permet de corriger les lacunes de la méthode PDCAAS mais le manque de données humaines limite, pour le moment, son utilisation (Lee et al., 2016). Le PDCAAS reste donc la méthode préférée pour la prédiction de routine de la qualité des protéines des produits alimentaires.

La détermination du PDCAAS nécessitant des essais cliniques, l'utilisation de méthodes de digestibilité *in vitro* ont été développées et améliorées au cours des décennies. Ces méthodes permettent en outre de mettre en évidence la présence éventuelle de facteurs antinutritionnels, notamment les inhibiteurs des enzymes impliqués dans la digestion.

La digestibilité *in vitro* des protéines se fait généralement en systèmes tampons, à 37°C, en présence des protéases majeures : pepsine, trypsine et chymotrypsine. Elle peut se faire dans des tubes à essai, dans des sacs à dialyse ou dans un réacteur thermostaté à pH régulé.

Lorsqu'elle est effectuée dans des sacs à dialyse, elle permet de mesurer l'azote libéré au cours de l'hydrolyse par les protéases (Dierick et al., 1985).

Le réacteur thermostaté utilise un système multi – enzymes à pH constant tout au long de l'hydrolyse par ajout d'une solution de NaOH à 0,1 ou 1 N. La mesure de la digestibilité dans ces conditions donne le degré d'hydrolyse des liaisons peptidiques d'une protéine. Le volume de NaOH ajouté pour maintenir le pH constant est corrélé au nombre de liaisons peptidiques rompues (Alonso et al., 2000).

Pour les méthodes en tubes (ou erlen), une méthode inter laboratoire a été mise au point. La digestion *in vitro* est décomposée en deux phases : gastrique et intestinale, dans des systèmes tampons spécifiques. La limite majeure de cette méthode est que les produits d'hydrolyse restant dans le milieu réactionnel ceci peuvent modifier les cinétiques enzymatiques (Minekus et al., 2014).

I.10 Les procédés permettant d'éliminer les facteurs antinutritionnels (FAN)

D'une manière générale, les procédés biologiques et thermiques sont utilisables pour réduire ou éliminer les FAN dans les graines de légumineuses et accroître la biodisponibilité des nutriments. Le trempage, le décorticage et la germination des graines de légumineuses ont aussi montré leur efficacité pour accroître la digestibilité *in vitro* des protéines (Bishnoi and Khetarpaul, 1994).

I.10.1 Trempage

Le trempage s'effectue en général avec environ trois fois le volume des graines. Il dure en moyenne 8 à 12 heures à la température ambiante. Cette opération permet en premier lieu d'attendrir la matière première pour faciliter le broyage ultérieur, et en second lieu de solubiliser la plupart des sucres solubles responsables de flatulence et même d'éliminer les protéines produisant l'amertume propre chez les légumineuses (Fredlund et al., 1997). Une partie des minéraux diffuse dans le milieu environnant (Purchas et al., 2003) ainsi que des inhibiteurs de biodisponibilité comme les phytates (Gibson and Hotz, 2001). Il a été montré qu'après trempage de pois bambara (*Vigna subterranea*) la teneur en phytates pouvait être réduite de 20 à 53% (Rahelimandimby, 2011).

I.10.2 Procédés thermiques-extrusion

La cuisson est un traitement thermique couramment utilisé pour réduire la quantité des FAN présents dans les graines comme les oxalates, tanins, phytates, inhibiteurs de trypsine, les composés cyanogénétiques (Gonzalo et al., 2002). Ces réductions sont dues, soit à une diffusion des FAN dans l'eau de cuisson, soit à une hydrolyse enzymatique due à l'activation des enzymes au début de la cuisson (Lestienne, 2004).

Le principe de la cuisson-extrusion consiste à soumettre aux effets conjugués de la pression (jusqu'à 200 bars) et de la température (de 90 à 250° C) durant un temps court (inférieur à 30 secondes), une matière première. La cuisson-extrusion entraîne des modifications profondes des caractéristiques physico-chimiques des produits. Elle inactive quasi-totalement les facteurs antitrypsiques des graines brutes ou préalablement décortiquées. La cuisson-extrusion peut réduire les teneurs en composés phénoliques et les phytates. Des réductions de 54 et 84% des teneurs en tanins et de 29 et 46% des teneurs en polyphénols totaux, respectivement pour la fève et le haricot ont été notées après cuisson extrusion (Alonso et al., 2000).

I.10.3 Procédés biologiques

I.10.3.1 Germination

La germination déclenche les processus enzymatiques des graines notamment des activités protéasiques et amylasiques. Ces enzymes permettent l'hydrolyse de certains inhibiteurs présents dans les graines : inhibiteurs d'amylases, facteurs antitrypsiques, hémagglutinines. La germination permet aussi de réduire de manière significative les teneurs en phytates (Razafindrazaka, 2006).

Par ailleurs, il a été montré que la teneur en certaines vitamines (comme celles du groupe B) augmente, et que certains éléments minéraux (fer) deviennent plus assimilables. De plus, les sucres fermentescibles disparaissent ou sont partiellement dégradés. Les acides aminés comme la méthionine et la cystéine deviennent aussi plus biodisponibles (King and Puwastien, 1987).

I.10.3.2 Fermentation

L'utilisation de la fermentation en tant que partie intégrante des processus de désintoxication alimentaire est largement pratiquée. Une grande variété d'aliments

fermentés sont produits et consommés dans le monde entier. La fermentation a été traditionnellement appliquée aux légumineuses dans beaucoup de pays, surtout hors d'Europe, les légumineuses principalement utilisées étant le soja, le pois chiche et le haricot (Humblot and Guyot, 2008). Le développement d'aliments fermentés a été préconisé par les nutritionnistes en raison des avantages nutritionnels intrinsèques associés à ces produits. Elle présente de nombreux avantages dont, entre autres, la réduction des risques de développement de microorganismes pathogènes par acidification du milieu, et la dégradation de certains facteurs antinutritionnels (Blandino et al., 2003; Nout, 1994). Certaines bactéries responsables de la fermentation sont capables d'hydrolyser les phytates et ainsi de diminuer leurs effets inhibiteurs sur l'absorption des minéraux.

Les graines peuvent être fermentées en tant que telles lors de fermentations fongiques et bactériennes/fongiques mixtes à l'état solide, par exemple de type tempeh, ou sous forme de suspension dans l'eau au cours de processus bactériens submergés. Le type le plus populaire de fermentation submergée des graines de légumineuses est la fermentation lactique, spontanée ou induite par l'inoculum de souches bactériennes (Frias et al., 1996; Krishna, 2005).

L'effet de la fermentation sur le contenu en Facteurs Antinutritionnels (FAN) a été étudié dans différentes légumineuses. Dans les haricots, une élimination partielle ou complète de α -galactosides, tanins, acide phytique et activité inhibitrice de la trypsine a été obtenue par fermentation naturelle (Granito et al., 2002). Dans le cas de pois, une réduction de l'acide phytique et de facteurs antitrypsiques a été obtenue par fermentation avec une souche *L. plantarum* (Starzyńska-Janiszewska and Stodolak, 2011).

Globalement il est montré une augmentation des teneurs en acides aminés libres, de la digestibilité des protéines et de la valeur biologique dans les légumineuses (Ejiofor and Oti, 1987 ; Barampama and Simard, 1993).

1.10.3.3 Lactobacillus plantarum dans les produits alimentaires

Les bactéries lactiques (LAB), dont le statut est généralement reconnu comme sûr GRAS (Generally Recognised As Safe), présentent un grand intérêt pour la fermentation alimentaire (Klupsaite et al., 2017). Elles sont connues pour leur contribution à l'amélioration des propriétés sensorielles et à l'amélioration de l'arôme des aliments (Coda et al., 2015). Parmi les LAB, *Lactobacillus plantarum*, espèce hautement hétérogène et

polyvalente (Di Cagno et al., 2011), très souvent rencontrée dans les fermentations de légumes et de fruits, de produits laitiers, de viande et de blé et comme habitant naturel du tractus gastro-intestinal chez l'homme et les animaux (Filya et al., 2004; Noonpakdee et al., 2004).

L. plantarum est un groupe de lactobacilles Gram-positifs, micro-aérophiles, tolérants à l'acide, non sporifères, non respirant, à faible teneur en G + C, présentant une gamme d'applications dans l'industrie alimentaire comme culture de départ et conservateurs (Valan Arasu et al., 2013). Cette bactérie non sporulée produit des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide succinique et l'acide lactique en tant que métabolites principaux.

L'adaptation de *L. plantarum* à différents milieux est expliquée par : sa capacité à fermenter une large gamme de glucides (Bringel et al., 2001), à métaboliser plusieurs composés polyphénoliques (Rodriguez et al., 2008), ou la possession d'un large portefeuille d'enzymes : β -glucosidase, décarboxylase de l'acide p-coumarique, décarboxylase générale (Rodriguez et al., 2008). *L. plantarum*, comme d'autres LAB, est capable de synthétiser, dans certaines conditions, plusieurs composés antimicrobiens, antifongiques, augmentant ainsi son succès d'implantation dans un milieu (Helander et al., 1997; Rejiniemon et al., 2015).

Les LAB ont donc été largement utilisées pour la fermentation des légumineuses au cours de la dernière décennie. Cependant, leur effet est fortement lié au type de légumineuse, à la souche de LAB et aux conditions de fermentation (Rui et al., 2017).

La fermentation lactique peut affecter la structure et la teneur en protéines des légumineuses. Cela peut être attribué à l'activité protéolytique bactérienne pendant la fermentation (Meinlschmidt et al., 2016 ; Lampart-Szczapa et al., 2006). Les changements de conformation et de structure des protéines modifient alors la fonctionnalité et les propriétés nutritionnelles des produits finaux (Masiá et al., 2020 ; Sozer et al., 2019).

Conclusion

La partie la plus précieuse du Néré est la graine qui est riche en protéines, en glucides et est une bonne source de lipides et de calcium pour les habitants des zones rurales. La forme de consommation la plus populaire des graines du Néré est dans sa fermentation traditionnelle condiment alimentaire savoureux appelé soubala, nététou,

dawadawa, afintin, kinda, Iru connu sous différents noms dans différents pays de l'Afrique de l'Ouest qui est utilisé comme renforçateur de goût pour les soupes et les ragoûts et ajoute également des protéines à un régime pauvre en protéines. L'utilisation de graines locales fermentées de *Parkia biglobosa* comme condiments est plus saine que les condiments riches en glutamate monosodique (MSG) qui sont actuellement importés. Sur le plan nutritionnel, le *Parkia biglobosa* est une plante légumineuse avec une qualité remarquable des protéines et sa composition en acides aminés a été rapporté par plusieurs chercheurs.

Le *Parkia biglobosa* est présent dans une diversité de zones, allant des forêts tropicales avec des précipitations élevées et bien réparties aux zones arides où les précipitations annuelles moyennes peuvent être inférieures à 400 mm.

L'utilisation de graines du *Parkia biglobosa* comme source de protéines est limitée par la présence de facteurs antinutritionnels qui sont une gamme diversifiée de composés naturels dans de nombreuses plantes tropicales. Les facteurs antinutritionnels provoquent une mauvaise digestibilité des protéines chez l'Homme et les animaux et sont capables de précipiter d'autres effets délétères. Les manifestations de toxicité résultant de la consommation de légumineuses contenant des facteurs antinutritionnels vont d'une réduction sévère de l'apport alimentaire et de la disponibilité ou de l'utilisation des nutriments, à des effets neurologiques profonds et même à la mort.

Pour améliorer la qualité nutritionnelle et l'acceptabilité organoleptique des graines de légumineuses, des techniques de transformation ont été employées pour réduire ou détruire les antinutriments présents dans celles-ci. Certaines des techniques de traitement couramment utilisées comprennent le trempage dans l'eau, ébullition à haute température dans l'eau, germination, autoclavage, torréfaction, décorticage, traitement aux micro-ondes, blanchiment à la vapeur et fermentation.

À l'avenir, les protéines végétales peuvent jouer un rôle plus important dans la satisfaction de la demande en protéines alimentaires tout en contribuant à une sécurité alimentaire renforcée et à un environnement durable. D'avantage de travail doit être fait pour améliorer ce qui a été accompli jusqu'à présent et pour relever le défi d'utiliser pleinement les protéines provenant de diverses sources végétales qui auront le potentiel et la promesse de nourrir la population mondiale croissante à l'avenir.

Objectifs et plan de déroulement du travail

On s'est proposé dans cette thèse de rechercher et d'améliorer les propriétés technofonctionnelles et organoleptiques d'une source de protéines produite localement en Guinée : le *Parkia biglobosa* ou Néré.

Le plan de travail que nous avons suivi est résumé sur la figure 3.

L'originalité de notre travail réside dans le fait comme constaté dans l'étude bibliographique (Chapitre I), que contrairement à d'autres légumineuses, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation de la composition biochimique et physico-chimique d'isolats protéiques issus de la graine de Néré et à leurs aptitudes technologiques. Le travail a consisté à optimiser les paramètres d'extraction et de purification des fractions albumines et globulines en combinant précipitation isoélectrique et ultrafiltration, puis à réaliser des gels thermiques afin d'évaluer leur aptitude de gélification. L'étude de la solubilité des protéines en fonction du pH a été étudiée. Le profil des protéines par SDS-PAGE a été comparé à celui d'autres légumineuses à graines : albumines, globulines et leurs sous-unités.

Dans un deuxième temps, un protocole de traitement thermique, une fermentation par des souches de *Lactobacillus plantarum* ont été mis en place sur le jus de Néré obtenu à partir de la farine de graines. Le suivi de croissance des bactéries, la mesure du pH et l'acidité titrable ont été étudiés dans le but de choisir les souches qui avaient des paramètres de croissance optimale dans la matrice protéique Néré. Puis sachant que des facteurs antinutritionnels et des problèmes de digestibilité sont associés aux légumineuses, nous avons opté pour une étude de la digestibilité *in vitro*, des dosages des facteurs antinutritionnels et la détermination de la protéolyse des jus de Néré fermentés.

La dernière partie a alors été consacrée à l'étude de l'aptitude à la gélification thermique des isolats protéiques d'albumines et globulines du Néré en fonction du pH. Il est apparu que le développement d'un modèle alimentaire à partir d'isolats de protéines sera peu adapté à l'Afrique de l'ouest, car il semble préférable de limiter les pertes de protéines dans un long processus de séparation/purification des fractions protéiques. Ainsi un modèle permettant de maximiser l'utilisation des protéines disponibles dans la graine de Néré a été mis en place. Sur la base de la technique du tofu de soja, des jus de Néré et de soja ont subi un traitement thermique en présence de sels bivalents ($MgCl_2$ et $CaCl_2$) à

différentes concentrations. Les propriétés rhéologiques des échantillons de tofu ont alors été analysées.

Pour finaliser notre étude nous voulions initialement étudier avec un panel de consommateurs en Guinée, l'acceptabilité de notre tofu de Néré fermenté. Malheureusement étant donné le contexte de pandémie mondiale de la Covid 19 et les difficultés techniques de mise en place de la fermentation lactique dans des conditions sanitaires satisfaisante pour les juges à l'ISSMV de Dalaba , cette étude n'a pu être mise en place.

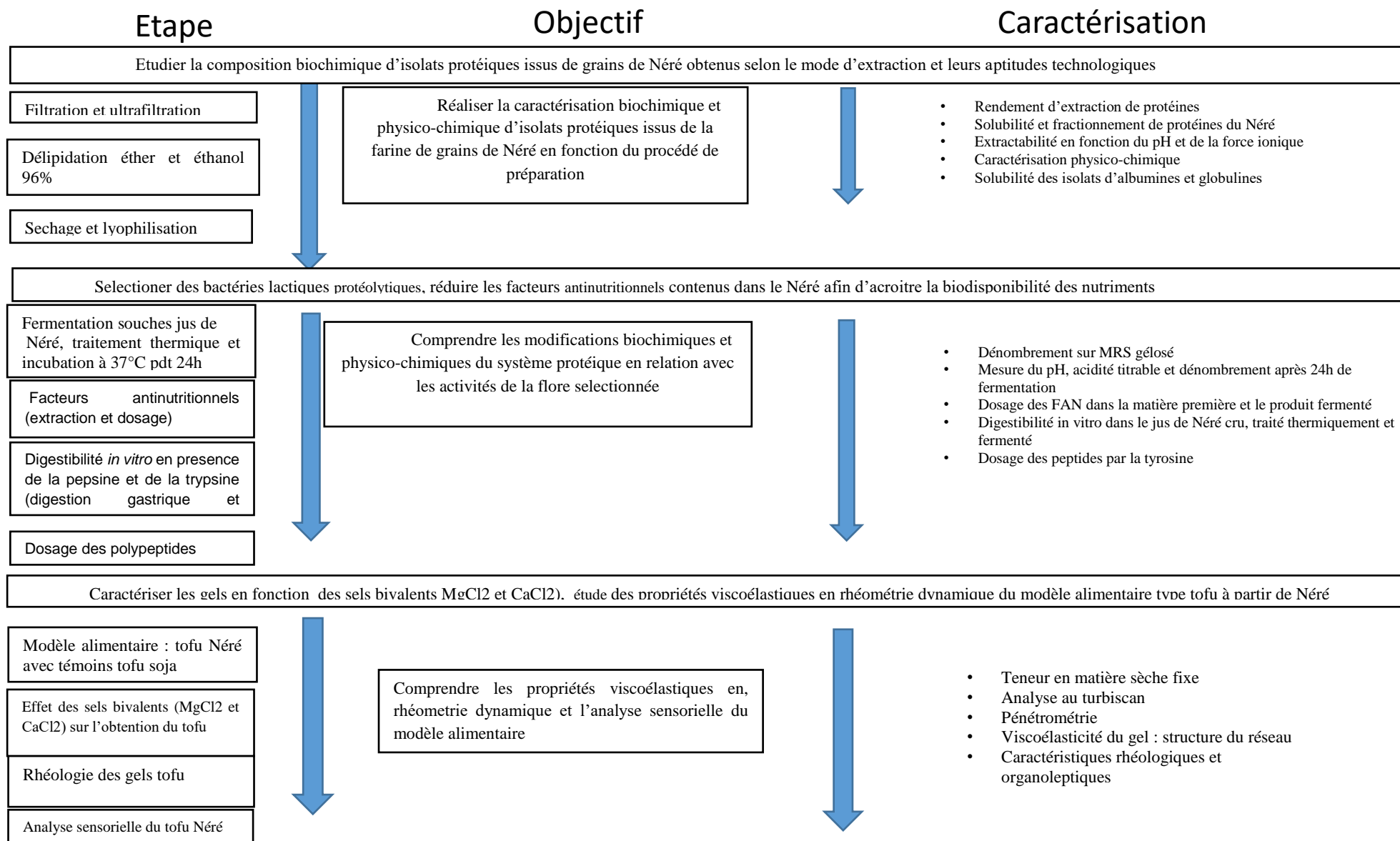


Figure 3 : déroulement schématique de la démarche scientifique de la

MATERIELS ET METHODES

I.11 Matériel végétal

I.11.1 Obtention de la farine de Néré avec et sans tégument

Quinze kilogrammes de graines de Néré (*Parkia biglobosa*) ont été obtenus sur un marché local de Dalaba (République de Guinée). Les graines ont été conditionnées dans un récipient en plastique et ont été stockées en chambre froide à 4°C UMR/PAM (Unité Mixte de Recherche /Procédés Alimentaires et Microbiologiques) Agrosup Dijon. Pour séparer les graines de Néré de leurs résidus de pulpe farineuse, elles ont été trempées 30 min dans de l'eau à 40°C. Puis les graines ont été lavées, égouttées à l'aide d'un tamis de 5mm de mailles et dépelliculées à la main. Les graines obtenues ont été étalées sur un papier filtre et mises à l'étuve à 35°C pour un séchage pendant 12 heures.



Figure 4 : aspect de présentation des graines de Néré a) graines brutes, b) graines avec tégument, c) graines sans tégument

Dans le but d'enlever le tégument, un bord de la graine de Néré a été frotté sur du papier de verre fin pour poncer le tégument juste pour atteindre l'amande. Les graines poncées ont été trempées dans de l'eau froide pendant 12 heures. L'eau ayant une brèche sur le tégument facilitant l'hydratation atteint l'amande, elle a fait gonfler les graines. Cette pratique a permis de retirer le tégument facilement de l'amande. Les graines humidifiées ont été séchées à l'étuve préalablement réglée à 35°C pendant une nuit.

Les graines séchées avec et sans tégument sont broyées avec un broyeur IKA WERKE Model 20 pour obtenir des farines. Les farines sont alors tamisées sur un tamis métallique de 0,71 mm de mailles (figure 5).



Figure 5: Farine de Néré avec tégument (a) ; Farine de Néré sans tégument (b)

I.11.2 Délipidation de la farine de Néré

La farine de Néré a été délipidée 3x2h avec un ratio de 100g pour 1 litre d'éther de pétrole et puis 2x2h par de l'éthanol (96%) avec le ratio 100g pour 1 litre de solvant. Entre chaque lavage, les solvants sont éliminés par une filtration sur verre filtré n°4. La poudre délipidée est ensuite étalée sur papier filtre et mise à sécher à température ambiante sous Sorbonne.

I.11.3 Préparation de la farine de soja

Un kg (1000g) du soja jaune (Markal bio, Saint-Marcel- Les-Valence, France) a été triés pour éliminer les débris et les graines endommagées. Les graines de soja ont été lavées, blanchies pendant 10 minutes dans de l'eau bouillante, puis trempées dans 3000 ml d'eau du robinet (rapport soja/eau pendant une nuit à température ambiante. Les sojas hydratés ont été égouttés, rincés et décortiqués manuellement. Les graines humidifiées ont été séchées à l'étuve préalablement réglée à 35°C pendant une nuit. Les graines séchées sans tégument sont broyées avec un broyeur IKA WERKE Model 20 pour obtenir des farines. Les farines sont alors tamisées sur un tamis métallique de 0,71 mm de mailles.

I.12 Analyses physico-chimiques des matières premières

Des analyses physico-chimiques de la farine de la graine de Néré non délipidée et de la farine de la graine de Néré délipidée ont été effectuées. Les paramètres suivants ont été déterminés : taux de matière sèche, matière minérale, matière grasse, teneur en protéines.

I.12.1 Mesure de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche a été déterminé selon la méthode 923.03 (AOAC, 925.10, 2005). Un échantillon de 1 g est pesé dans une capsule en aluminium préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante, puis il est refroidi dans un dessiccateur pendant 2 heures. La masse sèche est moyennée sur trois mesures. Le pourcentage en matière sèche (MS) est déterminé par l'équation (II.1):

Équation 0-1

$$\% MS = \frac{M_{sec}}{M_i} \times 100 \dots\dots\dots (II.1)$$

M_i : masse de l'échantillon initial (g) ;

M_{sec} : masse de l'échantillon sec (g) après passage dans l'étuve à 105 °C.

I.12.2 Mesure de la teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale est déterminée par la méthode 923.03 (AOAC, 2012).

Il est basé sur la calcination d'une prise d'essai dans un four à moufle à une température de 600±25 °C jusqu'à l'obtention des cendres blanches puis suivi de la pesée du résidu.

Les échantillons déshydratés sont placés dans un four à 600 °C pendant au moins une nuit. La quantité de sels des échantillons est moyennée sur trois mesures. Le pourcentage de matière minérale est calculé par l'Équation (0-2)

$$\% MM = \frac{M_{cendres}}{M_{sec}} \times 100 \dots\dots\dots (II.2)$$

M_{sec} : masse de l'échantillon en (g) après passage à l'étuve à 105 °C ;

M_{cendres} : masse des cendres en (g) issue de l'échantillon après calcination à 600 °C.

I.12.3 Teneur en lipides extractibles par l'éther de pétrole

La matière grasse présente dans les différents échantillons a été extraite selon la méthode 922.06 (AOAC, 922.06) : éther de pétrole et appareil de Soxhlet. Une quantité de 10 g d'échantillon est introduite dans des cartouches en cellulose et 150 ml d'éther de pétrole sont introduits dans le ballon contenant des pierres ponce pour assurer une agitation permanente durant le chauffage. L'éther de pétrole est chauffé à reflux pendant 5-6 heures. Durant le chauffage, les vapeurs de solvant traversent un système de réfrigération, ce qui provoque la condensation des vapeurs dans les siphons, conduisant ainsi au retour du solvant dans le ballon, accompagné des lipides extraits. Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les lipides restent piégés dans le ballon. Les échantillons sont ensuite étuvés à 50°C pendant 24 heures. La teneur en matière grasse des différents échantillons est ensuite calculée selon l'Équation 0-3

$$\% MG = \frac{m1-m0}{m*(\%MS)/100} \times 100 \dots\dots\dots(\text{II.3})$$

MG: la teneur en lipides par rapport à la matière sèche de l'échantillon (%);

m0 : la masse du ballon vide contenant les quelques pierres ponce (g);

m1 : la masse du ballon contenant les quelques pierres ponce et l'extrait lipidique sec (g);

m : la masse de l'échantillon introduit dans la cartouche (g);

% MS : matière sèche de l'échantillon de départ (%).

I.12.4 Mesure de la teneur en protéine par dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été réalisé selon la méthode (AOAC, 620.87, 1990), par Kjeldahl dans une unité de minéralisation et de distillation Büchi. La teneur en protéine a été ensuite calculée à partir de la quantité d'azote présente dans l'échantillon, en utilisant le coefficient K de conversion azote-protéine égal à 6,25 pour les protéines végétales et 6,38 pour les protéines de lait (AOAC, 1990). Une minéralisation de l'échantillon à analyser (0,5 g pour les poudres, 2 g pour les solutions) est nécessaire à haute température (400 °C) pendant 1 heure en présence de 20 ml d'acide sulfurique concentré et d'un catalyseur à base de Cu²⁺ (Kjeltab). L'azote de l'échantillon est transformé complètement sous ces conditions en ions ammonium. Après refroidissement, un volume de 50 ml de soude à 40% a été ajouté à l'échantillon minéralisé pour permettre

la formation de l'ammoniac. L'ammoniac produit est entraîné à la vapeur d'eau puis piégé dans une solution d'acide borique (2%).

L'ammoniaque est dosée directement par une solution d'acide chlorhydrique de normalité connue. Généralement une solution de titration de 10 mM de HCl a été employée. Le dosage est effectué par mesure du pH ; ainsi le volume équivalent de HCl a été relevé lorsque le pH atteint la valeur de l'acide borique seul. A partir du volume HCl utilisé, la quantité d'azote total de l'échantillon est calculée par l'Équation 0-4 :

$$\% \text{ protéine} = \frac{(v \cdot N \cdot 14 \cdot 100)}{m \cdot (\%MS) / 100} \times K \dots\dots\dots (II.4)$$

V : volume d'HCl utilisé pour la titration de l'échantillon (ml) ;

N : normalité de l'acide chlorhydrique ;

m : la masse de l'échantillon ;

% MS : pourcentage en matière sèche de l'échantillon ;

K : facteur de conversion des protéines de blé et légumineuses (5,4)

I.13 Extraction des protéines du Néré

I.13.1 Extractabilité des protéines dans la farine de Néré non délipidée et délipidée en fonction du pH et de la force ionique

2.5 g de farine de la graine de Néré non délipidée et délipidée ont été mis en agitation dans 50 ml de tampon phosphate HCl/NaOH de différents pH pendant 3 heures. Des concentrations de 0,1 M et 0,6 M de NaCl ont été ajoutées aux différents pH souhaités. La gamme de pH étudiée a été élargie de 2 à 10. Après le temps d'extraction les suspensions sont centrifugées à 10 000 g pendant 30 mn à 10 °C. La teneur en protéines des surnageants a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. L'extractabilité est exprimée en gramme de protéines extractibles pour 100 grammes de protéines totales.

Selon l'Équation 0-5

$$\% \text{ d'extractabilité} = \frac{\% \text{ d'azote dissous dans le surnageant}}{\% \text{ d'azote total}} \times 100 \dots\dots\dots (II.5)$$

I.13.2 Fractionnement

50 grammes de farine de la graine de Néré délipidée ont été mis en suspension dans un litre de tampon phosphate de di-sodium hydrogénophosphate et di-hydrogénophosphate de potassium à pH10 permettant de solubiliser toutes les protéines.

La farine délipidée a été ajoutée petit à petit et laissée sous agitation pendant 3 heures. La solution est centrifugée à 10 000g pendant 30 mn à 10°C. Le surnageant a été filtré sur verre fritté n°4, puis le pH a été ajusté à 4,5 par ajout lent de HCl à 3%. Cette acidification a permis de précipiter les globulines. Une centrifugation à 10 000g pendant 30 mn à 10°C a permis de séparer les albumines solubles dans le surnageant et les globulines dans le culot. La fraction albumines est récupérée et son pH a été remonté à 8 par ajout de 1 M de NaOH. Le culot contenant les globulines est collecté et resuspendu dans un tampon phosphate de sodium (0,1 M en présence de 5% de sulfate de potassium) à pH 8 sous agitation pendant une nuit à une température de 4°C. Les matières insolubles sont éliminées par centrifugation (10 000g pendant 30 min à 10°C). Les solutions contenant les protéines globulaires et les albumines ont été concentrées par ultrafiltration puis dessalées par diafiltration contre 10 volumes en utilisant une cassette de 1115 cm² type Kwick Lab (UFELA0010010ST, GE Healthcare, Amersham Biosciences Corp., Uppsala, Suède) avec une membrane de seuil de coupure de poids moléculaire de 10 kDa. Une quantité de 0,02% d'azide de sodium a été ajoutée aux solutions protéiques pour éviter tout développement microbien et le pH des solutions ajustées à 7,2. Après dialyse, les solutions ont été lyophilisées et les poudres ont été conservées à 4°C.

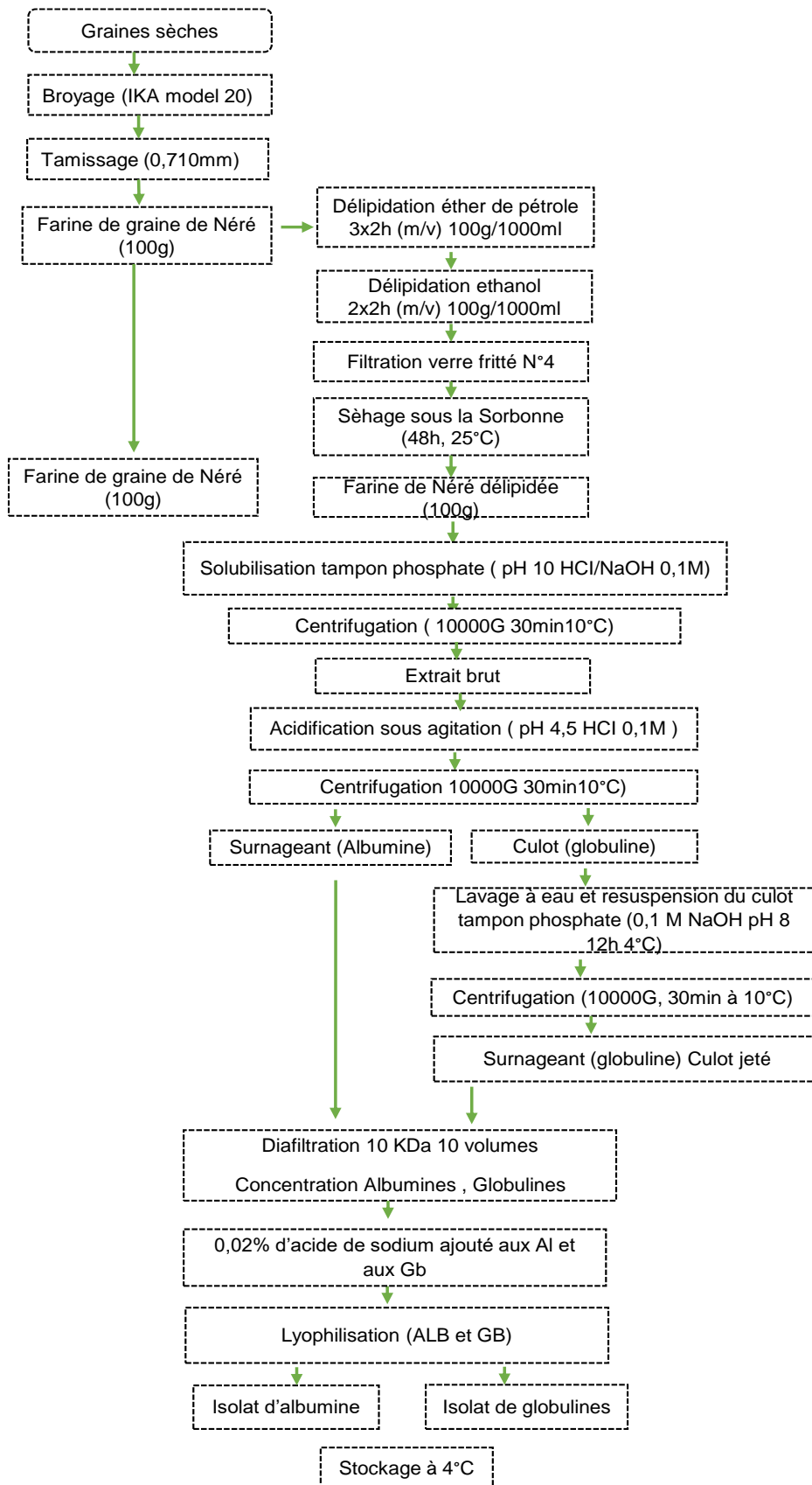


Figure 6: diagramme de fractionnement des protéines du Néré

I.14 Caractérisation des isolats protéiques issus de la graine de Néré

I.14.1 Solubilité des isolats de globuline et d'albumine du Néré en fonction du pH et de la force ionique

Un total de 0,05 g d'isolat de globuline et d'albumine a été mis en agitation dans 25 ml de tampon phosphate HCl/NaOH pendant 3 heures. Une concentration de 0,1 M de NaCl a été ajoutée aux différents pH souhaités. La gamme de pH étudiée a été élargie de 2 à 12. L'étude a été réalisée sur un isolat de globulines et un isolat d'albumines. Les protéines non solubles aux pH considérés sont éliminées par centrifugation à 10 000G pendant 30 mn à 10 °C. La teneur en protéines des surnageants a été déterminée par la méthode de Lowry. La solubilité des isolats de globulines et d'albumines est exprimée en g de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales. Selon l'Équation 0-6

$$NS = \frac{N(\%) \text{dissous dans le surnageant}}{N(\%) \text{initialement introduit}} \times 100 \dots \dots \dots \text{(II.6)}$$

I.14.2 Electrophorèse SDS-PAGE

I.14.2.1 Principe de la méthode

L'électrophorèse est une technique analytique qui permet de séparer les protéines sur gel, sous l'influence d'un champ électrique, conduisant à une migration des protéines en fonction de la différence de mobilité des polypeptides et de leurs poids moléculaires.

