



HAL
open science

Compréhension du devenir des alpha-galactosides et folates lors de l'opération de trempage-cuisson du niébé

Fanny Coffigniez

► **To cite this version:**

Fanny Coffigniez. Compréhension du devenir des alpha-galactosides et folates lors de l'opération de trempage-cuisson du niébé. Ingénierie des aliments. Montpellier SupAgro, 2018. Français. NNT : 2018NSAM0036 . tel-04542807

HAL Id: tel-04542807

<https://theses.hal.science/tel-04542807>

Submitted on 11 Apr 2024

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Génie des Procédés

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par

L'UMR QualiSud Cirad

Compréhension du devenir des alpha-galactosides et folates lors de l'opération de trempage-cuisson du niébé

Présentée par Fanny COFFIGNIEZ
Le 15 Novembre 2018

Sous la direction de Philippe BOHUON

Devant le jury composé de

Luc SAULNIER, Directeur de recherche, Inra Nantes

Rémi SAUREL, Professeur, AgroSup Dijon

Xuân-Mi MEYER, Professeur, INP-Ensiacet Toulouse

Eric MARCHIONI, Professeur, Université de Strasbourg

Philippe BOHUON, Professeur, Montpellier SupAgro

Aurélien BRIFFAZ, Chercheur, Cirad Montpellier

Christian MESTRES, Chercheur, Cirad Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Encadrant

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Résumé

Le niébé (*Vigna unguiculata*) est une légumineuse très consommée en Afrique de l'Ouest, qui possède d'importantes qualités nutritionnelles, de par sa forte teneur en protéines, amidon, minéraux et vitamines (folates). Elle est également composée des facteurs d'inconfort que sont les alpha-galactosides. Ces travaux de thèse ont été construits pour comprendre les mécanismes qui permettent de réduire la teneur en alpha-galactosides et conserver les folates au cours des opérations de germination, trempage et cuisson. Deux grandes familles de phénomènes couplés ont été explorées et interprétées pour optimiser les conditions de trempage/cuisson:

- i) Les mécanismes de diffusion de l'eau, des alpha-galactosides et des folates au sein de la graine et de transfert dans l'eau de trempage/cuisson, en relation avec la structure de la graine ;
- ii) Les réactions biochimiques (majoritairement enzymatiques) de ces molécules d'intérêt dans la graine et l'eau de trempage/cuisson.

Pour cela, les teneurs en raffinose, stachyose, verbascose et cinq formes de folates majoritaires ont été mesurées dans la graine et dans l'eau d'immersion. Un modèle représentant les phénomènes de diffusion et de réactions de ces deux familles de molécules, a été développé. Les diffusivités de l'eau, des alpha-galactosides et des folates ont été identifiées. Les réactions enzymatiques ont été modélisées par la loi de Mickaelis-Menten pour les alpha-galactosides et simplifiées par une loi d'ordre 1 pour les folates.

Lors d'un trempage, l'eau pénètre dans la graine essentiellement via le micropyle, tandis que lors d'une cuisson, le transfert s'opère essentiellement à travers le tégument. Les résultats ont montré une faible diffusion des alpha-galactosides et des folates au cours d'un trempage à 30 °C (environ $D \approx 2 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et beaucoup plus intense à 60 °C et 95 °C (de $D \approx 2$ à $6 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Cette très forte augmentation ($\times 100$) de la diffusivité apparente des alpha-galactosides et des folates entre 30 °C et 60 °C a été expliquée grâce à une étude cyto-histologique, qui a révélé une dégradation de la lamelle moyenne composant les cellules parenchymateuses des cotylédons. Les alpha-galactosides et les folates sont dégradés et interconvertis de manière importante lors d'un trempage à 30 °C. L'hydrolyse enzymatique des alpha-galactosides est favorisée par une température de 35 °C et pour un pH = 5.8. Concernant les folates, le trempage permet une interconversion des formes de stockage (formylées) sous une forme active (méthylés) pour l'organisme humain. La germination génère également ce type d'interconversion, mais est également à l'origine d'une forte production de folates après 48 h. Le modèle de transfert et réaction permet ainsi de mettre en exergue l'importance de bien conduire l'opération de trempage et/ou de germination afin de diminuer la quantité d'alpha-galactosides, tout en conservant/augmentant la quantité de folates et en améliorant leurs biodisponibilités. Ainsi, la germination et/ou le trempage permet de procéder à une étape limitée de cuisson, permettant alors de gélatiniser l'amidon et de rendre la graine consommable.

Abstract

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is a widely consumed legume in West Africa. Cowpea seeds have a high nutritional quality, due to its high content of proteins, starch, minerals and vitamins (folates). However, cowpea also contains anti-nutritional factors such as alpha-galactosides. The aim of this thesis was to understand the mechanisms that allow to reduce the alpha-galactosides content and preserve the folates during germination, soaking and cooking. Two coupled phenomena have been explored and interpreted to optimize the soaking/cooking conditions:

- i) The diffusion mechanisms of water, alpha-galactosides and folates within the seed and transfer in the soaking/cooking water, in relation to the structure of the seed;
- ii) The biochemical reactions (mainly enzymatic) of these molecules in the seed and soaking/cooking water.

The contents of raffinose, stachyose, verbascose and 5 major folate forms were measured in the seed and in the soaking water. A model representing the diffusion and reaction phenomena of these two kinds of molecules has been developed. The diffusivities of water, alpha-galactosides and folates have been identified. The enzymatic reactions were modeled by a Mickaelis-Menten law for alpha-galactosides and simplified by a first order kinetics for folates.

During the soaking process, the water absorption mainly occurs through the micropyle. During cooking, the water absorption takes mainly place through the testa. The results showed a low diffusion of alpha-galactosides and folates during soaking at 30 °C (about $D \approx 2 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and higher at 60 °C and 95 °C (from $D \approx 2$ to $6 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). This increase of apparent diffusivity ($\times 100$) of alpha-galactosides and folates between 30 °C and 60 °C was explained by a cyto-hisological study, which revealed a middle lamella degradation of parenchymateous cells of cotyledons. Alpha-galactosides and folates are degraded and significantly interconverted during soaking at 30 °C. An optimal enzymatic activity was identified at 35 °C and at pH = 5.8. Concerning the folates, the soaking allows an interconversion of the storage forms (formylated) in active form (methylated) for the organism. Germination also generates these interconversions, but also allows a high folate production after 48 hours. Therefore, the transfer and reaction model highlights the importance of the soaking and/or germination process in order to reduce the alpha-galactosides content while preserving/increasing the folates and their bioavailability. Thus, the germination and or soaking process allows to limit the cooking process, allowing then to gelatinize the starch and make the seed consumable.

Remerciements

Je remercie en premier lieu, le Cirad et plus particulièrement l'UMR QualiSud pour avoir financé ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à mon directeur de thèse, Philippe Bohuon, ainsi qu'à mes encadrants, Aurélien Briffaz et Christian Mestres, pour m'avoir guidée dans mon travail de recherche.

Mais aussi à toutes les personnes de l'UMR QualiSud qui se sont investies dans mon projet de thèse : Noel Durand, Pascaline Alter, Julien Ricci, Brigitte Pons...

Je tiens également à remercier Mohamed El Maâtaoui et Christine Sanier pour m'avoir reçue dans leur laboratoire, ainsi que pour leur aide précieuse et leur investissement dans l'élaboration des manipulations de microscopie.

Bien-sûr, je ne peux pas oublier de remercier toute l'équipe de l'université de Munich pour leur accueil et leurs précieux conseils et plus particulièrement Michael Rychlik et Lisa Striegel.

Je remercie également tout les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Merci à toutes les personnes qui ont croisé ma route et qui m'ont donné le sourire pendant trois ans. Je ne pourrai jamais tous vous citer, mais je sais que vous vous reconnaitrez !

Et merci du fond du cœur à ma famille et à Oscar, qui m'ont soutenue et encouragée pendant 3 ans, et qui ont même accepté de m'aider au travers d'ateliers longs et ennuyeux de couture et de lecture !

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de publications et de conférences :

Publication 1 : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, C., Alter, P., Durand, N., Bohuon, P., 2017. Multi-response modeling of reaction-diffusion to explain alpha-galactoside behavior during the soaking-cooking process in cowpea. Food Chemistry.

Publication 2 : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, C., Ricci, J., Alter, P., Durand, N., Bohuon, P., 2018. Kinetic study of enzymatic α -galactoside hydrolysis in cowpea seeds. Food Research International 113, 443–451.

Publication 3 : Coffigniez, F., Rychlik, M., Sanier, C., Mestres, C., Striegel, L., Bohuon, P., Briffaz, A., 2019. Localisation and modeling of reaction and diffusion to explain folate behavior during the soaking-cooking process in cowpea. Journal of food engineering (soumise)

Publication 4 : Coffigniez, F., Rychlik, M., Mestres, C., Striegel, L., Bohuon, P., Briffaz, A., 2019. Modeling reaction kinetics to explain folate behavior during cowpea seed (*Vigna unguiculata*) germination in comparison with soaking. Journal of Agricultural and Food Chemistry (soumise)

Publication 5 : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, C., Akissoé, L., Bohuon, P., El Maâtaoui, M., 2019. Impact of soaking process on the microstructure of cowpea seeds in relation to solid losses and water absorption. Food Research International (soumise)

Colloque Graines 2017, 17-19 octobre 2017, Montpellier : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, Bohuon, P. Modélisation du transport et réaction des alpha-galactosides durant le trempage-cuisson du Niébé (Oral)

Conférence EFFoST, 13-16 novembre 2017, Sitges : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, Bohuon, P. Modeling the transport and reaction of alpha-galactosides during soaking-cooking of pulses: case of cowpea (Oral)

A venir:

Conférence IUFoST, 23-27 octobre 2018, Mumbai : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, Bohuon, P. Modelling of endogenous cowpea alpha-galactosidase enzyme activity to optimize cowpea soaking-process (Poster)

Rencontres Francophones sur les Légumineuses, 17-18 octobre 2018, Toulouse : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, Bohuon, P. Modélisation du comportement des alpha-galactosides au cours du trempage-cuisson du niébé en vue d'une réduction de son pouvoir antinutritionnel (Oral Flash)

Conférence Comsol, 22-24 octobre 2018, Lausanne : Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, Bohuon, P. Modeling alpha-galactosides behavior during cowpea soaking-cooking for nutritional optimization (Oral)

Nomenclature

a	Attenuation constant (dimensionless)
A	Seed surface (m^2)
Abs	Sample absorbance
AFNOR	Agence Francaise de Normalisation
Ap	Aperture of micropyle
BSA	Bovine serum albumin
c	Constant (pH)
C	Cotyledon
$C1/C2$	Constantes de Peleg
Cy	Cytosol
CW	Cell wall
d	Constant (pH)
db	Dry basis
det	Matrix determinant
DML	Dry matter loss (kg/100 kg db)
D_x	Apparent diffusivity coefficient of component X ($m^2.s^{-1}$)
E	Embryonic axis
E_a	Activation energy ($kJ.mol^{-1}$)
$E_{a,in}$	Inactivation energy ($kJ.mol^{-1}$)
FAO	Food and Agriculture Organization
FB	Fluorescent Brightener
Galac	Galactose
H	Hilum
H_4 folate	Tetrahydrofolate
HS	Hydrolyzed substrate
I	Inhibitor concentration (mM)
IC	Intercellular space
$J_x(t)$	Mass flux for component X ($kg.s^{-1}$)
K_I	Inhibition constant (mM)
K_M	Michaelis constant (mM)
k_{pX}	Rate production of component X (s^{-1})
$k_{X,\Omega}$	Rate constant of component X in domain Ω (s^{-1})
m	Dried mass
M	Micropyle
MM	Masse molaire
max	Maximum
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MeFox	pyrazino-s-triazin
min	Minimum
M_r	Molecular weight
mw	Wet mass
n	Number of data

N	Nucleus
NBB	Naphthol blue-black
p	Number of parameters
Pa	Palissade
PAS	Periodic acid-Schiff's reagent
PB	Protein bodie
PBS	Phosphate buffer
PFA	paraformaldehyde
\overline{pH}	Middle of the peak (pH)
PNP	P-nitrophényl- α -D-galactopyranoside
PteGlu	Folic acid
Q_v	Débit ($m^3 \cdot s^{-1}$)
R	Gas constant ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
RR	Ruthenium red
r, y	Radial (width) and orthoradial coordinates (m)
<i>Raffi</i>	Raffinose
RMSE	Root mean square error
S	Substrate/ Starch
SE	Standard externe
SI	Standard interne
<i>Stach</i>	Stachyose
t	Time (s)
T	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)/ testa
TI	Tracheid island
v	Enzymatic activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ of enzyme or $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
V	Volume (mL)
<i>Verba</i>	Verbascose
V_{Ω}	Volume of domain Ω (m^3)
v_{max}	Maximum velocity of enzymatic reaction (mM/s)
W	Water component
WC	Water content (kg of water/kg db)
W_{eq}	Teneur en eau à l'équilibre ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
$[X]_{\Omega}$	Concentration of component X in domain Ω ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
z	Length (m)
5-CHO- H_4 folate	5formyltetrahydrofolate
5- CH_3 - H_4 folate	5methyltetrahydrofolate
10- CH_3 - H_4 folate	10formyltetrahydrofolate
10-CHO- PteGlu	10formylfolic acid

symboles

ε	Extinction coefficient of p-nitrophenol at 405nm ($\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
∇	<i>Nabla</i> operator
Ω	Domain
ρ	Density ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