Le gel d'électrophorèse est préparé par réticulation des monomères d'acrylamide, qui forment un réseau tridimensionnel. Ce maillage dépend de la concentration en acrylamide.

Les protéines migrent avec une vitesse constante dans le gel de faible maillage, alors que dans un gel de fort maillage (gel de séparation), la vitesse de migration changera d'une espèce protéique à l'autre ; les petites particules atteindront le front de migration (faible poids moléculaire) rapidement, et les grosses particules seront piégées loin de ce front de migration (hauts poids moléculaire).

L'incorporation d'un tensioactif anionique comme le dodécyle sulfate de sodium (SDS) au cours de la préparation de gels permet d'augmenter la charge négative globale de la protéine. D'autre part, l'ajout du SDS dans le tampon échantillons permet de dissocier les sous-unités des protéines oligomériques et un déploiement complet des

chaînes de polypeptides. Pour bien visualiser la migration totale des fractions protéiques, il est indispensable d'ajouter à la présence de SDS, un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT), qui réduit toutes les liaisons covalentes de type S-S, formées initialement entre les protéines natives ou agrégées.

1.14.2.2 Mode opératoire

Les fractions natives d'albumine et de Glob ont été traitées et préparées à une concentration de 5-10 mg/ml dans un tampon d'échantillon : 65 mM phosphate -HCl à pH 8, 20% de glycérol, 0,002% de bleu de bromophénol (conditions natives (N) ; avec 2% SDS (condition non réductrice NR) ; avec 2% de DDT et 2% SDS (condition réductrice CR) ; tous les pourcentages sont exprimés en m/v. Les échantillons préparés dans CR sont chauffés à 90°C pendant 10 min pour réduire les liaisons covalentes disulfures.

Tous les échantillons ont été centrifugés (10000 x g pendant 10 min) et 20 µl de chaque échantillon ont été déposés dans les puits du gel. Une gamme de protéines standard (Sigma, S8445, large gamme, poids moléculaire 6,500-200,000 Da) a été utilisée en tant que marqueurs moléculaires. La séparation des protéines a été effectuée à 40 V pendant 2 h, puis 120 V jusqu'à la fin de migration des protéines. Une intensité constante de 20 mA a été appliquée sur le gel. Le tampon de migration contenait 25 mM de phosphate HCl, 0,192 M de glycine, 0,1% de SDS (p/v). Les gels ont été colorés avec 0,2% (m/v) de bleu de Comassie R-250 en solution dans l'éthanol : eau (4 : 1 v/v), et l'excès de colorant a été éliminé avec un mélange de méthanol, acide acétique et d'eau distillée respectivement à des volumes 4: 1: 5.

I.14.3 Mesures calorimétriques par DSC :

La DSC : Differential Scanning Calorimetry est une technique d'analyse thermique qui permet d'étudier le comportement des matériaux en fonction de la température ou du temps. Les points de fusion, le comportement de cristallisation et les réactions chimiques sont quelques-uns des processus ou propriétés mesurables par DSC.

Les analyses d'enthalpie différentielle (DSC), ont été réalisées sur le microcalorimètre, micro DSC III de SETRAM (Caluire, France). Des suspensions à 8% des fractions d'albumine et de globuline de Néré ont été faites dans de l'eau distillée. La référence utilisée a été l'eau distillée. Une montée en température de 25°C à 120°C à

0,5°C/min a été appliquée. Pour chaque échantillon, deux cycles de montée en température ont été effectués pour vérifier que la dénaturation était complète et irréversible. Les températures de début de pic notées (T_{on}), de sommet de pic (T_d), et de fin de pic de dénaturation (T_{of}) en °C ainsi que l'enthalpie de dénaturation (ΔH) (J/g de protéine) ont été déterminées.

I.14.4 Charge de surface par mesure de potentiel zêta :

Le potentiel zêta a été mesuré par zetacompactTM Z8000 (CAD instruments, les Essarts le roi, France), sur le principe de la mobilité électrophorétique des particules. Les solutions protéiques ont été diluées dans de l'eau distillée à pH 8 jusqu'à observation d'un nombre de particules proche de 100. Les mesures ont été réalisées à un voltage de 80 Volts. Un seuil de 2,5% a été appliqué sur les mesures, supprimant les mesures parasites observées pour moins de 2,5% des particules totales. Les valeurs de potentiels zêta ont été calculées à partir de la mobilité des particules.

I.15 Gélification thermique des isolats de protéines de Néré

Dans l'objectif de développement de nouveaux aliments riches en protéines, nous avons étudié l'aptitude à la gélification à chaud d'isolats complets de protéines de Néré (globulines + albumines). Des isolats non fractionnés de protéines (globuline, albumine) délipidés et non délipidés ont été préparés séparément dans un tampon phosphate/HCl (10 mM, pH=7,2) et à des concentrations allant de 20 à 120 g/L. Un volume de 5 ml de dispersions protéiques a été mis dans des tubes en verre étanches et chauffé selon le protocole de dénaturation thermique : 40 °C à 85 °C avec une rampe de chauffage de 1°C/mn, puis maintenu à 85 °C pendant 60 mn. Les tubes ont été refroidis dans un bain de glace pendant 10 mn et laissés à 4 °C pendant 12 heures. Les tubes sont ensuite retournés et observés. La concentration de gélification thermique C_g thermique a été considérée comme étant la concentration minimale à laquelle le gel tient dans le tube sans effondrement.

I.16 Préparation des jus de Néré et de soja

Sur la base des teneurs en protéines des farines de Néré et de soja, les quantités adéquates de farines ont été mises en suspension dans de l'eau de robinet ; les jus obtenus devant être potentiellement ingérés lors d'évaluations sensorielles. La figure 7 présente le traitement des farines de Néré et de soja.

50g de farine sans tégument + 250 ml d'eau à pH10 sont mis en agitation pendant 2h à 1100tr/min puis remis à l'Ultraturax 10mn à 1000tr/min et enfin mis en agitation 1h à 1100tr/min. La suspension est ensuite filtrée sur un sac à jus végétal en nylon de pores de 200 µm. Le jus végétal est stocké à 4°C avant utilisation dans les 48 heures. L'objectif est d'obtenir une concentration potentielle maximale de protéines.

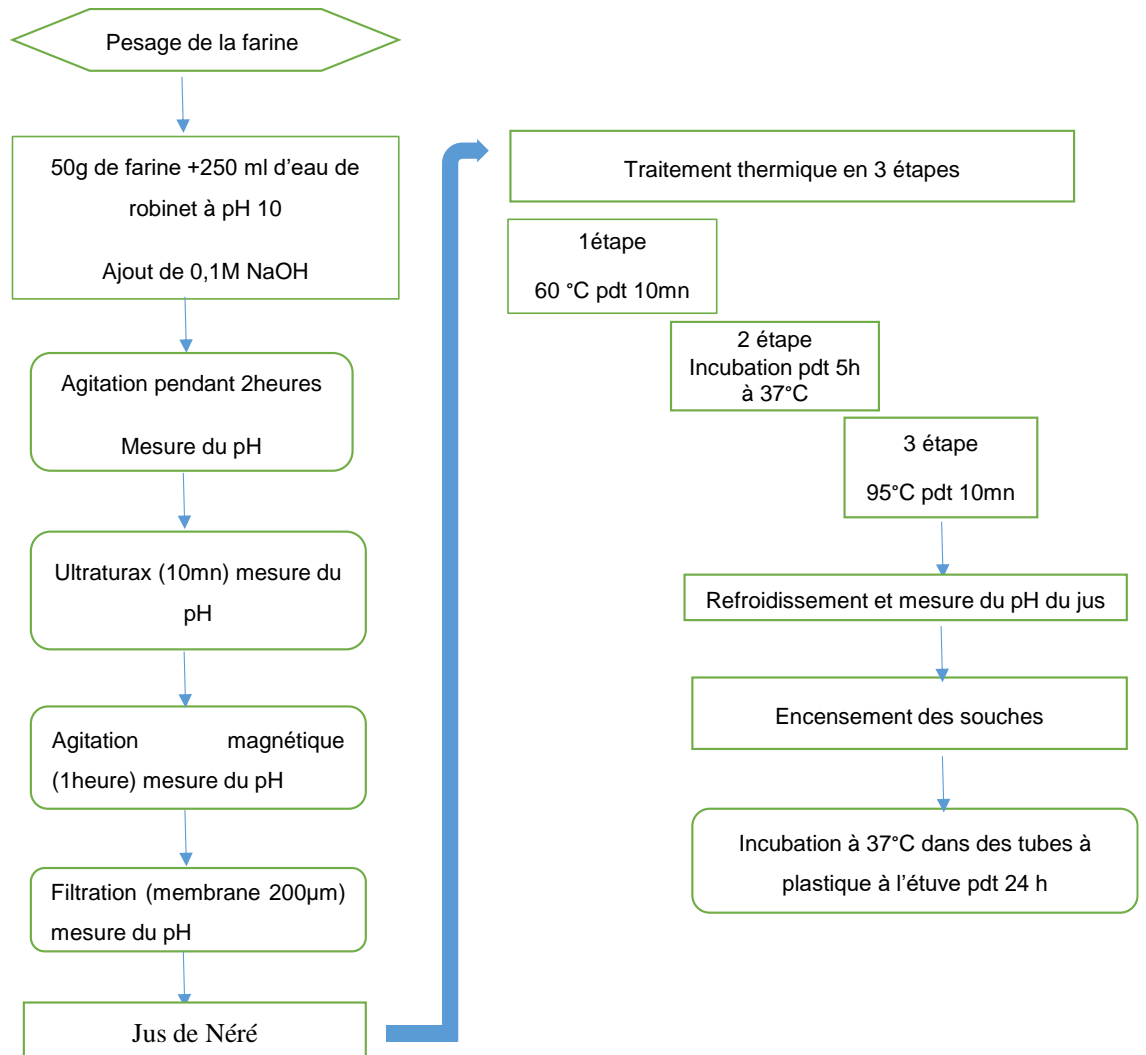


Figure 7: diagramme de préparation des Jus Soja et Néré



Figure 8: Jus de Néré et Soja avant traitement thermique

I.17 Souches bactériennes, milieu de culture et fermentation

Quatre souches de *Lactobacillus plantarum* PFC-P1C1, SFSAC-P1D2, VFVN-P2A12 et VFVN-P2C3 ont été isolées à partir des produits traditionnels fermentés d'Asie du Sud Est. Elles ont été choisies sur la base de leurs activités protéolytiques positives avérées sur la viande, le poisson et le soja. Elles se trouvent dans la banque de souches de bactéries lactiques du laboratoire International Tropical Bioresources & Biotechnology, un international joint laboratory de l'UMR PAM (AgroSup Dijon, Université de Bourgogne) et de l'Université des Sciences et Technologies de Hanoï. Ces souches ont été sélectionnées pour leur activité protéolytique positive. Les deux autres souches de *L. plantarum* Lp-WCFS1 et Lp-NC8, largement étudiées dans la littérature, ont également été utilisées comme des souches de référence dans cette étude (Tableau 7).

Produits traditionnels fermentés

Avec activités protéolytiques avérées sur la viande, poisson et soja

Tableau 7: Souches de *Lactobacillus plantarum* utilisées dans cette étude

Souches	Matrices	Origines	
PFC-P1C1	Poisson Fermenté	Cambodge	
SFSAC-P1D2	Soja Fermenté Salé	Cambodge	
VFVN-P2A12	Viande Fermentée	Viet Nam	
VFVN-P2C3	Viande Fermentée	Viet Nam	
Lp-WCFS1	Salive humaine	Suède	} Temoins
Lp-NC8	Grass silage		

Les souches de *L. plantarum* ont été cultivées à 37°C pendant 24 h dans 10mL de milieu MRS. Ces cultures ont été centrifugées à 4000G pendant 10 minutes et ensuite lavées deux fois avec de l'eau physiologique pour éliminer les traces de milieu MRS. Par la suite, ces culots bactériens ont été repris dans 10mL de jus de Néré pour fermentation. La densité optique DO_{600nm} a été mesurée pour que chaque préparation de souches ait la même DO au début de la fermentation. Des tests préliminaires ont été effectués pour calculer le nombre d'unités colonies formés correspond à une unité de DO afin de déterminer la quantité de ferment ajoutée.

La fermentation a eu lieu à 37°C pendant 24 h dans un volume de 50 ml de Jus de Néré avec un taux d'inoculum de 10⁷ CFU/ml. Les dénombrements bactériens avant et après fermentation ont été réalisés sur le milieu MRS agar en utilisant la méthode de dilution en cascade. Le pH avant et après fermentation a également été contrôlé. Le diagramme de manipulation (Figure 9) résume les étapes suivies pour réaliser la fermentation.

I.18 Dosage de facteurs antinutritionnels dans la farine de Néré

I.18.1 Extraction des polyphénols totaux dans la farine avec et sans tégument

Les polyphénols sont extraits par macération de 0,4g de farine de Néré avec et sans tégument dans des tubes à bouchons contenant 16 ml d'un mélange acétone/eau à 80% (v/v), sous ultrasons pendant 45 min et à 4°C pour empêcher l'action des

polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques. Après une première centrifugation de 1700G pendant 10min à 15°C, le surnageant contenant les polyphénols est récupéré (surnageant 1). On procède à une deuxième extraction identique sur le culot de 15 min à 4°C pour extraire 30% de polyphénols supplémentaires (surnageant 2) et donc d'obtenir un dosage plus exhaustif. Les surnageants sont réunis avant d'être concentrés à sec sous évaporateur rotatif Buchi (voir diagramme d'extraction des polyphénols Figure 10). L'extrait sec est repris dans de l'eau pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0,5 et 1.

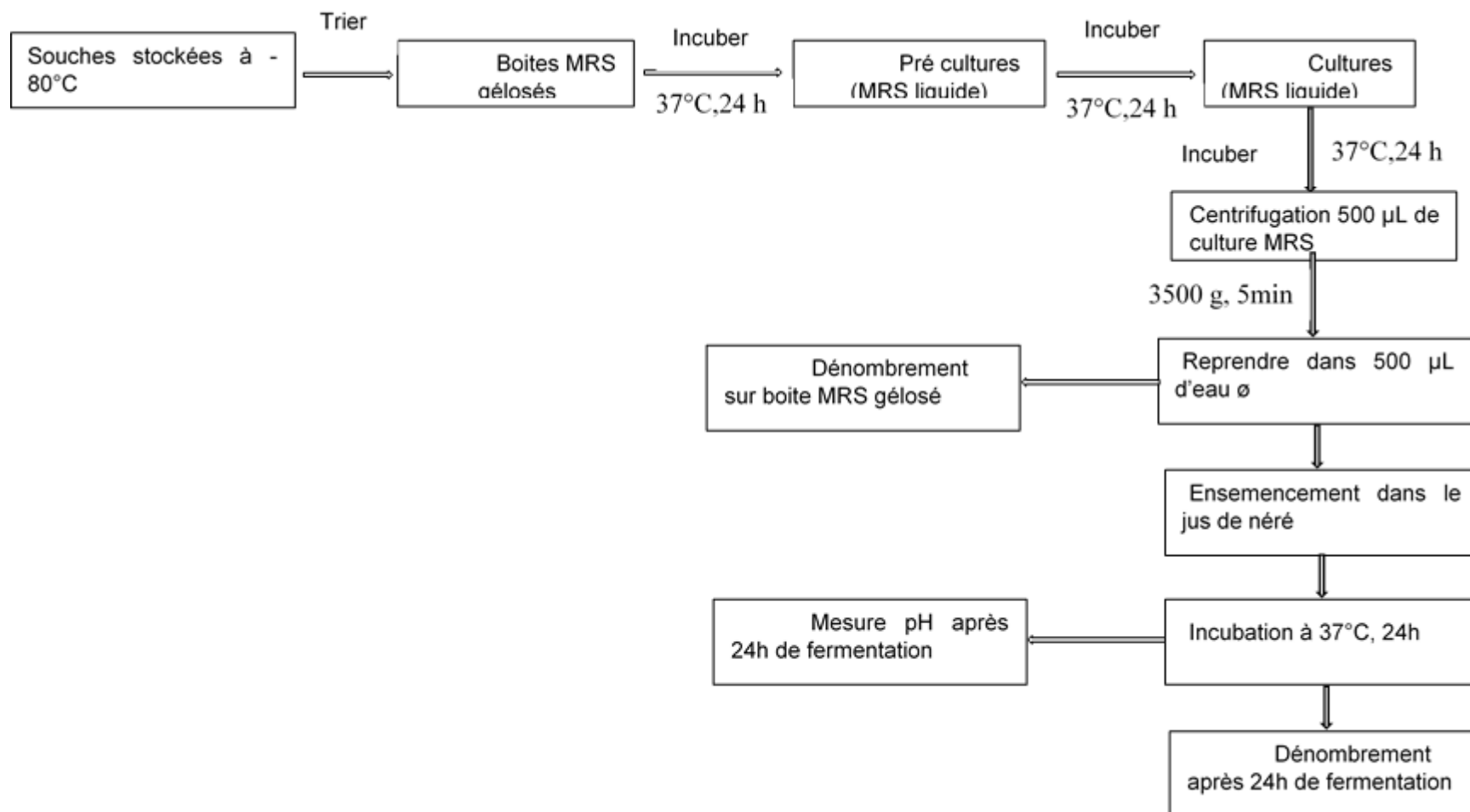


Figure 9: diagramme résumant les étapes fondamentales de la fermentation du jus de Néré

On réalise une gamme étalon en milieu aqueux : 6 points de concentrations de 0 à 20 $\mu\text{g/ml}$ d'acide gallique. Pour réaliser le dosage, 500 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à 100 μL d'extrait dilué ou de point de gamme. On ajoute ensuite 400 μL de Na_2CO_3 20%. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 30 min à 25°C. Les mesures d'absorbances ont été réalisées à 725nm sur le spectrophotomètre UVISCOUV-1200. La droite de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique a été obtenue avec un coefficient de régression linéaire $R^2=0,99$. L'équation de la droite $y=0,0006x$ a été utilisée pour calculer la teneur en polyphénols totaux des échantillons à analyser en équivalent acide gallique.

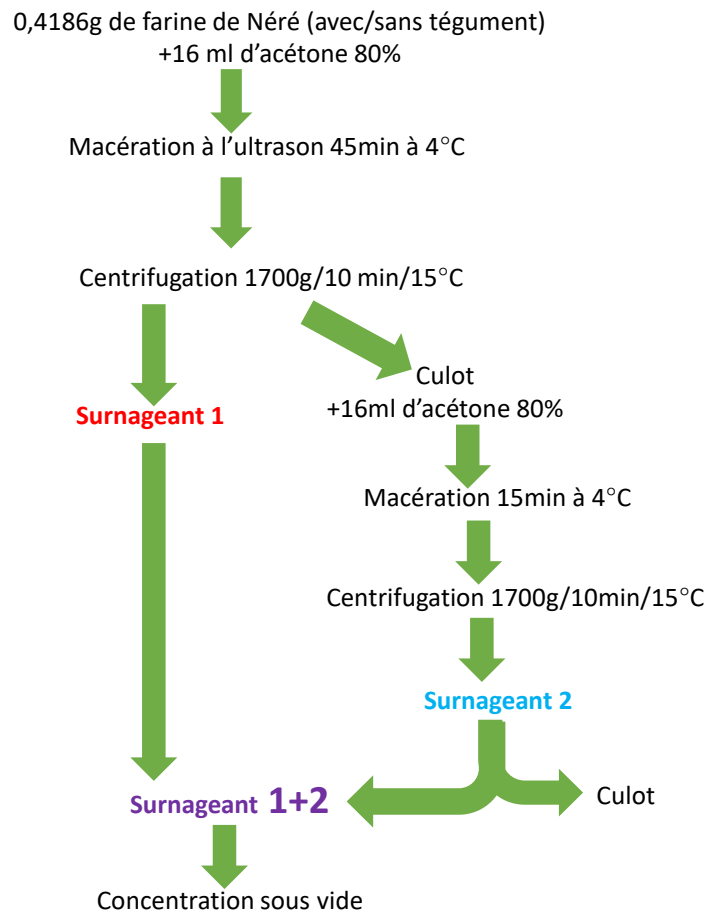


Figure 10: Diagramme d'extraction des polyphénols par macération aux ultrasons

I.18.2 Extraction des Tanins condensés (TCs) :

Les tanins sont extraits par agitation de 200 mg de farine de Néré avec et sans tégument dans des tubes à bouchons contenant 10 ml de méthanol, pendant 1 heure sous Sorbonne. Les tubes sont ensuite centrifugés à 5000G pendant 15min à 15°C. Les surnageants contenant les tanins ont été récupérés. Les surnageants sont collectés avant d'être concentrés à sec sous évaporateur rotatif Buchi. Les tanins condensés ont été dosés par la méthode à la Vanilline/HCl (37%) décrite par (Julkunen-Tiitto, 1985). Une gamme étalon de 5 points a été réalisée avec de la catéchine (0 à 1000µg). Les concentrations de catéchine de 0 à 1000µg/ml ont permis d'obtenir des valeurs d'absorbance en fonction de la concentration en catéchine, avec un coefficient de régression linéaire $R^2=0,99$. Pour le dosage, 750µl d'acide chlorhydrique concentré ont été mis par tube. Ensuite, 4% de vanilline/méthanol (1500µl) et 100µl de l'extrait des tanins ont été vigoureusement vortexés 10s avant d'être laissé incubé pendant 20min à température ambiante. Les absorbances ont été lues à 550nm sur le spectrophotomètre UVISCOUV-1200.

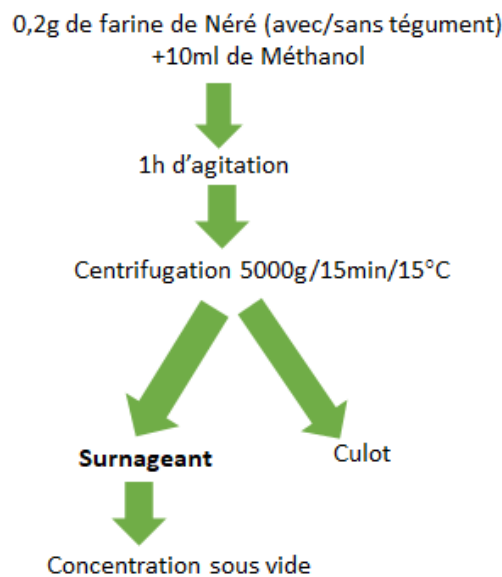


Figure 11: Diagramme d'extraction des tanins dans les farines de Néré par agitation au Méthanol

I.18.3 Extraction des phytates :

Les phytates sont extraits par agitation de 0,5g de farine de Néré avec et sans tégument dans des tubes contenant 1ml de HCl à 2,4 %, dilués dans 25 ml d'eau distillée

pendant 3 heures sous la hotte à température ambiante. Après une centrifugation à 12000G pendant 30min à 15°C a été effectuée. Les surnageants contenant les phytates ont été collectés et concentrés à sec sous évaporateur rotatif Buchi

Pour évaluer la teneur totale en phytate, la méthode basée sur la réaction entre le chlorure ferrique et l'acide sulfosalicylique (Latta and Eskin, 1980) a été suivie.

3 ml d'eau (utilisée comme niveau zéro) ou des étalons (solutions de phytate de sodium contenant de 5 à 50 µg /ml de phytate dans de l'eau distillée) ou des surnageants de mélange ont été pipetés dans des tubes à centrifuger coniques de 15 ml. Dans chaque tube, on a ajouté 1 ml du réactif de Wade modifié (0,03% FeCl₂-6H₂O et 0,3% d'acide sulfosalicylique dans de l'eau distillée), et la solution a été mélangée sur un agitateur vortex pendant 5 s. Les absorbances ont été lues à 500nm sur le spectrophotomètre UVISCOUV-1200. Les concentrations de sodium phytate de 0 à 50µg/ml ont permis d'obtenir des valeurs d'absorbance en fonction de la concentration en sodium phytate, avec un coefficient de régression linéaire $R^2=0,9947$.

I.18.4 Teneurs en inhibiteurs de trypsine

Les inhibiteurs de trypsine sont déterminés par mesure de l'hydrolyse d'un substrat peptidique de synthèse : TAME (Tosyl -L- Arginine Méthyl Ester) (Udensi et al., 2007a). Cette méthode est basée sur la baisse de la vitesse d'hydrolyse de la trypsine porcine causée par la présence d'inhibiteurs dans les échantillons. L'activité de la trypsine non inhibée est alors mesurée en présence de TAME qui libère le toluène sulfonyl présentant un maximum d'absorption à 410 nm.

Pour l'extraction une quantité de 0,1 gramme de poudre de Néré avec tégument et sans tégument a été mis en agitation dans des Erlenmeyers avec 50 ml de 0,1 mol de NaOH. Le pH du mélange a été ajusté à 9,8 avec NaOH (0,1mol). La solution a été mise sous agitation sous une hotte à température ambiante pendant 3 h. Ensuite, elle a été transférée dans la chambre froide 4°C pendant une nuit. Après elle a été centrifugée à 3500 trs/mn pendant 20min à 20°C. enfin les surnageants obtenus ont été utilisés pour le dosage des inhibiteurs de trypsine.

Préparation des solutions et étalonnage

- Tampon Tris (pH 8,2) : Dissoudre 50 mM de Tris dans 900 ml d'eau distillée,

Compléter le mélange à 1000 ml et ajuster à pH 8,2.

- TAME : Dissoudre 40 mg de TAME dans 1 ml de diméthyl sulfoxyde et

Compléter à 100 ml avec le tampon Tris préalablement maintenu à 37°C.

- Solution de trypsine : Dissoudre 20 mg de trypsine bovine dans 1 l de HCl 1 mM.

Le tableau 8 indique la méthode de préparation des tubes pour le dosage.

Expression des résultats

Les résultats obtenus permettent de calculer l'activité de la trypsine restante et sont exprimés en mg de trypsine inhibée / g d'échantillon. Ainsi donc, la quantité de trypsine pure inhibée (QTI) par unité de g d'échantillon est calculée selon l'Équation 0-7

Selon : $QTI = [(2,632 * D * Ar) / m] \dots \dots (II.7)$ Avec

D = facteur de dilution de l'extrait ; Ar (changement d'absorbance dû à l'inhibition par la trypsine) = (DOb – DOa) – (DOd – DOc) ; m = masse de l'échantillon.

Tableau 8 : Préparation des tubes pour le dosage des inhibiteurs de trypsine

Tubes							
	A	b	b'	C	c'	d	d'
Eau distillée (ml)	2	2	2	1	1	1	1
Trypsine (20 mg / l) (ml)	/	2	2	/	/	2	2
Extrait (ml)	/	/	/	1	1	1	1
Incubation à 37°C pendant 10 min							
TAME (40 mg / 100 ml) (ml)			5	5	5	5	5
Incubation à 37°C pendant 10 min							
Acide acétique (30 %) (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Trypsine (ml)	2	/	/	2	2	/	/
Centrifugation ou filtration							
DO du surnageant à 410 nm	DOa	DOb	DOb'	Doc	DOc'	DOd	DOd'

I.19 Digestibilité *in vitro* des protéines du jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté

I.19.1 Protocole de digestibilité *in vitro*

La digestibilité *in vitro* des protéines du jus de Néré a été évalué en suivant la méthode décrite par Minekus et al., (2014), avec quelques modifications. Les Simulants des Fluides Gastriques (SFG) et Intestinaux (SFI) ont été préparés selon les conditions du protocole. Les échantillons de jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté par les différentes souches (suivi du protocole de traitement du jus de Néré) ont été préparés. Pour la Digestion Gastrique, dans des Erlenmeyers de 50ml, 5 ml de chaque échantillon à une teneur en protéines de 2% (m/m) ont été dilués avec 10 ml d'eau distillée et 8 ml de SGF. Le pH a été ajusté à 3 avec une solution d'HCl (1M). Ensuite il a été ajouté 1,6 ml de solution de pepsine (100 mg de pepsine dans 20 ml d'eau distillée avec une activité enzymatique théorique supérieure à 25000U/mg de protéines). Un volume de 5µl de CaCl₂ à 0,3 M a été ajouté. Le mélange a été incubé sous agitation continue à 300 RPM pendant 2h à 37 °C dans l'incubateur Sanyo.

Pour la digestion intestinale, 11 ml de SIF avec 40µl de CaCl₂ à 0,3 M et 1,31 ml d'eau distillée ont été ajoutés à la solution résultant de la digestion gastrique. Le pH du mélange a été ajusté à 7 avec une solution de NaOH (1M). Le volume final est ajusté à 40 ml avec du SIF. Puis 736mg de pancréatine (pancréas de porc 4x USP) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 2h à 37°C sous agitation continue à 300 RPM dans l'incubateur Sanyo.

Après la 2^{ème} incubation, un volume de 10 ml de la mixture digérée a été prélevé et mélangé avec 10 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% (m/v). La solution a été centrifugée à 20°C, durant 10 min, à 800G. Sur les surnageants, un dosage par la méthode de Kjeldahl a été fait. Le pourcentage d'azote soluble dans le TCA libéré pendant le processus de digestion a été calculé à l'aide de l'Équation 0-8 suivante :

$$\text{Hydrolyse enzymatique} = \frac{\text{quantité de protéines dans le surnageant de TCA}}{\text{quantité totale de protéines}} \times 100 \dots(\text{II.8})$$

NB : la caséine a été utilisée comme référence sachant que son pourcentage d'hydrolyse a été considéré comme correspondant à 100% de digestibilité.

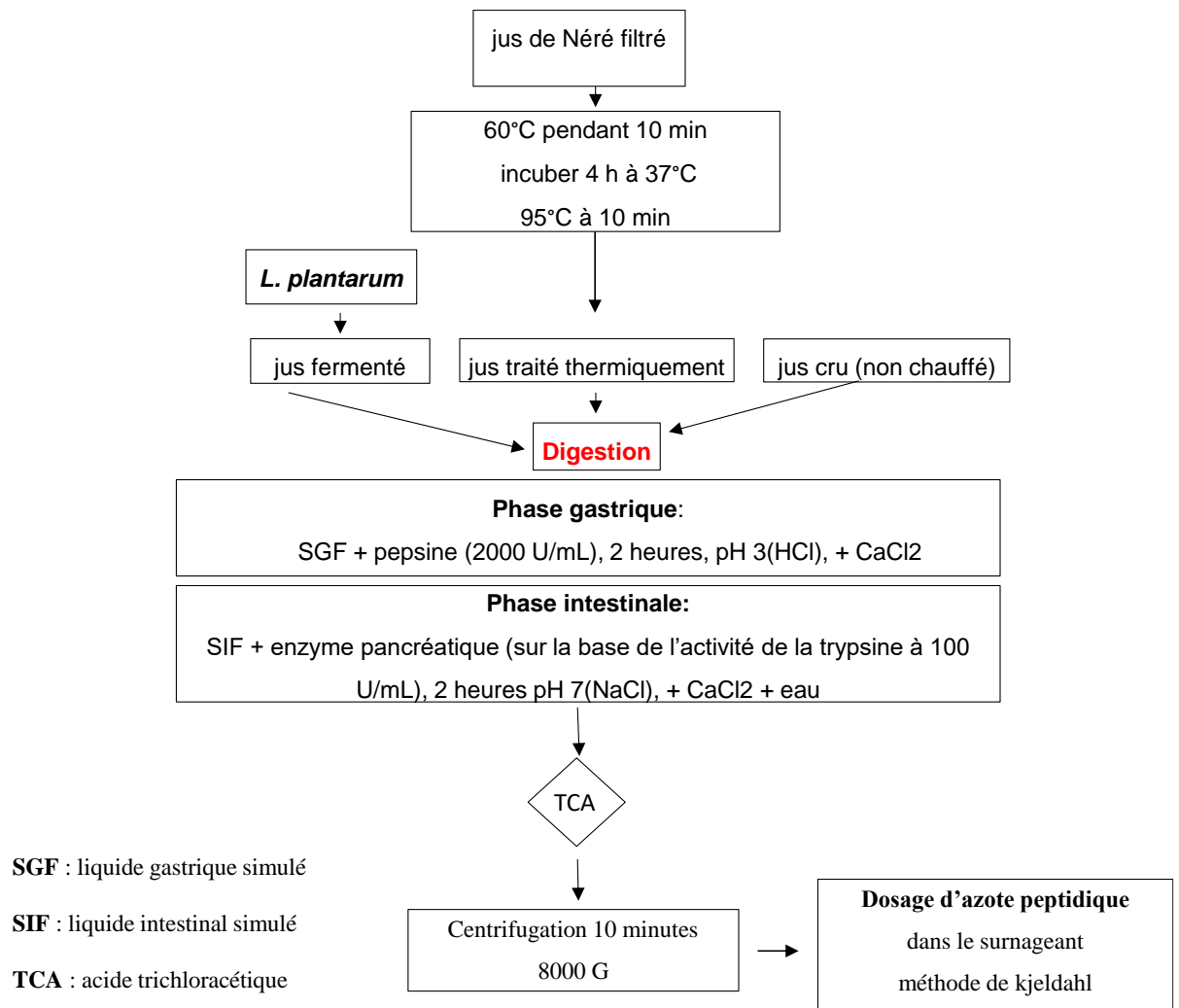


Figure 12 : Schéma des manipulations mises en œuvre pour étudier la digestibilité *in vitro* des protéines du jus Néré crue traité thermiquement et fermenté

I.20* Dosage des facteurs antinutritionnels dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de *Lactobacillus plantarum

Après lyophilisation des jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum*, les mêmes démarches analytiques utilisées pour la détermination des facteurs antinutritionnels dans les farines ont été aussi utilisés, excepté pour les facteurs antitrypsiques.

I.21 Dosage des peptides dans le jus de Néré fermenté

Le jus de Néré fermenté avec les différentes souches (50g) de *L. plantarum* a été centrifugé pour avoir les protéines solubles du Néré (10 000G, 15 min, 10°C). Les surnageants ont été collectés. 800µl de surnageant et 800µl d'acide trichloroacétique (TCA) ont été pipetés et mis dans des tubes Eppendorfs de 2 ml. L'ensemble de la solution a été soumis à une centrifugation de 12000 x g à 4°C pendant 5mn à la centrifugeuse 5417R pour l'extraction des peptides. Les peptides solubles dans l'acide trichloroacétique ont été estimés par la procédure de Lowry-Folin, avec expression des résultats en termes d'équivalent à celui de la tyrosine "valeur de la tyrosine" (Juffs, 1973). On réalise une gamme étalon en milieu aqueux : 6 points de concentrations de 0 à 0,58 mg/ml de tyrosine. Pour réaliser le dosage, 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à 25 µL du produit (échantillon) ou de point de gamme. On ajoute ensuite 500 µL de Na₂CO₃ 20% et 1ml de CuSO₄ plus le tartrate de potassium et sodium. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 30 min à 25°C. Les mesures d'absorbances ont été réalisées à 700nm sur le spectrophotomètre UVISCOUV-1200. La droite de l'absorbance en fonction de la concentration en tyrosine a été obtenue avec un coefficient de régression linéaire R²=0,99. L'équation de la droite $y = 0,9635x + 0,0213$ a été utilisée pour calculer la teneur en peptides des échantillons à analyser en équivalent de la tyrosine.

I.22 Détermination de l'agrégation des protéines (Soja et Néré)

I.22.1 Etude en tubes avec centrifugation

Des essais de traitements thermiques et de précipitations salines ont été réalisés sur les jus de soja et de Néré préalablement préparés (Cf II.6).

Les essais ont été conduits en partant du principe d'avoir une solution protéique de 1 mg de protéines/ 100 ml de tampon phosphate à pH 7. Les deux solutions (Soja et Néré) ont subi un traitement thermique au bain marie au cœur du produit à 95°C pendant 10 min. Après refroidissement à 65 °C, un volume de 3 ml de chaque suspension traitée thermiquement a été pipeté et mis dans des tubes à essai. Des solutions de sels bivalents

(MgCl₂ et CaCl₂) de 1 M préalablement préparées ont été utilisées. Les sels de MgCl₂ et CaCl₂ sont ajoutés de façon graduelle en fonction de la concentration souhaitée dans chaque tube (30 µl pour 10mM et 360 µl pour le 120 mM). Tous les essais ont été centrifugés à 3000g, 10 min, 20°C. Ensuite les surnageants ont été collectés et pesés. Enfin un dosage des protéines par la méthode de Lowry a été fait sur les surnageants. Le pourcentage d'agrégation de protéines est calculé en considérant la concentration protéique dans la solution initiale à 100%. Les essais où les concentrations protéiques sont plus élevées selon le dosage au Lowry ne sont pas maintenus pour la suite de l'expérience, ceux où le culot domine sont gardés.

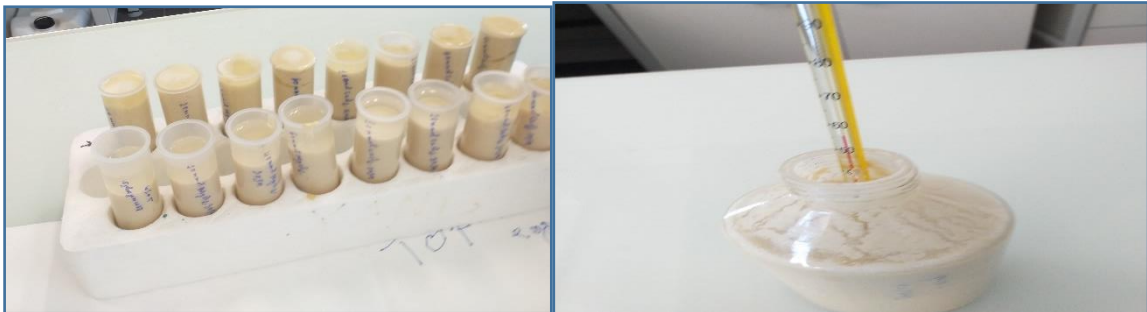


Figure 13: Solution aqueuse des protéines et mesure de la température du jus

I.22.2 Turbiscan

Le Turbiscan Lab Expert (Formulacion, Toulouse, France) permet d'identifier et de suivre les phénomènes de déstabilisation (migration ou variation de taille) de systèmes complexes à partir de la diffusion multiple de la lumière (MLS pour Multiple Light Scattering). L'équipement possède deux capteurs optiques qui mesurent la lumière monochromatique proche infrarouge transmise et rétrodiffusée ($\lambda = 800$ nm). (Mengual et al., 1999) ont indiqué la capacité de cette technique pour caractériser la variation de taille des particules ou des agrégats et la migration des particules / agrégats. Dans les systèmes dilués (variation de transmission > 0,2%), ces phénomènes sont mesurés par l'intensité lumineuse de transmission et de rétrodiffusion de l'échantillon en fonction de la hauteur et du temps de l'échantillon.

Des suspensions de protéines de Néré et de soja ont été préparées dans une solution tampon phosphate à pH 8 de sorte à avoir 0,5 mg de protéine dans 50 ml de tampon. Les suspensions ont été mises sous agitation pendant 3 heures ensuite soumises

à un traitement thermique de 95°C pendant 10min au bain marie avant de réaliser l'analyse. Un volume de 5 ml de Néré et soja de la solution protéique a été pipeté et mis dans le tube de mesure (tubes en verre borosilicate cylindriques à fond plat) puis on ajoute les sels (MgCl₂ et CaCl₂) à concentration graduelle de 10 mM à 120 mM

La tête de détection Turbiscan a scanné l'échantillon en se déplaçant verticalement le long de la cellule d'analyse et acquisition des données tous les 40 µm. Les profils de diffusion de la lumière ont été enregistrés toutes les 4 minutes pendant 40min. Les différences dans les profils de transmission le long du temps indiquent l'instabilité de l'échantillon. L'intensité lumineuse transmise (T) est affectée par la moyenne du diamètre des particules et le libre parcours moyen du photon. T peut changer avec le temps et la hauteur.

Sur la base des graphiques de l'intensité lumineuse transmise (T), trois régions différentes ont été distinguées : le bas, le milieu et le haut du tube. Les variations de T dans le haut et le bas de l'échantillon sont liés à des phénomènes de migration, tels que la clarification (en haut) et la sédimentation (en bas). Les variations de T dans la partie médiane de l'échantillon indiquent les phénomènes d'interaction entre les particules, et donc la variation granulométrique. Basé sur les spectres obtenus, la stabilité de la suspension peut être calculée par l'indice de stabilité Turbiscan (TSI) selon l'Équation 0-9

$$TSI = \sum_i \frac{\text{Scan}_i(h) - \text{Scan}_{i-1}(h)}{H} \dots \dots \dots (\text{II.9})$$

Où H : hauteur de l'échantillon du bas de la cellule au ménisque

Scan_i (h): intensité de la lumière de balayage (le temps est i, la hauteur est h)

Scan_{i-1} (h): intensité de la lumière de balayage (le temps est i-1, la hauteur est h)

Les valeurs TSI les plus basses indiquent les suspensions les plus stables. Les spectres Turbiscan® étaient analysés avec le logiciel Turbisoft-Lab version 2.2.0.82-5 (Formulacion, Toulouse, France).

I.23 Préparation du tofu soja et de Néré

A partir des jus de soja et de Néré préalablement préparés, 150 ml de jus est mis au bain marie à 95°C pendant 15 minutes. Puis après refroidissement à 65°C, 3 et 6 ml/l de solution de MgCl₂ ou CaCl₂ (concentration finale dans le jus de 20 mmol/l et 40 mmol/l) sont ajoutés à cette préparation afin d'agréger les protéines. Après 20 minutes, les jus de soja ou

de Néré en cours de coagulation sont transférés dans des moules perforés tapissés d'une étamine. Un béccher rempli d'eau (1Kg) est posé au-dessus de ces dernières afin de permettre au sérum de s'égoutter et de former des tofus. Après 24h de stockage sous poids de 1Kg, les tofus sont démoulés. Le rendement en tofu, la teneur en eau ont été déterminés sur une base humide. Des mesures de rhéologie ont également été effectuées.

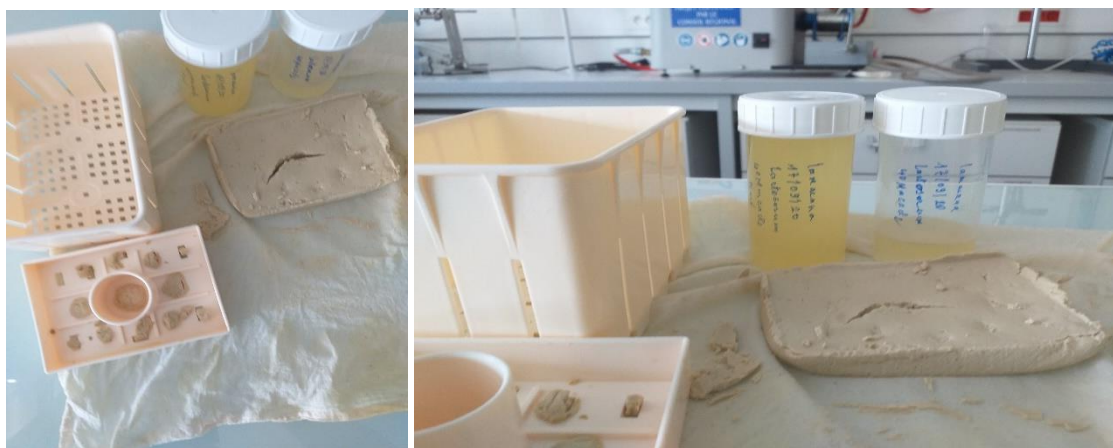


Figure 14: moule, étamine lactosérum et tofu obtenu après l'ajout des sels bivalents

I.24 Etude des propriétés rhéologiques par Texture Analyser (TA-XT2i)

Les paramètres rhéologiques des tofus ont été mesurés par la méthode de compression uni axiale ; un appareil TA-XT2i Texture Analyser a été utilisé. Cet appareil équipé du logiciel *Stable Micro system texture Expert Exceed* effectue un test en compression permettant d'étudier et de comparer la texture et la déformation des différents échantillons sous l'effet d'une contrainte. Les échantillons de tofus sont mis à une température de 22 °C après leur sortie du stockage (4°C). Un emporte-pièce de diamètre 20 mm a été utilisé pour obtenir des cylindres de 11 mm de diamètre sur 4 mm épaisseur. Trois échantillons (cylindre) sont prélevés à des points différents de la surface du bloc de tofu.

Une géométrie cylindrique de 25 mm de diamètre (Duralum) a été utilisée avec une cellule de pesée de 5 kg. L'échantillon a été comprimé sur 25% de sa hauteur d'origine. Les paramètres d'analyse utilisés sont : • vitesse de pré-test : 2,0 mm / s ; • vitesse d'essai: 1,0 mm / s ; • vitesse post-test: 1,0 mm / s.

La contrainte de pénétration ou fermeté, l'adhésion et la cohésion ont été déterminées à partir des courbes obtenues après deux pénétrations successives. La Force maximale est mesurée au sommet du pic. La cohésion (A_2/A_1) est calculée en divisant l'aire sous la courbe de la seconde pénétration (A_2) par l'aire sous la courbe de la première pénétration à la même vitesse de pénétration (A_1). L'adhésion (A_3) a été évaluée à partir de l'aire délimitée par la courbe négative située entre les 2 cycles de pénétration.

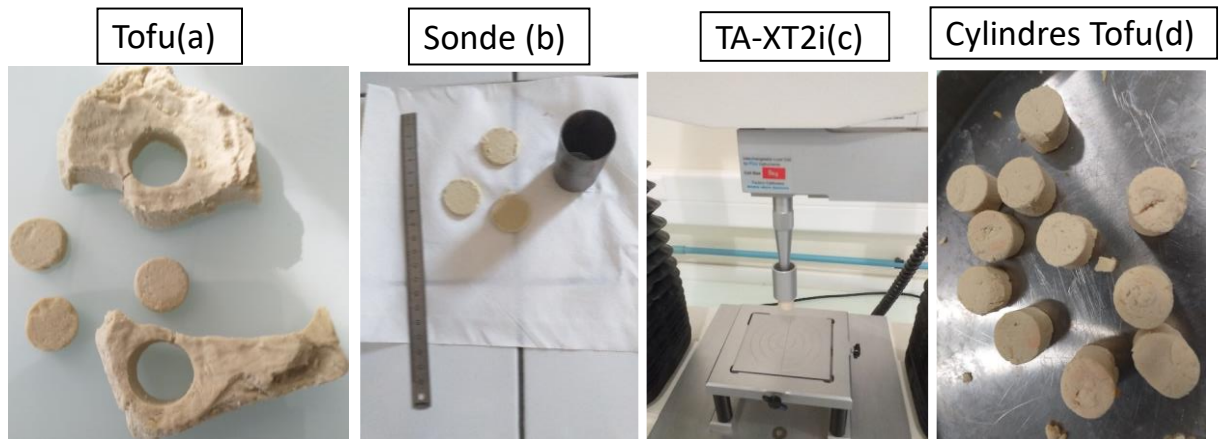


Figure 15: Etapes clés de mesure des propriétés rhéologiques par Texture Analyser (TA-XT2i)

I.25 Rhéologie à contrainte imposée

Les expérimentations de rhéologie à contrainte de déformation ont été réalisées sur un rhéomètre rotatif Anton Paar au Laboratoire de Rhéologie de Agrosup Dijon UMR PAM. Cet appareillage présente de nombreux avantages. Il permet en particulier d'utiliser une faible quantité de matière, d'effectuer des mesures isothermes, de travailler à une fréquence de déformation définie et d'appliquer de très faibles déformations.

Principe de la méthode

La rhéologie oscillatoire à petite déformation ou rhéologie dynamique est une technique qui permet d'évaluer la structure lors de la formation et de la réticulation d'un polymère. Cette technique est capable d'estimer le point de transition ou de passage de l'état liquide vers l'état semi solide. Le principe de cette méthode consiste à faire subir à l'échantillon une contrainte non destructive, c'est à dire sans modification des propriétés mécaniques. Cette contrainte est une fonction sinusoïdale dans le temps. Les résultats sont

obtenus sous forme d'une sollicitation sinusoïdale (γ) (équation 0-10) à des fréquences variables dont on déduit la mesure du module de conservation G' et du module de perte G'' , avec γ_0 et ω l'amplitude et la fréquence de l'oscillation, respectivement.

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \dots \dots (II.10)$$

Un module dit élastique (ou conservatif) G' et un module visqueux G'' (ou de perte) sont alors définis, correspondant à l'énergie élastique accumulée au cours de la déformation et à l'énergie dissipée ou perdue, respectivement. Autrement dit, un module complexe de cisaillement G^* peut être décomposé en deux termes, dont l'un (G') représente la contrainte en phase avec la déformation (la partie réelle) et l'autre (G'') correspondant à la contrainte en déphasage avec la déformation (la partie imaginaire)

Équation 0-11

$$G^* = \sigma^* / \gamma^* = G' + G'' \dots, \dots (II.11)$$

Sachant que δ représente le déphasage entre la contrainte et la déformation de cisaillement, d'une manière générale, on conçoit que δ reflète la contribution relative de la composante visqueuse et élastique selon l'Équation 0-12

$$\tan \delta = G'' / G' \dots, \dots (II.12)$$

Dans le domaine linéaire de viscoélasticité, les valeurs de G' et G'' sont indépendantes de l'amplitude de déformation, quelle que soit la valeur de fréquence ω . Par contre, pour des valeurs de déformation très élevées, des modifications dans la structure telles que la rupture de liaisons conduit à la diminution des deux modules (domaine non linéaire).

Au point de gel, les deux modules sont égaux ($G' = G''$; $\tan \delta = 1$). Un réseau macroscopique commence alors à se former, et le module élastique G' augmente fortement du fait de sa structuration. Les deux modules évoluent alors suivant une loi de puissance, indépendamment de la fréquence appliquée et dans un domaine large de fréquences.

Le suivi de l'évolution de la gélification des bio polymères en solution, est réalisé par les mesures de G' et G'' dans le temps à fréquences basses et constantes, où l'on peut distinguer plusieurs phases suivant l'état des systèmes étudiés :

- Dans un système liquide ou visqueux on trouve $G'' > G'$; cela traduit une faible contribution du comportement élastique ;
- Au croisement de G' et G'' ($G' = G''$), que l'on appelle aussi le point de gel (transition sol-gel), où $\tan \delta = 1$ et donc indépendant de la fréquence appliquée. A partir de ce point le G' commence à augmenter plus fortement que G'' ;
- A la fin du processus de gélification, les valeurs de G' et G'' atteignent leurs seuils maximums et se stabilisent. A ce moment $G' \gg G''$ et la valeur de $\tan \delta$ sera très faible dans le cas de gels forts (gel élastique). La contribution visqueuse est négligeable et le module élastique restera stable quelle que soit la fréquence appliquée. En ce qui concerne les gels viscoélastiques présentant des imperfections, G' et G'' augmenteront quel que soit la fréquence appliquée. Dans un domaine de basse fréquence, G' se rapproche d'un plateau d'équilibre (module d'équilibre du réseau gélifié).

Mode opératoire

Les propriétés rhéologiques des gels ont été déterminées à l'aide du rhéomètre (Anton Paar Rheocompass), équipé d'une géométrie de type plan-plan (D-PP25). Les mesures ont été réalisées sur des échantillons des tofu soja et Néré à différentes concentrations des sels bivalents à savoir 20 et 40 mM de $MgCl_2$ et $CaCl_2$. Un cylindre de 11mm de diamètre sur 4 mm d'épaisseur de chaque tofu a été déposé sur le plateau du rhéomètre.

Les mesures ont été réalisées sous contrainte de déformation (des pré-tests ont permis de trouver le domaine de linéarité) à une fréquence de 0,1 à 100 Hz et un entrefer (gap) de 4 mm. La température a été maintenue à 25 °C par le biais d'un système de régulation de température à effet Peltier. Les échantillons ont été bien couverts pour éviter l'évaporation de l'eau et le séchage de l'échantillon au cours de la mesure. L'évolution des modules de stockage G' et de perte G'' et le profil de $\tan \delta = G''/G'$ a été enregistrée en fonction de la fréquence (spectre mécanique) ainsi que de la contrainte.



Figure 16: Matériel utilisé pour la découpe des cylindres ; Echantillons après passage au RheoCompass Anton Paar

I.26 Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica, version 12 (Tulsa, OK, Etats-Unis), par analyse de variance (ANOVA). Un test de TUKEY a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes. Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$. Toutes les mesures ont été effectuées avec au moins trois répétitions.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Caractérisation biochimique et physico-chimique d'isolats protéiques issus de farine de graines de Néré en fonction du procédé d'extraction des protéines

Cette première partie de résultats tente de déterminer les conditions d'extractabilité des protéines des farines du *Parkia biglobosa* et d'étudier la solubilité des protéines isolées. Par la suite, la gélification induite thermiquement de diverses suspensions de protéines a été étudiée.

I.27 Composition des farines de graines de Néré (*Parkia biglobosa*)

La composition des graines de Néré a été évaluée dans le but de l'utilisation efficace du *Parkia biglobosa*. Tout d'abord, l'idée est de fournir des données qui permettront l'utilisation efficace de cette légumineuse tropicale sous-exploitée dans des applications alimentaires. Les graines de Néré ont été dépulpées, décortiquées, déshydratées, broyées et dégraissées. Des analyses chimiques ont été effectuées selon des méthodes standard.

La teneur en protéines de la farine de Néré non délipidée est de $24,1 \pm 2,1$ g/100g (Tableau 9). En revanche, elle est de $30,7 \pm 2,3$ pour la farine de graine de Néré délipidée. La quantité de sucres libres est de 3,3 %, tandis que la part de glucides (amidon non résistant) et de fibres brutes était de 16,5 % et 26,9 %, respectivement. Il est important de noter que la délipidation entraîne une réduction de la matière sèche dans la farine de graine de Néré délipidée. Cela augmente en conséquence la teneur en protéines, qui est calculée à partir de la matière sèche. Le même effet de calcul est observé avec les autres composés.

Tableau 9: Composition proximale de la farine de graine de Néré (g/100 g de matière sèche)

Valeur de composition	Farine brute	Farine délipidée
Protéines	24,1±2,1	30,7±2,3
Lipides /huile brute	17,2±0,1	Trace
Fibres brutes	26,9±2,1	34,2±1,9
Glucides (amidon)	16,5±1,9	20,8±1,2
Sucres	3,3±0,9	4,2±0,8
Cendres	4,73±0,1	5,6±0,1
Humidité	4,5±0,4	7,2±0,6

L'intérêt de la délipidation est de réduire les interactions lipides-protéines et d'augmenter l'extractabilité des fractions protéiques (Shand et al., 2007). Par ailleurs, il a été constaté que la présence de matière sèche conduit à une modification de la solubilité des protéines dans l'eau et augmente la turbidité des suspensions protéiques, comme dans le cas des solutions de protéines de soja (Li et al., 2007). Les éléments non protéiques pourraient par conséquent perturber l'extraction de la fraction protéique.

Les résultats obtenus ont montré que la graine de Néré est une bonne source de protéines. Le taux de protéines correspond aux valeurs citées dans la littérature entre 30 et 35% de protéines brutes. Ce taux est supérieur à ceux des légumineuses traditionnellement consommées en Afrique : haricots, arachides ou pois Bambara, qui en contiennent entre 16 et 29% (Subuola et al., 2012).

I.28 Etude des conditions d'extraction des protéines à partir de la graine de Néré

L'extractabilité des protéines en fonction des conditions de pH et de la force ionique a été établie pour la farine de Néré non délipidée et la farine délipidée. L'extractabilité des protéines a été faite en agissant à la fois sur le pH, en élevant la concentration en sel et en enlevant la matière grasse. Les conditions d'extractions sont choisies pour répondre au but de pureté et l'extraction simultanée des albumines et des globulines.

La figure 17 montre qu'en l'absence de chlorure de sodium, l'extractabilité varie, en fonction du pH, de plus de 50%. Ainsi l'extractabilité à pH 10 est presque deux fois plus élevée que l'extractabilité à pH 4. Néanmoins à pH 10, seulement 31% des protéines disponibles dans la farine ont été solubilisées. La plus faible extractabilité est obtenue à pH 4. Comme cela a déjà été montré dans la littérature, le pH isoélectrique de nombreuses protéines végétales, en particulier les globulines, se situe autour de pH 4-4,5 (Klupšaitė and Juodeikienė, 2015). Ceci explique la faible extractabilité à ce pH.

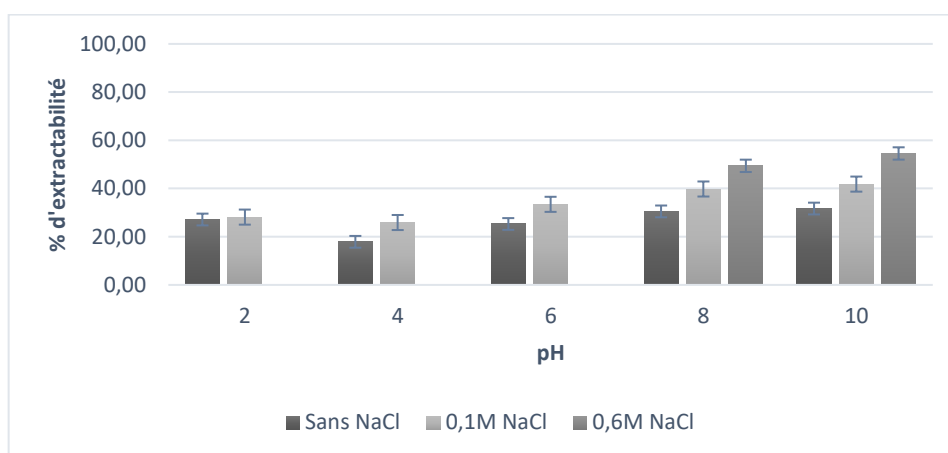


Figure 17: Extractabilité de protéines dans la farine de Néré non délipidée en fonction du pH et de la force ionique (0,1 et 0,6 M de NaCl) en gramme de protéines extractibles pour 100 grammes de protéines totales.

En présence de sel, l'extractabilité des protéines a été améliorée par un effet de salage (salting in) qui confère aux protéines une plus grande solubilité en les empêchant de s'agréger. Ainsi, à pH 10 et avec une teneur en NaCl de 0,6 M, un pourcentage d'extractabilité de 55% a été obtenu.

En l'absence de matières grasses, le pourcentage d'extraction des protéines de la farine délipidée est d'environ 45%, à pH 10 (sans NaCl) (Figure 18). La délipidation préalable de la farine permet d'augmenter l'extractabilité de 10 à 30% en fonction du pH. On constate que l'effet "force ionique" est moins net sur la farine délipidée mais permet d'accroître le rendement d'extraction. Ainsi à pH 8 et 10, le pourcentage d'extraction des protéines de la farine dégraissée atteint environ 57% (Figure 18).

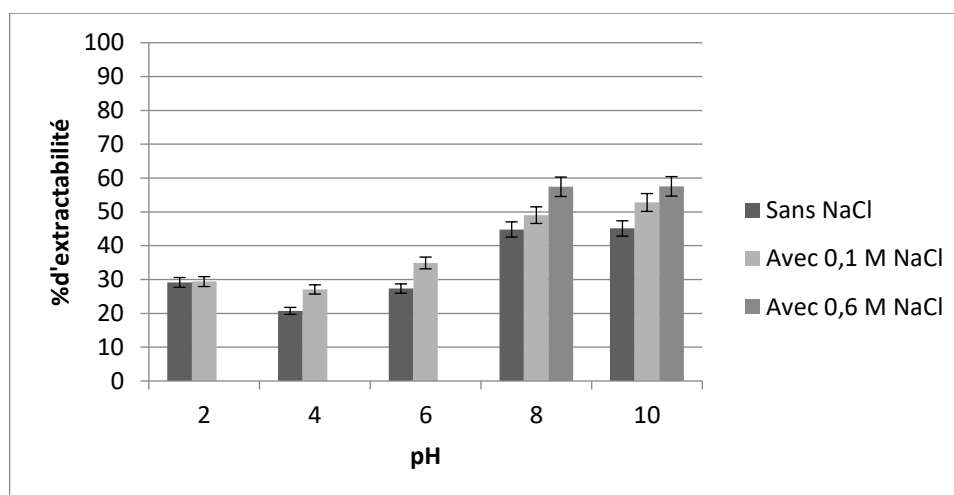


Figure 18: : Etude de l'extractabilité des protéines totales du Néré délipidée en fonction du pH et de la force ionique (0,1 et 0,6 M de NaCl) en gramme de protéines extractibles pour 100 grammes de protéines totales.

Ce rendement d'extraction est proche de celui décrit dans la littérature (Créviu et al., 1996). Cependant, 40% du contenu protéique potentiellement disponible dans la farine, n'a pas été extrait. Les protéines sont restées piégées dans le culot centrifugé. Il serait nécessaire de relaver le culot plusieurs fois pour récupérer le maximum de protéines. Des lavages supplémentaires conduisent à des volumes plus importants de surnageant avec des concentrations en protéines plus faibles qui engagent donc des étapes de concentration en protéines pour retrouver une suspension avec une concentration en protéines acceptable. À ce stade de nos recherches, le taux de récupération potentiel des protéines piégées dans les culots par un nouveau lavage n'a pas encore été déterminé.

I.29 Caractérisations des protéines des isolats albumines et globulines

I.29.1 Solubilité en fonction du pH et de la teneur en NaCl

A partir de la suspension protéique de la farine de Néré délipidée, des fractions de globuline et d'albumine ont été obtenues par précipitation sélective au point isoélectrique des globulines. La caractérisation de l'isolat de globulines a révélé une teneur en protéines de $74,2\% \pm 0,2$. Pour l'isolat d'albumine, la teneur en protéines était de $89,1\% \pm 0,1$.

La solubilité des isolats de globuline de Néré présente un profil en forme de " V " caractérisé par une solubilité élevée à pH acide et à pH alcalin (Figure 19). La solubilité à pH2 était de 87 et 91% sans sel et avec 0,1M de NaCl, respectivement.

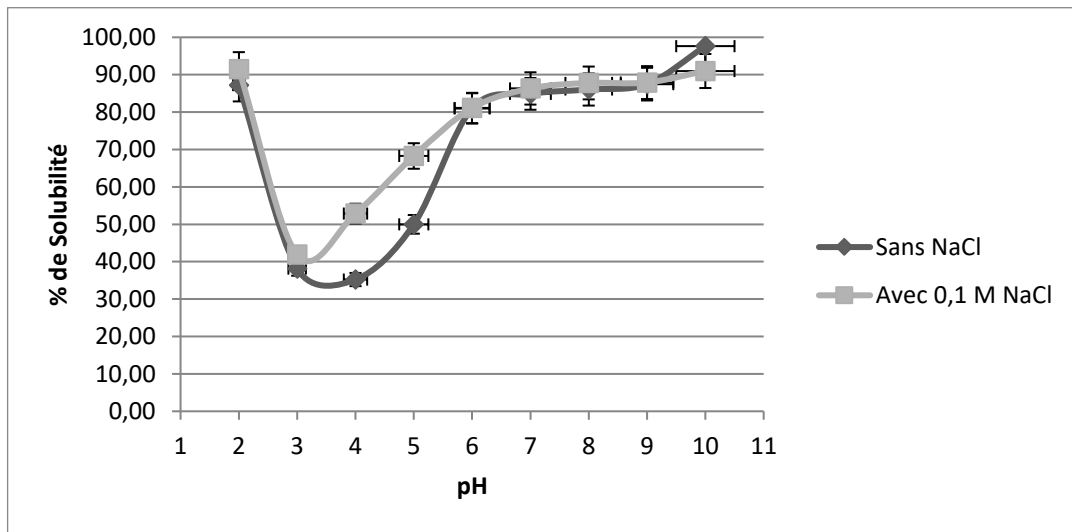


Figure 19 : Etude de la solubilité des isolats de globuline de Néré en fonction du pH et de la force ionique (g de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales)

La solubilité était plus élevée à un pH alcalin. À pH 10, la solubilité était de 87 et 97 % sans sel et avec 0,1 M de NaCl, respectivement. La solubilité était minimale, autour du point isoélectrique, de 41 à 68% respectivement pour une force ionique de 0,1M de NaCl à pH 3 à 5. Ce profil est similaire aux profils de solubilité des globulines du soja et d'autres légumineuses, pois chiches et lentilles (Boye et al., 2010; Karaca et al., 2011). De manière générale, une solubilité élevée suggère que les protéines extraites sont dans un état natif (Fuhrmeister and Meuser, 2003). L'augmentation de la solubilité peut s'expliquer par la préparation de la matière première, car avant la lyophilisation des solutions protéiques, un ajustement du pH à 8 a été effectué, suivi d'une centrifugation. Ainsi, lorsque les globulines ont été resolubilisées, on s'attendait à une plus grande solubilité.

Comme pour la plupart des protéines, la solubilité varie en fonction du pH et donc de la charge nette de la protéine. A un pH isoélectrique, les charges positives et négatives d'une protéine sont équilibrées, ce qui facilite les interactions entre protéines, au détriment des interactions protéine-solvant, ce qui augmente le repliement de la protéine et réduit par conséquent sa solubilité. À des valeurs de pH acides ou alcalines, la protéine est respectivement chargée positivement et négativement. Cette différence de charge nette

augmente les forces de répulsion entre les particules, favorisant ainsi les interactions protéine-solvant qui se traduisent par une solubilité accrue.

La figure 20 montre le profil de solubilité des isolats d'albumine en fonction de la force ionique à différentes valeurs de pH. Pour la gamme de pH comprise entre 2 et 8, l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu a conduit à une plus grande solubilité des albumines. A pH 4,5, proche du pI de la protéine, on observe une légère baisse de la solubilité en fonction de la force ionique. Ce phénomène peut être dû à un effet synergique entre le pI et l'effet salting-out. A des pH très élevés entre 9 et 10, une solubilité maximale supérieure à 90% a été observée.