σ_i	Width of the peak (pH)
σ_y	Standard deviation
δ	Random number between 0 and 1
Γ_i	Boundary ($i = 1$: seed/soaking water interface; $i = 2$: Seed axial-symmetry)
T	Temps nécessaire pour obtenir 50 % de la saturation en eau des graines

Exposant

0	Intrinsic properties
~	Experimental data
^	Predicted data

Indice

<i>act</i>	Activation
<i>app</i>	Apparent
<i>deg</i>	Degraded
<i>diff</i>	Transferred by diffusion
<i>dm</i>	Dry matter
<i>enz</i>	Enzyme
<i>ex</i>	Extrait
<i>m</i>	Mass
<i>max</i>	Maximal
noise	Noisy data
<i>prod</i>	Produced
<i>ref</i>	Reference
<i>res</i>	Residual
S	Seed domain
<i>SW</i>	Soaking water domain
<i>tot</i>	Total
<i>u</i>	Index of experimental runs
0	Initial
∞	Equilibrium
<i>w</i>	Wet
<i>W</i>	Water

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
1. ÉTAT DE L'ART	4
1.1 Le niébé, une légumineuse à fort potentiel	4
1.1.1 Importance du niébé	4
1.1.1.1 Origine et taxonomie	4
1.1.1.2 Production du niébé en Afrique	5
1.1.1.3 Consommation du niébé en Afrique	6
1.1.2 Anatomie et structure de la graine	7
1.1.3 Composition de la graine	7
1.1.4 Les procédés de transformation du niébé	9
1.1.4.1 Le trempage	9
1.1.4.2 La cuisson	10
1.2 Transfert d'énergie et d'eau dans les légumineuses au cours du procédé	10
1.2.1 Approche globale du transfert de l'eau	10
1.2.2 Transfert de l'eau à travers le tégument et effet d'un traitement alcalin	13
1.2.3 Transfert d'eau par convection	14
1.2.4 Comportement des structures amidon/protéine	15
1.2.4.1 L'amidon	15
1.2.4.2 Les protéines	18
1.3 Les alpha-galactosides	18
1.3.1 Structure et famille	18
1.3.2 Impact d'un trempage-cuisson sur la teneur en alpha-galactosides	19
1.3.3 Les réactions enzymatiques au cours du procédé	21
1.3.3.1 L'alpha-galactosidase dans un milieu modèle	22
1.3.3.2 L'alpha-galactosidase dans la graine au cours du procédé	26
1.3.4 La diffusivité des alpha-galactosides au cours du procédé	27
1.4. Les folates	29
1.4.1 Structure et famille	29
1.4.2 Impact de l'opération de trempage-cuisson sur la teneur en folates	30
1.4.3 Les réactions impliquant les folates au cours du procédé	31
1.4.3.1 Les réactions enzymatiques impliquant les folates	32
1.4.3.2 Les réactions chimiques (thermique, lumière et oxygène)	34
1.4.4 La diffusivité des folates au cours du procédé	37
1.5 Conclusions et objectifs	38
2. MATERIELS ET METHODES	41
2.1 La matière première	41
2.2 Équipements et protocoles de traitement	41
2.2.1 Les procédés de trempage-cuisson	41

2.2.2	La germination.....	43
2.3	Analyses physico-chimiques	43
2.3.1	Teneur en eau.....	43
2.3.2	Teneur en amidon total.....	43
2.3.3	Teneur en protéines.....	44
2.3.4	Teneur en fibres.....	45
2.3.5	Teneur en lipides.....	46
2.3.6	Teneur en alpha-galactosides.....	46
2.3.6.1	Extraction des alpha-galactosides.....	46
2.3.6.2	Quantification des alpha-galactosides.....	46
2.3.7	Teneur en folates	47
2.3.7.1	Préparation des solutions	47
2.3.7.2	Extraction des folates.....	48
2.3.7.3	Quantification des folates	49
2.3.8	Mesure de l'activité enzymatique de l'alpha-galactosidase.....	52
2.3.8.1	Préparation des solutions	52
2.3.8.2	Extraction de l'enzyme	52
2.3.8.3	Caractérisation de l'extrait d'enzyme	52
2.3.9	Mesure du degré de gélatinisation de l'amidon.....	54
2.3.10	Biométrie.....	54
2.3.11	Microscopie classique	54
2.3.11.1	Obtention des sections	54
2.3.11.2	Coloration des sections.....	55
2.3.11.3	Observation des sections	56
2.3.12	Immunomarquage du 5-methyl-tetrahydrofolate.....	56
2.4	Expression et analyse des résultats.....	56
2.4.1	Absorption d'eau.....	56
2.4.2	Perte de matière sèche	57
2.5	Méthodes statistiques.....	57
3.	RESULTATS.....	59
3.1.	Publication 1 : Modélisation multi réponse des mécanismes de réaction et diffusion pour expliquer le comportement des alpha-galactosides durant le procédé de trempage-cuisson du niébé	59
3.1.1.	Article paru.....	60
3.1.2.	Synthèse et perspective	82
3.2.	Publication 2 : Etude cinétique de l'hydrolyse enzymatique des alpha-galactosides dans les graines de niébé ..	83
3.2.1.	Article paru.....	83
3.2.2.	Synthèse et perspective	106
3.3	Publication 3 : Localisation et modélisation des mécanismes de réaction et diffusion pour expliquer le comportement des folates durant le procédé de trempage-cuisson du niébé	107
3.3.1.	Article soumis	107
3.3.2.	Synthèse et perspective	134
3.4	Publication 4 : Modélisation des mécanismes de réaction pour expliquer le comportement des folates durant la germination du niébé	135
3.4.1.	Article soumis	135
3.4.2.	Synthèse et perspective	154

3.5 Publication 5 : Impact du procédé de trempage-cuisson sur la microstructure des graines de niébé en relation avec la perte de nutriments et l'absorption d'eau	155
3.5.1. Article soumis	155
3.5.2. Synthèse et perspective	172
4. DISCUSSION GENERALE.....	174
4.1. La connaissance du Niébé.....	174
4.1.1. Histologie.....	174
4.1.2. Localisation des molécules d'intérêts.....	176
4.2. Base de données expérimentales et d'étude cinétique.....	177
4.2.1. Procédé de trempage-cuisson	177
4.2.2. Dosage des alpha-galactosides.....	177
4.2.3. Dosage des folates.....	178
4.3. Compréhension des mécanismes de transfert et réactions.....	178
4.3.1. Transfert	178
4.3.2. Convection.....	182
4.3.3. Réactions biochimiques.....	183
4.3.3.1. Réactions enzymatiques	183
4.3.3.2. Interconversion des folates.....	188
4.3.3.3. Oxydation des folates.....	188
4.4. Développement d'un simulateur	189
4.4.1. Choix du modèle.....	189
4.4.2. Limite des hypothèses	190
4.4.2.1. Géométrie des graines de niébé	190
4.4.2.2. Structure des graines de niébé	191
4.4.2.3. Isotropie du milieu	193
4.4.2.4. Absence de déformation.....	193
4.4.2.5. Méthode d'identification des paramètres	194
4.5. Comment construire un procédé optimal de trempage/cuisson	194
4.5.1. Une teneur en alpha-galactosides acceptable	194
4.5.2. Une teneur en folate recommandée.....	194
4.5.3. Choix du couple (t , T) au cours du procédé de trempage-cuisson	195
4.5.4. La germination.....	197
4.5.5. Application aux autres légumineuses.....	197
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	200
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	204

Introduction générale

Introduction générale

De nos jours, la consommation des légumineuses est fortement encouragée de par leur qualité nutritionnelle (Iqbal et al., 2006). Les légumineuses sont également respectueuses de l'environnement, car elles permettent de fixer l'azote et utilisent moins d'eau et d'engrais que ce que peut nécessiter l'élevage animal (De Boer and Aiking, 2011). L'assemblée générale des Nations Unies a ainsi proclamé 2016 « année internationale des légumineuses » pour promouvoir la production vivrière durable des légumineuses à l'appui de la sécurité alimentaire et nutritionnelle. Le Niébé, *Vigna Unguiculata*, est une des principales légumineuses consommées dans le monde. De par sa grande tolérance aux régions arides et semi-arides, il est cultivé principalement sur le continent africain (Ehlers and Hall, 1997). D'après la FAO, la majeure partie (95 %) de la production mondiale de niébé provenait en 2016 d'exploitations africaines (FAO, 2018), et en particulier des exploitations ouest-africaines (83% de la production mondiale). La consommation des graines de niébé en Afrique de l'ouest est importante (Gomez, 2004) et peut compléter la consommation de céréales. En effet, avec sa teneur en protéines de 25 %, le niébé est l'une des sources de protéines les moins chères pour les populations démunies. Il apporte aussi de l'amidon (45 %), de l'acide folique (vitamine B9) et des minéraux (fer, zinc ou calcium) (Gonçalves et al., 2016). Ses graines sèches sont cuisinées et présentes dans plus d'une cinquantaine de plats traditionnels africains (Dovlo et al., 1976) sous des formes les plus diverses (graines entières ou broyées). Cependant, le niébé contient également des facteurs antinutritionnels tels que les phytates et les alpha-galactosides, qui peuvent freiner la consommation de la graine. En effet les alpha-galactosides sont à l'origine de désordres intestinaux, tandis que les phytates diminuent la biodisponibilité des minéraux.

Comme pour toutes les légumineuses, la préparation du niébé comporte généralement une succession de deux étapes que sont les opérations de trempage et de cuisson. L'opération de trempage consiste à immerger les graines initialement sèches dans de l'eau à température ambiante durant une dizaine d'heures. Cette opération a pour objectif de réduire la durée de cuisson qui s'ensuit (en favorisant l'absorption d'eau) et d'éliminer une partie des alpha-galactosides. Lorsque cette étape est effectuée à température ambiante, les graines peuvent être amenées à germer. La cuisson, qui peut être précédée par un trempage, consiste à immerger les graines dans de l'eau à ébullition. La cuisson permet l'absorption d'eau et la gélatinisation de l'amidon, étape nécessaire pour rendre la graine consommable. Lors de ces opérations, l'eau rentre dans la graine et les micronutriments hydrosolubles (minéraux, acide folique...) sont susceptibles de migrer en sens opposé de la graine vers l'eau de trempage.

Ainsi, les pertes ou gains en micronutriments (vitamines) et facteurs antinutritionnels (alpha-galactosides) peuvent être dus à des mécanismes de transfert et de dégradation enzymatique ou thermique (Delchier et al., 2014 ; Abdel-Gawad, 1993). Ces dégradations correspondent aussi à des conversions pour

les alpha-galactosides (raffinose en stachyose et stachyose en verbascose) et les folates (5-formyltetrahydrofolate en 5-méthyltetrahydrofolate). Cependant, à ce jour ces mécanismes ont été peu ou pas étudiés. De même, l'absorption d'eau par la graine a été étudiée dans son ensemble, mais l'impact des structures (cotylédon, tégument, mycropile,...) sur les mécanismes de transfert est pour l'instant peu connu. Parfois, la préparation des plats à base de niébé implique des prétraitements, tel que le dépelliculage, le broyage ou la germination. L'opération de germination modifie les teneurs en micronutriments et facteurs nutritionnels grâce à l'action d'enzymes, en permettant la production de folates et l'hydrolyse des alpha-galactosides. Ainsi, la combinaison des prétraitements et du procédé de trempage-cuisson peut être adapté (type de prétraitement, temps, température...) afin d'améliorer la qualité nutritionnelle des graines.

La thèse vise à développer des connaissances et divers outils pour reconcevoir les opérations de germination, trempage et cuisson du niébé. Il s'agit i) de combler le retard de connaissance de la structure, composition et évolution de cette légumineuse lors du procédé ; ii) de comprendre et décrire les mécanismes physiques et physiologiques associés aux phénomènes de transfert d'eau durant le procédé de trempage-cuisson ; iii) de comprendre, décrire et découpler les phénomènes de transfert et de réactions (hydrolyse enzymatique, oxydation) mis en jeu sur les alpha-galactosides et les folates lors du procédé de trempage-cuisson/germination du niébé. La compréhension des processus physiques et biochimiques sous-jacents devrait permettre la mise en évidence de leviers pour les contrôler dans la conduite du procédé.

Le manuscrit de thèse est organisé de la manière suivante : le chapitre 1, « Bibliographie » décrit le niébé et son importance, passe en revue les différents phénomènes physiques et biochimiques se produisant durant les différentes étapes de germination, trempage et cuisson. Une attention toute particulière est apportée à la description des mécanismes de transfert et réactions des alpha-galactosides et des folates. Le chapitre se termine sur les objectifs de la thèse. Le matériel d'étude ainsi que les méthodes utilisées sont présentées dans le chapitre 2 « Matériels et Méthodes ». Le chapitre 3 « Résultats et Discussions », regroupe successivement cinq publications. Le chapitre 4 « discussion générale » discute en cinq temps : i) des connaissances établies sur le niébé, ii) des contributions méthodologiques, iii) des mécanismes de transfert et de réactions observés sur les alpha-galactosides et les folates, iv) du simulateur et de ses limites et v) des leviers possibles pour améliorer la qualité nutritionnelle du niébé pour sa consommation. Le dernier chapitre « Conclusion et perspectives » résume les principales contributions et propose les perspectives technologiques et scientifiques de cette thèse.

Etat de l'art

1. État de l'art

L'étude portera essentiellement sur le niébé. Cependant lorsque les connaissances seront insuffisantes sur le niébé, l'étude sera élargie aux autres légumineuses, voire aux céréales.