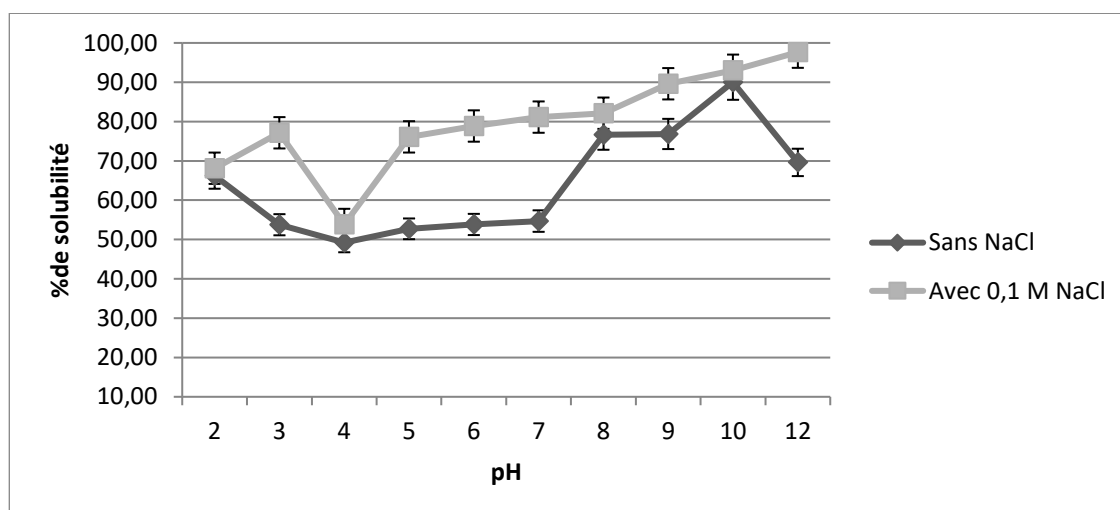


Figure 20: Etude de la solubilité des isolats d'albumines de Néré en fonction du pH et de la force ionique (g de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales)

L'isolat d'albumine a présenté un meilleur profil de solubilité que l'isolat de globuline. En effet, l'albumine est restée presque entièrement soluble dans toute la gamme de pH étudiée, même à un pI- 4. Cette haute solubilité est liée à la nature hydrophile des albumines AfLB et à leur faible hydrophobie selon la classification "hydrosoluble" d'Osborne. Ce profil de solubilité est similaire à celui observé pour la fraction d'albumine du pois jaune (Adebiyi and Aluko, 2011; Fuhrmeister and Meuser, 2003b) et du tournesol (Pérez et al., 2005).

I.29.2 Analyse des profils SDS-PAGE

La figure 21 présente les profils en électrophorèse (SDS-PAGE) dans des conditions non réductrices des fractions de globulines et albumines du Néré. Pour l'isolat de globulines, le profil protéique présentait quatre polypeptides principaux (poids moléculaires de 35, 50, 60 et 69 kDa). Ce profil était très similaire aux globulines 7S et 11S des protéines de légumineuses (Basman et al., 2006; Gatehouse et al., 1982). Nous avons trouvé une bande à 69 kDa, que nous avons nommée Conviciline en référence à la principale globuline de pois. La bande diffuse à 60-50 kDa a été assimilée à la sous-unité de la Légumine, et la Viciline (α , β , γ) 50kDa. La bande à 35 kDa était assimilée à la Viciline (α , β) 35kDa.

L'isolat d'albumines a également présenté des bandes caractéristiques de cette fraction, à savoir : Lipoxygénase (94 kDa), et les albumines 2S à 20 kDa et 16 kDa, qui sont fréquemment décrites dans la fraction albumine des légumineuses (Le Gall et al., 2007b). Contrairement aux autres albumines de légumineuses, nous pouvons remarquer la fraction majoritaire A4 (50 kDa) et la bande de faible intensité A3 à 45 kDa. A ce stade des travaux, nous ne pouvons pas affirmer si les bandes à 50 et 45 kDa sont effectivement des albumines ou une contamination par la fraction globulines. Cependant, dans les protéines de légumineuses, la fraction albumines a été décrite comme complexe car elle contient diverses protéines comme des lectines, des inhibiteurs de protéase et d'autres protéines fonctionnelles en plus des albumines 2S (Le Gall et al., 2007b).

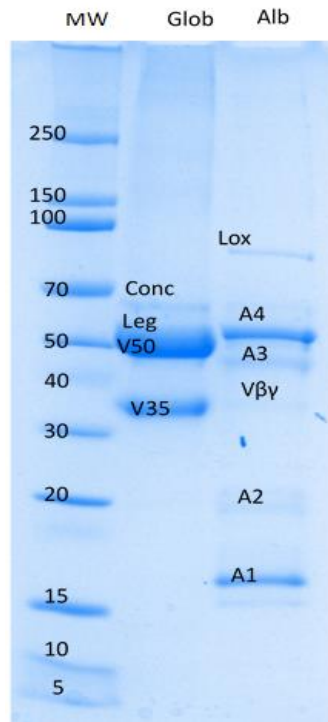


Figure 21 : électrophorogramme de SDS-PAGE en conditions non réductrices des fractions globuline et albumine de Néré. MW = marqueurs de poids moléculaire ; Glob = isolat de globuline ; Alb = isolat d'albumine ; Leg = principales sous-unités de légumine ; Con = conviciline

I.29.3 Le potentiel Zêta

Le potentiel Zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entourent quand elle est en suspension ou en solution. Sa mesure apporte donc une compréhension des causes de dispersion, d'agrégation ou de floculation.

Le potentiel zêta des isolats protéiques de Néré a été mesuré à pH 8 (Figure 22). A ce pH, toutes les protéines étudiées sont solvatées et forment une suspension stable.

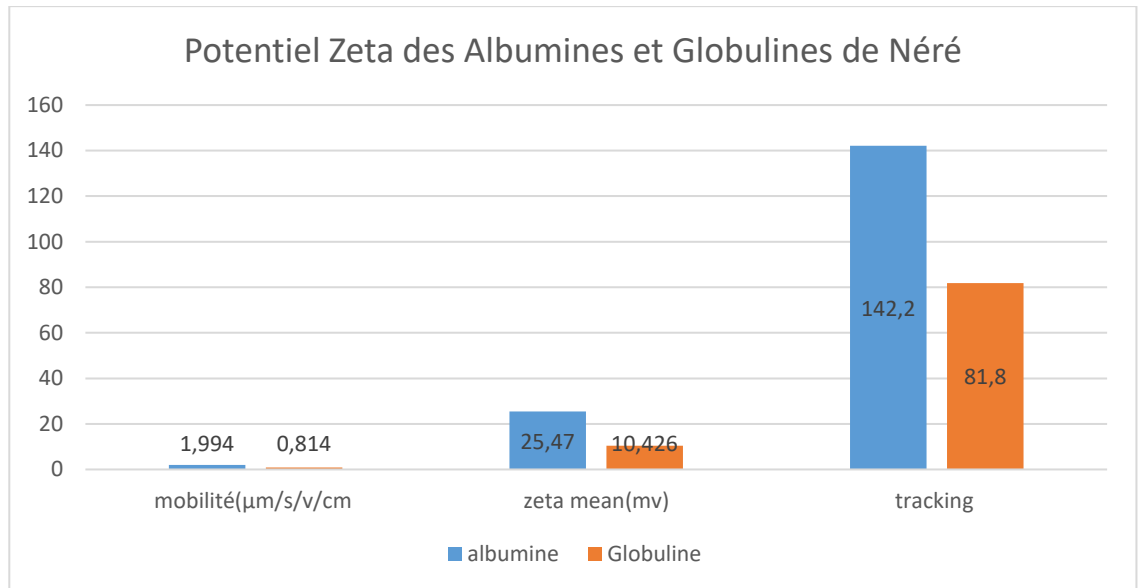


Figure 22: Potentiel Zeta des albumines et globulines du Néré à pH 8

Les valeurs de la charge de la mobilité, du potentiel zêta et le tracking des isolats d'albumine sont plus élevées que ceux des isolats de globulines. Cela serait dû au pH du milieu, à la concentration en sel et la conductivité qui peuvent affecter l'optimisation ou la stabilisation électrostatique pendant les interactions entre particules. Sachant que pour obtenir un système stable avec deux types de particules, il faut que leurs charges soient de même signe et suffisantes afin qu'elles se repoussent.

Les résultats obtenus indiquent dans les travaux de (Stone et al., 2015) sur les protéines du pois que l'augmentation du pH au-dessus du point isoélectrique conduit à un potentiel zêta (ζ) de la protéine de plus en plus négatif, et inversement si le pH diminue au-dessous du point isoélectrique, la charge de surface devient positive. En plus du pH de la solution, la concentration et le type de sel présents dans la solution affectent la charge électrique des biomolécules.

I.29.4 Analyse des profils de thermodénaturation des différents isolats

L'estimation du degré de thermodénaturation des différents isolats (Alb et Glob) protéiques du Néré a été effectuée par une analyse enthalpique différentielle adaptée (micro-DSC). Dans cette étude les isolats de globuline et d'albumine du Néré obtenus à pH 8 par dialyse puis lyophilisation ont une température de dénaturation variable. Le pic de dénaturation est de 89,44°C pour les Alb contre 87,68°C pour les Glob (Figure 23).

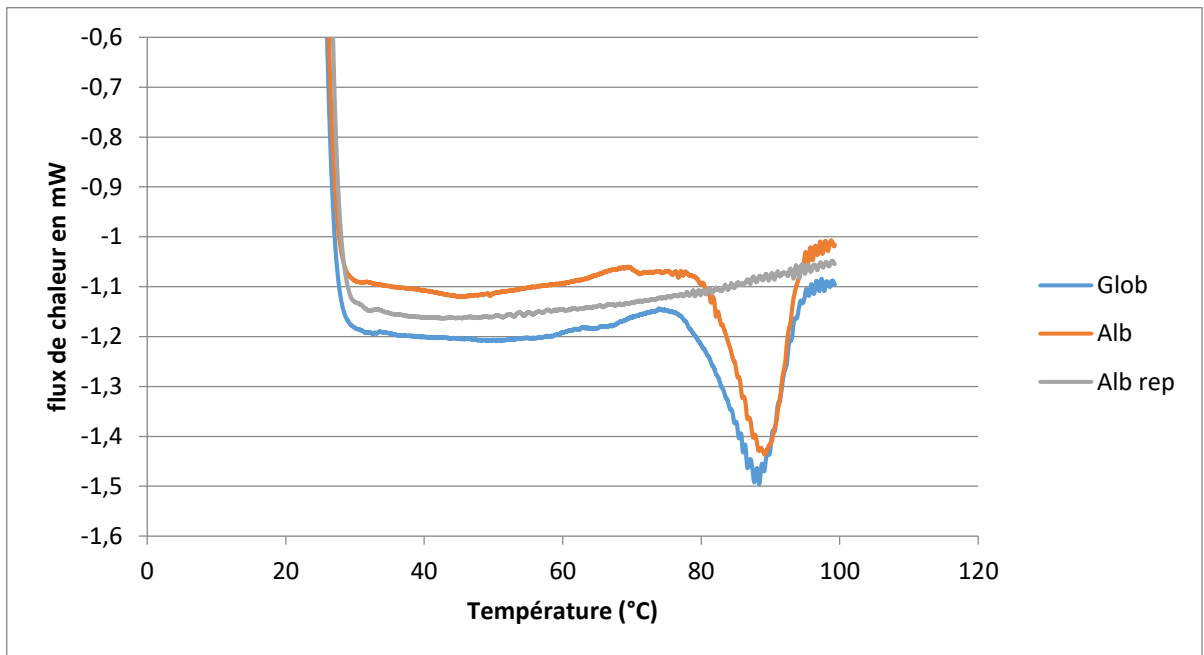


Figure 23: Profil DSC des Albumines et Globulines du Néré

Quant à l'enthalpie elle est de 0,79J/g pour les Alb en revanche elle est de 0,75J/g de protéine pour les Glob du Néré. Cette enthalpie de dénaturation est du même ordre de grandeur pour les isolats du Néré car les conditions d'obtention sont similaires. Les conditions de dialyse suivies de la lyophilisation utilisées dans ce cas de figure ne semblent pas influencer la dénaturation. Par conséquent, un seul pic endothermique est normalement visible par analyse enthalpique différentielle, bien que celui-ci soit le résultat d'une combinaison de phénomènes endothermes et exothermes. (Tanford, 1970) a déclaré que "la dénaturation des protéines n'affecte pas radicalement la séquence des acides aminés, mais affecte la structure quaternaire native drastiquement. Selon (Hermansson, 1978), "la dénaturation n'est pas spécifique et irréversible". Si l'on considère les protéines alimentaires, on peut adopter la définition large selon laquelle, dans la dénaturation, "une protéine individuelle est modifiée physico-chimiquement dans une certaine mesure". Leurs propriétés dépendront de la formation ou non d'un gel, et du type de gel, ces deux facteurs dépendant du degré de dénaturation et de l'étendue de l'agrégation des protéines.

Donc, la structure de la protéine peut être modifiée par différents traitements pour améliorer les propriétés fonctionnelles, le chauffage étant l'un des traitements les plus fréquemment utilisés à cette fin (Yamauchi et al., 1991).

De nombreux chercheurs ont étudié l'effet du traitement thermique dans différentes conditions (température, temps, concentration en protéines, pH, force ionique) sur les propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, l'absorption d'eau, la gélification, l'émulsification et la formation de mousse (Hermansson, 1978; Kinsella, 1979; Petrucci and Anon, 1994). Il a été démontré que la fonctionnalité dépend essentiellement du degré de dissociation, de dénaturation et d'agrégation des globulines 7s et 11s (Arrese et al., 1991; Utsumi et al., 1984)

I.30 Aptitude à la gélification thermique

L'aptitude à la gélification thermique des protéines totales de Néré (globulines et albumines) a été étudiée. A partir d'une extraction à pH8 de farine brute ou délipidée, trois types de suspensions de protéines de Néré ont été préparées. Les isolats des protéines (alb+Glob) non délipidés (IPND) et délipidés (IPD) ont été obtenus après centrifugation et ultrafiltration. Le troisième échantillon (IPT) a été obtenu après une étape de filtration (maille 200µm) à la place de la centrifugation et de l'ultrafiltration pour potentiellement augmenter le niveau de récupération des protéines. Il semblait préférable de limiter les pertes en protéines dans un long processus de séparation/purification des fractions protéiques dans le but de développer de nouveaux aliments riches en protéines. La composition des suspensions de protéines est présentée dans le tableau 10.

Tableau 10: Composition des suspensions de protéines de Néré

Valeur de composition g/L	IPND	IPD	IPT
Protéines	119,3±2,1	119,5±1,9	55,2±1,9
Lipides	75,2±0,1	trace	30,8±0,5
Glucides	Nd	Nd	26,5±1,1
Matière sèche % (p:v)	19,7±0,4	12,0±0,6	11,8±0,5

IPND= Isolat de protéines non Délipidé, IPD= Isolat de protéines délipidé, IPT= Isolat de protéines totales

Les isolats des protéines non délipidés IPND et délipidés (IPD) ont des teneurs en protéines comparables (119 g/L). En effet, l'ultrafiltration a été réalisée jusqu'à la concentration maximale du soluté avant colmatage de la membrane pour ces deux suspensions. L'IPND étant obtenu à partir de farine non délipidée, la matière grasse a

également été concentrée et a une teneur de 75,2 g/L dans la suspension. En conséquence, la matière sèche de la suspension de IPND était de 19,7% (p/v) contre 12,0% pour le IPD obtenu à partir de farine délipidée. Le niveau global de récupération des protéines a été décevant avec seulement 35 % par rapport à la teneur initiale en protéines de la farine de Néré. En effet, de faibles volumes de perméat ont été obtenus en raison de pertes dans le système d'ultrafiltration.

Les concentrations en protéines et en matières grasses de l'échantillon IPT sont respectivement de 55,2 g/L et 30,8 g/L. Les glucides sont à 26,5 g/L. Ainsi, bien que la partie protéique de l'IPT était inférieure à celle de l'IPND ou de l'IPD, la matière sèche de la suspension était de 11,9 % (p/v) et se situait dans la même fourchette que les autres suspensions. Le niveau de récupération des protéines était de 65 % par rapport à la teneur initiale en protéines de la farine de Néré. La filtration utilisée pour obtenir l'IPT a permis un niveau de récupération des protéines plus élevé que le procédé de centrifugation-ultrafiltration. Cependant, les trois suspensions de protéines avaient une stabilité physique différente. Les IPND et IPD étaient des suspensions stables, toutes les matières insolubles étant éliminées par centrifugation. En revanche, la stabilité de l'IPT était transitoire ; une sédimentation est apparue après un stockage de 12 heures à 4 °C. En effet, l'IPT est composé de protéines en suspension, de lipides, de glucides (amidon insoluble) et de particules farines plus fines que 200 µm.

Le tableau 11 indique la concentration minimale de protéines pour la gélification thermique pour les trois types de suspension de protéines. Les concentrations minimales en protéines pour la gélification thermique sont respectivement de 80 g/L pour l'IPND (isolat protéique non délipidé) et de 119 g/L pour l'IPD (isolat protéique délipidé).

Tableau 11: Concentration totale en protéines à pH 7 pour obtenir un gel thermique

	Concentration protéique g/L						
	20	30	40	55	80	100	119
IPND	liq	Liq	liq	Epais	gel	gel	Gel
IPD	liq	Liq	liq	Liq	liq	épais	Gel
IPT	liq	-	-	Gel	-	-	-

IPND= Isolat de protéines non Délipidé, IPD= Isolat de protéines délipidé, IPT= Isolat de protéines totales, Liq= Liquide

Pour l'IPND, la matière sèche de la suspension est plus importante en raison de la présence de la graisse. Le gel a été obtenu avec moins de protéines que pour l'IPD, et la présence de graisse n'a pas interféré dans la construction du réseau moléculaire nécessaire à la formation du gel. Pour l'IPD, la concentration protéique de gélification thermique plus élevée peut être due à une dénaturation partielle des protéines en raison du traitement par solvant pour opérer la délipidation (Sawada et al., 2014; Sessa et al., 1998).

Pour l'IPT, la concentration minimale en protéines pour la gélification thermique était de 55 g/L. Ainsi, la suspension de protéines, la moins purifiée, a permis d'obtenir un gel avec une concentration en protéines plus faible. Les polysaccharides pourraient être impliqués dans la structure du gel. Ils pourraient augmenter la viscosité de la phase aqueuse à l'intérieur du réseau protéique, et améliorer la structure du gel (Berg et al., 2007). Cette hypothèse de départ demande à être vérifiée.

Nos résultats sont comparables à ceux d'autres études sur les extraits de protéines végétales. Les concentrations minimales de gélification de la globuline de pois et de la glycinine de soja sont respectivement de 84 et 66 g/L (sur une base protéique) (O'Kane et al., 2004). Récemment, (Nivala et al., 2021) ont rapporté que l'isolat de protéines de féverole formait un gel thermique à une concentration de 100 g/L. (Lawal et al., 2005) ont signalé une concentration gélifiante plus élevée (180 g/L) pour les fractions de globulines de Néré, préparées par précipitation isoélectrique, par rapport à celle des isolats protéiques de pois, de soja et de féverole. En revanche, la concentration minimale de gélification était de 80 g/L pour un extrait de protéines entières (glob+alb) de Néré. L'extrait le moins purifié donne un gel nécessitant la concentration en protéines la plus faible possible (Lawal et al., 2005).

La gélification thermique des isolats de protéines végétales nécessite de fortes concentrations en protéines. De plus, les processus d'obtention de ces isolats sont complexes et prennent du temps. Cette méthode ne semble pas être très durable pour produire des aliments riches en protéines. L'utilisation d'extraits non purifiés devrait être privilégiée. A titre d'exemple, le modèle de production du jus de soja est intéressant car il permet d'obtenir un gel thermique avec une concentration initiale en protéines de 30 g/L (Mullin et al., 2001). La formation du gel de soja est un processus en deux étapes nécessitant la dénaturation des molécules de protéines suivie de leur agrégation (Kohyama et al., 1995). Le traitement thermique provoque l'exposition des groupes

hydrophobes et les molécules de protéines exposées sont chargées négativement. De plus, l'ajout de sels induit une neutralisation de la charge sur ces agrégats de protéines chauffés, permettant aux interactions hydrophobes de se produire et entraînant la formation de gel (Gandhi and Bourne, 1988; Guo et al., 2015). Cette question devrait être explorée avec les protéines de Néré afin d'améliorer l'étape de gélification à partir de suspensions de protéines à faible concentration.

I.31 Conclusion partielle de la partie 1

Grâce à sa teneur élevée en protéines et en matières grasses, le *P. biglobosa* est une matière première qui devrait trouver d'autres utilisations que sa transformation en condiment. Ainsi, notre travail indique que les graines de *P. biglobosa* sont adaptées au développement de produits à base de protéines. Le processus d'extraction des protéines de la farine de *P. biglobosa* est une étape cruciale. Dans des conditions alcalines et en présence de sel, le taux d'extractibilité peut atteindre 57%. A partir de l'isolat de globuline et d'albumine, une gélification a été obtenue avec des concentrations élevées de protéines. Il est donc raisonnable de conclure que cette méthode ne convient pas à la production d'aliments riches en protéines. En revanche, l'utilisation d'un extrait moins purifié avec un procédé plus simple a permis d'obtenir un gel nécessitant une concentration en protéines plus faible. Des études complémentaires sont nécessaires pour améliorer ce modèle d'aliment riche en protéines, en particulier sur la résistance mécanique du gel et sur l'acceptabilité potentielle par les consommateurs.

Partie 2 : Sélection des bactéries lactiques protéolytiques capables de fermenter le jus de Néré, réduire les facteurs antinutritionnels afin d'accroître la biodisponibilité des nutriments.

Dans cette partie de la thèse on se focalise sur les souches à utiliser, l'impact du traitement thermique sur la flore pathogène, le comportement des souches et la caractérisation des modifications biochimiques de la farine et du jus de Néré.

Quatre souches de *Lactobacillus plantarum* : PFC-P1C1, SFSAC-P1D2, VFVN-P2A12 et VFVN-P2C3 isolées à partir de produits (viande, poisson et soja) fermentés d'Asie du Sud -Est ont été utilisées. Ces souches font partie de la banque de souches de bactéries lactiques du laboratoire international « Tropical Bioresources & Biotechnology », un laboratoire international associant des équipes de l'UMR PAM (AgroSup Dijon, Université de Bourgogne) et de l'Université en Sciences et Technologies de Hanoi (Viet Nam). Ces souches ont été choisies sur la base des performances technologiques, des activités protéolytiques et des paramètres nutritionnels (élimination des facteurs antinutritionnels). Deux autres souches de *L. plantarum* : Lp-WCFS1 et Lp-NC8, largement citées dans la littérature, sont utilisées comme des souches des références. (Diep et al., 2009; Tai et al., 2015)

La quantification de facteurs antinutritionnels (FAN) dans la farine de graines de Néré a été évaluée, par des méthodes standard de spectrophotométrie dans le but de fournir des données qui permettront l'utilisation efficace de la farine et du jus issus de graines avec et sans tégument. La croissance des souches de *L. plantarum* a été évaluée par plusieurs paramètres tels que le dénombrement des colonies, la mesure du pH, et l'acidité titrable.

Enfin l'effet de traitements thermiques et de la fermentation par les souches de *L. plantarum* sur les teneurs en FAN et la digestibilité *in vitro* des protéines a été évalué sur des jus de Néré fermentés. La diminution des principaux antinutriments, inhibiteurs de la trypsine, polyphénols totaux, tanins condensés et acide phytique, et l'augmentation de la qualité de la digestibilité *in vitro* des protéines ont été suivies.

I.32 Facteurs antinutritionnels dans la graine de Néré

Les données concernant la répartition des facteurs antinutritionnels entre la farine entière et celle décortiquée dans la graine de Néré sont rares. Comme dans toutes les légumineuses, le germe contient les plus fortes teneurs en nutriments (protéines, lipides et cendres). Dans les légumineuses, les phytates sont uniformément répartis dans les cotylédons où ils sont associés aux corps protéiques. On retrouve également des facteurs antinutritionnels localisés dans les téguments des graines.

Les facteurs antinutritionnels : polyphénols, tanins, acide phytique et les activités inhibitrices de la trypsine (TIA) dans les graines de Néré ont été déterminés à deux stades : farine de Néré avec tégument et sans tégument.

I.32.1 Polyphénols totaux

Les polyphénols sont connus pour inhiber les activités des enzymes digestives et leur présence, même à de faibles teneurs, n'est donc pas souhaitable, même si les méthodes de transformation et de cuisson réduisent considérablement ce phénomène (Nowacki, 1980).

La farine de graine de Néré avec tégument et sans tégument possède une teneur en polyphénols totaux équivalente de l'ordre de 9,7 mg/g de farine de Néré exprimée en 'Equivalent d'Acide Gallique' (Figure 24).



Figure 24 : Dosage des polyphénols dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument.

Les teneurs en polyphénols totaux entre la farine de graine sans tégument et avec tégument sont similaires. Le tégument représente environ 27% du poids de la graine mais son élimination ne fait baisser la teneur en polyphénols totaux que de 3%. Le décortiquage de la graine n'est donc pas suffisant pour abaisser significativement la teneur en polyphénols totaux dans la farine de Néré. Des études menées par plusieurs auteurs ont montré que les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires qui sont omniprésents dans les plantes et les produits végétaux (Razali et al., 2008). Différentes méthodes de transformation, telles que le trempage, la germination (24–72 h) et le séchage à l'étuve peuvent être utilisées pour réduire significativement les niveaux de polyphénols dans la farine de légumineuses (Alonso et al., 1998; Chau and Cheung, 1997).

I.32.2 Tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés, exprimées en équivalent catéchine, sont présentées sur la Figure 25. La farine de la graine de Néré avec tégument renferme 2,15 mg/g d'équivalent catéchine contre 1,41 mg/g d'équivalent catéchine dans celle sans

tégument. Le décortiquage de la graine permet donc une réduction de 34% de la teneur en tanins dans la farine.

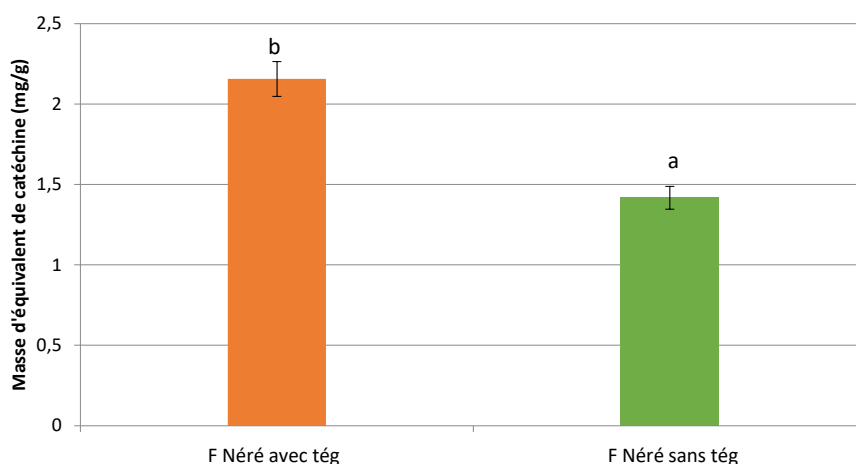


Figure 25: Dosage des tanins dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

La dégradation des tanins condensés peut suivre différentes voies impliquant plusieurs enzymes telles que les décarboxylases et oxygénases et elle peut également être réalisée par activité microbienne (Bhat et al., 1998). Un mécanisme similaire pourrait également être envisagé dans le cas du *Parkia biglobosa*. Les tanins étant principalement concentrés dans les coques, le décortiquage précédent était déjà utile pour réduire leur contenu.

I.32.3 Acide phytique

Les résultats du dosage de l'acide phytique dans la farine de Néré avec et sans tégument sont présentés dans la Figure 26.

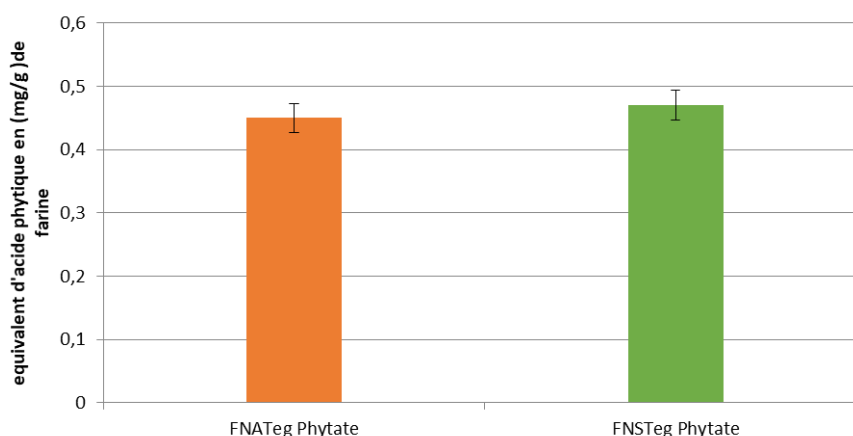


Figure 26: Dosage de l'acide phytique dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument.

L'acide phytique (hexaphosphate de myo-inositol) est considéré comme un antinutriment en raison de sa capacité à chélater les minéraux divalents et à empêcher leur absorption. Les teneurs sont comparables pour la farine avec et sans tégument, 0,473 mg/g et 0,485 mg/g respectivement. Les teneurs disponibles dans la littérature sont comprises entre 0,06 à 1,3 mg/g (Elemo et al., 2011; Gernah et al., 2007; Thompson, 1993). L'origine géographique peut expliquer cette différence de teneur. Les phytates étant majoritairement retrouvés parmi les protéines dans les cotylédons de la graine, il est normal que le dépelliculage n'ait pas d'impact.

L'acide phytique peut être éliminé par traitement thermique ou fermentation. La réduction observée de la teneur en acide phytique dans les graines des légumineuses pendant les traitements thermiques pourrait être en partie due à la nature thermolabile de l'acide phytique et à la formation d'insolubles complexes entre l'acide phytique et d'autres composants (Udensi et al., 2007b).

I.32.4 Activité inhibitrice de la trypsine

Les résultats du dosage de l'activité inhibitrice de la trypsine dans la farine de Néré avec et sans tégument sont présentés dans la Figure 27. Les résultats sont exprimés en quantité de trypsine inhibée (QTI) par gramme d'échantillon testé.

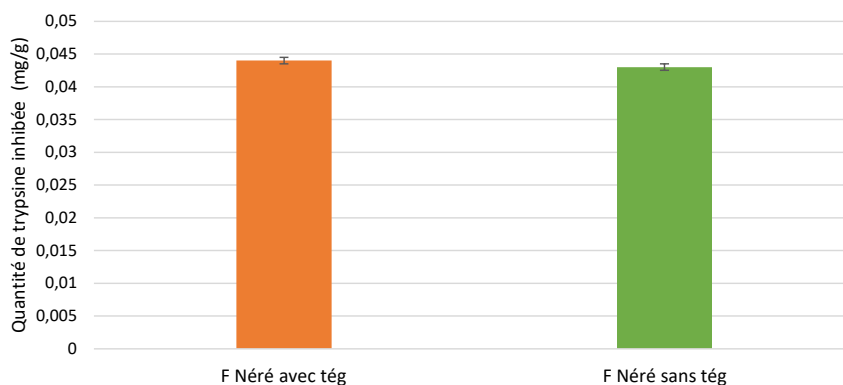


Figure 27: Dosage de l'activité inhibitrice de la trypsine dans les farines de graines de Néré avec et sans tégument.

Les graines de Néré avec et sans tégument contenaient des niveaux similaires d'inhibiteur de trypsine. Les teneurs QTI sont de 0,043 mg/g \pm 0,021 et 0,044 mg/g \pm 0,003 respectivement dans la farine de graines de Néré avec tégument et sans tégument. Il n'y a pas d'impact du dépelliculage. Des valeurs similaires sont données par (Soetan et al., 2014). Consommés sur une longue période, des produits présentant une activité anti-trypsique même faible engendrent les effets négatifs sur le métabolisme protéique (Thompson, 1993).

Les méthodes de traitement impliquant un traitement thermique sont très efficaces pour éliminer l'activité anti-trypsique dans les graines de légumineuses tandis que le trempage et la germination ont un moindre impact (El-Adawy, 2002). L'effet de ce type de traitement sera mis en évidence sur le traitement de jus de Néré avant fermentation.

I.33 Fermentation du jus de Néré

La fermentation du Néré par *Bacillus subtilis* pour produire du soubala est un exemple de fermentation alcaline. Ce condiment alimentaire est considéré comme le plus important de toutes les régions d'Afrique centrale et de l'ouest (Odunfa, 1986). L'étude de cette fermentation a été assez bien décrite dans la bibliographie. Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la fermentation de jus végétal issu de farine de graines de Néré et fermenté par des bactéries lactiques. *Lactobacillus plantarum* étant un genre présentant de nombreuses qualités pour s'implanter dans différents milieux, plusieurs souches isolées de produits fermentés ont été testées sur un jus de graine de Néré.