1.1 Le niébé, une légumineuse à fort potentiel

1.1.1 Importance du niébé

1.1.1.1 Origine et taxonomie

Le niébé est une légumineuse de la famille des *Fabaceae* dont le nom scientifique est *Vigna unguiculata* L.Walp. D'un point de vue botanique, sa classification est la suivante (Meyer, 2018; Magloire, 2005) : Règne : Végétal ; Embranchement : Spermaphytes ; Sous-embranchement : Angiospermes ; Classe : Dicotylédones ; Ordre : Fabales ; Famille : Fabaceae ; Sous-famille : Faboideae ; Genre : *Vigna* ; Espèce : *Vigna unguiculata* ; Sous-espèce : *Vigna sinensis*. Elle possède plusieurs noms vernaculaires : banette, dolique de Chine, dolique mougette, haricot corneille, niébé fourrager ou bien pois à vache (Meyer, 2018). Le niébé trouve son origine en Afrique de l'Est et plus particulièrement aux abords de l'Éthiopie, puis a été produit principalement dans les fermes de la savane Africaine (Pasquet et Fotso, 1994). Sa culture remonte à la période néolithique. Il y a plus de 2000 ans, le niébé a été exporté en Inde, en Europe et en Asie (Magloire, 2005). C'est seulement au 18^e siècle que le niébé atteint le sud des États-Unis (Magloire, 2005). Aujourd'hui, le niébé est fortement produit et consommé en Afrique de l'Ouest.



Figure 1 : Plantation et graine de niébé (Tropical Forages, 2017)

De nombreuses variétés existent, dont par exemple, seize différentes au Niger (Réseau National des Chambres d'Agriculture du Niger, 2012) et au Bénin (Ministère de l'agriculture, de l'élevage et de la pêche, 2016). Le niébé est une plante herbacée annuelle atteignant 80 cm de hauteur et possédant de fortes racines,

et des feuilles vert foncé de taille 6-16× 4-11 cm (Figure 1). Les fruits sont des gousses contenant 8 à 20 graines (Magloire, 2005).

1.1.1.2 Production du niébé en Afrique

La production annuelle totale des légumineuses dans le monde est de 77 millions de tonnes en 2014 (FAO 2017). Dans ce volume, le niébé représente 7 %, tout comme la lentille, loin derrière le haricot (33 %), le pois chiche (17%), le pois sec (16 %) et la fève (10%) (FAO 2006-2008). L'aire cultivée ainsi que la production de niébé en Afrique et dans le monde sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Production de niébé dans différents pays d'Afrique (Gomez, 2004) :

Pays	Aire cultivée (×1000 ha)	Production (×1000 t) bs*
Nigeria	3425	1691
Niger	3268	359
Mali	322	79
Burkina Faso	201	156
Togo	135	38
Bénin	100	64
Sénégal	95	32
Ghana	85	57
Mauritanie	52	17
Côte d'Ivoire	40	20
Tchad	44	21
Cameroun	38	31
Total en Afrique	8375	2565
Total dans le monde	9738	3731

* bs : base sèche

Ainsi, 70 % de la culture mondiale du niébé sont produits en Afrique de l'Ouest et centrale et plus particulièrement au Nigeria et Niger, 17 % au Brésil, 3 % aux États-Unis, et 2 % en Asie (Gomez, 2004). Il est à noter que plus de 570 000 hectares sont cultivés dans d'autres régions d'Afrique que celles citées dans le tableau 1, comme l'Afrique du Sud. La surface cultivée mondiale a augmenté de 38 % entre 1994 et 2006, tandis que la production a augmenté de 88 % grâce à une réduction des pertes pré et post-récoltes (Akibode and Mareida, 2011). Cette forte croissance est essentiellement due à l'augmentation de production de niébé au Niger et au Nigeria. L'importante production de niébé en Afrique est permise par la haute adaptation de la plante à la sécheresse (Langyintuo et al., 2003). Elle est de ce fait la légumineuse la plus cultivée au Bénin.

1.1.1.3 Consommation du niébé en Afrique

Tableau 2 : Demande et consommation de niébé dans différents pays d'Afrique (Gomez, 2004) :

Pays	Demande (×1000 ha)	Consommation kg/habitant/an
Nigeria	2160	18,0
Niger	16	1,5
Mali	16	1,5
Burkina Faso	16	1,5
Togo	41	9,0
Bénin	55	9,0
Sénégal	14	1,5
Ghana	169	9,0
Mauritanie	25	2,5
Côte d'Ivoire	28	1,8
Tchad	11	1,5
Cameroun	14	1,5
Total en Afrique	2565	-

La consommation du niébé, tout comme sa production, est très importante en Afrique et plus particulièrement au Nigéria (tableau 2). Le niébé est essentiellement consommé pour ses graines, mais parfois aussi pour ses feuilles, servant également à nourrir le bétail (Gomez, 2004). Les graines de niébé en Afrique de l'Ouest, comme au Bénin, peuvent être consommées sous différentes formes et sont retrouvées dans une cinquantaine de plats traditionnels (Dovlo et al., 1976) : beignets (Akara), ragouts (Abobo ou Veyi), purées (Adowé), en mélange avec du riz (Atassi), etc... (Gomez, 2004). Le niébé peut être également consommé sous forme de pudding salé (niébé écrasé dans des feuilles de Bananier), appelé « Moin-moin » au Bénin et en Afrique de l'Ouest ou « Koki » au Cameroun (Gomez, 2004). Au Ghana, le « red red » est un ragoût de niébé associant poivron rouge et huile de palme rouge (Gomez, 2004). Le niébé peut également être mélangé à des céréales comme dans le plat « Adalu », qui est composé de niébé et de maïs séché (Gomez, 2004). La cuisson du niébé peut parfois être effectuée sous pression, comme pour les plats « Abobo » et « Veyi » (Madodé et al., 2011). Il arrive aussi que les graines soient dépelliculées, comme dans la confection du plat « Adowé » ou « Fechuada » (Madodé et al., 2011). En plus de son goût apprécié et son faible coût, la part importante du niébé en Afrique dans l'alimentation est due à sa forte qualité nutritionnelle, notamment à la présence de certains acides aminés essentiels tels que la lysine, la leucine et l'arginine, mais aussi de micronutriments comme les minéraux et les vitamines (Iqbal et al.,

2006). En effet, dans les pays du sud en développement, le premier fléau est la malnutrition associée au manque de protéines et ce essentiellement chez les enfants (Iqbal et al., 2006).

1.1.2 Anatomie et structure de la graine

Le niébé est une légumineuse exalbuminée qui possède un axe embryonnaire logé entre ses deux cotylédons et protégé par un tégument (Figure 2). Une graine pèse entre 0,10 et 0,26 g (Drabo et al., 1984; Kabas et al., 2007; Henshaw, 2008) et présente une longueur, largeur et hauteur comprises entre 5,0–10,0 mm ; 3,8–6,6 mm ; et 3,3–6,1 mm respectivement. Sa forme peut être ovoïde, rhomboïde, réniforme ou globoïde (Kabas et al., 2007; Henshaw, 2008).

Plusieurs types de téguments existent : certains durs, d'autres tendres, de couleur blanche, brune ou noire (Faye et al., 2002) (Figure 1) et présentant un « œil » noir ou brun (Faye et al., 2002). Cet œil du tégument, appelé hile, est la cicatrice de l'attache entre la graine et la plante mère. Le hile est une structure bien visible sur le tégument et dont les extrémités sont bordées par le micropyle d'un côté et par le raphé de l'autre (Figure 2) (Lush and Evans, 1980; Swanson et al., 1985). Les cotylédons sont des tissus de réserves et contiennent essentiellement des granules d'amidon et des protéines (Blaszczak et al., 2007). Enfin, l'axe embryonnaire est à l'origine de la future plantule comprenant sa racine et ses premières feuilles. (Figure 2) (Stanley and Aguilera, 1985).

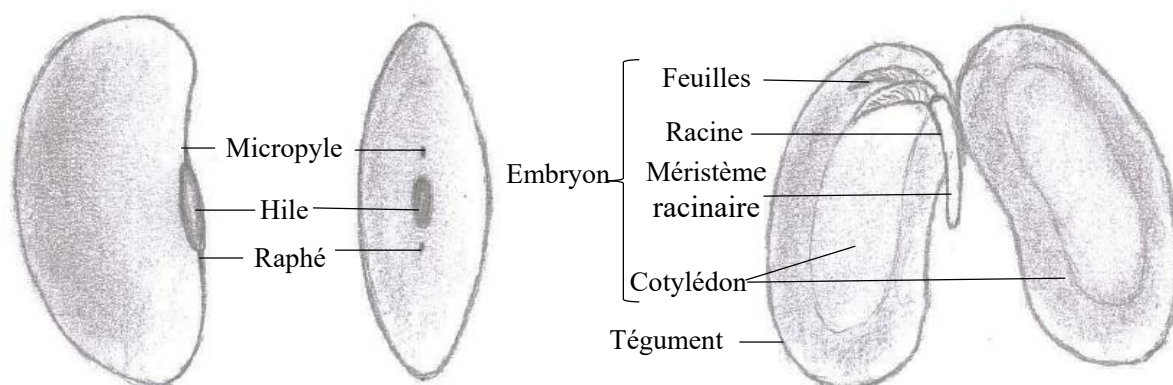


Figure 2 : Structure d'une graine de niébé fermée (à gauche et au centre) et ouverte au niveau des cotylédons (à droite) (Stanley and Aguilera, 1985)

Entre les deux cotylédons se trouve un sillon qui permet aux premières feuilles de l'embryon de grandir lors de la germination.

1.1.3 Composition de la graine

Le tableau 3 ci-dessous présente la composition physico-chimique du niébé.

Tableau 3 : Composition physico-chimique du niébé (Gonçalves et al., 2016 (a); Ajeigbe et al., 2008 (b); Antova et al., 2014 (c) Iqbal et al., 2006 (d); Sreerama et al., 2012 (e); Khalid and Elharadallou, 2013 (f); Stadlmayr et al., 2010 (g)).

Constituant	Composition
Eau (d)(e)(g)	9,2-12,9 (g.100g ⁻¹ bs)
Macronutriments	(g/100 g bs)
Amidon (a)(c)(g)	22,3-66,5
Protéines(a)(b)(c)(d)(e)(f)(g)	20,3-39,4
Fibres (a)(e)(g)	16,0-20,9
Lipides(c)(b)(d)(e)(g)	1,2-9,8
Stachyose (a)(e)	1,7-6,0
Raffinose (a)(e)	0,5-1,0
Verbascose (a)(e)	0,6-1,3
Acide phytique (e)	0,26-1,52
Micronutriments	(mg.100g ⁻¹ bs)
Acide ascorbique (Vitamine C) (a)(g)	5,2-55,4.
Niacine (vitamine B3) (a)(g)	0,7-4,0
Acide panthothénique (vitamine B5) (a)	1,7-2,2
Thiamine (vitamine B1) (a)(g)	0,2-1,7
Pyridoxine (vitamine B6) (a)(g)	0,2-0,4
Acide folique (vitamine B9) (a)(g)	0,1-0,4
Riboflavine (vitamine B2) (a)(g)	0,1-0,3
Biotine (vitamine B8) (a)	0,02-0,03
Lutéine (précurseur de la vitamine A) (a)(g)	0,05
Potassium (a)(d)(g)	190-2890
Calcium (a)(d)(g)	40-1060
Zinc (a)(d)(g)	0,8-11,8
Fer (a)(d)(g)	0,69-21,8

Le niébé contient une forte proportion de protéines (Tableau 3) et est ainsi utilisé en Afrique comme substitut peu coûteux de la viande (Boye et al., 2010). En effet, le niébé possède une forte teneur en certains acides aminés essentiels, tels que la lysine (3.5-7.9 g 16 g⁻¹ d'azote N), la leucine (7.5-7.8 g 16 g⁻¹ N) et la phénylalanine (4.1-5.7 g 16 g⁻¹ N). Cependant la méthionine (1.1-3.5 g 16 g⁻¹ N), acide aminé essentiel chez l'homme est très peu présente dans les graines de niébé (Gonçalves et al., 2016). Ce manque constitue un facteur limitant dans l'apport protéique (Vasconcelos et al., 2010). Ainsi, d'un point de vue protéique, le niébé ne peut pas constituer la seule source de protéines, mais peut en revanche compléter des produits céréaliers (Iqbal et al., 2006). Le niébé possède également une forte teneur en vitamines A (lutéine), B (Niacine, acide panthothénique, thiamine, pyridoxine et acide folique) et C (acide ascorbique)

et en minéraux (potassium, calcium, zinc et fer) (Tableau 3). Une consommation journalière de 100 g de niébé permet de couvrir les besoins journaliers en ces éléments (AJR pour un homme actif : vitamine B1 : 1.0 mg ; vitamine C : 30 mg ; calcium : 400-500 mg ; fer : 5-9 mg) (FAO, 1974). Ces micronutriments confèrent à la graine un fort intérêt nutritionnel. Les graines de niébé contiennent également de fortes quantités d'alpha-galactosides. Ces molécules possèdent des effets positifs grâce à leur effet prébiotique, et négatifs par les désordres intestinaux et les problèmes de flatulence qu'elles peuvent générer (Martinez-Villaluenga et al., 2008; Bouhnik et al., 2004). Ces problèmes de flatulence constituent un frein à la consommation (Martinez-Villaluenga et al., 2008). Cependant, une faible concentration en alpha-galactosides ne génère pas de problème d'inconfort, mais permet de conserver les effets bénéfiques de ces molécules. Pour la suite de cette étude, les alpha-galactosides seront classés parmi les facteurs antinutritionnels (le but étant de réduire leur teneur). D'autres composés antinutritionnels sont aussi présents en quantités non négligeables, tels que les phytates qui réduisent la biodisponibilité des minéraux (Tableau 3) (Ologhobo and Fetuga, 1984).

1.1.4 Les procédés de transformation du niébé

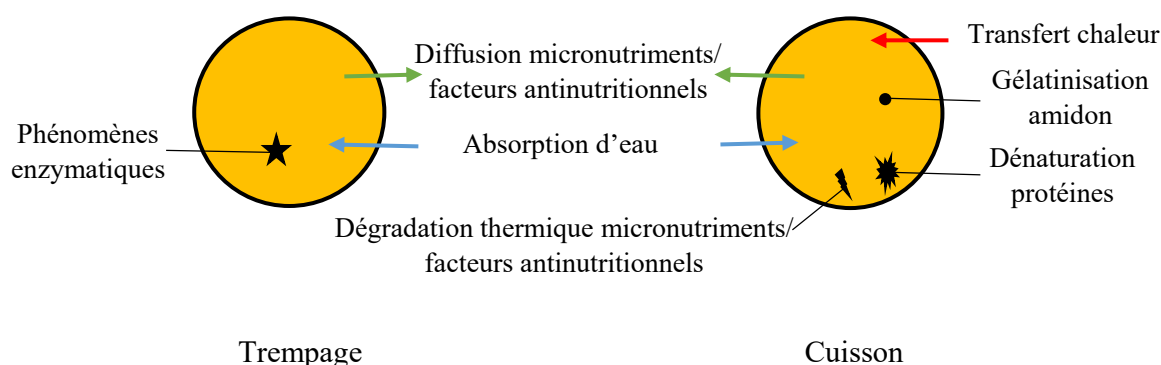


Figure 3 : Phénomènes prenant place au cours du procédé de trempage et de cuisson

1.1.4.1 Le trempage

Le trempage est une opération qui consiste à immerger durant une dizaine d'heures les graines dans un ratio graine/eau (m/m) allant de 1 :1 (eau limitante) jusqu'à 1 :10 (excès d'eau). La température lors du trempage se situe généralement entre 20 °C et 60 °C (Madodé et al., 2013). Cette opération permet de réduire la durée de cuisson qui s'ensuit, en favorisant l'absorption d'eau (Madodé et al., 2011). L'absorption d'eau et le gonflement permettent d'aider à ôter le tégument et à rendre la graine plus tendre. Par ailleurs, les facteurs antinutritionnels tels que les alpha-galactosides et les phytates peuvent migrer dans l'eau de trempage avant cuisson. Cependant, le trempage provoque également des pertes indésirables en micronutriments solubles tels que les minéraux et les composés vitaminiques (Delchier et al., 2014; Nestares et al., 2003) (Figure 3). Lorsque cette étape est effectuée à température ambiante, les graines

peuvent être amenées à germer. La germination nécessite la présence d'obscurité, d'oxygène et une température comprise entre 15 °C et 30 °C. Un prétraitement à 35 °C est favorable à la germination (Toole et al., 1955). La germination est également avantaagée par un ratio graine/eau limitant (1 :1, oxygénation facilitée) et survient à la suite de l'absorption suffisante d'eau. Lors de cette germination, la graine utilise les alpha-galactosides comme source d'énergie nécessaire à sa croissance (Peterbauer and Richter, 2001). Ce phénomène permet de réduire la teneur en alpha-galactosides des graines par leur dégradation enzymatique endogène. La germination permet également d'augmenter la teneur en vitamines, et notamment en folates (Hefni and Witthöft, 2014).

1.1.4.2 La cuisson

La cuisson, qui peut être précédée par un trempage, consiste à immerger les graines dans de l'eau généralement à ébullition (100 °C à pression atmosphérique). Certaines pratiques utilisées couramment en Afrique de l'Ouest permettent de diminuer le temps de cuisson. L'ajout de certains sels (carbonate ou bicarbonate de sodium) dans l'eau de cuisson permet par exemple de faciliter l'absorption d'eau (étape limitante car longue, notamment par la présence du tégument qui constitue une résistance aux transferts de matière) en ramollissant le tégument. Le temps de cuisson de 60 min peut alors être abaissé à 35-45 min (Madodé et al., 2011). Une cuisson sous pression (e.g. 2 bars/120 °C) combinée avec les stratégies décrites ci-dessus réduit le temps de cuisson à 15-20 min. Il est également possible de réduire le temps de cuisson en dépelliculant la graine, mais le produit obtenu dans ce cas en fin de cuisson est plus une bouillie que des graines cuites intègres. La cuisson permet simultanément l'absorption d'eau, la gélatinisation de l'amidon (Bello et al., 2007 ; Okechukwu and Anandha Rao, 1996), la dénaturation de protéines (Tang; 2008), et la réduction des facteurs antinutritionnels, dont les alpha-galactosides (Udensi et al., 2007) (Figure 3). Cependant, la cuisson conduit également à la perte et dégradation de micronutriments, dont les folates (Delchier et al., 2014) (Figure 3).

1.2 Transfert d'énergie et d'eau dans les légumineuses au cours du procédé

Au cours du procédé de trempage-cuisson, l'eau de trempage pénètre progressivement dans la graine et cette dernière absorbe de l'énergie thermique lui permettant de cuire.

1.2.1 Approche globale du transfert de l'eau

Cette absorption d'eau est très souvent expliquée par une approche globale où le milieu « graine » est considéré comme homogène et isotrope. Dans ce cas, la littérature montre que l'absorption d'eau dépend de la température (Figure 4). Par exemple, Kaptso et al. (2008) montrent que la vitesse d'absorption d'eau est plus importante lorsque la température augmente de 25 °C à 45 °C sur deux variétés de niébé (Figure 4).

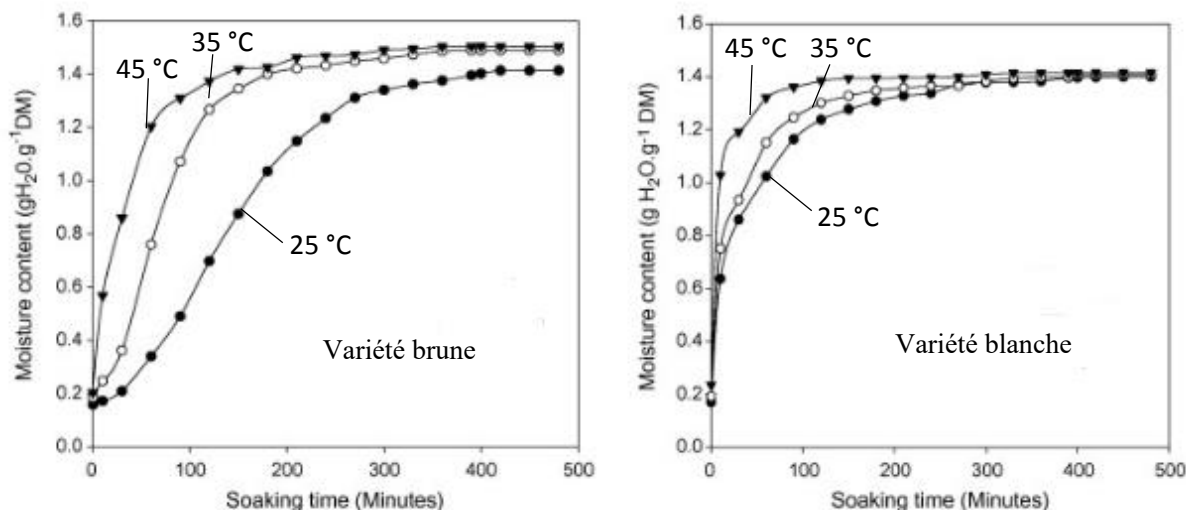


Figure 4 : Absorption d'eau par deux variétés de graines de niébé (blanche et brune) à différentes températures (25 graines dans 100 mL) (Kaptso et al., 2008) :

Dans la littérature, les évolutions cinétiques de la teneur en eau dans la graine de niébé ont été décrites par des modèles empiriques de type sigmoïde (eq.(3)) (Kaptso et al., 2008), par une cinétique de premier ordre (eq.(2)), par le modèle de Peleg (eq.(1)) (Kaptso et al., 2008; Sopade and Obekpa, 1990) ou par la solution mathématique de la seconde loi de Fick (eq.(4)) pour un transfert diffusif dans une sphère (Kashaninejad et al., 2007; Yildirim et al., 2011).

$$W = W_0 + \frac{t}{C_1 + C_2 t} \quad (1)$$

$$W = \frac{k_0}{k_1} - \left(\frac{k_0}{k_1} - W_0 \right) \exp(-k_1 t) \quad (2)$$

$$W = \frac{W_{eq}}{1 + \exp(-k(t - \tau))} \quad (3)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left[-\frac{n^2 D \pi^2}{R^2} t \right] \quad (4)$$

Avec W (g.g⁻¹), la teneur en eau de la graine au temps t (min), W_0 (g.g⁻¹) la teneur en eau initiale, W_{eq} (g.g⁻¹) la teneur en eau à l'équilibre, C_1 (min.g⁻¹.g) et C_2 (g⁻¹.g) les constantes de Peleg, k_0 (min.g.g⁻¹) et k_1 (min⁻¹) des constantes cinétiques d'ordre 0 et 1, k (min⁻¹) une constante de « vitesse de réhydratation », τ (min) le temps nécessaire pour obtenir 50 % de la saturation en eau des graines, D la

diffusivité apparente ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) et R le rayon de la graine (m). M_t et M_∞ sont les quantités d'eau entrées dans la graine à l'instant t et à l'équilibre, respectivement. À partir du modèle sigmoïde, Kaptso et al. (2008) estiment une diffusivité apparente par analogie à la loi de Fick.

$$D = \frac{R^2 k}{\pi^2} \quad (5)$$

Pour ces mêmes auteurs, le modèle sigmoïdal est celui qui décrit le mieux la cinétique d'absorption d'eau du niébé. Toutes les diffusivités apparentes qui résultent de la loi sigmoïdale montrent des valeurs plus importantes lorsque la température augmente. La diffusivité apparente identifiée est de $2,16 \times 10^{-10}$, $3,90 \times 10^{-10}$ et $5,62 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 25 °C, 35 °C et 45 °C respectivement pour la variété brune et de $7,89 \times 10^{-10}$, $1,19 \times 10^{-9}$ et $5,95 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 25 °C, 35 °C et 45 °C respectivement pour la variété blanche (Kaptso et al., 2008). De la même façon, la diffusivité de l'eau dans le pois chiche a été estimée à $1,4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 20 °C, $2,4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 40 °C, $5,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 60 °C, et $7,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 87 °C (Yildirim et al., 2011).

Limite d'un modèle de transfert d'eau passif à travers le tégument:

Cette description macroscopique et globale de l'absorption d'eau de la graine peut être améliorée en considérant les différents éléments constitutifs de cette dernière (Figure 5) : le transfert passif à travers le tégument, mais aussi le transfert dans la structure amidon/ protéine et la convection au niveau de structures spécialisées tel que le micropyle et le sillon du hile (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979).

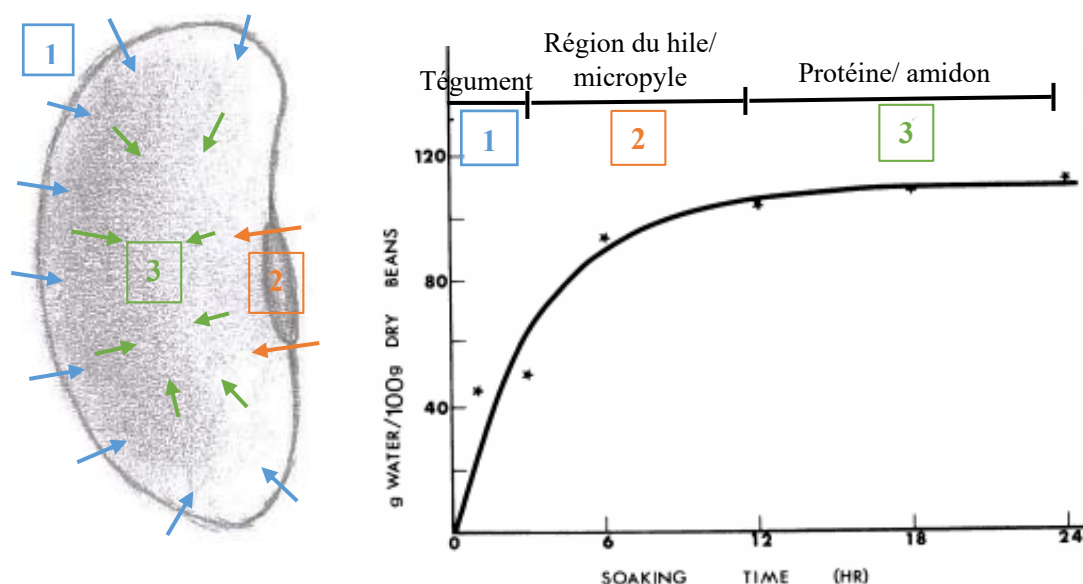


Figure 5 : Absorption de l'eau par la graine de niébé et les différents composants impliqués dans cette absorption (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979) :

Le premier élément en contact avec l'eau est le tégument (1), qui est donc le premier à transférer l'eau vers l'intérieur de la graine. La zone du hile (cicatrice de la graine au point d'attache de la graine) (2) est également en contact direct avec l'eau. En revanche, il nécessite un changement physiologique qui va engendrer son ouverture pour pouvoir absorber l'eau. Ce changement s'opère lorsque de l'eau a déjà été transférée dans la graine, permettant d'obtenir une teneur en eau dans la graine de 24 %. Enfin, les protéines et l'amidon (3) sont les derniers composants à jouer un rôle dans l'absorption d'eau (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979). Ils possèdent chacun leur potentiel d'absorption respectif, en fonction de leur état thermophysique. L'ensemble de ces processus s'additionnent simultanément et/ou séquentiellement pour en apparence décrire une dynamique de type Fickienne (Figure 5).