I.33.1 Obtention d'un jus microbiologiquement stable

Avant ensemencement avec des inocula de *L. plantarum*, nous avons vérifié que notre traitement thermique (pasteurisation) était efficace. Deux barèmes temps/température ont été testés sur le jus de graines de Néré : 95°C, 10 min et 100°C, 10 min. Les bouteilles de 500ml de jus étaient placées dans un bain-marie à la température de consigne. Quand la température au sein du produit atteignait la température de consigne, le temps était alors décompté. Le temps moyen de montée en température des échantillons était de 10 à 14 min. Malgré ce traitement thermique il est apparu que le jus contenait encore des formes de microorganismes capables de se développer après incubation à 37°C pendant 24h. L'hypothèse de formes sporulées de certains germes a été avancée pour expliquer la présence de ces contaminations (Figure 28). Une contamination liée soit à la 'Main d'œuvre', 'à la Matière Première' est envisageable. En effet il faut rappeler que le procédé de dépelliculage se fait à la main, graine par graine, après une étape de trempage de 24h.

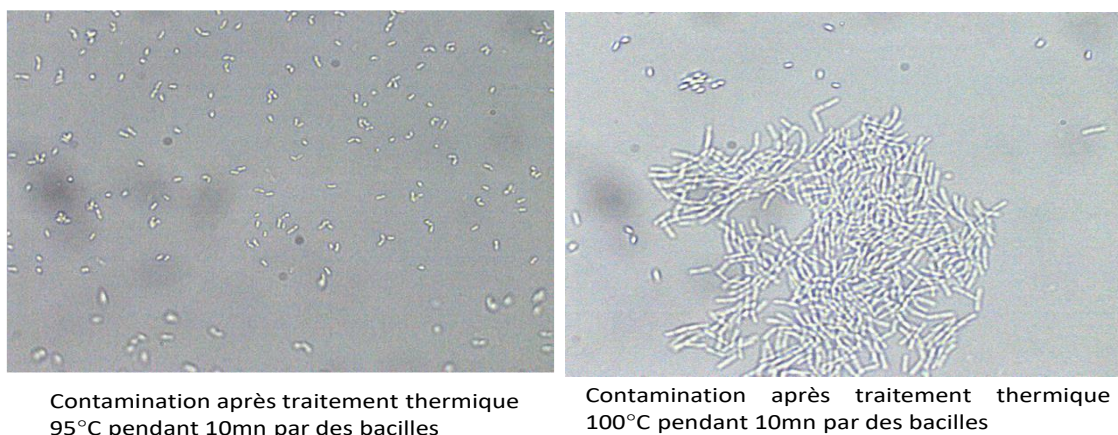


Figure 28: Photographies d'observations au microscope optique (x1000) d'échantillons de jus de Néré incubés à 37°C pendant 24h après traitement thermique

Le traitement thermique est largement utilisé pour prolonger la durée de conservation des produits végétaux. Les ascospores fongiques résistantes à la chaleur qui contaminent ces produits peuvent persister après la pasteurisation (Dijksterhuis, 2019; Santos et al., 2018) Pour obtenir un jus stérile avant ensemencement, un traitement thermique en trois étapes a été mis au point :

1-60°C pendant 10 min > élimination partielle de la flore présente dans le jus de Néré ;

2-incubation pendant 5h à 37°C > germination des formes sporulées ;

3-95°C pendant 10 min > élimination totale des germes.

I.33.2 Croissance des souches de *L. plantarum* sur MRS

Un suivi des paramètres de croissance des différentes souches de *L. plantarum* sur bouillon MRS a été réalisé et les résultats sont mentionnés dans le tableau 12.

Tableau 12: Résultat de dénombrement sur MRS

Souches	Densité optique (Do à 600 nm)		Dénombrement (CFU/ml)	Inoculum (µl) à ajouter à 50 ml à jus de Néré
	Pré culture MRS (24h à 37°C)	Culture MRS (24 à 37°C)		
Lp-NC8	7,320±0,082 ^b	7,477±0,042 ^c	2,85 ^E +09±8,39 ^{£+08b}	175
Lp-WCFS1	6,780±0,061 ^a	6,833±0,119 ^b	1,25 ^E +09±8,62 ^{£+08a}	400
VFVNP2A12	7,470±0,120 ^b	7,497±0,038 ^c	2,50 ^E +09±3,06 ^{£+08b}	200
VFVNP2C3	7,940±0,101 ^c	8,033±0,015 ^d	2,50 ^E +08±2,89 ^{£+08b}	200
PFCP1C1	6,577±0,067 ^a	6,527±0,021 ^a	8,00 ^E +08±7,02 ^{£+07a}	625
SFSACP1D2	7,380±0,030 ^b	7,477±0,107 ^c	1,30 ^E +09±1,15 ^{£+08a}	385

Les données sont la moyenne de trois écarts-types d'expériences indépendantes (n=3). ^{a-c} Les lettres représentent les différences significatives à p<0,05 Lp= Lactobacillus Plantarum, VFVN= ViandeFermentée VietNam, PFC= PoissonFermenté Cambodge , SFSA= Soja Fermenté Salé Cambodge

Après 24h d'incubation à 37°C, les densités optiques relevées sont de même ordre de grandeur avec quelques variations d'une souche à l'autre. Les souches de *L. plantarum* de références et du souchier du laboratoire montrent des moyennes comparables. On observe, comme attendu, une évolution de la croissance entre la pré-culture et la culture des souches. Le dénombrement sur PCA indique une croissance importante des différentes *L. plantarum* entre 8.10⁸ à 28,8.10⁸ CFU/mL. En établissant le lien entre la Densité Optique et la CFU/ml, cela a permis de trouver un volume d'inoculum à ajouter

dans 50 ml de jus de Néré en fonction de la souche pour obtenir un taux d'ensemencement identique de 10^7 CFU/mL. Ce volume est variable pour les souches : PFC-P1C1 (625 μ l), Lp-WCFS1 (400 μ l), SFSAC- P1D2(385 μ l), Lp-NC8 (175 μ l) et identique pour les souches VFVNP2A12 et VFVNP2C3 (200 μ l). Cette variabilité pourrait être due à la nature des matrices alimentaires de départ (viande, poisson, soja).

I.33.3 Croissance des souches de *L. plantarum* dans le jus de Néré

Les mesures du pH, de l'acidité titrable et le dénombrement des bactéries, après fermentation de 24h à 37° C des jus de Néré par les différentes souches sont présentés dans le tableau 13.

Les pH des jus de Néré fermentés par les différentes souches de *L. plantarum* ont été très semblables. Une acidification s'est produite avec une légère diminution du pH pour tous les essais. Le pH initial du jus de Néré était de 5.26, les souches étudiées ont permis une baisse de pH comprise entre 4,62 et 4,55. Il semblerait que la variabilité du comportement des souches soit fonction de leur activité protéolytique ou de la matrice alimentaire de provenance donnant une certaine spécificité aux souches expérimentées.

Tableau 13: suivi de la fermentation après 24h à 37°C dénombrement de CFU/ml dans le jus de Néré fermenté sous ensemencement 10^7 UFC/ml (N0= 10^7 UFC/ml)

Souches <i>L. Plantarum</i>	pH		Fermentation 24h, 37°C	Acidité titrable °D	Dénombrement (CFU/ml) 24 h, à 37°C	Log N/N0
	Av thermique	Après thermique				
NC8	5,50±0,01	5,26±0,06	4,58±0,01 ^b	106,80±0,51 ^c	1,13.10 ⁹ ±1,7.10 ⁸ ^{cd}	2,05
WCFS1			4,55±0,01 ^a	105,60±0,51 ^c	4,40.10 ⁸ ±1,15.10 ⁷ ^a	1,6
VFVNP2A12			4,62±0,02 ^c	108,00±0,00 ^c	1,42.10 ⁹ ±2,0.10 ⁸ ^d	2,15
VFVNP2C3			4,56±0,01 ^{ab}	105,90±1,3 ^c	6,40.10 ⁸ ±1,22.10 ⁷ ^{ab}	1,80
PFCP1C1			4,61±0,01 ^c	99,90±1,8 ^b	5,30.10 ⁸ ±7,57.10 ⁷ ^a	1,72
SFSACP1D2			4,57±0,06 ^b	100,80±0,51 ^b	9,00.10 ⁸ ±8,33.10 ⁷ ^{bc}	1,95
Jus control			5,26±0,06	63,60±0,51 ^a	0,00 +00	0

Les données sont la moyenne de trois écarts-types d'expériences indépendantes (n=3). ^{a-d} Les lettres représentent les différences significatives à p<0,05

Comme pour toutes bactéries lactiques, le taux de diminution du pH était une indication de la performance de croissance des souches. Les souches VFVN-P2A12 et PFC-P1C1 sont celles qui acidifient le moins le milieu, la souche de référence Lp-WCFS1 étant celle qui abaisse le plus le pH. Les souches de *L. plantarum* sont donc capables de s'implanter et d'utiliser les sucres initialement contenus dans le Néré comme substrats pour leur croissance. Des études antérieures ont également démontré la capacité de *L. plantarium* à fermenter les légumineuses (Ren-You Gan et al., 2017; Sarkar and Tamang, 1995).

L'augmentation de l'acidité titrable suspecte la production d'acide lactique au cours de la fermentation (Tableau 13). L'acidité titrable du témoin était de 63.6° Dornic. La souche VFVNP2A12 a produit le plus d'acides avec un degré Dornic de 108. Les valeurs d'acidité titrable sont à corrélérer avec l'accroissement de la population bactérienne. En effet les jus présentant les acidités titrables les plus élevés ont les populations bactériennes les



Figure 29: Echantillons de jus de Néré fermenté par *L. plantarum* : deux souches de références (Lp-NC8 et Lp-WCFS1 et quatre souches du laboratoire

plus importantes en UFC/mL. Nos résultats sont en accord avec une étude menée sur les céréales par (Guyot et al., 2003) qui ont montré des productions d'acides lactique et acétique.

A la fin de la fermentation, l'abaissement du pH a permis la gélification du jus de Néré. On obtient un gel faible type 'yaourt', qui se maintient dans le tube après retournement (Figure 29). Les produits fermentés présentaient des notes aromatiques associées à la fermentation lactique, ce qui améliore positivement la qualité d'odeur du jus de Néré qui présentait une odeur globale très verte, végétale.

I.34 Digestibilité *in vitro* des protéines dans le jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté

La mesure de la digestibilité ou simulation de digestion gastro-intestinale *in vitro* (GIS) a été un moyen utile pour prédire le devenir des protéines du jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté par l'utilisation des deux enzymes impliqués dans la digestion gastrique et intestinale. Les résultats sont répertoriés dans les Figures 30 et 31 suivantes.

I.34.1 Digestibilité des protéines du jus de Néré cru et traité thermiquement

La digestibilité *in vitro* a été établie en suivant un protocole discontinu en système tampon impliquant la pepsine et la pancréatine (trypsine–chymotrypsine). L'échantillon contrôle (caséinate de sodium) a été hydrolysé à 100% dans nos conditions expérimentales. Le taux d'hydrolyse des protéines du jus de Néré cru a été de 53%. Cela pourrait être dû à la résistance des globulines, principales protéines de l'échantillon, et à la présence d'une quantité considérable de facteurs antinutritionnels tels que l'acide phytique, polyphénols, tanins et facteurs antitrypsiques.

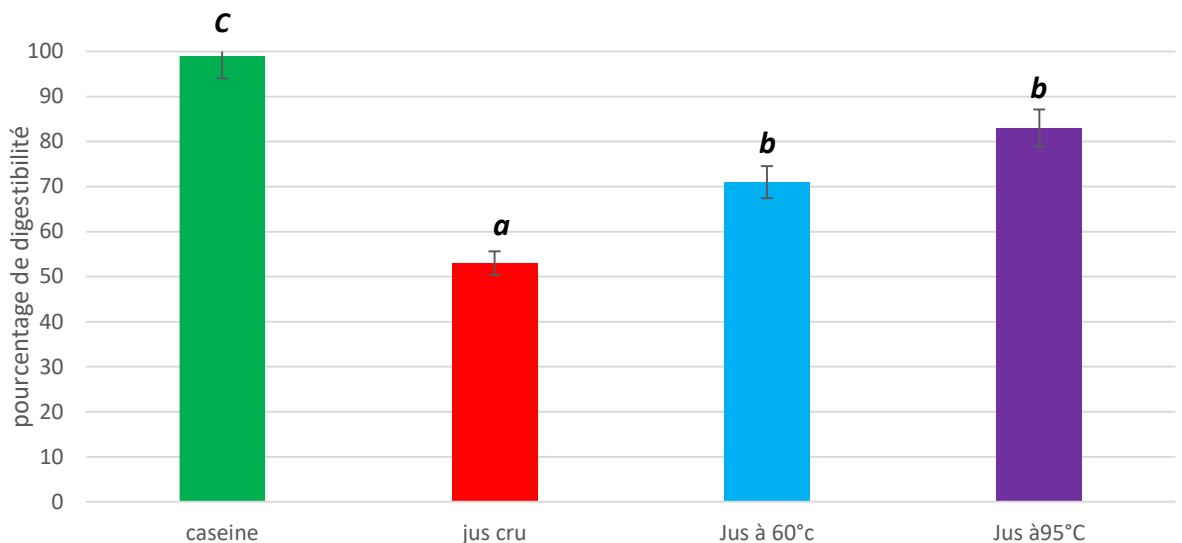


Figure 30: pourcentage de digestibilité *in vitro* des protéines du jus de Néré avec et sans traitement thermique. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

L'acide phytique diminue la solubilité de la protéine en la liant et il peut également rendre la protéine plus résistante à la digestion protéolytique (Deshpande et al., 1982). Les tanins sont également connus pour entraîner l'inactivation des enzymes digestives et insolubilité des protéines (Reddy et al., 1985).

La digestibilité des protéines du jus de Néré traité thermiquement s'est améliorée progressivement avec les températures de traitement 60°C et 95°C. Les températures de traitement et le temps semblaient avoir un effet cumulatif sur l'amélioration de la digestibilité des protéines dans le jus de Néré. Cependant le traitement statistique ne montre aucune différence significative entre le jus traité à 60°C et 95°C pendant 10 min. Le protocole utilisé est une succession d'étapes qui engendrent une variabilité potentiellement importante. Ceci explique que même si la tendance sur les moyennes montrait une amélioration du taux d'hydrolyse à 95°C, ce résultat ne ressort significativement différent. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature sur le traitement thermique de protéines qui rapportent une augmentation de la digestibilité *in vitro* de protéines peut s'expliquer par l'élimination d'une partie des substances anti-nutritionnelles telles que les phytates, les tanins et les inhibiteurs de trypsine, dont les teneurs baissent considérablement après un certain temps de cuisson (Elsheikh et al., 2000 ; Clemente et al., 2000).

Une autre raison pouvant expliquer l'augmentation de la digestibilité *in vitro* des protéines est la dénaturation des structures moléculaires des protéines au cours du traitement thermique. En effet, la température entraîne la rupture des liaisons hydrogènes et hydrophobes ; la molécule protéique se trouvant ainsi ouverte et les protéines plus exposées aux sites actifs des enzymes digestives (Duodu et al., 2003).

I.34.2 Digestibilité *in vitro* du jus de Néré fermenté par les souches de *L. plantarum*

La digestibilité *in vitro* de protéines contenues dans le jus de Néré fermenté avec les différentes souches est reportée sur la Figure 31.

L'un des objectifs de cette étude est d'améliorer la digestibilité des protéines du jus de Néré fermenté par l'utilisation des souches de *L. plantarum* pour augmenter la valeur nutritionnelle de ce dernier.

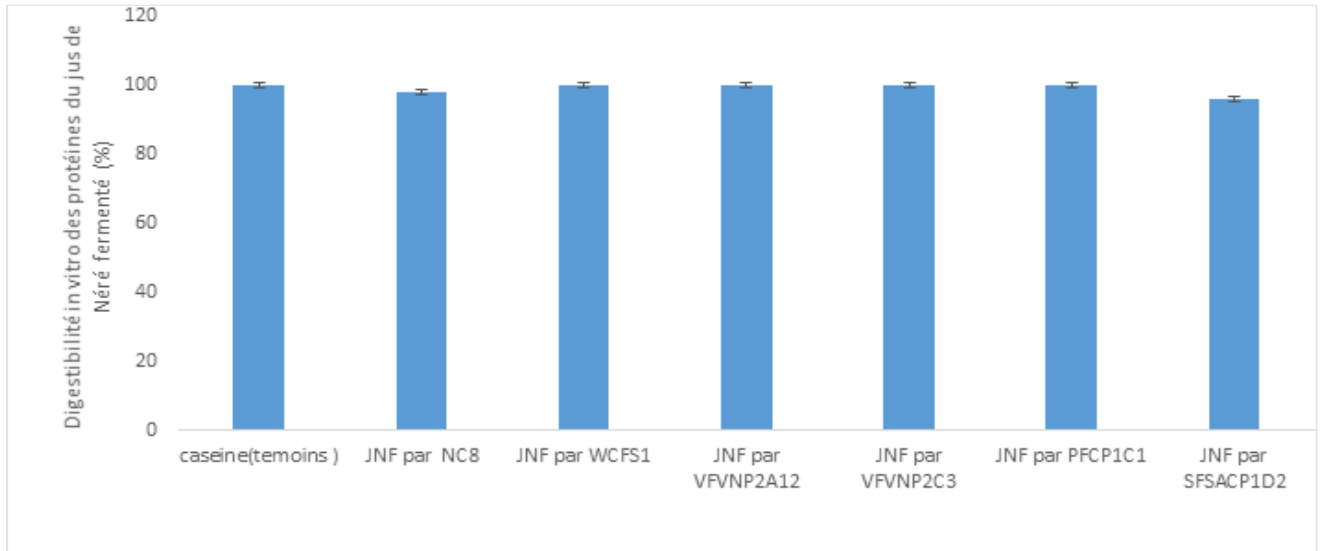


Figure 31: pourcentage de digestibilité *in vitro* des protéines du jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum* utilisées.

JNF= Jus de Néré Fermenté, JNFVFVN= Jus de Néré Fermenté ViandeFermentée VietNam, PFC= PoissonFermenté Cambodge, SFSAC= Soja Fermenté Salé Cambodge

Quelle que soit la souche, la digestibilité *in vitro* du jus de Néré fermenté est comparable à celle du contrôle sur caséinate de sodium. Les taux sont de l'ordre de 95-98%. Les jus ayant été traités thermiquement, accroissent le taux d'hydrolyse de 58%, la fermentation a permis de gagner +19% de taux d'hydrolyse.

Les expériences précédentes ont montré que le trempage dans l'eau, le dépelliculage et le traitement thermique ont un effet important de réduction des facteurs antinutritionnels (tanins, facteurs antitrypsiques, phytates) de la matière première utilisée pour obtenir le jus de Néré. L'effet de la fermentation peut être expliqué en partie par la présence de plusieurs activités enzymatiques : phytases, polyphénol oxydases chez les souches de *L. plantarum* qui contribuent à une diminution significative des facteurs antinutritionnels. Ce résultat est en accord avec les études faites par (Chau et al., 1997; Moubarak, 2005), qui ont signalé que différentes méthodes de traitement traditionnel tels que le décorticage, le trempage, la cuisson, la fermentation ou la germination ont un

impact pour améliorer la qualité nutritionnelle des légumineuses alimentaires à divers degrés.

Lors de la fermentation une activité protéasique élevée a souvent été rapportée dans la fermentation des aliments protéinés à base de soja : le tempeh et miso (Kao and Robinson, 1978), soja fermenté (Boralkar and Reddy, 1985; Grewal, 1992 ; Goyal 1991). Une augmentation de l'azote aminé par la fermentation signifie une dégradation partielle des protéines en peptides et acides aminés, résultant en une amélioration des protéines digestibles (Kao and Robinson, 1978).

Les effets de la fermentation sur ces différents paramètres ont été déterminés dans la suite de notre étude.

I.35 Facteurs antinutritionnels dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum*

I.35.1 Polyphénols totaux dans le jus de Néré fermenté par les souches de *L. plantarum*

Des variations importantes se sont produites dans le contenu polyphénolique du jus de Néré fermenté à 37°C pendant 24H par les différentes souches de *L. plantarum* (Figure 32). Le témoin correspond au jus de Néré cru.

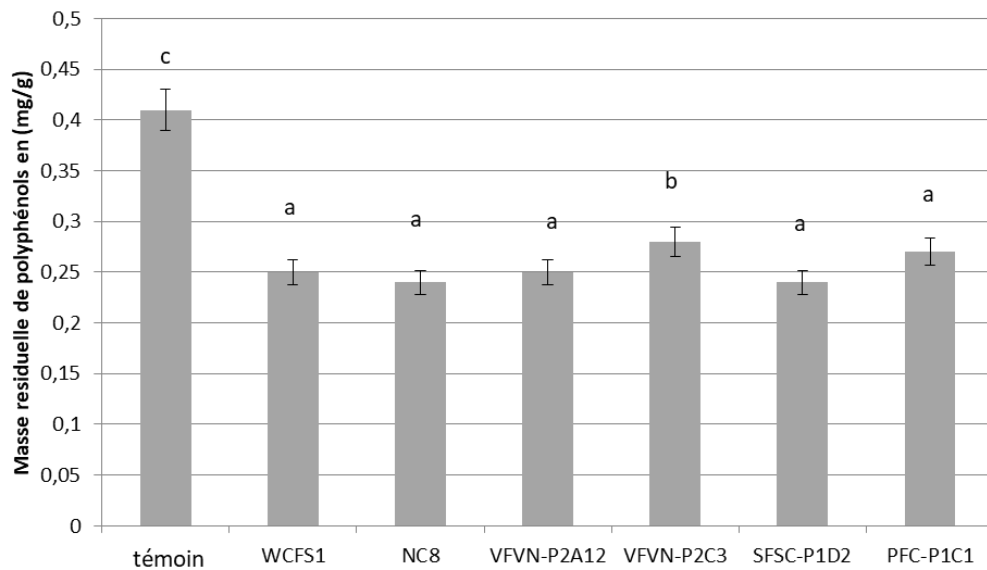


Figure 32: Dosage des polyphénols dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum* utilisées. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

Selon les souches utilisées, les teneurs en polyphénols sont réduites de 31 à 41% par rapport au témoin. Un traitement statistique nous montre que les souches : NC8, SFSC-P1D2, VFVNP2A12 et WCFS1 ont un impact similaire sur la teneur en polyphénols. Par contre la souche VFVN-P2C3 engendre une plus faible baisse de la concentration polyphénols totaux dans le jus fermenté que les précédentes. L'effet de la fermentation sur les polyphénols peut être dû à l'activité du polyphénol oxydase présente chez les souches utilisées. Une baisse de la teneur en polyphénols pendant la fermentation a été signalée plus tôt dans divers aliments fermentés, le mil fermenté par des cultures pures de levures et de lactobacilles (Dhankher and Chauhan, 1987 ; Khetarpaul and Chauhan, 1990).

I.35.2 Tanins condensés dans le jus de Néré fermenté par les souches de *L. plantarum*

La valeur du témoin correspond à la teneur en tanins dans la farine de graine de Néré décortiquée non traitée thermiquement. Après fermentation nous observons une réduction variable de la teneur en tanins par toutes les souches de *L. plantarum* utilisées mais non significativement différente (Figure 33).

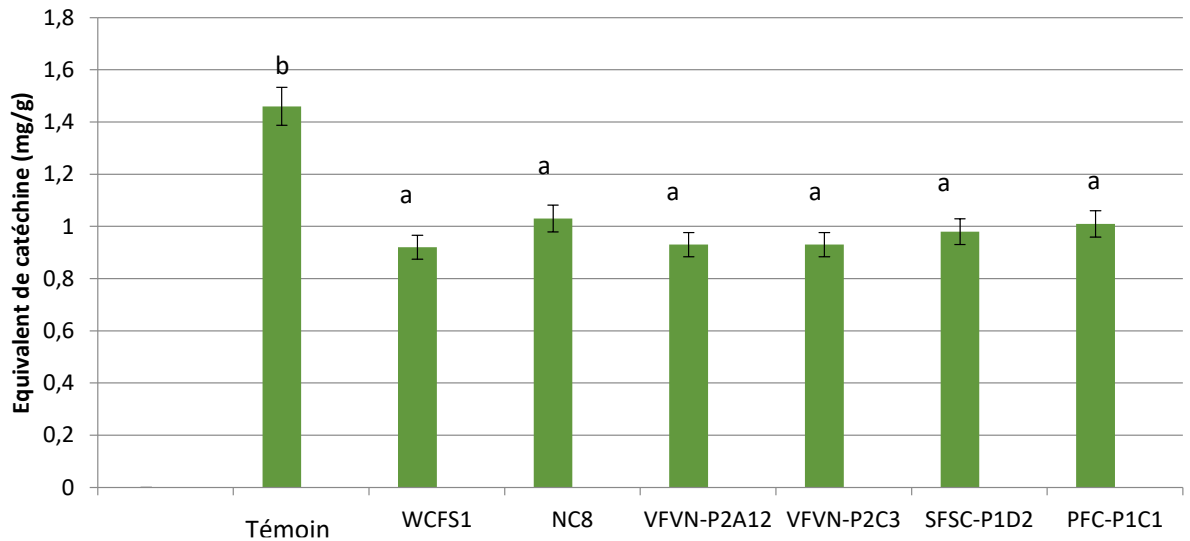


Figure 33: Dosage des tanins dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum* utilisées. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

La réduction des tanins est de l'ordre de 35% par rapport au témoin. Comme montré précédemment le décorticage (prédominance des tanins dans le tégument) des graines de Néré permet une élimination de près de 50% des tanins présents dans la graine complète. Le trempage et le traitement thermique ont probablement une part importante dans la réduction des tanins par rapport à l'effet stricte de la fermentation. Ces résultats concordent avec ceux de (Moubarak, 2005) qui ont trouvé que la teneur en tanin des graines de haricot mungo (*Vigna radiata*.) était réduite après trempage à l'eau pendant 12 h, l'ébullition dans l'eau du robinet pendant 90 min, l'autoclavage à 121° C pendant 35 min et la cuisson au micro-ondes pour 15 min, respectivement. Ils sont également conformes à ceux rapportés par (Udensi et al., 2007b) qui ont découvert que la teneur en tanin dans le niébé végétal a été réduit de 37, 12,5 et 37 % après trempage dans l'eau bouillante pendant 45 min, étuvage à 120° C pendant 30 min ou passage à l'autoclave à 120° C pendant 15 min, respectivement.

I.35.3 Acide phytique dans le jus de Néré fermenté par les souches de *L. plantarum*

La fermentation du jus de Néré par les souches de *L. plantarum* en expérimentation affiche une réduction variable de la teneur en acide phytique de près de la moitié par rapport au témoin (Figure 34). Le témoin correspondait au jus de Néré cru.

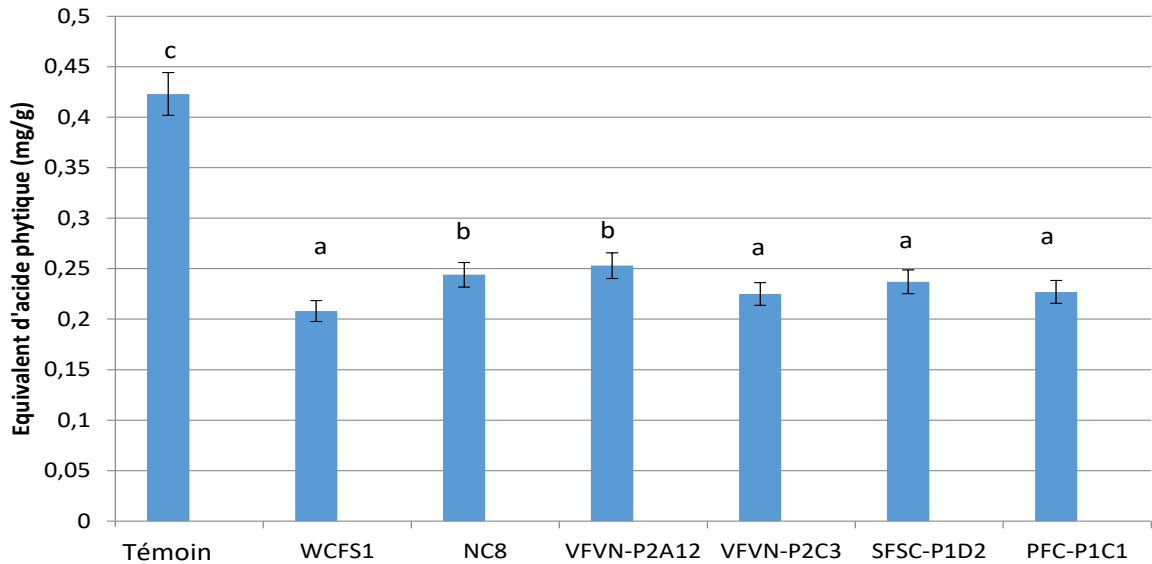


Figure 34: Dosage de l'acide phytique dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum* utilisées. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

De faibles variations sont observées entre les souches par rapport à leur capacité à réduire la teneur en acide phytique. Les essais fermentés avec les souches Lp-NC8 et VFVN-P2A12 ont des teneurs en acide phytique un peu plus élevées 0.24 et 0.26 (mg/g) respectivement, que ceux fermentés avec les autres souches testées : SFSC-P1D2, PFC-P1C1, VFVN-P2C3 et WCFS1, qui ne sont pas différents significativement entre eux.

Ces résultats sont soutenus par une étude précédente faite par Lopez et al. (1983), qui ont montré la réduction de la teneur en acide phytique dans les produits fermentés par une large gamme de microflore possédant une activité phytasique. Une réduction sensible de la teneur en phytate de 68% due à la phytase endogène a été mise en évidence lors de la fermentation de haricots secs pré-trempés (*P. vulgaris L.*) pendant 48 h, sans l'ajout d'une culture de démarrage (Sandberg and Andlid, 2002)

I.36 Activité protéolytique des souches de *L. plantarum* sur le jus de Néré fermenté

Les teneurs en peptides des jus de Néré fermentés (24 h d'incubation à 37°C) ont été déterminées par la méthode au Folin Ciocalteu et les résultats sont exprimés en équivalent tyrosine (Figure 35). Une augmentation de la teneur en polypeptides a été observée pour toutes les souches étudiées à la fin de la fermentation. Par rapport au témoin (jus de Néré cru). Etant donné les faibles écarts entre les valeurs en fonction des souches, il est difficile de différencier les souches entre elles. Seule la souche PFC-P1C1 présente une activité protéolytique clairement plus faible.

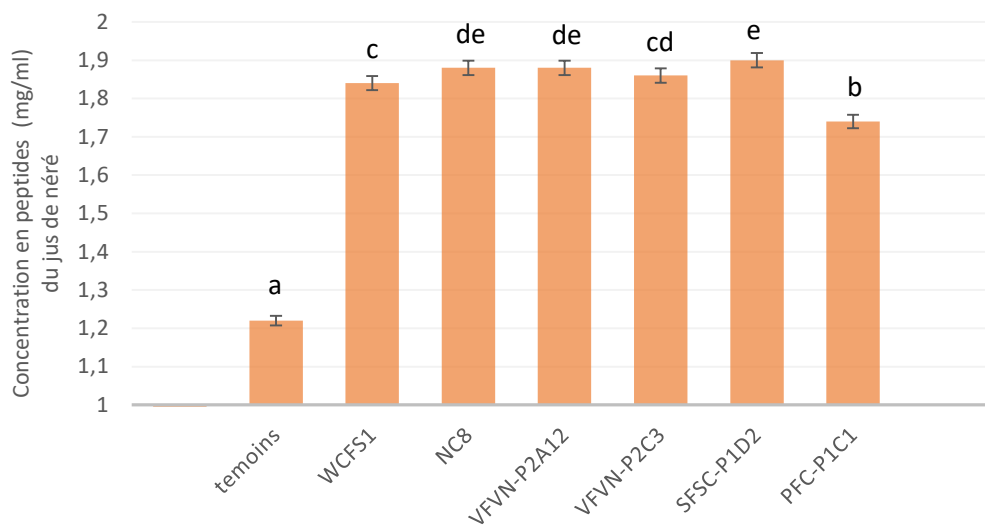


Figure 35 : Concentration en peptides dans le jus de Néré fermenté par les différentes souches de *L. plantarum*. Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

L'augmentation de la teneur en peptides après la fermentation lactique peut s'expliquer par la capacité protéolytique des souches utilisées qui ont permis la dégradation des protéines. En effet, certaines bactéries lactiques possèdent un système complexe de dégradation, d'assimilation et d'utilisation des protéines, constitué de protéases et peptidases et intracellulaires membranaires et de plusieurs systèmes d'absorption de peptides (Savijoki et al., 2006). Selon les souches de *L. plantarum*, les données de la littérature mettent en évidence, soit une faible capacité protéolytique comme pour *L. plantarum* WCFS1 qui dégrade peu les protéines (Dallagnol et al., 2013

; Liu et al., 2010), soit une puissante capacité protéolytique comme observée chez *L. plantarum* B1-6 (Rui et al., 2015; Wu et al., 2015).

Les résultats de la présente étude ont démontré que la capacité protéolytique de *L. plantarum* était dépendante de la souche et que certaines souches, à savoir *L. plantarum* SFSC-P1D2, NC8, VFVN-P2A12 et VFVN P2C3, présentaient une capacité protéolytique plus élevée que les autres. Cette capacité protéolytique chez les souches utilisées est à mettre en relation avec le taux de la digestibilité *in vitro* des protéines sur les jus de Néré fermentés qui atteint près de 98%.

I.37 Conclusion partielle sur la partie 2

Toutes les souches de *L. plantarum* choisies se sont implantées dans le jus de Néré. Certaines ont montré des activités protéolytiques plus importantes ce qui présentent un intérêt pour améliorer la digestibilité des protéines. Il apparait que la combinaison des procédés physique (trempage, traitement thermique) et biologique (fermentation) permet de réduire significativement les teneurs en FAN et d'améliorer la digestibilité *in vitro* des protéines du jus de Néré fermenté. La réduction de la teneur en acide phytique et des polyphénols dans les produits fermentés, a été renforcé par les activités phytasique et le polyphénol oxydase présentes chez les souches utilisées.