1.2.2 Transfert de l'eau à travers le tégument et effet d'un traitement alcalin

La capacité de la graine à absorber de l'eau dépend de l'épaisseur du tégument et donc de la capacité de l'eau à diffuser à travers (Sefa-Dedeh et al., 1978). Dans le niébé le tégument peut représenter de 4 % à 26 % du poids de la graine pour *Vigna (L.) Walp Unguiculata (R.)* et *Vigna Unguiculata Mensensis (w)* respectivement (Lush and Evans, 1980). L'épaisseur du tégument peut varier entre 37 et 131 μm (sur une zone extérieure à l'hile) (Lush and Evans, 1980).

Dans l'étude menée par Kaptso et al., (2008), les deux variétés différentes de niébé (une blanche et une brune) diffèrent essentiellement par l'épaisseur de leur tégument. En effet, le tégument de la variété blanche représente 5,6 % de la graine, tandis que celui de la variété brune représente 15,9 %. Dans le modèle global réalisé par les auteurs, cette différence n'est pas intégrée (Figure 4). Ainsi, pour chaque température, les diffusivités apparentes estimées sont plus importantes pour la variété blanche que pour la variété brune (agit comme une barrière à la diffusivité) (paragraphe 1.2.1).

Dans le cas des graines difficiles à cuire, les pectines constitutives du tégument se modifient et interagissent avec les ions divalents (Yi et al., 2016). La conséquence de cette interaction est que la pectine devient moins soluble et plus imperméable (Njoroge et al., 2014). Ce phénomène serait, entre autre, à l'origine des difficultés de la graine à absorber l'eau. Les graines acquièrent cette difficulté à cuire lors de stockages trop longs (Njoroge et al., 2015; Varriano-Marston and Jackson, 1981). En effet, lors d'un stockage long, les phytates sont dégradés libérant ainsi le magnésium et le calcium et les rendant disponibles pour une liaison avec les pectines, qui s'en retrouvent alors renforcées (Kruger et al., 2015; Mwangwela et al., 2006). Ce phénomène peut être observé dans la figure 6. Pour pallier à cette résistance à la cuisson, plusieurs traitements sont envisageables : l'ajout de carbonate de sodium lors de la cuisson (traitement alcalin), et un prétraitement thermique des graines.

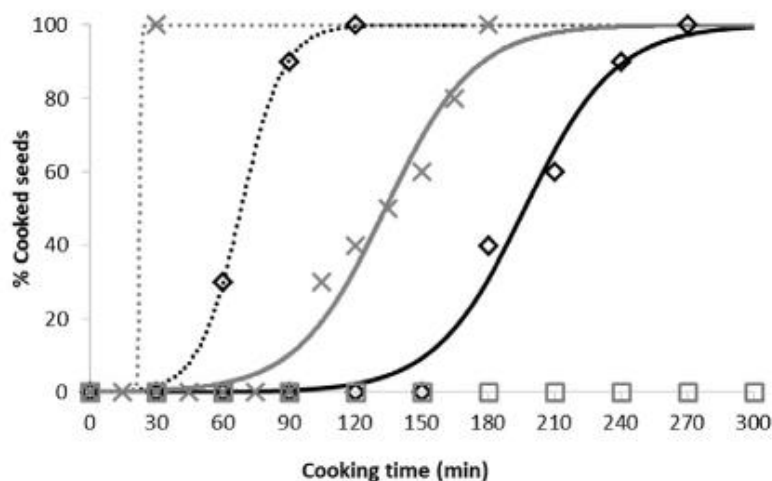


Figure 6 : Absorption d'eau par une variété de haricot Canadien frais (pointillé) stockée six mois à 35°C (trait plein) puis cuite dans de l'eau déionisée (◇) ou dans de l'eau contenant du NaCO₃ (×) (Njoroge et al., 2016) :

En effet, l'étude de Njoroge et al. (2016) a montré que l'ajout de NaCO₃ durant le trempage induit une déméthoxylation des pectines, aboutissant à une perméabilisation accrue du tégument. Aussi, un pré-traitement thermique (à 96 °C) peut induire la dépolymérisation des pectines par β -élimination (Njoroge et al., 2016). Ces traitements conduisent ainsi à la solubilisation des pectines et facilitent alors l'absorption d'eau par la graine (Figure 6).

1.2.3 Transfert d'eau par convection

L'absorption d'eau s'observe également dans la région spécifique du tégument où se situent le hile, le micropyle et le raphé (structure Figure 2). La structure de ces derniers peuvent différer en fonction des espèces (Robles-Díaz et al., 2016). L'impact de ces éléments sur l'absorption d'eau de la graine de *Cercis canadensis* a été mis en évidence par des mesures du taux d'absorption d'eau sur des graines dont ces structures ont été bouchées (Gama-Arachchige et al., 2013) (Figure 7). En effet, lorsque le raphé, le micropyle et le hile sont bouchés, l'absorption d'eau par les graines est entièrement stoppée (Gama-Arachchige et al., 2013) (Figure 7). Ces structures ont donc un rôle essentiel dans l'absorption d'eau. D'autres auteurs ont confirmé sur d'autres légumineuses l'implication de ces structures dans leur comportement à l'hydratation. Dans les graines de Lupins par exemple, l'entrée d'eau s'opère également par le micropyle ou le raphé (Robles-Díaz et al., 2016). De plus, Lush and Evans (1980) ont montré que le micropyle et le raphé sont fermés lorsque la graine de niébé est sèche. Lors de l'absorption d'eau, les cellules changent de conformation, permettant ainsi l'ouverture de ces deux structures. Le hile quant à lui

ne serait en fait pas directement impliqué dans le phénomène d'absorption d'eau, mais plutôt dans la dessiccation lors de la dormance de la graine (Lush and Evans, 1980).

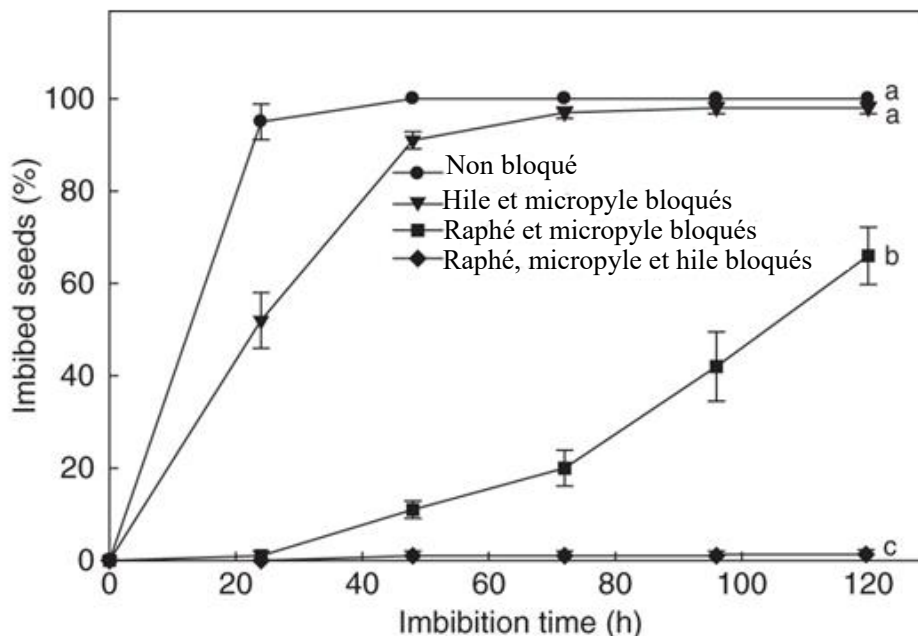


Figure 7 : Pourcentage d'absorption d'eau de la graine de *Cercis canadensis* à température ambiante avec différentes structures (hile, micropyle et raphée) bouchées ou non (Gama-Arachchige et al., 2013) :

Le micropyle et le raphé permettent l'entrée d'eau dans la graine lorsque les conditions du milieu sont favorables (hygrométrie, température). Lorsque la graine de niébé contient 10 à 12 % (m/m) d'eau, la graine est imperméable. À partir de 17 % (m/m), l'absorption est lente et s'opère par le raphé. À partir de 24 % (m/m), l'eau entre essentiellement par le micropyle, tandis qu'au-dessus de 30 % (m/m) l'eau peut pénétrer de manière importante par toutes les structures du tégument (Lush and Evans, 1980). Ainsi, le raphé et le micropyle sont deux structures fortement impliquées dans l'absorption d'eau et sont essentielles pour les graines présentant un tégument imperméable (Lush and Evans, 1980).

1.2.4 Comportement des structures amidon/protéine

1.2.4.1 L'amidon

L'amidon est composé essentiellement d'amylose et d'amylopectine (Ratnayake et al., 2002; Hoover et al., 2010) stockés dans des granules de taille comprise entre 15 μm et 30 μm . Le grain d'amidon natif présente une structure semi-cristalline polymorphe, due principalement à la longueur des chaînes d'amylopectine (Ratnayake et al., 2002). Le niébé contient entre 22 et 66 % d'amidon (Gonçalves et al.,

2016). Si l'amidon est chauffé en présence d'eau (lors d'un procédé de cuisson), cela entraîne une rupture des liaisons hydrogène et donc une perte de la structure cristalline de l'amidon. Ceci correspond à la gélatinisation de l'amidon (Ratnayake et al., 2002). Le taux de gélatinisation, mesurable par DSC (Differential Scanning Calorimetry) permet de déterminer l'état d'avancement (ou degré) de la cuisson.

Le taux de gélatinisation qui peut varier entre 0 (amidon natif) à 1 (amidon complètement gélatinisé), dépend essentiellement de la température et teneur en eau (Briffaz et al., 2014; Toro et al., 2015). La Figure 8 présente par exemple le diagramme de phase de l'amidon de riz (Briffaz et al., 2014).

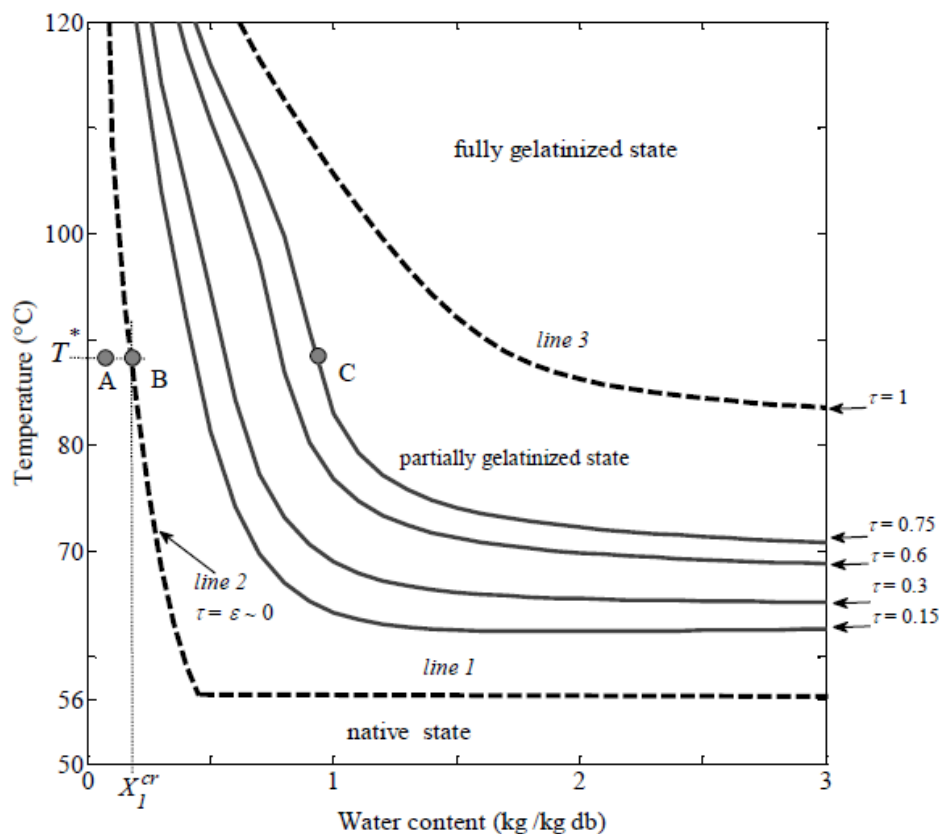


Figure 8 : Taux de gélatinisation du grain d'amidon de riz en fonction de la température et de la teneur en eau (non gélatinisé en dessous de la ligne 1, partiellement gélatinisé entre la ligne 1 / 2 et 3 et entièrement gélatinisé en dessus de la ligne 3) (Briffaz et al., 2014)

Le degré de gélatinisation est une fonction croissante de la teneur en eau (X) et de la température (T). Les modèles prédictifs de la gélatinisation en fonction de la température et de la teneur en eau (diagramme de phase) $\tau = f(X, T)$ sont soit empiriques (Fukuoka *et al.*, 2002), soit thermodynamiques avec la relation de Clausius-Clapeyron (Baks *et al.*, 2007 ; Turhan et Gunasekaran, 2002) ou la loi de

Flory – Huggins utilisée pour prédire la température de fusion des polymères semi-cristallins. A. Briffaz et al., 2013 ont proposé un modèle empirique utilisant une double sigmoïde ajustée.