Le produit fermenté présente une texture de gel faible due aux traitements et à l'acidification du milieu au cours de la fermentation lactique. Il a été relevé que la qualité d'odeur du produit a été améliorée avec la production de note « lactique ». La fermentation par *L. plantarum* apparait donc comme un procédé très intéressant pour améliorer du point de vue nutritionnel et organoleptique des produits à base de jus de Néré.

Partie 3 : Caractérisation des gels de Néré en fonction des concentrations en $MgCl_2$ et $CaCl_2$, étude des propriétés des gels de Néré type tofu

Cette partie de la thèse est consacrée à la fabrication d'un modèle alimentaire 'tofu' de Néré qui répond à l'objectif de développement de nouveaux produits riches en protéines d'origine végétale comme alternative à l'usage du soja comme ingrédient de base.

En partant du principe de préparation d'un tofu de soja, des jus de soja et de Néré ont été obtenus à partir de farines de soja et de Néré, fixant la teneur en matière sèche et en protéines. Les deux jus (soja et Néré) ont subi un traitement thermique de 95°C pendant 10 min.

Afin de déterminer la quantité de sels bivalents ($MgCl_2$ et $CaCl_2$) nécessaire pour une agrégation optimale des protéines, des expériences sur des jus dilués de soja et de Néré ont été conduites par deux méthodes : en tube avec centrifugation et par analyse de la turbidité des suspensions protéiques.

Enfin les caractéristiques rhéologiques des tofus ont été étudiées par un test de compression uni axial et par rhéométrie dynamique (caractéristiques viscoélastiques).

Une analyse sensorielle des tofus était initialement prévue en Guinée, avec une cohorte de consommateurs. Malheureusement cette étude n'a pu être faite compte tenu des conditions sanitaires liées à la pandémie du Covid-19.

I.38 Composition chimique des jus de Soja et de Néré

Les jus de soja et de Néré ont été obtenus à partir de farine de graines sans tégument, mis en suspension dans une solution aqueuse à pH10 puis filtrés sur filtre nylon 200 mesh. La teneur en protéines des jus est donnée dans le tableau 14.

Tableau 14: Teneur en protéines et matière sèche des jus de soja et Néré

Echantillons	g protéines / 100 g jus	%MS	% protéines/MS
Jus de Soja	5,56±0,35 ^b	17,04±0,71	32,64 ^b
Jus de Néré	4,48±0,051 ^a	14,87±0,61	30,17±0,051 ^a

Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

La teneur du jus de Néré est de 4,48 g de protéines pour 100 g de jus. Cette teneur est suffisante pour réaliser les différentes expériences avec le jus de Néré sans dilution. Cette teneur est plus élevée pour le jus de soja qui est de 5,56 g pour 100 g de jus, la farine de soja étant initialement plus riche en protéines. Le taux de récupération en protéines par rapport à la teneur initiale des farines est intéressant avec le procédé utilisé car il est de l'ordre de 65%. Les jus obtenus contiennent des lipides et polysaccharides (teneur non déterminée) et ont des teneurs en matière sèche comparables. L'étude comparative des tofus de soja et de Néré sera donc plus facile.

I.39 Effet des sels bivalents pour l'agrégation des protéines des jus de Néré et soja

I.39.1 Etude en tube à essai

Afin de déterminer la quantité de sels bivalents nécessaire pour une agrégation optimale des protéines, des jus de soja et de Néré à teneur fixe en protéines ont été traités thermiquement, puis des solutions de $MgCl_2$ et $CaCl_2$ à différentes concentrations ont été ajoutées. La répartition des protéines entre le surnageant et le culot permet d'estimer les concentrations en sels bivalents permettant d'obtenir les plus grandes quantités de protéines agrégées. Les résultats pour le jus de soja et le jus de Néré sont présentés sur les figures 36 et 37.

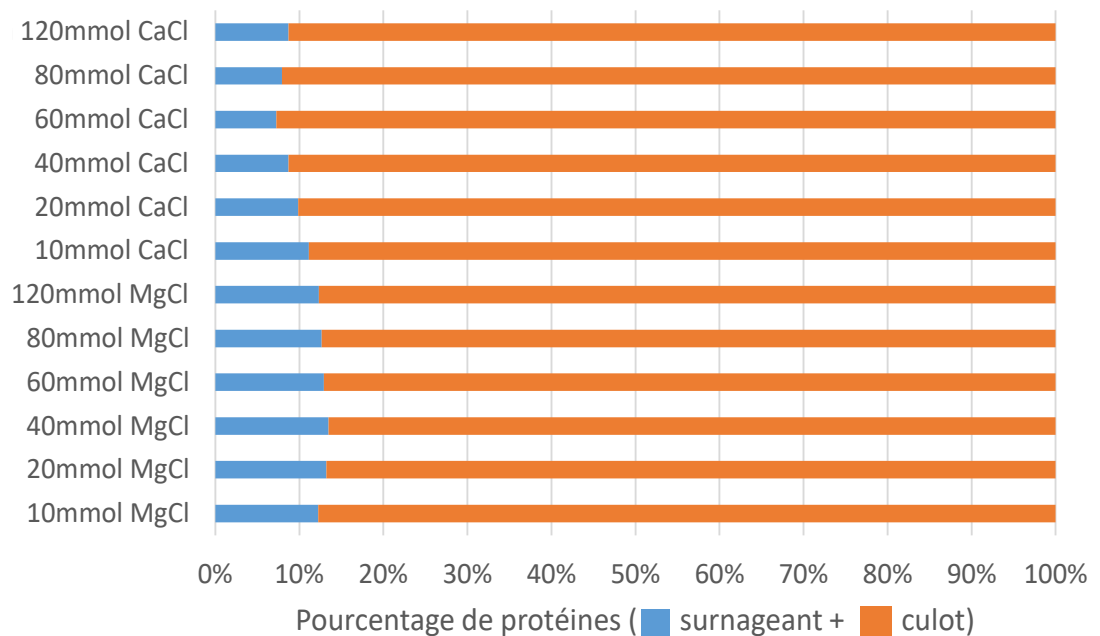


Figure 36 : Pourcentage en protéines dans le surnageant et le culot en fonction des concentrations de sels bivalents dans le jus de soja

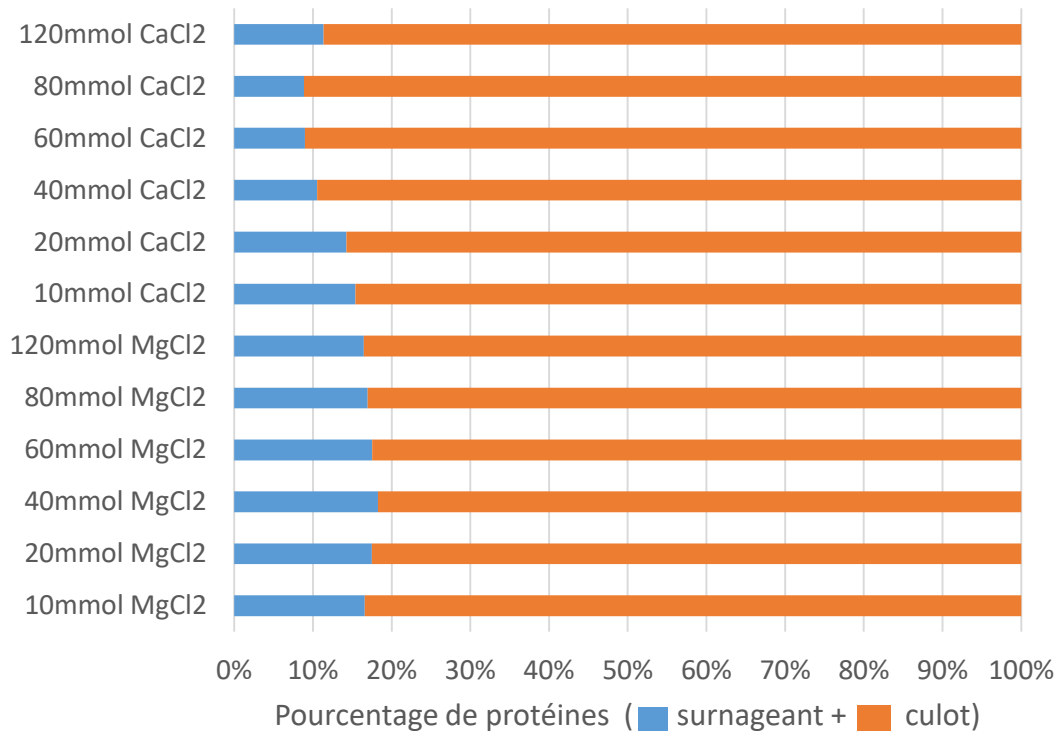


Figure 37: Pourcentage en protéines dans le surnageant et le culot en fonction des concentrations de sels bivalents dans le jus de Néré

Pour pouvoir étudier les effets de concentration de MgCl₂ et CaCl₂, l'expérience a été conduite avec des jus dilués. La concentration en protéines était de 1,5 g /100 ml. Cela a permis de différencier les effets MgCl₂ et CaCl₂ en fonction de la concentration. Le sel de calcium a un effet comparable sur les protéines de soja et de Néré. On constate une diminution de la quantité de protéines dans le surnageant avec les concentrations croissantes jusqu'à 60 mM puis une faible augmentation signifiant une plus faible agrégation des protéines. A la concentration de 60mM CaCl₂, 7 à 9% de la quantité de protéine initiale du jus n'est pas agrégée.

Avec le MgCl₂, aucune différence significative n'a été mesurée sur les quantités de protéines dans les surnageants de jus de soja ou de Néré en fonction de la concentration en sel (10 à 120 mM). Il reste en moyenne 15% de la quantité de protéine initiale du jus qui n'est pas agrégée.

Sans traitement thermique du jus végétal, il est seulement observé une sédimentation des protéines. Une fois que les protéines ont subi une dénaturation thermique, celles-ci vont s'agréger entre elles, les sels bivalents facilitant le phénomène. Des travaux antérieurs ont montré que les globulines de soja, principalement la

fraction 11S, fixent le Ca^{2+} et le Mg^{2+} en induisant la formation d'agrégats (Rao and Rao, 1975). L'effet négatif sur l'agrégation à des teneurs plus importantes en sels bivalents a déjà été montré. (Sorgentini et al., 1995) ont rapporté que les dilutions aqueuses de l'isolat de soja natif atteignent un maximum de turbidité dû à l'agrégation à une concentration de 40 mM MgCl_2 . A des concentrations plus élevées de MgCl_2 , la turbidité diminue, indiquant ainsi la dissociation des agrégats de protéines.

I.39.2 Etude au Turbiscan

L'analyseur Turbiscan® Lab (Formulaction, France) a été utilisé pour étudier la stabilité des suspensions protéiques des échantillons testés en présence de sels bivalents. L'instrument est équipé de deux capteurs optiques synchrones qui mesurent la lumière transmise (T) et rétrodiffusée (BS), c'est à dire la lumière qui traverse l'échantillon et la lumière rétrodiffusée par l'échantillon, respectivement. Une lumière en mode balayage est émise directement dans l'échantillon, traversant l'échantillon du bas vers le haut.

Les échantillons de jus de soja et de Néré avec différentes concentrations de MgCl_2 ont présenté des profils de transmission et de rétrodiffusion qui évoluent au cours du temps. La diminution de la transmission dans le fond de l'échantillon indique une sédimentation. A l'opposé, la transmission augmente dans la partie supérieure de l'échantillon, indiquant la formation d'une couche de clarification. L'augmentation au milieu de l'échantillon indique que les particules ont augmenté de taille (floculation) permettant aux photons de traverser l'échantillon sans être diffusés. Une valeur de l'indice de stabilité Turbiscan (TSI) est calculée à partir des différentes valeurs. Toute déstabilisation d'une suspension protéique dans un milieu aqueux peut être déterminée par l'indice TSI. Plus la valeur TSI est élevée plus la stabilité de la suspension protéique est faible, et donc sa tendance à s'agréger et à se désagréger élevée.

La Figure 38 présente l'analyse de la stabilité globale de jus de Néré au moyen de la variation du TSI.

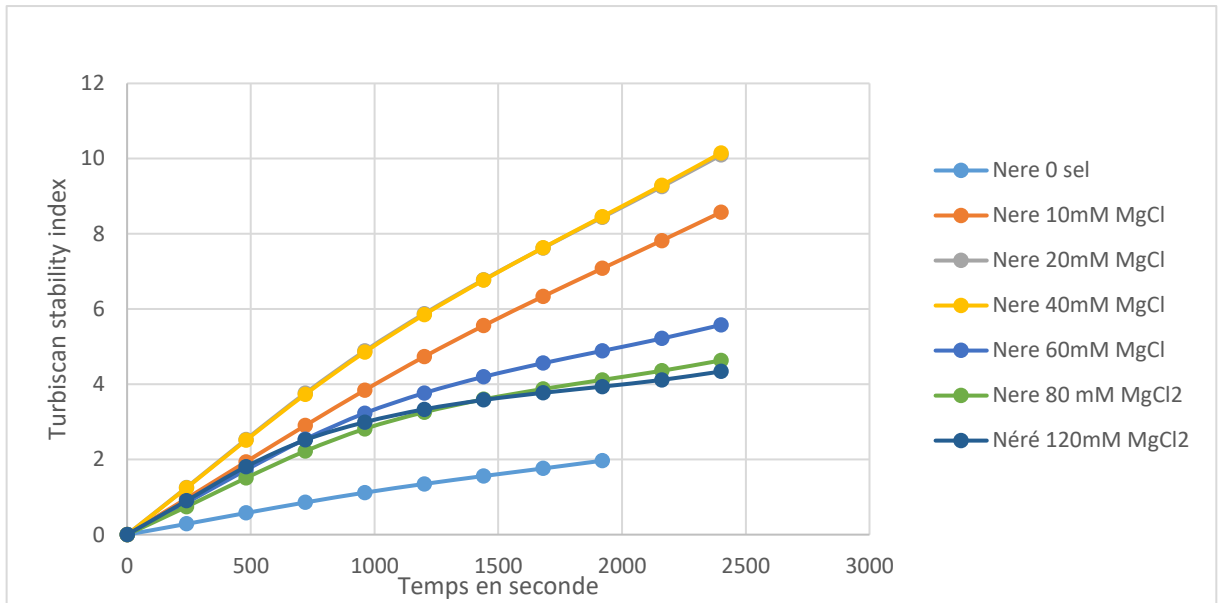


Figure 38: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Néré avec différentes concentrations du sel MgCl₂

Les profils TSI pour les échantillons de jus de Néré avec 120, 80, 60 mM de MgCl₂, sont très similaires et indiquent une déstabilisation de la suspension protéique en comparaison avec le profil de transmission le plus stable : contrôle Néré 0 sel. Les échantillons à 20 et 40 mM de MgCl₂ ont montré les valeurs de TSI les plus élevées en raison des phénomènes de clarification et de floculation qui ont eu lieu pendant les mesures. Ainsi, les suspensions protéiques du Néré avec 20 et 40 mM de MgCl₂ ont présenté de valeurs de TSI (10 à 2000 sec) les plus favorables à l'agrégation.

L'expérience a été reconduite en utilisant du CaCl₂ entre 10 et 120 mM (Figure 39).

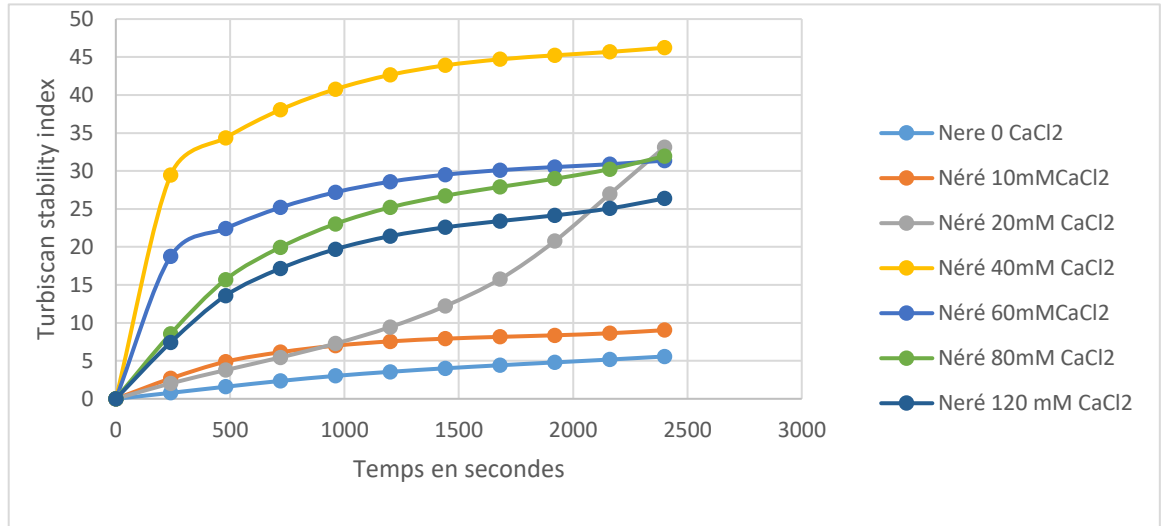


Figure 39: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Néré avec différentes concentrations du sel CaCl₂

Les échantillons à 0 et 10 mM de CaCl₂ offrent une sédimentation faible qui n'évolue pas dans le temps. Les échantillons à 60, 80 et 120 mM de CaCl₂ montrent une stabilité colloïdale moindre favorisant la coagulation et la floculation des suspensions protéiques du Néré, sans possibilité de mettre en évidence un effet concentration. En revanche, l'échantillon à 40 mM de CaCl₂ montre la plus forte déstabilisation avec une clarification très rapide due à l'agrégation des protéines et à l'augmentation de la taille des particules. Il est à noter que les valeurs maximales de TSI relevées sont avec le CaCl₂ trois à quatre fois supérieures que celles obtenues avec le MgCl₂.

Pour le jus de soja, avec une concentration de 40 mM de MgCl₂, le profil de TSI (Figure 40) indique la plus forte déstabilisation de la suspension protéique (TSI 30 à 2000 sec). Les échantillons à 20 mM de MgCl₂ offrent un signal de rétrodiffusion et de transmission avec des valeurs de TSI de stabilité moindre. Pour des concentrations de 60, 80 et 120 mM de MgCl₂, une stabilité similaire à celle du contrôle 0 sel est mesurée.

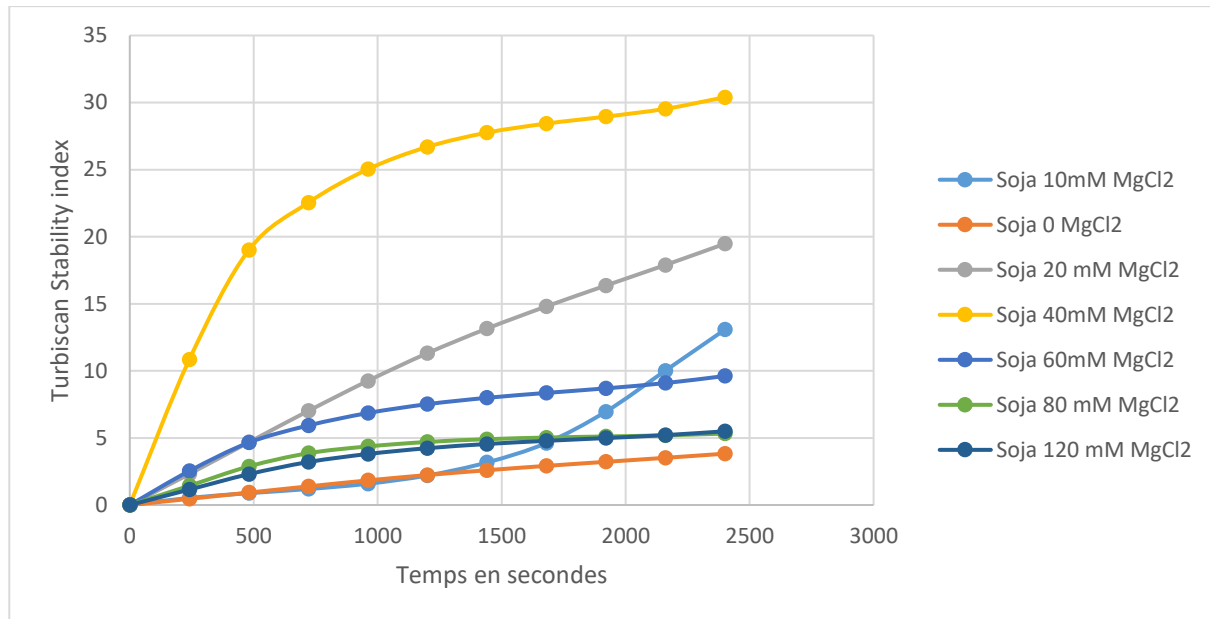


Figure 40: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Soja avec différentes concentrations du sel MgCl₂

Avec le CaCl₂ dans le jus de soja, l'effet concentration est plus difficile à cerner (Figure 41). Les TSI les plus hautes sont obtenues avec les concentration à 20 et 120 mM. Les échantillons à 60 et 80 mM CaCl₂ ont montré une stabilité moindre.

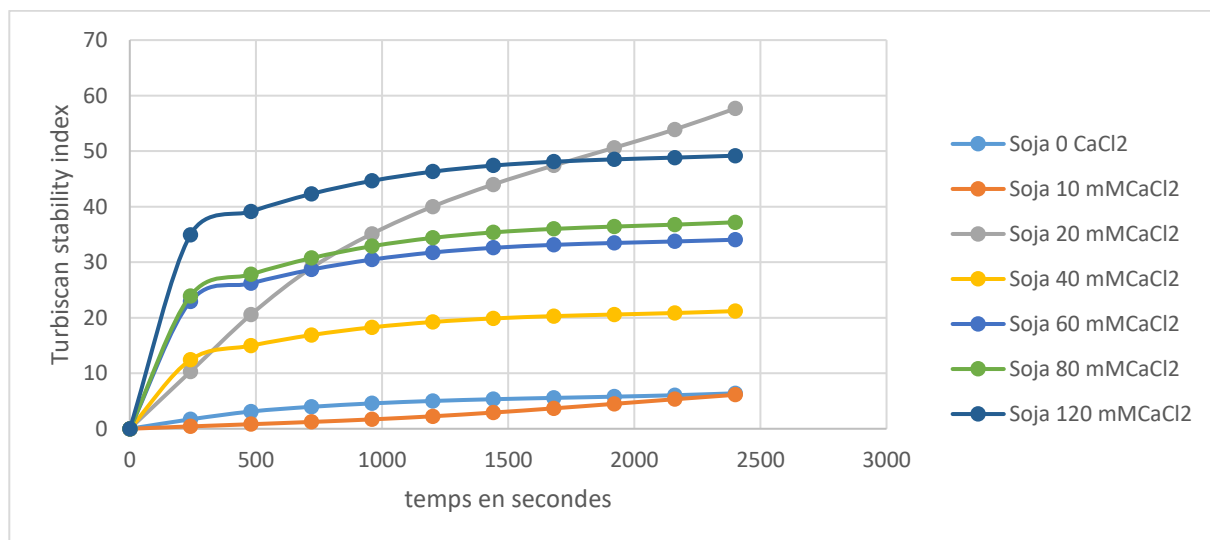


Figure 41: valeurs de l'indice de stabilité au Turbiscan (TSI) du Jus de Soja avec différentes concentrations du sel CaCl₂

L'échantillon 40 mM de CaCl₂ présente une stabilité relativement plus importante que les autres échantillons. Ceci apparaît contradictoire avec les données des autres expériences où la concentration 40 mM était la concentration qui engendrait la plus forte agrégation des protéines dans la suspension.

Avec le jus de soja on note également une efficacité plus importante du CaCl₂ par rapport au MgCl₂ dans la déstabilisation de la suspension protéique avec des valeurs de TSI supérieures.

Nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature (Molina and Wagner, 1999; Sorgentini et al., 1995). L'augmentation de la turbidité est due aux interactions électrostatiques entre les cations et les protéines. Ces interactions électrostatiques amènent les cations à former des ponts avec les protéines, ce qui entraîne la formation d'agrégats. Ce processus a été défini comme "l'effet d'agrégation" (Molina and Wagner, 1999). Par ailleurs, la diminution de la turbidité lorsque la concentration de sels augmente pourrait être due à la diminution de l'interaction électrostatique entre les cations et les protéines causée par les anions. Ce processus a été défini comme "l'effet de dissociation" (Molina and Wagner, 1999).

Que ce soit par la méthode en tube avec centrifugation ou par le suivi de la turbidité des suspensions, il ressort que le CaCl₂ permet une agrégation plus importante des protéines de Néré ou de soja. Ces expériences sur des jus dilués ont permis de retenir deux concentrations en sels de calcium et de magnésium : 20 et 40 mM, qui seront utilisés dans le procédé 'tofu' sur les jus de soja et de Néré.

I.40 Caractérisation rhéologique des tofus de soja et de Néré

I.40.1 Matière sèche tofu Soja et Néré à concentrations différentes de sels bivalents

Des jus de soja et de Néré à des concentrations en protéines de 5,56 et 4,48 g/100 mL, respectivement, ont été traités thermiquement à 95°C puis ont été coagulés en présence de sels bivalents (MgCl₂ et CaCl₂). Les coagulums obtenus ont été déposés dans des moules équipés de filtre nylon à 200 mesh puis égouttés pendant 24h. Les tofus obtenus ont été démoulés (Figure 42).

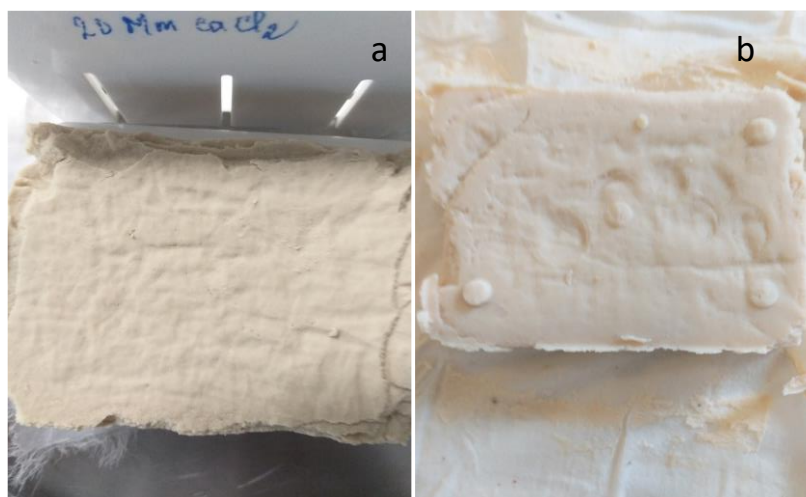


Figure 42: tofu Néré 20 Mm CaCl₂ (a) tofu de soja 20 Mm CaCl₂ (b)

Les pourcentages de matière sèche, d'humidité et de protéines dans les différents tofus obtenus sont présentés dans la tableau 15.

Tableau 15: Pourcentage de matière sèche, d'humidité et de protéines dans les tofus de Soja et de Néré à différentes concentrations de sels bivalents

Echantillons de tofu	Matière sèche %	% d'humidité	% protéines
Soja 20mM MgCl ₂	33,79±2,29 ^{bc}	66,20±2,29	13,05±0,29b
Soja 40mM MgCl ₂	40,19±3,08 ^{de}	59,81±3,08	15,96±0,16c
Soja 20mM CaCl ₂	25,97±0,65 ^a	74,02±0,65	10,66±0,64a
Soja 40mM CaCl ₂	31,46±0,88 ^b	68,53±0,88	11,27±0,15a
Néré 20mM MgCl ₂	35,53±2,57 ^c	64,47±2,57	12,46±0,19b
Néré 40mM MgCl ₂	42,27±0,69 ^e	57,72±0,69	15,25±0,16c
Néré 20mM CaCl ₂	40,40±0,76 ^{de}	59,59±0,76	17,55±0,20d
Néré 40mM CaCl ₂	36,76±0,69 ^{cd}	63,23±0,69	15,34±0,23c

Les lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$

Pour le soja, le tofu présentant la plus forte matière sèche et le plus fort pourcentage de protéines est obtenu avec une concentration de MgCl₂ à 40mM. Contrairement aux expériences menées avec les jus dilués, c'est le MgCl₂ qui permet

d'obtenir les tofus avec la matière sèche, le taux de protéines les plus importants pour le jus de soja.

Pour le Néré le tofu présentant la matière sèche la plus importante est obtenu avec $MgCl_2$ à 40mM mais cela ne correspond pas au pourcentage le plus élevé en protéines. Le pourcentage en protéines le plus fort 17.5 % est obtenu avec le tofu Néré $CaCl_2$ à 20mM. Il faut noter une forte élimination de lactosérum après l'ajout des sels bivalents dans le jus de Néré par rapport au jus de soja, ce qui peut expliquer les plus forts taux de matière sèche et de protéines mesurés.

Les pourcentages d'humidité des tofus obtenus (Soja et Néré), compris entre $57,72 \pm 0,69$ et $74,02 \pm 0,65$, sont en accord avec les données obtenues dans la littérature qui notent une teneur en eau généralement inférieure à 76 % (WANG et al., 1982), les classant dans la catégorie des tofus fermes.

La coagulation de la protéine est l'étape la plus importante du processus de fabrication du tofu car le rendement et la qualité du tofu dépendent principalement de cette étape. La coagulation se produit en raison de la liaison croisée des molécules de protéines et les cations divalents. Des études antérieures ont montré que le chlorure de calcium et le chlorure de magnésium sont des coagulants très efficaces pour la préparation du tofu de soja (Prabhakaran et al., 2006) ; (Oboh, 2006; Poysa and Woodrow, 2002). Tout comme le type de coagulant, la concentration du coagulant affecte également la nature du tofu. La quantité de coagulant ajoutée dans la fabrication du tofu est l'un des points critiques car elle détermine la texture, la saveur et le rendement du produit (Wilson, 1995).

I.40.2 Caractérisation rhéologique des tofus de soja et de Néré

I.40.2.1 Etude en compression uniaxiale

Les propriétés rhéologiques des échantillons de tofu préparés en utilisant différentes concentrations de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$ comme coagulants du jus de soja et du Néré ont été étudiées dans un premier temps avec l'application de grandes déformations.

Un test en double compression a permis d'obtenir des courbes d'analyse représentant la force mesurée par le capteur en newton par rapport au temps en seconde telles que représentées sur la figure 43. Sur la courbe, cinq valeurs peuvent être relevées : les forces maximales et de retrait appliquées, la pente à l'origine, l'aire positive et l'aire

positive 2 qui donne le rapport A2/A1 qui fournit la valeur de la cohésion et l'aire négative qui correspond à l'adhésion du mobile au produit (partie collante).

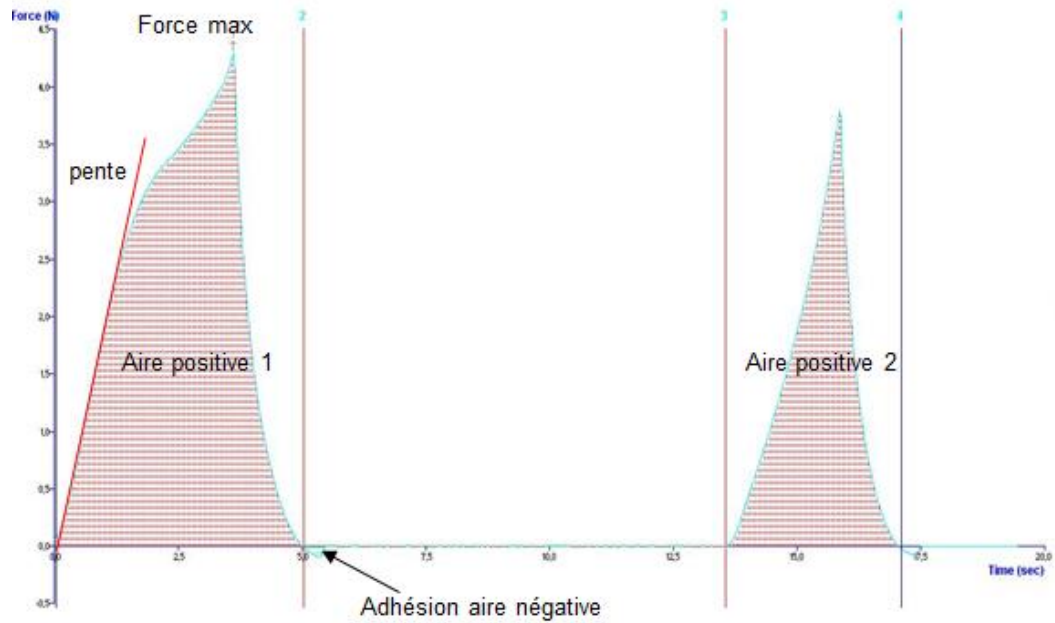


Figure 43: Courbes de compression uniaxiale du tofu de Néré à 20 mmol de CaCl₂

Les valeurs relevées sur les courbes pour les différents échantillons de tofus sont rassemblées dans le tableau 16.

Tableau 16: Etude de la rhéologie par Texture Analyser des tofus soja et Néré

Echantillons	Force (N)	Cohésion	Adhésion (10 ⁻³ N.s)
Tofu Soja 20Mm MgCl ₂	2,76 ^b	0,78 ^g	-8 ^b
Tofu Soja 40Mm MgCl ₂	4,51 ^d	0,68 ^{ef}	-30 ^b
Tofu Néré 20Mm MgCl ₂	1,16 ^a	0,58 ^{cd}	-70 ^a
Tofu Néré 40Mm MgCl ₂	8,23 ^e	0,63 ^{ce}	-8 ^b
Tofu Soja 20MmCaCl ₂	2,60 ^b	0,57 ^{bc}	-22 ^b
Tofu Soja 40Mm CaCl ₂	3,30 ^{bc}	0,61 ^{cd}	-2 ^b
Tofu Néré 20Mm CaCl ₂	4,40 ^{cd}	0,51 ^a	-0,3 ^b
Tofu Néré 40MmCaCl ₂	8,84 ^e	0,57 ^{cd}	-20 ^b

Les lettres représentent les différences significatives à p<0,05

Les caractéristiques texturales, notamment la dureté, l'élasticité, la cohésion, l'adhésion, la friabilité, etc, sont importantes pour l'évaluation de la qualité du tofu et sont des facteurs déterminants pour les consommateurs. Les mesures instrumentales peuvent

être mise en relation avec les critères sensoriels. Ainsi la force maximale peut être rapprochée de la dureté sensorielle définie comme la force nécessaire pour comprimer un produit avec les molaires. L'adhésivité est le travail/la force nécessaire pour surmonter les forces d'attraction entre la surface d'un produit et la surface d'un matériau (la sonde), cette valeur peut être reliée au caractère sensoriel collant. La cohésivité est la tendance d'un produit à cohérer ou à coller ensemble (Novaković and Tomašević, 2017), elle peut être reliée à la valeur de cohésion instrumentale.

La force, la cohésion et l'adhésion des échantillons de tofu ont connu des changements substantiels avec les différents coagulants et leurs concentrations. Les résultats ont montré que la valeur de force maximale augmentait avec l'augmentation de la concentration de $MgCl_2$ et $CaCl_2$ dans le tofu soja et Néré. Les échantillons préparés avec 40 mM de $MgCl_2$ et de $CaCl_2$ présentent des valeurs de force environ deux fois plus grande qu'avec la concentration à 20 mM.

Pour le facteur cohésion, la tendance est une valeur plus élevée avec les concentrations à 40 mM, mais significative seulement avec les tofus de Néré avec $CaCl_2$ et de soja avec $MgCl_2$.

La mesure du travail de retrait de la géométrie de la surface l'échantillon n'a pas été reproductible. Des valeurs entre 0,3 et $30 \cdot 10^{-3}$ N.s ne sont pas significativement différentes. Les valeurs d'adhésion ne peuvent pas être exploitées.

Le pic de force maximale correspond à la résistance du produit. En effet, plus la force appliquée est élevée, plus la structure du gel est résistante à la compression. Ce paramètre traduit donc la fermeté du produit. Le système est d'autant plus capable de résister à la force appliquée que la quantité de protéines et le taux de matière sèche sont importants. Le $CaCl_2$ apparaît comme un agent coagulant permettant d'obtenir des gels des fermetés plus importantes. Ce résultat est en conformité avec une étude précédente qui rapporte qu'en comparant l'état de caillage à de protéines de soja, le pouvoir coagulant des sels était dans l'ordre suivant $CaCl_2 > MgCl_2 > CaSO_4 > MgSO_4$. A partir de ces résultats, il a été déduit qu'à la même concentration, les sels de calcium influencent plus la coagulation que les sels de magnésium et que les sels de chlorure influencent plus la coagulation que les sels de sulfate (Zhu et al., 2016).

Des résultats proches pour l'effet de la concentration en sels $MgCl_2$ ont été mentionnés dans la littérature. (Xia et al., 2015) ont montré qu'une concentration faible de sel de magnésium entraînait une plus faible formation de coagulum avec les protéines de soja, insuffisant pour former un gel de tofu ferme.

I.40.2.2 Rhéomètre à contrainte de déformation des tofus soja et Néré

Afin de mieux apprécier les propriétés mécaniques des gels tofus préparés à partir du jus de soja et de Néré avec différents coagulants, les spectres mécaniques (G' , G'' et $\tan \delta$) ont été mesurés sur un appareil Anton Paar Rhéodynamique à 25°C. Le module de stockage (G') et le module de perte (G'') ont été enregistrés à une fréquence de 1 Hz avec un balayage en déformation de 0,01 à 10%. La valeur de déphasage $\tan \delta$ a également été calculée. Un enregistrement type est présenté Figure 44.

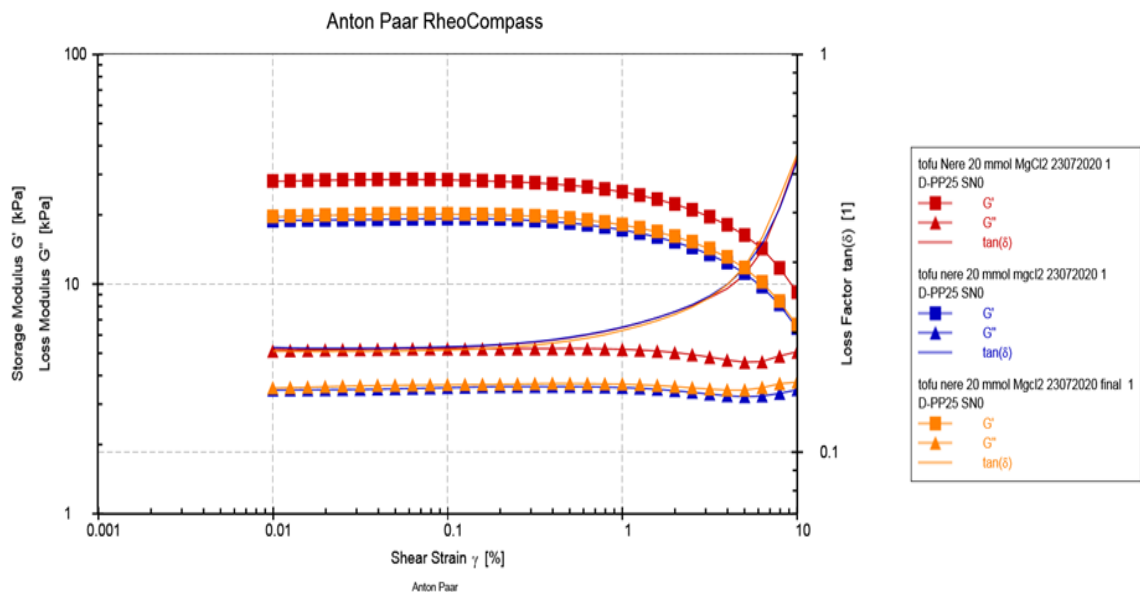


Figure 44: Mesures Anton Paar RheoCompass de 3 échantillons tofu Néré 20mM $MgCl_2$ décrivant le comportement rhéologique par déformation

Tous les échantillons de tofu Néré à différentes amplitudes de déformation ont montré des courbes similaires du module de stockage G' et du module de perte G'' sur la plage de 0,01 à 10% de déformation (Figure 44). Tout d'abord, on observe une prédominance du caractère élastique sur le caractère visqueux avec des valeurs constantes sur la plage de déformation 0,01 à 1%, puis les valeurs de G' tendent à diminuer alors que celles de G'' tendent à augmenter. Cette étape signifie que la déformation est trop importante et que la structure du matériau commence à être fragilisée ((Maltais et al., 2008). Pour faciliter l'analyse des résultats, les moyennes de G' et G'' , à la fréquence de 1 Hz et à 0.1% déformation ont été relevées sur les différentes courbes et regroupées dans la figure 45.

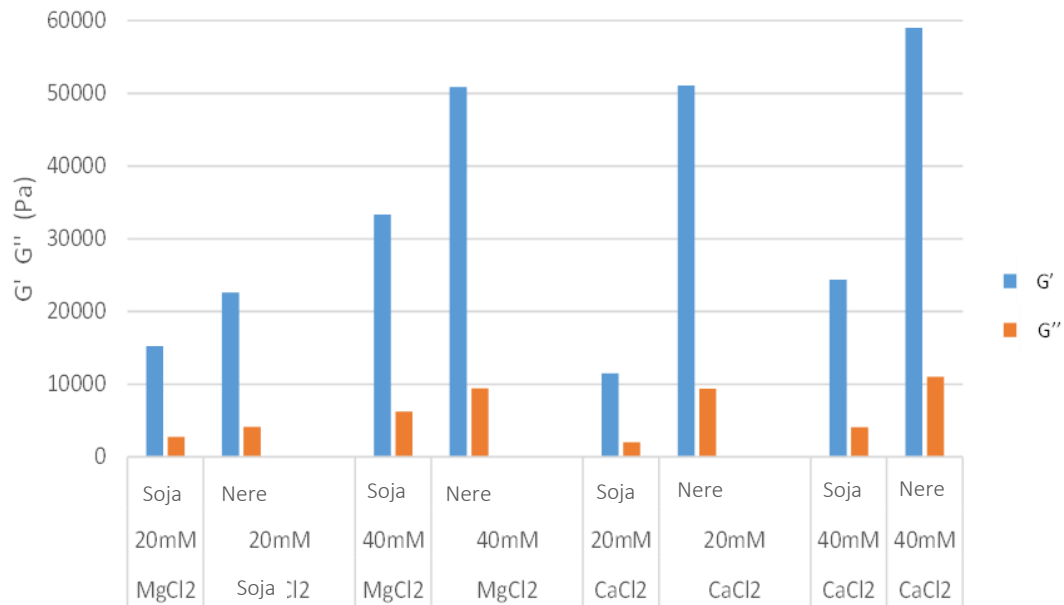


Figure 45: : histogramme du module de stockage (G') et de perte (G'') des tofus Soja et Néré avec les concentrations de 20 et 40 mM de $MgCl_2$ et $CaCl_2$

Dans le cas du tofu Néré et de Soja avec $MgCl_2$ et $CaCl_2$ on peut observer une prédominance du caractère élastique sur le caractère visqueux. Les modules de stockage G' max étaient les plus élevés pour les échantillons de Néré avec 40mM de $CaCl_2$, puis 20mM de $CaCl_2$ et 40Mm $MgCl_2$. Pour le tofu de soja, le G' max était obtenu avec 40mM $MgCl_2$.

Le rapport (G''/G') représenté par la tangente résultante de l'angle de phase ($\tan \delta$) donne une mesure relative de l'énergie perdue par rapport à l'énergie stockée dans la déformation cyclique. Une $\tan \delta$ de 90° indique que le matériau est totalement visqueux,

alors qu'un matériau élastique est caractérisé par une valeur $\tan \delta$ proche de 0° (Alvarez and Canet, 2013). Toutes les valeurs de $\tan \delta$ sont proches à toutes les concentrations de sels bivalents. Les échantillons ont été caractérisés par des valeurs $\tan \delta$ comprises entre 0,183 pour soja 20mM $MgCl_2$ et 0,187 pour Néré 40mM $CaCl_2$. On peut donc les qualifier de gels forts. Dans des conditions de petites déformations, ils présentent le comportement typique des solides viscoélastiques et, au-delà d'une valeur critique de déformation, ils se rompent plutôt que de s'écouler (Clark et al., 1992).

Les valeurs G' ont clairement changé avec l'augmentation de la concentration en sels, ce qui signifie des changements dans les interactions protéine-protéine et protéine-eau. La nette prédominance du caractère élastique sur le caractère visqueux est une caractéristique classique des tofus ; cela s'expliquerait par la structure du réseau protéique (soja ou Néré) continu dû à des interactions de type hydrophobes entre les agrégats, interactions permettant le stockage d'énergie mécanique, réversible durant la déformation du produit (Noh et al., 2005).

De nombreuses études ont été menées sur le mécanisme de gélification des protéines de soja. En général, le mécanisme de gélification de la protéine de soja implique deux étapes : 1- la protéine de soja est chauffée et dénaturée. Cela conduit à l'exposition des groupements hydrophobes situés dans les molécules de protéines natives. 2- les coagulants sont ajoutés pour stimuler la gélification pendant l'incubation (Nishinari et al., 2014). Nos résultats avec le soja sont en accord avec les données de la bibliographie où des tofus de soja plus compacts sont obtenus avec les sels de $MgCl_2$. Une coagulation plus rapide induirait des interactions plus importantes entre les protéines de soja et les ions de magnésium créant ainsi une structure de tofu plus compacte (Prabhakaran et al., 2006).

I.41 Conclusion partielle partie 3

Ce chapitre a permis de mettre au point un modèle alimentaire de type tofu à partir des farines de graines de Néré et de soja. L'effet de concentrations des sels bivalents $CaCl_2$ et $MgCl_2$ sur les jus de soja et le jus de Néré a été expérimenté. Quelles que soient les concentrations, une différence a été observée entre les deux sels selon la nature des protéines végétales. Dans les conditions de préparation du modèle alimentaire (tofu), l'augmentation de la concentration en sel a augmenté la floculation et la coalescence jusqu'à un certain seuil puis a baissé. L'analyse au Turbiscan peut rapidement décrire l'état de la suspension protéique en présence des différentes concentrations de sels. Ainsi

la valeur de TSI a un potentiel pour être un outil de ciblage rapide des concentrations en sels ayant des liaisons plus élevées avec une suspension protéique. Les concentrations à 20 et 40 mM de MgCl₂ ou CaCl₂ sont celles qui favorisent le plus l'agrégation des protéines et de facto la production du Tofu. Le taux protéique maximal pour le tofu de Néré était de 17,5 % avec 20mM de CaCl₂.

Les tofus obtenus sont caractérisés par la prédominance du caractère élastique sur le caractère visqueux. Les comportements rhéologiques entre les tofus Soja et Néré ont montré une différence selon la concentration en MgCl₂ et CaCl₂ ajouté. Le tofu de Néré possède des caractéristiques rhéologiques enviables au tofu de soja parfois meilleures. Par conséquent, la mise au point d'un tofu à base du jus de Néré peut contribuer efficacement à la diversité des produits à base du Néré dans le pays de l'Afrique de l'Ouest, offrant aux consommateurs un nouveau produit de Néré riche en protéines.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Ce travail a été consacré à l'étude de la composition biochimique et de la physico-chimie d'un modèle alimentaire à base de protéines de *Parkia biglobosa*. A partir des résultats obtenus les conclusions suivantes peuvent être faites :

Extraction des protéines à partir de farine de graines de *Parkia biglobosa*

La délipidation par les solvants (éther de pétrole et éthanol) est une étape préalable pour améliorer le taux d'extractabilité des protéines à partir de la graine mais des alternatives devront être étudiées car cette étape est globalement coûteuse et génère des polluants. L'extractabilité des protéines par voie humide a été la plus élevée aux pH alcalins. Les facteurs les plus influents sur le rendement d'extraction sont donc le pH et la présence de matière grasse.

La solubilité des fractions d'albumines et globulines est dépendante du pH du milieu de solvation et de la présence de sels (NaCl). La fraction de globulines montre la solubilité la plus faible à pH compris entre 4 et 6. Cette propriété pourrait être exploitée pour la formation de gels protéiques après acidification ménagée.

Les profils en SDS-PAGE sont comparables à ceux décrits pour d'autres légumineuses comme le pois ou le soja avec un ensemble de protéines polymériques de tailles allant de 150 à 15 kDA.

Avec un isolat de protéines totales (globulines et albumines), il est possible d'obtenir un gel thermique avec 8-12% de protéines. Dans cette expérience on remarque que, la présence de lipides est favorable à la formation d'un gel malgré une teneur en protéines plus faible. Le développement de nouveaux aliments à base de protéines de Néré semble donc envisageable mais le processus d'obtention d'isolats plus ou moins purifiés est difficilement envisageable à l'échelle de la Guinée, en l'état actuel de son agro-industrie.

Fermentation

L'objectif de la fermentation était d'utiliser un processus biologique pour réduire ou éliminer un certain nombre de facteurs anti-nutritionnels présents dans la graine de Néré et de modifier le profil aromatique des produits obtenus.

Nous avons quantifié certains facteurs antinutritionnels (FAN) dans la farine de graine avec et sans tégument. Pour les molécules localisées majoritairement dans le tégument, le dépelliculage permet de réduire significativement leur teneur. Des opérations comme le trempage, le dépelliculage peuvent limiter la présence de ces FAN. Globalement, la farine de graine de Néré sans tégument convient mieux dans la production du jus de Néré car présentant une quantité de FAN plus réduite.

Les souches *L. plantarum* étudiées sont capables de se développer sur le jus de graines de Néré, avec des croissances variables. Les mesures du pH et de l'acidité titrable montrent une diminution légère du pH et une augmentation de l'acidité titrable dans le jus de Néré fermenté. Les souches utilisées ont une capacité protéolytique qui a permis la dégradation des protéines en des petits peptides après la fermentation lactique. Une fermentation de 24h à 37°C a donné un produit gélifié où on pouvait remarquer une synérèse et des modifications des odeurs propres au Néré à travers une note lactique.

Les opérations préliminaires de traitement de la graine, les traitements thermiques et les activités enzymatiques des souches de *L. plantarum* ont pesé favorablement sur la réduction des facteurs anti-nutritionnels dans le jus de Néré fermenté avec une réduction significative de tous les FAN étudiés. La simulation gastro-intestinale in vitro (GIS) a été un moyen utile pour prédire le devenir des protéines du jus de Néré cru, traité thermiquement et fermenté. L'augmentation de la digestibilité des jus de Néré fermentés par les différentes souches a été gouvernée majoritairement par les enzymes des souches utilisées et les traitements thermiques. Le jus de Néré cru a présenté un pourcentage de digestibilité faible de 53%. Ce pourcentage a atteint 83 % avec un traitement thermique à 95 °C et 98% après fermentation. Ce choix a permis une élimination des facteurs antitrypsiques et d'autres facteurs anti-nutritionnels ainsi qu'une dégradation des protéines ayant pour conséquence une amélioration de la disponibilité des protéines à la digestion. L'utilisation du procédé de fermentation des légumineuses a donc permis de gérer le problème des facteurs anti-nutritionnels et la digestibilité.

La fermentation lactique et protéolytique de plantes légumineuses s'avère être un procédé prometteur afin de développer de nouveaux produits fermentés de meilleure valeur ajoutée, pouvant être fabriqués à faible coût. Nos travaux sur la graine de Néré peuvent constituer un point de départ à approfondir sur d'autres ressources de protéines végétales en Guinée (pois bambara, wouanjou). Une étude sensorielle serait à envisager afin de déterminer le niveau d'acceptabilité du jus de Néré fermenté par les consommateurs.

Modèle alimentaire tofu :

Un modèle permettant de maximiser l'utilisation des protéines disponibles dans la graine de Néré a été mis en place. La mise en suspension de la farine ainsi qu'une filtration à froid ont permis d'obtenir un jus possédant des aptitudes de transformation en tofu (riche en protéines et teneur en matière sèche).

Notre travail a mis en évidence que la température de dénaturation des protéines de la graine de Néré est de 95°C. Une fois que les protéines ont subi une dénaturation thermique, celles-ci vont s'agréger entre elles. Des concentrations à 20 et 40 mM de MgCl₂ ou CaCl₂ sont celles qui favorisent le plus l'agrégation des protéines et l'obtention d'un type de tofu « ferme ». Le taux protéique maximal pour le tofu de Néré était de 17,5 % avec 20mM de CaCl₂. L'analyse du profil en compression uni-axiale a révélé que le jus de Néré gélifié avec le CaCl₂ possède la plus grande résistance mécanique.

Notre étude sur ce modèle alimentaire devrait être reconduite à partir de jus de Néré fermenté afin de bénéficier des apports de la fermentation lactique pour le produit fini en terme de teneur en FAN. Toutefois nous pouvons déjà affirmer que notre travail est une proposition pouvant contribuer efficacement à la diversité des produits à base du Néré dans les pays de l'Afrique de l'Ouest, offrant aux consommateurs un nouveau produit de Néré riche en protéines.

Perspectives de recherche

Comme souvent en recherche, les réponses obtenues lors de cette thèse ont soulevé de nombreuses autres questions qui restent encore à étudier. Cette sous-section dresse une liste non exhaustive des travaux à poursuivre. Il s'agit de :

Tout d'abord de poursuivre les travaux pour améliorer le modèle alimentaire riche en protéines, en particulier sur la résistance mécanique du gel et sur l'acceptabilité potentielle par les consommateurs. L'ajout des hydro-colloïdes dans le jus de Néré pour retenir l'eau suite à l'ajout des sels bivalents et caractériser le produit obtenu avec cette technique devrait être tenté ;

Envisager l'utilisation d'un starter lyophilisé de souches de bactéries lactiques comme *L. plantarum* pour mettre en évidence les améliorations potentielles apportées par la fermentation sur un tofu lacto-fermenté pour la Guinée. Il conviendrait aussi de caractériser le sérum du jus de Néré et définir les possibilités d'utilisation ;

Développer des procédés technologiques pour produire des protéines à partir des légumineuses africaines à graines pour tenter de les substituer aux protéines de soja dans le marché de l'alimentation humaine ;

Réduire par des technologies appropriées ou par voie génétique la teneur des graines en précurseurs responsables du goût du *Parkia biglobosa*.

BIBLIOGRAPHIE

- el-Adawy, T.A. (2002). Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 57, 83–97. <https://doi.org/10.1023/a:1013189620528>.
- Adebiyi, A.P., and Aluko, R.E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chem.* 128, 902–908. .
- Afolabi, O.A., Oshuntogun, B.A., Adewusi, S.R., Fapojuwo, O.O., Ayorinde, F.O., Grissom, F.E., and Oke, O.L. (1985). Preliminary nutritional and chemical evaluation of raw seeds from *Mucuna solanei*: an underutilized food source. *J. Agric. Food Chem.* 33, 122–124. <https://doi.org/10.1021/jf00061a035>.
- AFSSA (2007). apport en protéines: consommation qualité, besoins et recommandation. 461. .
- Afssa, /Afssaps (2005). Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations. Recommandations, Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Consulté le Mars 05, 2013.
- Ake Assi, L., and Guinko, S. (1991). Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest. Ed. Roche 151. .
- Alonso, R., Orue, E., and Marzo, F. (Physiology and A.N.L. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chem. U. K.* 505–512. .
- Alonso, R., Aguirre, A., and Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.* 68, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7).
- Alonso, R., aguirre, A., and MARZO, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.* 2, 159–165. [https://doi.org/10.1016 / S0308-8146 \(99\) 00169-7](https://doi.org/10.1016 / S0308-8146 (99) 00169-7).
- Alvarez, M.D., and Canet, W. (2013). Dynamic viscoelastic behavior of vegetable-based infant purees. *J. Texture Stud.* 44, 205–224. .
- AOAC, 942.05 (2012). Determination of ash in animal feed. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International. Gaithersburg, MD, USA; 2012. [18th Edition; vol. 19th Edition].
- AOAC, 62087 (1990). , 620.87. Kjeldahl method. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International. Gaithersburg, MD, USA; 1990. [15th Edition; vol. 15th Edition].

AOAC, 620.87 (1990). Kjeldahl method. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, (Gaithersburg, MD, USA), p.

AOAC, 922.06 Fat in Flour. p.

AOAC, 925.10 (2005). Solids (Total) and Moisture in Flour. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, (Gaithersburg, MD, USA), p.

Arrese, E.L., Sorgentini, D.A., Wagner, J.R., and Anon, M.C. (1991). Electrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* *39*, 1029–1032. <https://doi.org/10.1021/jf00006a004>.

Asif, M., Rooney, L.W., Ali, R., and Riaz, M.N. (2013). Application and opportunities of pulses in food system: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *53*, 1168–1179. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.574804>.

Aubréville, A. (1950). Flore forestière soudano-guinéenne. AO.F-CAMEROUN-AEF., cameroun 523. .

Balogun, A.M., and Fetuga, B.L. (1986). Chemical composition of some underexploited leguminous crop seeds in Nigeria. *J. Agric. Food Chem.* *34*, 189–192. <https://doi.org/10.1021/jf00068a008>.

Basman, A., Köksel, H., and Ng, P.K.W. (2006). Effects of Transglutaminase on SDS-PAGE Patterns of Wheat, Soy, and Barley Proteins and their Blends. *J. Food Sci.* *67*, 2654–2658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08794.x>.

Baussay, K., Bon, C.L., Nicolai, T., Durand, D., and Busnel, J.P. (2004). Influence of the ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein β -lactoglobulin at pH 7. *Int. J. Biol. Macromol.* *34*, 21–28. .

Beddows, C.G., and Wong, J. (1987). Optimization of yield and properties of silken tofu from soybeans. *Int. J. Food Sci. Technol.* *22*, 29–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb00452.x>.

Berg, L. van den, Vliet, T. van, Linden, E. van der, Boekel, M.A.J.S. van, and Velde, F. van de (2007). Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. *Food Hydrocoll.* *5–6*, 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.017>.

Besancon, P. (1994). Innocuité et disponibilité des nutriments dans les aliments de complément. In: TRECHE S, BENOIST B, BENBOUZI D. Acte d'un atelier OMS/ORSTOM inter pays (Alexandre, 1994). L'alimentation de complément du jeune enfant. Paris : ORSTOM, 123-146. - Recherche Google.

Bhat, T.K., Singh, B., and Sharma, O.P. (1998). Microbial degradation of tannins--a current perspective. *Biodegradation* *9*, 343–357. .

Bishnoi, S., and Khetarpaul, N. (1994). Protein digestibility of vegetables and field peas (*Pisum sativum*). Varietal differences and effect of domestic processing and cooking methods. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* *46*, 71–76. <https://doi.org/10.1007/BF01088463>.

- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., and Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36, 527–543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).
- De Boland, A.R., Garner, G.B., and O'Dell, B.L. (1975). Identification and properties of “phytate” in cereal grains and oilseed products. *J. Agric. Food Chem.* 23, 1186–1189. <https://doi.org/10.1021/jf60202a038>.
- Bonkougou, E.G. (1987). . Monographie du néré, *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., espèce agro-forestière à usages multiples. Ouagadougou IRBET-CNRST 45. .
- Boralkar, M., and Reddy, N.S. (1985). Effect of roasting, germination and fermentation on the digestibility of starch and protein present in soy bean. *Nutr. Rep. Int. USA*.
- Boukary, A.R., SAERGERMENTE.C, ADEHOSSE, MATHENESSE, Vias, gf, and wenkoye, A. (2014). la brucellose en Afrique subsaharienne. *Ann.Méd. Vét* 158, 39–56. .
- Boye, J., Zare, F., and Pletch, A. (2010a). Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 414–431. .
- Boye, J., Zare, F., and Pletch, A. (2010b). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., and Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br. J. Nutr.* 108 *Suppl* 2, S183-211. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>.
- Brain, K.R. (1976). Accumulation of L-DOPA in cultures from *Mucuna pruriens*. *Plant Sci. Lett.* 7, 157–161. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(76\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0304-4211(76)90129-2).
- Breman, H., and Kessler, J. (1995). *Woody Plants in Agro-Ecosystems of Semi-Arid Regions: with an Emphasis on the Sahelian Countries* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- Bringel, F., Quénéé, P., and Tailliez, P. (2001). Polyphasic Investigation of the Diversity within *Lactobacillus plantarum* Related Strains Revealed Two *L. plantarum* subgroups. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 561–571. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00061>.
- Bruneton, J. (1987). *Elements de phytochimie et de pharmacognosie*. Paris, francia, technique et documentation - Lavoisier, 1987,. *Acta Farm. Bonaer.* 7, 585. .
- Bryant, C.M., and McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in.* 9, 143–151. .
- Cai, T.D., and Chang, K.C. (1998). Characteristics of production-scale tofu as affected by soymilk coagulation method: propeller blade size, mixing time and coagulant concentration. *Food Res. Int.* 31, 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00091-X).

Chang, R., Schwimmer, S., and Burr, H.K. (1977). Phytate: Removal from whole dry [kidney] beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J. Food Sci. USA* 42, 1098–1101.

Chau, C.-F., and Cheung, P.C.-K. (1997). Effect of Various Processing Methods on Antinutrients and in Vitro Digestibility of Protein and Starch of Two Chinese Indigenous Legume Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4773–4776. <https://doi.org/10.1021/jf970504p>.

Chau, C.-F., Cheung, P.C.-K., and Wong, Y.-S. (1997). Effects of cooking on content of amino acids and antinutrients in three Chinese indigenous legume seeds. *J. Sci. Food Agric.* 75, 447–452. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199712\)75:4<447::AID-JSFA896>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199712)75:4<447::AID-JSFA896>3.0.CO;2-5).

Chen, D., and al (2004). « Green tea and tea polyphenols in cancer prevention ». *front Biosci* 9. .

Choi, S.M., and Ma, C.Y. (2006). Study of Thermal Aggregation of Globulin from Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Size-Exclusion Chromatography and Laser Light Scattering. 54, 554–561. .

Clark, A., Kavanagh, G., and Ross-Murphy, S. (2001). , A., G., , S. (2001). Globular protein gelation—theory and experiment. , 15(4), 383-400. *Food Hydrocoll.* 15, 383–400.

Clark, A.H., Schwartzberg, H.G., and Hartel, R.W. (1992). *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker N. Y. 263. .

Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., and Millán, F. (2000). Factors affecting the in vitro protein digestibility of chickpea albumins. *J. Sci. Food Agric.* 80, 79–84. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000101\)80:1<79::AID-JSFA487>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1<79::AID-JSFA487>3.0.CO;2-4).

Coda, R., Melama, L., Rizzello, C.G., Curiel, J.A., Sibakov, J., Holopainen, U., Pulkkinen, M., and Sozer, N. (2015). Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.012>.

Colot, C., and Louis, H. (2012). Les protéines de soja et leur utilisation en agroalimentaire.

Créviu, I., Bérot, S., and Guéguen, J. (1996). Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. *Nahr.* 40, 237–244. <https://doi.org/10.1002/food.19960400502>.

Dahouda, M., Toléba, S.S., Senou, M., Youssao, A.K.I., Hambuckers, A., and Hornick, J.L. (2009). M., S.S., M., A.K.I., A., J.-L, 2009 ; Les ressources alimentaires non-conventionnelles utilisables pour la production aviaire en Afrique : valeurs nutritionnelles et contraintes ; *Ann. Médecine Vét.* 5–21. .

Dallagnol, A.M., Pescuma, M., De Valdez, G.F., and Rollán, G. (2013). Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: proteolytic activity.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 3129–3140. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4520-3>.

Davies, N.T., and Nightingale, R. (1975). The effect of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc and whole-body retention; of zinc, copper, iron, and manganese in rats. *Brit.J.Nutr* 34, 243. .

Davis, K.R. (1981). Effect of processing on composition of Tetrahymena relative value on green and yellow peas, lentils and white pea beans. 454–460. .

Deshpande, S.S., and Cheryan, M. (1984). Effects of Phytic Acid, Divalent Cations, and Their Interactions on α -Amylase Activity. *J. Food Sci.* 49, 516–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12456.x>.

Deshpande, S.S., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K., and Cornforth, D.P. (1982). Effects of Dehulling on Phytic Acid, Polyphenols, and Enzyme Inhibitors of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.* 47, 1846–1850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12896.x>.

Dhankher, N., and Chauhan, B.M. (1987). Effect of Temperature and Fermentation Time on Phytic Acid and Polyphenol Content of Rabiadi— A Fermented Pearl Millet Food. *J. Food Sci.* 52, 828–829. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06739.x>.

Di Cagno, R., Surico, R.F., Minervini, G., Rizzello, C.G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S., and Gobbetti, M. (2011). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 28, 900–909. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.008>.

Diawara, B., and al (2004). . Valorisation technologique et nutritionnelle du néré ou *Parkia biglobosa* (Jacq.) benth: une espèce agroforestière. Ouagadougou, Burkina Faso. 173. .

Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., and Nes, I.F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30, 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.014>.

Dierick, N., Vervaeke, I., Decuypere, J., and Hendrickx, H. (1985). Dierick, N., Vervaeke, I., Decuypere, J. & Hendrickx, H. (1985). Protein digestion in pigs measured in vivo and in vitro. In *Digestive Physiology in the Pig*, pp. 329-332 [A. Just, H. Jørgensen and J. A. Fernández, editors]. Copenhagen : National Institute of Animal Scienc. p.

Dijksterhuis, J. (2019). Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiol.* 81, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>.

Dike, E.N., and Odunfa, S.A. (2003). Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product - Soyadawadawa. *J. Food Sci. Technol.* 40, 606–610. .

- Dixon, R.A., and Sumner, L.W. (2003). Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiol.* 131, 878–885. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017319>.
- Dossa, C.S., Mensah, G.A., Dossa, A.D., and Adoun, C. (1998). C.S, 1998. Influence de divers traitements physico-chimiques de graines de *Mucuna pruriens* sur leur composition chimique en nutriments. *Tropicultura*, 16, 141-146p. *Tropicultura 16–17*, 141_146. .
- Duhan, A., Khetarpaul, N., and Bishnoi, S. (1995). Variability in nutrient composition of newly evolved pigeon pea cultivars. *Legume Res.* 18(2), 93– 99. pp. 93–99.
- Duodu, K.G., Taylor, J.R.N., Belton, P.S., and Hamaker, B.R. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38, 117–131. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00016-X).
- Ejiofor, M.A.N., and Oti, E. (1987). Studies on the fermentation of seeds of *U?entaclethra macrophylla*. in. *In Tree Crops J.*, pp. 135–145.
- El Youssef, C., Bonnarme, P., Fraud, S., Péron, A.-C., Helinck, S., and Landaud, S. (2020). Sensory Improvement of a Pea Protein-Based Product Using Microbial Co-Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeasts. *Foods* 9, 349. <https://doi.org/10.3390/foods9030349>.
- Elemo, G.N., Elemo, B.O., Oladunmoye, O.O., and Erukainure, O.L. (2011). Comprehensive investigation into the nutritional composition of dehulled and defatted African locust bean seed (*Parkia biglobosa*). *Afr. J. Plant Sci.* 5, 291–295. <https://doi.org/10.5897/AJPS.9000050>.
- Elsheikh, E., Fadul, I., and Tinay, A. (2000). Effect of cooking on anti-nutritional factors and in vitro protein digestibility (IVPD) of faba bean grown with different nutritional regimes. *Food Chem. - FOOD CHEM* 68, 211–212. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00153-3).
- Erdman, J.W. (1979). Oilseed phytate : Nutritionnal Implications. 736–741. .
- Filya, I., Sucu, E., and Karabulut, A. (2004). The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97, 818–826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02367.x>.
- Fredlund, K., Asp, N.G., Larsson, M., Marklinder, I., and Sandberg, A.S. (1997). Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oats after hydrothermal treatment. *J. Cereal Sci.* 25, 83–91. .
- Fredot, E. (2009). , E. (2009). *Connaissances des aliments, bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*. Lavoisier 2. .
- Fredrikson, M., Biot, P., Marie, L., Alminger, M.L., Carlsson, N.G., and Sandberg, A.S. (2001). Production Process for High-Quality Pea-Protein Isolate with Low Content of Oligosaccharides and Phytate. *J. Agric. Food Chem.* 1208–1212. .