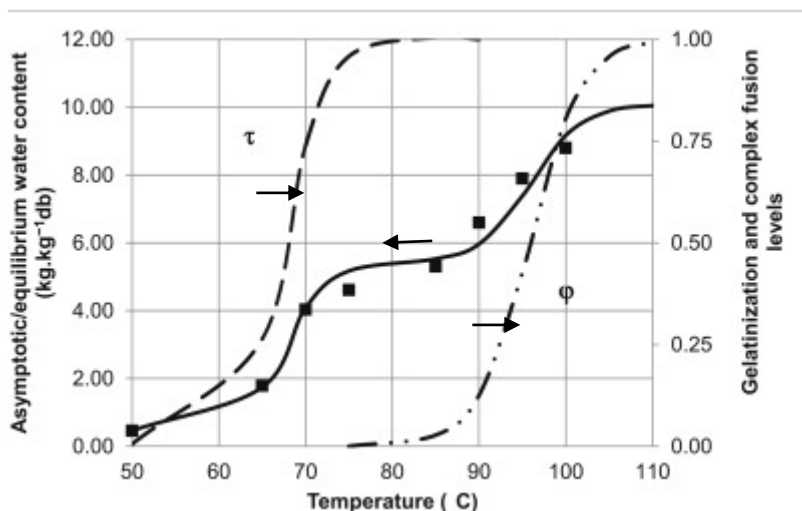


Figure 9 : Evolution de la teneur en eau (g.g^{-1}) ; du taux de gélatinisation τ et de la fusion du complexe amylose-lipide ϕ en fonction de la température du grain de riz (Aurélien Briffaz et al., 2013) :

Le changement de structure de l'amidon permet aux molécules d'eau de former des liaisons hydrogène avec le groupement hydroxyle de l'amylose et de l'amylopectine, augmentant ainsi le pouvoir d'absorption d'eau de l'amidon et sa solubilité (Ratnayake et al., 2002). Ce phénomène augmente le pouvoir d'absorption de l'amidon de 4 à 27 pour une température passant de 50°C à 95°C chez le pois (Ratnayake et al., 2002). La gélatinisation de l'amidon va entraîner une augmentation de taille des granules de 20 μm à 50-70 μm chez le niébé, avant rupture et perte d'intégrité de ces derniers (Okechukwu and Anandha Rao, 1996). Dans le cas du niébé, la gélatinisation débute à 67 °C (pic de gélatinisation à 77 °C) (Okechukwu and Anandha Rao, 1996). Le facteur de gonflement (volume de l'amidon après cuisson/volume de l'amidon sec) du grain d'amidon du niébé est de 4,8 à 60 °C, de 7,2 à 70 °C, de 21,0 à 80 °C, et de 27,0 à 90 °C (Hoover et al., 2010). Dans le riz étudié par Briffaz et al., (2013), la gélatinisation débute à 60 °C (pic de gélatinisation à 68 °C) et se traduit également par une augmentation de volume du grain d'amidon. En effet, à 50 °C, 75 °C et 95 °C, les grains d'amidon mesurent 0,3 ; 4,8 et 8,3 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ (Briffaz et al., 2014). La diffusivité apparente était estimée à $3,6 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ dans le grain natif et $2,8 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ dans le grain gélatinisé (Briffaz et al., 2014). La gélatinisation et donc la diffusion de l'eau dans le grain d'amidon (68 °C) et la fusion du complexe amylose-lipide (90 °C-100 °C) expliquent en partie l'évolution de teneur en eau du riz (Figure 9). Ainsi, le grain de riz double sa teneur en eau lors d'une cuisson à 50 °C (pas de gélatinisation), alors qu'elle est multipliée par 20 et par 40 à des températures de 75 °C et 95 °C (gélatinisation) (Aurélien Briffaz et al., 2013).

1.2.4.2 Les protéines

Lors de la cuisson, les protéines constitutives des légumineuses comme le niébé subissent également des modifications thermophysiques. Cela se traduit par une perte des liaisons intermoléculaires et de leur conformation. Cette dénaturation thermique peut s'accompagner d'une agrégation des protéines (Horax et al., 2004). Les globulines sont majoritaires chez les dicotylédones comme le niébé (vicilline), mais aussi chez le haricot rouge, le haricot mungo, et le soja (Tang, 2008). Ces protéines présentent un pic de dénaturation thermique, détectable par DSC (Differential Scanning Calorimeter), entre 85 °C et 88 °C (globuline 7S) pour le niébé, le haricot rouge et le haricot mungo, tandis que le soja présente deux pics : le premier entre 77 °C et 88 °C (globuline 7S) et le second à 96 °C (globuline 11S) (Horax et al., 2004; Tang, 2008). Or ces résultats varient en fonction de la teneur en eau de l'isolat protéique. En effet, par exemple, lorsque la teneur en eau augmente de 11 % à 94 %, la température de dénaturation diminue de 180 °C à 93,3 °C (globuline 11S) et 76,5 °C (globuline 7S) chez le soja (Horax et al., 2004)..

Les protéines sont également impliquées dans l'absorption d'eau. Ainsi, Fleming et al. (1974) ont mesuré la capacité d'absorption d'eau du soja et du tournesol sous forme de poudre, plus ou moins concentrée en protéines. Pour une farine de soja enrichie en protéines à 50 % ; 64 % et 86 %, les quantités d'eau absorbées sont, respectivement de 2,8, 3,7 et 6,3 kg H₂O par kg de farine. Lin et al. (1974) ont confirmé cette capacité d'absorption d'eau. La capacité d'absorption d'eau des protéines est maximale à 80 °C (avant dénaturation) et augmente lorsque le pH augmente (Kinsella, 1979). Contrairement au transfert de l'eau à travers le tégument, un traitement alcalin diminue la capacité d'absorption d'eau des protéines (Kinsella, 1979).

1.3 Les alpha-galactosides

1.3.1 Structure et famille

Les alpha-galactosides sont des sucres composés d'un saccharose + n galactoses, dont les plus répandus chez les légumineuses sont le raffinose, le stachyose et le verbascose (Figure 10). Dans le niébé, le raffinose est présent à 0,5-1 g/100g bs, le stachyose à 1,7-6,0 g/100g bs et le verbascose à 0,6-1,3 g/100g bs (Gonçalves et al., 2016), avec une distribution régionalisée. Il a été ainsi montré que dans le pois chiche, les alpha-galactosides sont présents essentiellement dans le cotyledon (65 %) et l'embryon (27 %) et peu dans le tégument (7 %) (Sreerama et al., 2010). Au niveau cellulaire, 15 % de ces alpha-galactosides sont conservés dans des vacuoles de stockage et 85 % sont sous forme libre dans le cytosol (Obendorf and Gorecki, 2012). Les alpha-galactosides ont deux rôles dans la graine : (i) ils permettent de la protéger contre la dessiccation et (ii) ils sont également un apport nutritif pour la croissance de la plante lors de la germination (Peterbauer and Richter, 2001). Lors de cette consommation, ces oligosaccharides sont dégradés par une alpha-galactosidase endogène.

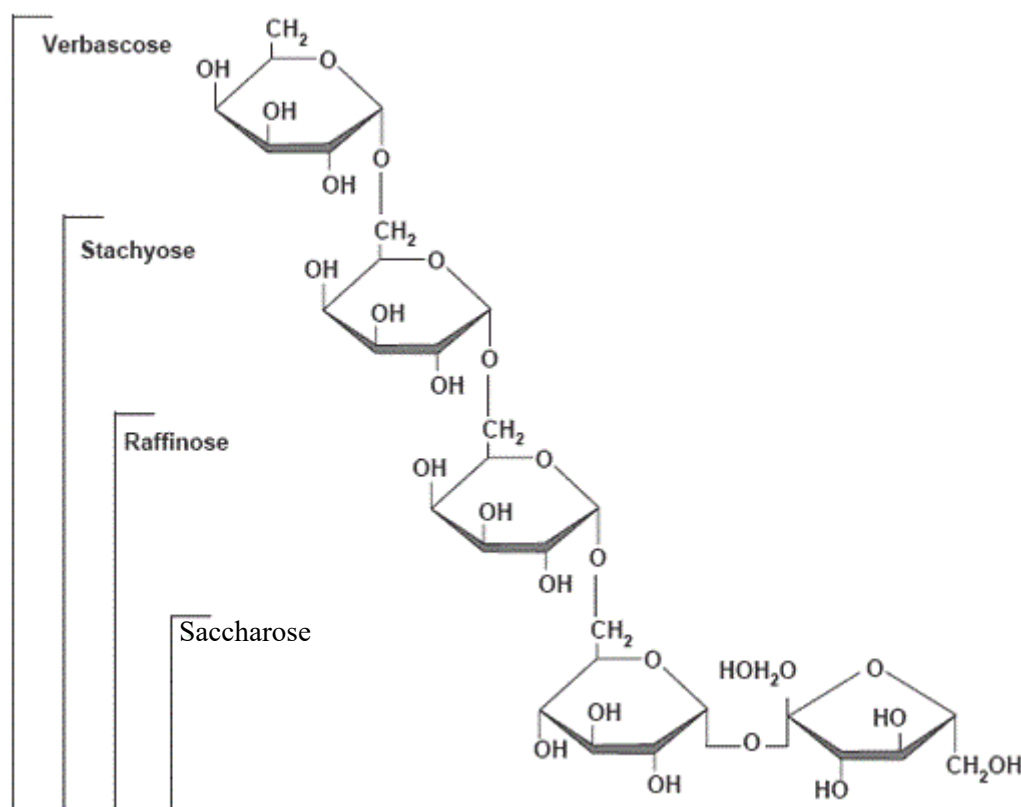


Figure 10 : Structure chimique du raffinose, stachyose et verbasose

Du fait de l'absence d'alpha-galactosidase chez l'homme, lors de la consommation de légumineuses, les alpha-galactosides ne peuvent pas être dégradés et fermentent dans le côlon, générant ainsi des désordres digestifs et des problèmes de flatulence (Obendorf and Gorecki, 2012). Ces problèmes apparaissent 5 à 6 h après l'ingestion (Calloway et al., 1971). En effet, par exemple, la formation de gaz est estimée à environ 9 ml/h de CO₂, 2,8 ml/h de CH₄ et 9,2 ml/h de H₂ pour l'ingestion de 100 g d'haricot blanc californien par l'homme, et à 2 ml/h de CO₂, 0,5 ml/h de CH₄ et 5,5 ml/h de H₂ pour l'ingestion de 100 g de soja (Calloway et al., 1971). La réduction de la teneur en alpha-galactosides dans la graine de niébé pour la consommation peut cependant être optimisée lors de l'étape de trempage-cuisson en contrôlant mieux les phénomènes de transfert et de dégradation prenant place au cours de l'opération de trempage-cuisson (Price et al., 1988)

1.3.2 Impact d'un trempage-cuisson sur la teneur en alpha-galactosides

Le tableau 4 reporte le taux de réduction en alpha-galactosides mesuré par différents auteurs sur diverses légumineuses au cours du procédé de trempage-cuisson :

Tableau 4 : Taux de réduction en alpha-galactosides après le procédé de trempage-cuisson (en % m/m bs). Raffi=Raffinose, Stach=Stachyose et Verba=Verbascose ; G=Graine et E=Eau et T=Température.

Variété	Conditions du procédé				Taux de réduction (%)			Référence
	T (°C)	Temps (h)	Ratio G/E	autres	Raffi	Stach	Verba	
Niébé	24	12	1 :1,4	Germination , broyage	4	30	/	Alani et al., 1990)
	25	12	1 :4		42	24	27	(Abdel-Gawad, 1993)
	25	12	1 :4	Ajout de NaHCO ₃	46	28	37	
	25	12	1 :10		46	63	/	(Ibrahim et al., 2002)
	28	16	1 :10		33	28	/	(Onyenekwe et al., 2000)
	30	12	100% HR	Germination	49	55	/	(Nnanna and Phillips, 1988)
	34	12	1 :1,4	Germination , broyage	15	62	/	Alani et al., 1990)
	60	1	1 :5		72	42	30	(Abdel-Gawad, 1993)
	100	0.66	1 :10		47	37		(Onyenekwe et al., 2000)
	100	0.75	?		46	50	/	(Onigbinde and Akinyele, 1983)
	100	0.75	1 :10		100	81	/	(Ibrahim et al., 2002)
Haricot	25	12	1 :4		47	31	28	(Abdel-Gawad, 1993)
				Ajout de NaHCO ₃	60	40	32	
	60	1	1 :5		89	47	32	
Lentille	25	12	1 :4		38	37	18	(Abdel-Gawad, 1993)
				Ajout de NaHCO ₃	56	39	21	
	60	1	1 :5		67	45	36	
Fève	25	12	1 :4		38	22	29	(Abdel-Gawad, 1993)
				Ajout de NaHCO ₃	46	28	32	
	60	1	1 :5		62	38	39	
	25	9	1 :3		22	7	/	(Frias et al., 2000)
Pois chiche	25	72	-	Germination	100	100	100	(El-Adawy, 2002)
	100	0.58	1 :6,7	Trempage 9 h-25 °C	63	60	/	(Frias et al., 2000)
	100	1,5	1 :10	Trempage 12 h-25 °C	48	40	100	(El-Adawy, 2002)

Le taux de réduction en alpha-galactosides à la suite d'un procédé de trempage ou de cuisson est similaire pour le niébé, le haricot, la lentille, la fève et le pois chiche. Plusieurs paramètres influencent ce taux de réduction et notamment la germination, l'ajout de sel, le dépelliculage et le ratio graine/eau employé. En effet, Abdel-Gawad (1993) montre que l'ajout de bicarbonate de sodium peut augmenter la réduction de 4 à 10 % en alpha-galactosides dans la graine, par ramollissement du tégument (Tableau 4). L'augmentation de température favorise également la réduction de la teneur en alpha-galactosides de la graine en amplifiant les phénomènes de transferts. Cependant, l'impact du ratio graine/eau n'est pas certain. En effet, Onyenekwe et al. (2000) et Ibrahim et al. (2002) obtiennent des résultats très différents pour de mêmes conditions expérimentales. Il est cependant envisageable qu'un ratio eau/graine élevé augmente la diffusion des molécules dans l'eau de trempage. La germination en milieu oxygéné réduit également la teneur en alpha-galactosides. Nnanna and Phillips (1988) ont montré qu'un trempage des graines de niébé effectué sans injection d'oxygène entraîne une réduction de 16 % du stachyose après 9 h de trempage à 30 °C, tandis que l'ajout d'oxygène peut entraîner une réduction de 68 % du stachyose après 24 h de trempage à 30 °C. Cette réduction est d'origine enzymatique (alpha-galactosidase endogène). Sur des temps plus long de germination (plusieurs jours), une perte totale en alpha-galactosides est possible dans la graine. En effet, Kadlec et al. (2008) ont montré qu'à la suite d'une germination de 5 jours à température ambiante, la concentration en alpha-galactosides diminue de 100 % dans le haricot mungo, de 74 % pour la lentille et de 69 % pour le pois chiche. Parfois, pour amplifier la perte en alpha-galactosides de la graine, l'ajout d'alpha-galactosidase exogène est possible au cours du trempage (Price et al., 1988) (fonctionnerait essentiellement sur des farines, car les alpha-galactosides seraient libérés dans l'eau de trempage et donc en contact de l'enzyme). Cela peut conduire à la perte totale des alpha-galactosides.

Enfin les différents facteurs pouvant favoriser la perte en alpha-galactosides peuvent être combinés, comme c'est le cas dans l'étude de Alani et al. (1990) qui combine la germination au trempage. Il en est de même pour Rakshit et al. (2015) qui ont optimisé le procédé de trempage du haricot mungo afin de favoriser la perte des alpha-galactosides. Ainsi, un trempage de graines dépelliculées à 16 °C pendant 21 h, avec un ratio graine/eau de 1 :10 (m/m) et un pH de 6,0 permet de réduire la teneur en alpha-galactosides de 95 %, ce qui est supérieur aux pertes observées (57 %) lors d'un trempage effectué dans des conditions domestiques.

Ces différentes pertes observées sont dues à des mécanismes de transfert et de dégradation enzymatique, décrits ci-dessous.

1.3.3. Les réactions enzymatiques au cours du procédé

Lors du procédé de trempage cuisson, les alpha-galactosides sont thermostables, mais peuvent cependant être dégradés par l'action enzymatique de l'alpha-galactosidase endogène (Figure 11).

Où v est l'activité enzymatique ou vitesse de réaction ($\mu\text{mol min}^{-1}$), $[S]$ est la concentration en substrat (mM), v_{\max} est une constante définissant l'activité enzymatique maximale ($\mu\text{mol min}^{-1}$) mesurable lorsque la concentration en substrat est saturante, et K_m est la constante de Michealis (mM) définissant la concentration en substrat lorsque la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximale. Cette équation (6) de Michaelis-Menten peut cependant être assimilée à une cinétique d'ordre 1, lorsque K_m est très grand devant S, ce qui aboutit à: $v \approx (v_{\max} / K_m)[S]$. Les constantes K_m et v_{\max} de l'enzyme de différentes légumineuses ont déjà été déterminées pour le raffinose et le stachyose dans un milieu in vitro. En effet, Alani et al. (1989) ont déterminé pour le niébé un K_m pour le raffinose de 4,6 mM pour l'isoforme I et de 5,0 mM pour l'isoforme II, tandis que le K_m du stachyose a été estimé à 11,0 mM pour l'isoforme I et à 15,0 mM pour l'isoforme II¹. Chez *Vicia Faba*, la v_{\max} est de 28,4 et de 4,18 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéine pour l'isoforme I et II respectivement pour le raffinose et de 9,0 et 1,36 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéine pour l'isoforme I et II respectivement pour le stachyose (Dey and Pridham, 1969a). Ces mêmes auteurs ont également identifié chez la fève des constantes Michaeliennes K_m de 4,0 mM (isoforme I) et 5,0 mM (isoforme II) pour le raffinose et de 7,5 mM (isoforme I) et 5,26 mM (isoforme II) pour le stachyose.

L'activité enzymatique de l'alpha-galactosidase peut également être impactée par la présence d'inhibiteurs (e.g. sucres, galactinol, myo-inositol...). Dans le cadre d'un inhibiteur compétitif (Eq. 7), non compétitif (Eq. 8) et incompétitif (Eq. 9), l'équation de Michaelis-Menten devient :

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m^{app1} + [S]} \quad (7)$$

$$v = \frac{v_{\max}^{app} [S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

$$v = \frac{v_{\max}^{app} [S]}{K_m^{app2} + [S]} \quad (9)$$

Avec,

$$K_m^{app1} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (10)$$

$$K_m^{app2} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (11)$$

$$v_{\max}^{app} = \frac{v_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (12)$$

Où $[I]$ est la concentration en inhibiteur (mM), K_I , la constante d'inhibition de l'inhibiteur I (mM). K_m^{app1} et K_m^{app2} sont les constantes de Michealis apparentes (mM) pour les inhibitions compétitives et incompétitives, respectivement, v_{\max}^{app} est l'activité enzymatique maximale apparente ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$). Ainsi pour une inhibition compétitive $K_m^{app1} > K_m$ et v_{\max} est constant; pour une inhibition non compétitive $v_{\max}^{app} < v_{\max}$ et K_m est constant; et pour une inhibition incompétitive $K_m^{app2} < K_m$ et $v_{\max}^{app} < v_{\max}$.

Dans l'ensemble des travaux réalisés antérieurement, la détermination des paramètres Michaeliens K_m et v_{\max} (apparents ou non) a été réalisée par la méthode de Lineweaver Burk en inversant l'équation de Michaelis-Menten :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (13)$$

Cette technique de linéarisation en $1/[S]$ qui permet une identification simple de K_m et v_{\max} par simple régression linéaire est décrite comme peu précise par plusieurs auteurs du fait de l'importance accordée aux faibles concentrations et à la forte incertitude associée à son inversion (van Boekel, 2009; Doeswijk and Keesman, 2009). Van Boekel (2009) propose plutôt d'identifier les paramètres de Michaelis-Menten en utilisant la forme intégrée (eq. (14)) de l'équation différentielle de Michaelis-Menten:

$$t = \frac{1}{v_{\max}} ([S_0] - [S]) + \frac{K_m}{v_{\max}} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (14)$$

Avec $[S_0]$ (mM), la concentration initiale en substrat. À notre connaissance, cette méthode d'identification n'a jamais été réalisée sur les alpha-galactosides.

Le pH optimal de l'alpha-galactosidase de niébé se situe entre 5,0 et 5,9 sur un substrat modèle (p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside) (Alani et al. 1990). De la même façon, Dey & Pridham (1969a) ont montré que l'activité optimale de l'enzyme chez les fèves (*Vicia Faba*) sur le même substrat est observable pour un pH compris entre 3 et 6, tandis qu'elle apparaît pour le raffinose entre 3 et 5 (Figure 12). Dey, Campillo, & Lezica (1983) et Bhaskar et al. (1990) présentent des résultats similaires chez la lentille et *C. Sericea* respectivement.

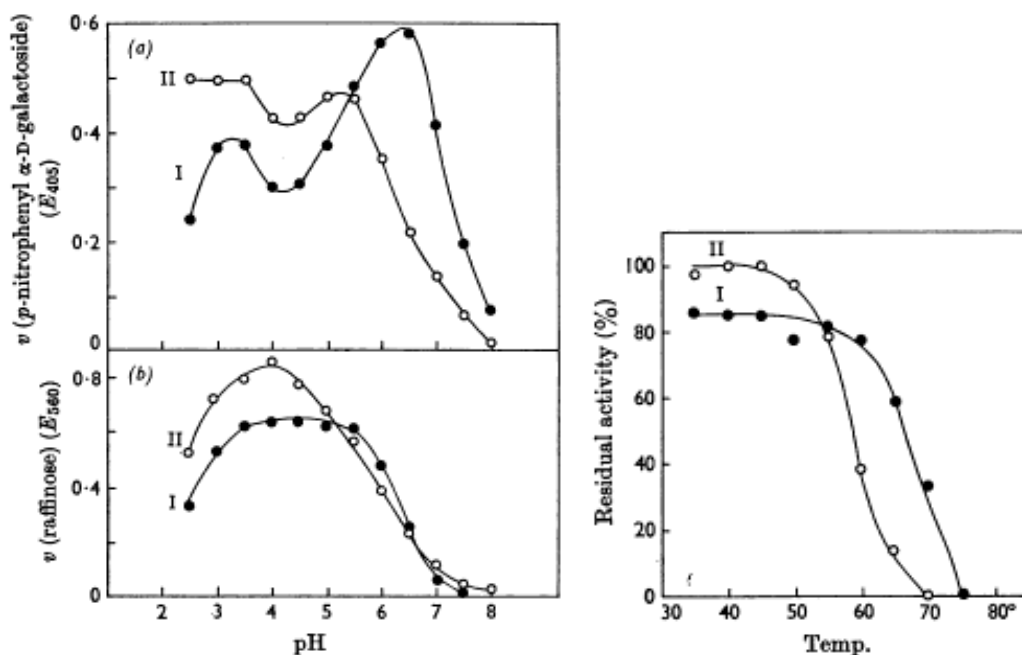


Figure 12 : Effet du pH (à gauche) et de la température (à droite) sur l'activité enzymatique résiduelle de l' α -galactosidase de fèves (*Vicia Faba*) pour des temps d'incubation de 15 min (Dey and Pridham, 1969b)

Comme le pH, la température impacte également l'activité enzymatique. La température optimale est de 30 °C pour le niébé (Alani et al. 1990). Dey et al. (1983), Dey and Pridham, (1969b) et Bhaskar et al. (1990) ont montré que pour la lentille, la fève, et *C. Sericea*, l'activité enzymatique en fonction de la température présentait une allure Gaussienne, dont l'optimal se situe à 50 °C (Figure 12) (temps d'incubation de 5 min). L'énergie d'activation de l' α -galactosidase de fève est de 62,1 kJ mol⁻¹.

L'activité enzymatique (v) change en fonction de la température T et van Boekel, (2008) propose une formulation qui prend en compte l'augmentation de l'activité lorsque la température augmente (v_{act}) corrigée par un terme d'atténuation (a_{rel}). En effet, sur des temps longs, l'enzyme peut être dénaturée par effet thermique :

$$v = a_{rel} v_{act} \quad (15)$$

Et v_{act} suit une loi d'Arrhénius:

$$v_{act} = v_{ref} \exp \left(-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right) \quad (16)$$

Avec v_{ref} , l'activité enzymatique ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ d'enzyme) à la température de référence, E_a l'énergie d'activation (kJ mol^{-1}) et R la constante des gaz parfaits. Le terme d'atténuation (a_{rel}) est décrit par une cinétique d'ordre 1 et la constante de réaction (k) (min^{-1}) suit également une loi d'Arrhenius (van Boekel, 2008) :

$$a_{rel} = \exp(-k t) \quad (17)$$

$$k = k_{ref} \exp\left(-\frac{E_{a,in}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (18)$$

1.3.3.2 L'alpha-galactosidase dans la graine au cours du procédé

Alani et al. (1990) ont montré que durant les 6 premières heures de germination à 30 °C, l'activité de l'alpha-galactosidase du niébé doublait. Ce changement d'activité enzymatique est responsable de la dégradation de 38 % du stachyose présent dans la graine en 12 h. Cependant le milieu graine contient d'autres molécules dont certaines peuvent être des inhibiteurs, notamment de nombreux sucres. Gangola et al. (2014) ont détecté la présence de galactinol (0,31-0,69 mmol/100g, soit 0,11-0,24 g/100g) et de myo-inositol (0,32-0,83 mmol/100 g, soit 0,06-0,15 g/100g) dans le pois chiche. Ces deux molécules, également présentes dans le niébé, sont impliquées dans la bio-synthèse des alpha-galactosides (Obendorf and Gorecki, 2012; Peterbauer and Richter, 2001). De plus, le niébé contient du galactose (0,15 g/100g, soit 0,83 mmol/100g) (Gonçalves et al., 2016) et de l'arabinose (Longe, 1980). Or ces sucres agissent comme des inhibiteurs compétitifs sur l'alpha-galactosidase (Dey and Pridham, 1969a). En effet, la présence de galactose en concentrations 6,25 mM et 25 mM réduit l'activité de l'alpha-galactosidase de *Vicia Faba* sur le PNP (p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, substrat spécifique à l'alpha-galactosidase) de 70 et 90 % respectivement, tandis que ces mêmes concentrations en galactinol entraînent une réduction de l'activité enzymatique de 44 et 74 % (Dey and Pridham, 1969a). Une concentration de 6,25 mM et 25 mM de myo-inositol entraîne une réduction de l'activité de l'alpha-galactosidase de *Vicia Faba* de 16 et 44 %, alors qu'une concentration de 25 mM en L-arabinose conduit à une réduction de 16 % de l'activité enzymatique (Dey and Pridham, 1969a). Ainsi le galactose est un inhibiteur plus fort que le galactinol, qui est lui-même un inhibiteur plus fort que le myo-inositol. Il est à noter que le PNP est un substrat plus spécifique ($K_m = 0,38-0,45$ mM pour *Vicia Faba*) que les alpha-galactosides (4,0-7,5 mM en fonction de l'alpha-galactoside considéré pour *Vicia Faba*). Ces derniers risquent donc d'être plus fortement impactés par ces inhibiteurs pour une même concentration en substrat et en inhibiteur.