- Frias, J., Vidal-Valverde, C., Kozłowska, H., Tabera, J., Honke, J., and Hedley, C.L. (1996). Natural Fermentation of Lentils. Influence of Time, Flour Concentration, and Temperature on the Kinetics of Monosaccharides, Disaccharide, and α -Galactosides. *J. Agric. Food Chem.* *44*, 579–584. <https://doi.org/10.1021/jf9501150>.
- Fuhrmeister, H., and Meuser, F. (2003a). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *J. Food Eng.* *56*, 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00241-8).
- Fuhrmeister, H., and Meuser, F. (2003b). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *J. Food Eng.* *56*, 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00241-8).
- G., H. (1974). *Berhaut J. — La Flore illustrée du Sénégal*. Préf. de L. Sédar Senghor. *J. Agric. Tradit. Bot. Appliquée* *21*, 269–270. .
- Gandhi, A.P., and Bourne, M.C. (1988). Effect of Pressure and Storage Time on Texture Profile Parameters of Soybean Curd (tofu). *J. Texture Stud.* *19*, 137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1988.tb00930.x>.
- Gatehouse, J.A., Lycett, G.W., Croy, R.R., and Boulter, D. (1982). The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochem. J.* *207*, 629–632. <https://doi.org/10.1042/bj2070629>.
- Gatehouse, J.A., Gilroy, J., S Hoque, M., and Croy, R. (1985). Purification, properties and amino acid sequence of a low-Mr abundant seed protein from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochem. J.* *225*, 239–247. <https://doi.org/10.1042/bj2250239>.
- Gerard, D. (1996). Valeur alimentaire et usage des graines de légumineuses - Recherche Google.
- Gernah, D.I., Inyang, C.U., and Ezeora, N.L. (2007). Incubation and Fermentation of African Locust Beans (*parkia Biglobosa*) in Production of “Dawadawa.” *J. Food Process. Preserv.* *31*, 227–239. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00109.x>.
- Gibson, R.S., and Hotz, C. (2001). Dietary diversification/modification strategies to enhance micronutrient content and bioavailability of diets in developing countries. *Br. J. Nutr.* *85*, S159–S166. <https://doi.org/10.1079/BJN2001309>.
- Gonzalo, G., Mateos, Maria, A.L., and Rosa, L. (2002). Traitement de la graine de soja American Soybean Association. *Am. Soybean Assoc.* 1–48. .
- Goyal, R. Nutritional improvement and utilization of the cereal-legume blends through fermentation. M.Sc. Thesis, Haryana Agricultural University, Hisar, India. - Recherche Google.
- Graf, E., and Eaton, J.W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic. Biol. Med.* *8*, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90146-a](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90146-a).
- Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M., and Vidal-Valverde, C. (2002). Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* *214*, 226–231. .

- Grewal, R. (1992). Nutritional improvement of soybean through fermentation and its utilization in traditional foods of India. Ph.D. thesis, Haryana Agricultural University, Hisar, India. - Recherche Google.
- Guéguen, J. (1983). Legume seed extraction, processing and end product characteristics. *Qualitas Plantarum. Plant Foods Hum. Nutr.* 267–303. .
- Guéguen, J., Walrand, S., and Bourgeois, O. (2016a). Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cah. Nutr. Diététique* 51, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.02.001>.
- Guéguen, J., Walrand, S., and Bourgeois, O. (2016b). Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cah. Nutr. Diététique* 51, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.02.001>.
- Guinko, S., and Pasgo, L.J. (1992). Harvesting and marketing of edible products from local woody species in Zitenga, Burkina Faso. *Unasylva*, (168): 16-19. .
- Guo, F., Xiong, Y.L., Qin, F., Jian, H., Huang, X., and Chen, J. (2015). Surface Properties of Heat Induced Soluble Soy Protein Aggregates of Different Molecular Masses. 80, C279–C287. .
- Guyot, J.-P., mouquet, C., Tou, E.H., Counil, E., Traoré, A.S., and Trêche, S. (2003). Etude de la transformation du mil (*Pennisetum glaucum*) en ben-saalga, une bouillie fermentée traditionnelle du Burkina Faso. Proceedings of the 2nd international workshop, Foodbased approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. In press. - Recherche Google.
- Hagos, T.H. (1962). “A Revision of the Genus *Parkia* R. BR. (Mim.) in Africa”. In: *Acta Botanica Neerlandica* II: 231–265. .
- Harland, and Morris (1995). Phytate: a good or a bad food component *Nutrition Research*, 19, 733–754. .
- Haslam, E. (1989). *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited* (CUP Archive).
- Hassan, L.G., and Umar, K.J. (2005). Protein and amino acids composition of African locust bean (*Parkia biglobosa*). *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 5, 45–50. .
- Helander, I.M., von Wright, A., and Mattila-Sandholm, T.-M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01030-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01030-3).
- Hermansson, A.M. (1978). Physico-Chemical Aspects of Soy Proteins Structure Formation. *J. Texture Stud.* 9, 33–58. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1978.tb01293.x>.
- Hopkins, H. (1983). The taxonomy reproductive biology and economic potential of *Parkia* (Leguminosae: Mimosoïdeae) in Africa and Madagascar. 87: 135-167pp.

- Humblot, C., and Guyot, J.P. (2008). Other Fermentations, Molecular Techniques. In *In the Microbial Ecology of Fermented Foods.*, (springer), pp. 208–224.
- Ikenebomeh, M.J., and Kok, R. (1984). Mass balance of the processing and fermentation of the African locust bean (*Parkia filicoidea* Welw.). *J. Can. Inst. Food Sci. Tech.*, 17: 48–50. *Food Sci. Tech.* 48–50. .
- Infante, M.E., Perez, A.M., Simao, M.R., Manda, F., Baquete, E.F., Fernandes, A.M., and Cliff, J.L. (1990). Outbreak of acute toxic psychosis attributed to *Mucuna pruriens*. *Lancet Lond. Engl.* 336, 1129. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92603-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92603-f).
- Joo, K.H., and Cavender, G.A. (2020). Investigation of tofu products coagulated with trimagnesium citrate as a novel alternative to nigari and gypsum: Comparison of physical properties and consumer preference. *LWT* 118, 108819. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108819>.
- Juffs, H.S. (1973). Proteolysis detection in milk: I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. *J. Dairy Res.* 40, 371–381. <https://doi.org/10.1017/S0022029900014746>.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213–217. <https://doi.org/10.1021/jf00062a013>.
- Kanauchi, M., Hatanaka, S., and Shimoyamada, M. (2015). New Cheese-Like Food Production from Soy Milk — Utility of Soy Milk Curdling Yeast. In *Food Production and Industry*, A.H.A. Eissa, ed. (InTech), p.
- Kao, C., and Robinson, R. (1978). Aspects nutritionnels des aliments fermentés à base de pois chiche, de haricot et de soja.
- Karaca, A.C., Low, N., and Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *44*, 2742–2750. .
- Khetarpaul, N., and Chauhan, B.M. (1990). Fermentation of pearl millet flour with yeasts and lactobacilli: in vitro digestibility and utilisation of fermented flour for weaning mixtures. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 40, 167–173. <https://doi.org/10.1007/bf01104139>.
- Ki, G. (1994). Etude socio-économique de la gestion de *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. BR. ex G. Don (Néré). Mémoire d'Ingénieur du Développement Rural (Eaux et Forêts). Ouagadougou.
- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., and Utsumi, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, faba bean, cowpea, and French bean with those of soybean--French bean 7S globulin exhibits excellent properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10273–10279. <https://doi.org/10.1021/jf801721b>.

- King, R.D., and Puwastien, P. (1987). Effects of Germination on the Proximate Composition and Nutritional Quality of Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Seeds. *J. Food Sci.* 52, 106–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb13982.x>.
- Kinsella (1979). Functional properties of soy proteins - Kinsella - 1979 - Journal of the American Oil Chemists' Society - Wiley Online Library.
- Kinsella, J.E., and Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 219–280. <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>.
- Klupšaitė, D., and Juodeikienė, G. (2015). Legume: composition, protein extraction and functional properties. a review. *Chem. Technol.* 66, 5–12. <https://doi.org/10.5755/j01.ct.66.1.12355>.
- Klupsaite, D., Juodeikiene, G., Zadeike, D., Bartkiene, E., Maknickiene, Z., and Liutkute, G. (2017). The influence of lactic acid fermentation on functional properties of narrow-leaved lupine protein as functional additive for higher value wheat bread. *LWT* 75, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.058>.
- Kohyama, K., Sano, Y., and Doi, E. (1995). Rheological Characteristics and Gelation Mechanism of Tofu (Soybean Curd). *J. Agric. Food Chem.* 43, 1808–1812. <https://doi.org/10.1021/jf00055a011>.
- Kohyama, Kaoru., Yoshida, Makoto., and Nishinari, Katsuyoshi. (1992). Rheological study on gelation of soybean 11S protein by glucono- δ -lactone. *J. Agric. Food Chem.* 40, 740–744. <https://doi.org/10.1021/jf00017a006>.
- Koura, K., Ouidoh, P.I.G., Azokpota, P., Ganglo, J.C., and Hounhouigan, D.J. (2014). Caractérisation physique et composition chimique des graines de *Parkia biglobosa* (Jacq.) R. Br. en usage au Nord-Bénin. *J. Appl. Biosci.* 75, 6239–6249. <https://doi.org/10.4314/jab.v75i1.4>.
- Koyoro, H., and Powers, J.R. (1987). Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chem. USA*.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 1–30. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>.
- Lakemond, C., de Jongh, H.J.H., Pâques, M., van Vliet, Gruppen, H., and Vorangen, A. (2003). Gelation of soy glycinin; influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation. *Food Hydrocoll.* 17, 365–377. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00100-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00100-5).
- Latta, M., and Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1313–1315. <https://doi.org/10.1021/jf60232a049>.
- Lawal, O.S., Adebowale, K.O., Ogunsanwo, B.M., Sosanwo, O.A., and Bankole, S.A. (2005). On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (*Parkia biglobosa*). *Food Chem.* 92, 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.043>.

- Le Gall, M., Guéguen, J., Séve, B., and Quillien, L. (2005). Effects of Grinding and Thermal Treatments on Hydrolysis Susceptibility of Pea Proteins (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* *53*, 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jf040314w>.
- Le Gall, M., Quillien, L., Sève, B., Guéguen, J., and Lallès, J.P. (2007a). Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (*Pisum sativum* L.) lectin and pea albumin 2. *J. Anim. Sci.* *85*, 2972–2981. .
- Le Gall, M., Quillien, L., Sève, B., Guéguen, J., and Lallès, J.P. (2007b). Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (*Pisum sativum* L.) lectin and pea albumin 2. *J. Anim. Sci.* *85*, 2972–2981. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-795>.
- Lee, W.T., Weisell, R., Albert, J., Tomé, D., Kurpad, A.V., and Uauy, R. (2016). Research Approaches and Methods for Evaluating the Protein Quality of Human Foods Proposed by an FAO Expert Working Group in 2014. *J. Nutr.* *146*, 929–932. <https://doi.org/10.3945/jn.115.222109>.
- Lestienne, I. (2004). Contribution à l'étude de la biodisponibilité du fer et du zinc dans le grain de mil et condition d'amélioration dans les aliments de complément. Université de Montpellier 2.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., and Lock, M. (2005). *Legumes of the World.*' (The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew: London, UK).
- Li, B., Qiao, M., and Lu, F. (2012). Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). *Food Rev. Int.* *28*, 231–252. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595023>.
- Li, X., Li, Y., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., and Cui, S. (2007a). Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chem.* *104*, 1410–1417. .
- Li, X., Li, Y., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., and Cui, S. (2007b). Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chem.* *104*, 1410–1417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.003>.
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., and Siezen, R.J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* *11*, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-36>.
- Liu, Z.-S., Chang, S.K.C., Li, L.-T., and Tatsumi, E. (2004). Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties. *Food Res. Int.* *37*, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.004>.
- Lolas, G., palamidis, N., and Markakis, P. (1976). Lolas GM, Palamidis N, Markakis P. 1976. The phytic acid-total phosphorus relation in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chem J* *53*:867–71. *Cereal Chem.* *53*, 867–871. .
- Lopez, Y., Gordon, D.T., and Fields, M.L. (1983). Release of Phosphorus from Phytate by Natural Lactic Acid Fermentation. *J. Food Sci.* *48*, 953–954. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14938.x>.

- Malewiak, M. (1992). Aliments et Nutriments In : Dupin H ; CUQ J-L ; Malewiak M. I. . P. In Alimentation et Nutrition Humains, (paris: ESF), pp. 85–192.
- Malhotra, A., and Coupland, J.N. (2004). The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocoll.* 18, 101–108. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00047-X).
- Maltais, A., Remondetto, G.E., and Subirade, M. (2008). Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocoll.* 22, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.026>.
- Marcone, M.F. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Res. Int.*
- Masiá, C., Jensen, P.E., and Buldo, P. (2020). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on Physicochemical Properties of Fermented Plant-Based Raw Materials. *Foods* 9, 1182. <https://doi.org/10.3390/foods9091182>.
- Meinlschmidt, P., Ueberham, E., Lehmann, J., Schweiggert-Weisz, U., and Eisner, P. (2016). Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate. *Food Chem.* 205, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.016>.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., and Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: The TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surf. A* 111–123. .
- Messina, M.J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 439S-450S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.439s>.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014a). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014b). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- Molina, M.I., and Wagner, J.R. (1999). The effects of divalent cations in the presence of phosphate, citrate and chloride on the aggregation of soy protein isolate. *Food Res. Int. Ott. Ont* 32, 135–143. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(99\)00086-1](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(99)00086-1).
- Mori, T., Nakamura, T., and Utsumi, S. (1982). Gelation Mechanism of Soybean 11S Globulin: Formation of Soluble Aggregates as Transient Intermediates. 47, 26–30. .
- Moubarak, A.E. (2005). (2) Nutritional composition and antinutritional factors of Mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes.

- Mullin, W.J., Fregeau-Reid, J.A., Butler, M., Poysa, V., Woodrow, L., Jessop, D.B., and Raymond, D. (2001). An interlaboratory test of a procedure to assess soybean quality for soymilk and tofu production. *Food Res. Int.* 34, 669–677. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00087-4).
- Nakata, and Kimura, (1985). Les principales actions des composés indésirables associés aux protéines végétales. In: GODON B. Protéines végétales. Paris: Technique et documentation Lavoisier: 309-330 - Recherche Google.
- Navindra, P. (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *J Agric* 627–629. .
- Nicolai, T., and Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion. In Colloid & Interface Science*, pp. 249–256.
- Nishinari, K., G. O., P., S., G., and Y., F. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocoll.* 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>.
- Nivala, O., Nordlund, E., Kruus, K., and Ercili-Cura, D. (2021). The effect of heat and transglutaminase treatment on emulsifying and gelling properties of faba bean protein isolate. *LWT* 139, 110517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110517>.
- Noh, E.J., Park, S.Y., Pak, J.I., Hong, S.T., and Yun, S.E. (2005). Coagulation of soymilk and quality of tofu as affected by freeze treatment of soybeans. *Food Chem.* 91, 715–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.050>.
- Noonpakdee, W., Sitthimonchai, S., Panyim, S., and Lertsiri, S. (2004). Expression of the catalase gene *katA* in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.020>.
- Nout, M.J.R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Res. Int.* 27, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90097-3).
- Novaković, S., and Tomašević, I. (2017). A comparison between Warner-Bratzler shear force measurement and texture profile analysis of meat and meat products: a review. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 85, 012063. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/85/1/012063>.
- Nowacki, E. (1980). Heat-stable anti-nutritional factors in leguminous plants. In *Advances in Legume Science*, eds Summerfield RJ & Bunting AH. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond Surrey, UK. pp. 171–177.
- Oberleas, D. (1973). Phytates. In “Toxicants Occurring Naturally in Foods.” In National Academy of Science, Washington. DC., p. 363.
- Oboh, G. (2006). Coagulants modulate the hypocholesterolemic effect of tofu (coagulated soymilk). *Afr. J. Biotechnol.* 5, 290–294. <https://doi.org/10.5897/AJB05.216>.

- Odeny, D.A. (2007). The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa. *Nat. Resour. Forum* 31, 297–305. <https://doi.org/10.1111/j.1477-8947.2007.00157.x>.
- Odufa, sa (1986). In Dawadawa. In: Reddy, N.R., Pierson, M.D., Salunkhe, , , pp. 173–189.
- O’Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H., and van Boekel, M.A.J.S. (2004a). Characterization of pea vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3149–3154. <https://doi.org/10.1021/jf035105a>.
- O’Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H., and van Boekel, M.A.J.S. (2004b). Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5071–5078. <https://doi.org/10.1021/jf035215h>.
- Organisation des Nations Unies pour l’Alimentation et l’Agriculture (FAO) (2018). Rapport Spécial - Mission FAO/PAM d’évaluation des récoltes et de la sécurité alimentaire à Madagascar (Rome, Italy: FAO).
- Ouédraogo, A. (1995). *Parkia biglobosa* (Leguminosae) en Afrique de l’Ouest: Biosystématique et Amélioration. Thèse doctorat Wageningen en University, Institute for Forestry and Nature Research, IBN-DLO, 205p.
- Ouédraogo, L.G., and al (2002). In Programme de ressources génétiques forestières en Afrique au Sud du Sahara. Kenya. 19–20. .
- Pedrosa, C., Trisciuzzi, C., and Ferreira, S.T. (1997). Effects of Glycosylation on Functional Properties of Vicilin, the 7S Storage Globulin from Pea (*Pisum sativum*). *J. Agric. Food Chem.* 45, 2025–2030. <https://doi.org/10.1021/jf960815k>.
- Pérez, S.G.-, Vereijken, J.M., Koningsveld, G.A. van, Gruppen, H., and Voragen, A.G.J. (2005). Physicochemical Properties of 2S Albumins and the Corresponding Protein Isolate from Sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Food Sci.* 70, C98–C103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09029.x>.
- Petrucelli, S., and Anon, M.C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2170–2176. <https://doi.org/10.1021/jf00046a018>.
- Phillippy, B.Q. (2003). Inositol phosphates in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*. In *Advances in Food and Nutrition Research*, pp. 1–60.
- Pouzot, M., Nicolai, T., Durand, D., and Benyahia, L. (2004). Structure Factor and Elasticity of a Heat-Set Globular Protein Gel. *Macromolecules.* 37, 614–620. .
- Poysa, V., and Woodrow, L. (2002). Stability of soybean seed composition and its effect on soymilk and tofu yield and quality. *Food Res. Int.* 35, 337–345. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00125-9).
- Prabhakaran, M.P., Perera, C.O., and Valiyaveetil, S. (2006). Effect of different coagulants on the isoflavone levels and physical properties of prepared firm tofu. *Food Chem.* 99, 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.011>.

- Purchas, R.W., Simcock, D.C., Knight, T.W., and Wilkinson, B.H.P. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. , 38: 827-837. *Int. J. Food Sci. Technol.* 827–837. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00732.x>.
- Rahelimandimby, H. (2011). Etude de la consommation des légumineuses dans les ménages d'Antananarivo et de l'influence des modes de préparation sur la réduction des teneurs en phytates. (Mémoire de DEA en Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et de la nutrition). Antananarivo : d'Antananarivo.
- Rao, A.G., and Rao, M.S. (1975). Binding of Mg (II) by the 11S fraction of soybean proteins. *J. Agric. Food Chem.* 23, 657–661. <https://doi.org/10.1021/jf60200a001>.
- Rateau, N. (1993). Dynamique sociale et stratégies nutritionnelles : La place du néré (*Parkia biglobosa*) dans l'alimentation des populations de la savane ivoirienne. Mémoire de maîtrise en sciences sociales, France. 23 – 30. Université des Hautes Etudes en Pratiques Sociales, Paris III, 1993.
- Rateau, N. (1995). Etude de la valeur nutritionnelle du néré ou « *Parkia biglobosa* ». Mémoire de DESS en Nutrition et Alimentation dans les pays en développement. Université des Sciences. Montpellier II- France. 33-45. Université des Sciences .Montpellier II-France.
- Razafindrazaka, V.L. (2006). Elaboration et évaluation d'une stratégie d'amélioration de l'alimentation de complément des jeunes enfants à Brickaville (côte Est de Madagascar). 215. .
- Razali, N., Razab, R., Junit, S.M., and Aziz, A.A. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chem.* 111, 38–44. .
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., and Salunkhe, D.K. (1985). Dry bean tannins: A review of nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 541–549. <https://doi.org/10.1007/BF02542329>.
- Rejiniemon, T.S., Hussain, R.R., and Rajamani, B. (2015). In-vitro functional properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented ragi malt. *South Ind J Biol Sci* 1, 15–23. .
- Renkema, J.M.S. (2004). Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. *Food Hydrocolloids.* 18, 39–47. .
- Ren-You Gan, Nagendra P. Shah, Ming-Fu Wang, Wing-Yee Lui, and Harold Corke (2017). *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Fermentation Differentially Affects Antioxidant Capacity and Polyphenol Content in Mung bean (*Vigna radiata*) and Soya Bean (*Glycine max*) Milks. *J. Food Process. Preserv.* 41. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12944>.
- Rizzo, G., and Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients* 10, 43. <https://doi.org/10.3390/nu10010043>.
- Rodriguez, H., Landete, J.M., Rivas, B. de las, and Munoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chem.*

- Rossi, F., Felis, G.E., Martinelli, A., Calcavecchia, B., and Torriani, S. (2016). Microbiological characteristics of fresh tofu produced in small industrial scale and identification of specific spoiling microorganisms (SSO). *LWT* 70, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.057>.
- Rui, X., Wen, D., Li, W., Chen, X., Jiang, M., and Dong, M. (2015). Enrichment of ACE inhibitory peptides in navy bean (*Phaseolus vulgaris*) using lactic acid bacteria. *Food Funct.* 6, 622–629. <https://doi.org/10.1039/c4fo00730a>.
- Rui, X., Wang, M., Zhang, Y., Chen, X., Li, L., Liu, Y., and Dong, M. (2017). Optimization of soy solid-state fermentation with selected lactic acid bacteria and the effect on the anti-nutritional components. *J. Food Process. Preserv.* 41, e13290. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13290>.
- Ryan, C.A. (1981). Ryan, C. A. (1981). Proteinase inhibitors. In: *The biochemistry of plants*. (Stumpf, P. K. & Corm, E. E. (Eds)), Vol. 6. Academic Press, New York. p.
- Sacandé, M., and Clethero, C. (2007). . Seed leaflet. N°124, Septembre, 2p.
- Sadik, N. (1991). Population growth and the food crisis. *Popul. Growth Food Crisis* 1, 3–6. .
- Salunkhe, D.K. (1990). Dietary tannins: consequences... - Google Scholar.
- Sandberg, A.-S., and Andlid, T. (2002). Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 823–833. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00641.x>.
- Santos, J.L.P. dos, Samapundo, S., Biyikli, A., Van Impe, J., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E.N., Sant’Ana, A.S., and Devlieghere, F. (2018). Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.019>.
- Sarkar, P.K., and Tamang, J.P. (1995). Changes in the microbial profile and proximate composition during natural and controlled fermentations of soybeans to produce kinema. *Food Microbiol.* 12, 317–325. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80112-X](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80112-X).
- Satabié, B. (1989a). Biosystématique et vicariance dans la flore Camerounaise: cas de quelques espèces arborescentesécophylétiques. *Nat.*, Université de Yaoundé. 299. .
- Satabié, B. (1989b). Biosystématique et vicariance dans la flore Camerounaise: cas de quelques espèces arborescentes, écophylétiques. *Thèse Doct. et Sei. Nat.*, Université de Yaoundé, 299 p.
- Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>.
- Sawada, M.M., Venâncio, L.L., Toda, T.A., and Rodrigues, C.E.C. (2014). Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and

protein solubility of defatted meal. *Food Res. Int. Complete*, 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.039>.

Schaafsma, G. (2012). Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. *Br. J. Nutr. 108 Suppl 2*, S333-336. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002541>.

Schneider, A., and Huyghe, C. (2015). les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables dans rôle des légumineuses dans l'agriculture française. In *Les Légumineuses Pour Des Systèmes Agricoles et Alimentaires Durables*, p.

Searchinger, T., Hanson, C., Ranganathan, J., Lipinski, B., Waite, R., Winterbottom, R., Dinshaw, A., Heimlich, R., Boval, M., Chemineau, P., et al. (2014). Creating a sustainable food future. A menu of solutions to sustainably feed more than 9 billion people by 2050. *World resources report 2013-14 : interim findings*.

Sessa, D.J., Nelsen, T.C., and Snyder, J.M. (1998). Effect of salts on soy storage proteins defatted with supercritical CO₂ and alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 911–916. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0266-6>.

Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., and Wanasundara, P.K.J.P.D. (2007a). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chem.* 102, 1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.060>.

Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., and Wanasundara, P.K.J.P.D. (2007b). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chem.* 102, 1119–1130. .

Shao, M. (2000). *Parkia biglobosa: Changes in resource allocation in Kandiga*,. Michigan Technical University.

Singh, M., and Krikorian, A.D. (1982). Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *J. Agric. Food Chem.* 30, 799–800. <https://doi.org/10.1021/jf00112a049>.

Smith, A.K., Watanabe, T., and Nash, A.M. (1960). Tofu from Japanese and United States soybeans. *Food Technol.* 14, 332–336. .

Soetan, K., Akinrinde, A., and Adisa, S. (2014). Comparative studies on the proximate composition, mineral and anti-nutritional factors in the seeds and leaves of african locust bean (*Parkia biglobosa*). *Ann. Food Sci. Technol.* 15. .

Sorgentini, D.A., Wagner, J.R., and Anon, M.C. (1995). Effects of Thermal Treatment of Soy Protein Isolate on the Characteristics and Structure-Function Relationship of Soluble and Insoluble Fractions. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2471–2479. <https://doi.org/10.1021/jf00057a029>.

Sozer, N., Melama, L., Silbir, S., Rizzello, C.G., Flander, L., and Poutanen, K. (2019). Lactic Acid Fermentation as a Pre-Treatment Process for Faba Bean Flour and Its Effect on Textural, Structural and Nutritional Properties of Protein-Enriched Gluten-Free Faba Bean Breads. *Foods* 8, 431. <https://doi.org/10.3390/foods8100431>.

- Spencer, C.M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., Magnolato, D., Lillcy, T.H., and Haslam, E. (1988). *Phytochemistry*. 27, 2397. .
- Stanley, A. (2003). «Antioxidants and the Free Radical Theory of Degenerative Disease», *Alternative Medicine and Rehabilitation*.
- Starzyńska-Janiszewska, A., and Stodolak, B. (2011). Effect of Inoculated Lactic Acid Fermentation on Antinutritional and Antiradical Properties of Grass Pea (*Lathyrus sativus* 'Krab') Flour. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 61, 245–249. <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0027-3>.
- Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D., and Nickerson, M.T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Res. Int.* 76, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>.
- Subirade, M., Guéguen, J., and Schwenke, K.D. (1992). Effect of dissociation and conformational changes on the surface behavior of pea legumin.
- Subuola, F., Widodo, Y., and Kehinde, T. (2012). Processing and Utilization of Legumes in the Tropics. In *Trends in Vital Food and Control Engineering*, A. Amer Eissa, ed. (InTech), p. 16.
- Tai, H.F., Foo, H.L., Abdul Rahim, R., Loh, T.C., Abdullah, Mohd.P., and Yoshinobu, K. (2015). Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb. Cell Factories* 14, 89. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0280-y>.
- Tanford, C. (1970). Protein Denaturation: Part C.**Parts A and B were published in Volume 23 of *Advances in Protein Chemistry* (1968), starting on p. 121 *Theoretical Models for The Mechanism of Denaturation*. In *Advances in Protein Chemistry*, C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, and F.M. Richards, eds. (Academic Press), pp. 1–95.
- Thompson, L. (1993). Thompson LU (1993). Potential health benefits and problems associated with anti-nutrients in foods. *Int J Food Resour* 26: 131-149. *Int. J. Food Resour.* 131–149. .
- Tomé, D. (2012). criteria and markers for protein quality assessment - review. *Br.J. Nutr.*, 108suppl2 s222-229. 222–229. .
- Totosaus, A., Montejano, J.G., Salazar, J.A., and Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. 37, 589–601. .
- Tsai, S.-J., Lan, C.Y., Kao, C.S., and Chen, S.C. (1981). Studies on the Yield and Quality Characteristics of Tofu. *J. Food Sci.* 46, 1734–1737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04474.x>.
- Udensi, E.A., Ekwu, F.C., and Isinguzo, J.N. (2007a). Antinutrient factors of vegetable cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 194–197. - Recherche Google.
- Udensi, E.A., Ekwu, F.C., and Isinguzo, J.N. (2007b). Antinutrient Factors of Vegetable Cowpea (*Sesquipedalis*) Seeds During Thermal Processing. *Pak. J. Nutr.*

- Urua, I. (2011). Proximate composition, mitotic and flow cytometric studies of four accessions of *Parkia biglobosa* (African locust bean) from Northern Cross River, An MSc thesis in the Department of Genetics and Biotechnology, University of Calabar, Nigeria. University of Calabar.
- Utsumi, S., Damodaran, S., and Kinsella, J.E. (1984). Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and .beta. subunits of 7S. *J. Agric. Food Chem.* *32*, 1406–1412. <https://doi.org/10.1021/jf00126a047>.
- Valan Arasu, M., Jung, M.-W., Ilavenil, S., Jane, M., Kim, D.-H., Lee, K.-D., Park, H.-S., Hur, T.-Y., Choi, G.-J., Lim, Y.-C., et al. (2013). Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *J. Appl. Microbiol.* *115*, 1172–1185. <https://doi.org/10.1111/jam.12319>.
- Van Damme, E., Peumans, W., Barre, A., and Rougé, P. (1998). Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles.
- Voisin, A.-S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.-H., Magrini, M.-B., Meynard, J.M., Mougel, C., Pellerin, S., and Pelzer, E. (2013). Les légumineuses dans l'Europe du XXI^e siècle: Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche? *Innov. Agron.* *30*, 283–312. .
- Wang, H., HL, W., and CW, H. (1982). Coagulation conditions in tofu processing. *Coagul. Cond. TOFU Process.*
- Welch, R.M., and Van Campen, D.R. (1975). Iron Availability to Rats from Soybeans. *J. Nutr.* *105*, 253–256. <https://doi.org/10.1093/jn/105.2.253>.
- Welch, R.M., House, W.A., and Allaway, W.H. (1974). Availability of Zinc from Pea Seeds to Rats. *J. Nutr.* *104*, 733–740. <https://doi.org/10.1093/jn/104.6.733>.
- Who, FAO, and UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation ; [Geneva, 9 - 16 April 2002] (Geneva: WHO).
- Wilson, L. (1995). Soy Foods. In: Erickson, D.R., Ed., *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, AOCS Press, Champaign, IL and United Soybean Board, St. Louis, 428-459. pp. 428–459.
- Wise, A. (1995). Phytate and zinc bioavailability. 53–63. .
- Wu, H., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., and Dong, M. (2015). Mung bean (*Vigna radiata*) as probiotic food through fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *LWT - Food Sci. Technol.* *1*, 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.011>.
- Xia, X., Abdalhai, M., Emmanuel, M., and Qian, H. (2015). Texture, rheological properties and microstructure of soy protein gels coagulated by CaSO₄ and the effect of soybean soluble polysaccharide on the gel performance. *6*, 5. .

Yamauchi, F., Yamagishi, T., and Iwabuchi, S. (1991). Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Rev. Int.* <https://doi.org/10.1080/87559129109540914>.

Yang, H.-Y., Lin, H.-S., Chao, J.C.J., Chien, Y.-W., Peng, H.-C., and Chen, J.-R. (2012). Effects of soy protein on alcoholic liver disease in rats undergoing ethanol withdrawal. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 679–684. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.03.016>.

Zare, F., Champagne, C.P., Simpson, B.K., Orsat, V., and Boye, J.I. (2012). Effect of the addition of pulse ingredients to milk on acid production by probiotic and yoghurt starter cultures. *LWT - Food Sci. Technol.* *45*, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.012>.

Zayas, J.F. (1997). *Functionality of Proteins in Food* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Zhu, Q., Wu, F., Saito, M., Tatsumi, E., and Yin, L. (2016). Effect of magnesium salt concentration in water-in-oil emulsions on the physical properties and microstructure of tofu. *Food Chem.* *201*, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.065>.