Ainsi lors d'un trempage-cuisson, les alpha-galactosides peuvent être dégradés par l'alpha-galactosidase endogène à une vitesse qui dépendra de la présence en inhibiteurs, de la température et du pH des graines. Il est à noter que ce pH peut évoluer au cours du procédé. En effet, les vacuoles de stockage contenant l'enzyme et les alpha-galactosides présentent un pH basique dans une graine crue. Blöchl et al. (2008) ont observé une acidification des vacuoles de stockage grâce à l'action d'une pompe à proton lors d'un trempage cuisson du pois.

Malgré cette complexité, la dégradation des alpha-galactosides par l'enzyme lors de la germination des graines de légumineuses a déjà été décrite par des équations empiriques (Kadlec et al., 2008) différentes de celles de Michaelis-Menten :

$$[S] = [S_0] - kt \quad (19)$$

$$[S] = [S_0] \exp(-kt) \quad (20)$$

$$[S] = at^2 + bt + [S_0] \quad (21)$$

k est une constante de réaction (s^{-1}) et a ($mM.s^{-2}$) et b ($mM.s^{-1}$) sont des constantes.

1.3.4 La diffusivité des alpha-galactosides au cours du procédé

Lors d'opération de trempage-cuisson, la perte en alpha-galactosides dans la graine est en partie expliquée par un mécanisme de diffusion de la graine vers l'eau de cuisson. Les coefficients de diffusion à dilution infinie à 30 °C sont de $4,35 \times 10^{-10} m^2 s^{-1}$, $3,80 \times 10^{-10} m^2 s^{-1}$, $5,23 \times 10^{-10} m^2 s^{-1}$ et $6,75 \times 10^{-10} m^2 s^{-1}$ pour le raffinose (MM=504 g.mol⁻¹) (Craig and Pulley, 1962), le stachyose (MM=660 g.mol⁻¹) (Craig and Pulley, 1962), le saccharose (MM=342 g.mol⁻¹) (Uedaira and Uedaira, 1985) et le galactose (MM=180 g.mol⁻¹) (Craig and Pulley, 1962) respectivement (Figure 13).

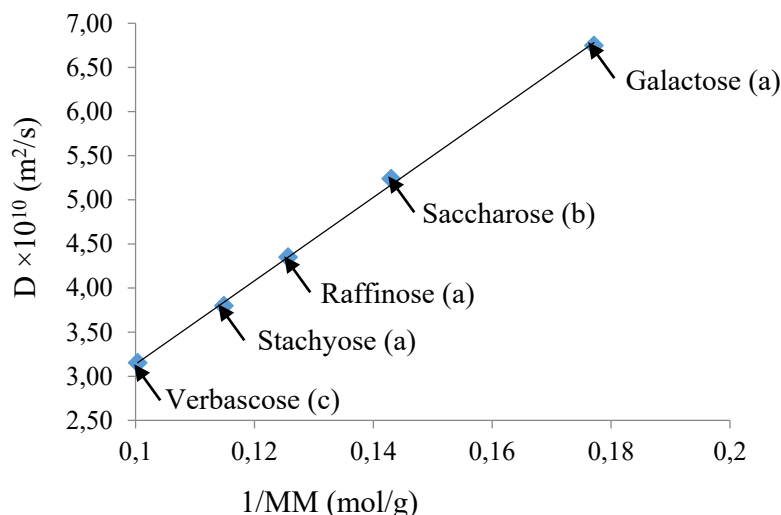


Figure 13 : Diffusivité de divers sucres selon leurs masses molaires : courbe réalisée à partir des données obtenues par différents auteurs. (a) (Craig and Pulley, 1962) (b) (Uedaira and Uedaira, 1985) (Uedaira et Uedaira, 1985) et (c) extrapolation de la droite de régression $D = 47,3(1/MM) - 1,6$ avec un $R^2 = 0,999$

La diffusivité est inversement proportionnelle à la masse moléculaire (Figure 13). La diffusivité des sucres solubles au cours d'un procédé de cuisson augmente également lorsque le ratio graine/eau diminue (Ku et al., 1976). La diffusion des alpha-galactosides peut être décrite en utilisant la loi de Fick.

$$J = -D\nabla[S] \quad (22)$$

Où J est la densité de flux ($\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$), et D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude indiquant la valeur de diffusivité des alpha-galactosides au cours de l'opération de trempage-cuisson. Cependant, la diffusivité de sucres réducteurs au cours d'un blanchiment sur différentes matrices a été estimée permettant alors de conférer une idée des identifications possibles sur les alpha-galactosides. Le tableau 5 fournit des valeurs de diffusivité moléculaire de différents sucres en fonction de la température (blanchiment réalisé entre 60 et 100 °C) et pour différentes matrices végétales (pomme de terre, carotte, betterave et tranches de pomme). Excepté pour les tranches de pommes, tous les auteurs obtiennent des diffusivités comprises entre $1,1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $1,7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ pour divers sucres réducteurs. Concernant les alpha-galactosides, dont les masses molaires sont proches de celles des sucres réducteurs, les diffusivités devraient être dans le même ordre de grandeur.

Tableau 5 : Diffusivité (D) de différents sucres en fonction de la température (T) et pour différentes matrices végétales.

Variété	Sucre	T (°C)	D ($\times 10^{-11}$ m ² /s)	Référence
Pomme de terre	SR	60	1,1	(Califano and Calvelo, 1983)
		70	1,2	(Kaymak and Kincal, 1994)
		80	1,2	
		90	1,6	
		100	1,7	
	Glucose	85	1,2	(Raul et al., 1984)
Carotte	SR	80	1,6	(Kincal and Kaymak, 1987)
	Saccharose	80	1,4	
Betterave	Saccharose	75	1,1	(Schneider, 1968)
Tranche de pomme	SR	75	1,2	(Vukov and Senyi, 1977)
		75	31,3	(Pedreschi et al., 2009)

SR : sucres réducteurs

1.4. Les folates

1.4.1 Structure et famille

Les folates ou vitamine B9 ($C_{19}H_{19}N_7O_6$ pour l'acide folique) sont composés d'un acide pterioïque lié à n glutamates de masse molaire 441,4 g mol⁻¹ (pour l'acide folique) (Figure 14).

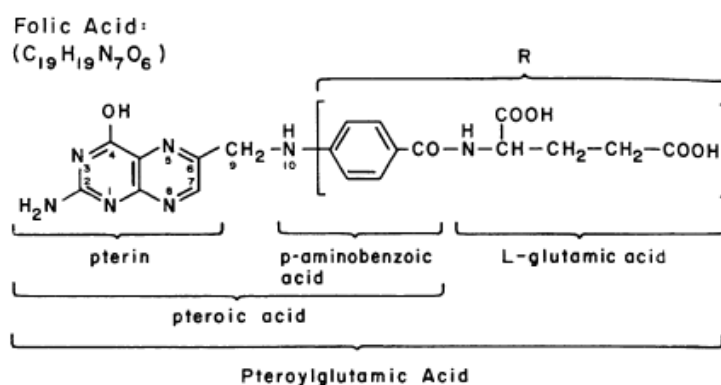


Figure 14 : Structure des folates (Arcot and Shrestha, 2005)

Dans les légumineuses, les folates sont essentiellement sous forme polyglutamate et peuvent être liés aux protéines ou à l'amidon (Arcot and Shrestha, 2005). Il existe plusieurs formes : l'acide tetrahydrofolique, l'acide 5-méthyltetrahydrofolique, l'acide 5-formyltetrahydrofolique et l'acide 10-formyltetrahydrofolique (Figure 14, pterine). La concentration totale en folates est estimée à 113,5 µg/100g dans le niébé (Nisha et al., 2005), et à 282 µg/100g dans le pois chiche (Ringling and Rychlik, 2012). Les folates sont distribués de manière hétérogène dans les graines de légumineuses. En effet, la concentration en folates est trois fois plus importante dans l'embryon que dans le cotylédon de la graine de pois. Cependant, l'embryon représente seulement 2 % de la masse totale de la graine et donc la majorité des folates sont retrouvés dans le cotylédon de la graine crue (Gambonnet et al., 2001). La plupart des folates sont contenus dans le cytosol, et une faible fraction est contenue dans les mitochondries et les chloroplastes (Scott et al., 2000). Clandinin and Cossins, (1972) ont montré par exemple que 3,5-4 % des folates totaux dans le cotylédon d'un grain de pois de 4 jours étaient retrouvés dans les mitochondries. Les formes majoritaires sont les folates méthylés (graine hydratée) et formylés (graine sèche) sous forme tetraglutamates et pentaglutamates (Rébeillé et al., 2006 ; Scott et al., 2000 ; Clandinin and Cossins, 1972).

Dans les plantes, le 5-méthyltetrahydrofolate est un précurseur de la méthionine (Gorelova et al., 2017). Le tetrahydrofolate joue un rôle important dans la photorespiration des plantes (Scott et al., 2000 ; Gorelova et al., 2017). Le 10-formyltetrahydrofolate est à l'origine de la synthèse de la purine (élément essentiel de l'ADN) et le 5,10-méthylentetrahydrofolate permet la conversion de la glycine en serine et la synthèse du thymidylate (Gorelova et al., 2017).

Chez l'homme, la vitamine B9 n'est pas naturellement formée et il est donc nécessaire qu'elle soit ingérée par l'alimentation. Lors de la digestion, les formes polyglutamates des folates sont hydrolysées en monoglutamates grâce à l'action de la pteroylpolyglutamate hydrolase (appelée communément conjugase) qui se situe au niveau de la muqueuse jéjunale. Les folates se fixent alors à des protéines (appelées Folate Binding Protein FBP) et sont absorbés par transport actif et diffusion passive (Scott et al., 2000). Enfin les différentes formes de folates sont interconverties en 5-méthyltetrahydrofolate, qui est la seule forme retrouvée dans le sang. Cependant, cette capacité d'interconversion est limitée et constitue donc un frein à la biodisponibilité de la molécule (Scott et al., 2000).

1.4.2 Impact de l'opération de trempage-cuisson sur la teneur en folates

Les cinétiques de pertes en folates lors d'un trempage-cuisson suivent des allures exponentielles décroissantes, avec une intensité de dégradation dépendant de la température et de la légumineuse étudiée. Les exemples suivants concernent des trempages réalisés en excès d'eau. Un trempage de 2 h à 45 °C et d'une heure à 65 °C entraîne une perte de 70 % et de 80% des folates respectivement pour les haricots verts (Delchier et al., 2014). Cependant, un trempage de graine de haricot pendant 12 h à 25 °C (ratio graine/eau

de 1 :5) (Hefni and Witthöft, 2014) induit une augmentation de la teneur en folates de 50% dans la graine ($\times 1,5$). Cette augmentation serait associée à un début de germination. Une cuisson à l'eau bouillante (100 °C pendant 10 min) induit une perte en folates de 25 % pour les haricots verts et de 70 % pour les pois chiche (Delchier et al., 2016). De même, Petersen (1993) a montré une réduction de 70 % de la teneur en folates contenus dans le brocoli lors d'une cuisson à 100 °C pendant 15 min, dont 39 % est observée après 5 min. Dans les mêmes conditions de cuisson et toujours sur le brocoli, McKillop et al. (2002) observent une réduction de 55 % de la teneur en folates avec 45 % des pertes obtenues au bout de 5 min.

Comme pour les alpha-galactosides, le ratio graine/eau (m/m) peut influencer la perte en folates durant le procédé de trempage-cuisson, en concentrant plus ou moins rapidement le milieu liquide de trempage-cuisson, freinant ainsi plus ou moins les phénomènes de transfert matière. En effet, Xue et al., (2011) ont montré que le trempage de haricot blanc à température ambiante (23 °C) pendant 12 h induisait une perte en folates (5-methyl-tetra-hydrofolate) de 45 % pour un ratio de 1:7 contre seulement 31 % pour un ratio graine/eau de 1:3.

Le trempage et la cuisson peuvent être combinés. Ainsi Xue et al., (2011) ont montré sur le haricot blanc qu'une cuisson à 100 °C de 40 min sans pré-trempage, à la suite d'un trempage de 6 h, et de 12 h induisait une réduction de la teneur en folates respectivement de 64 % ; 79 % et 85 %. Tandis que pour le pois chiche et le pois, il y a une perte de 47 % et 55 % respectivement en folates suite à un trempage de 16 h à température ambiante (volume graine/eau de 1 :3) suivi par une cuisson à 100 °C pendant 2 h (Dang et al., 2000).

L'étude de Hefni and Witthöft, (2014) porte sur les teneurs en folates de différents plats traditionnels égyptiens comme le ragout de haricot (bean stew) et la soupe de Nabet. Les graines trempées et germées à 25 °C sont 1,5 fois et 3 fois plus riches en folates que les graines crues. La phase de cuisson qui suit la germination entraîne une perte de 32 % en folates. De la même manière, la germination du soja entraîne une augmentation de 4 fois la teneur initiale en folates après 4 jours de germination à température ambiante (Shohag et al., 2012). Puis la concentration en folates diminue de moitié entre le 4^e et le 8^e jour de germination. Ainsi, la germination serait à l'origine d'une forte production en folates (Shohag et al., 2012).

Ces différentes pertes et productions observées sont dues à des mécanismes de transferts et de réactions qui sont décrits ci-dessous.

1.4.3 Les réactions impliquant les folates au cours du procédé

Au cours du procédé de trempage-cuisson, les folates peuvent rentrer dans différentes voies réactionnelles de nature enzymatique et métabolique ou bien peuvent subir des dégradations d'origine chimique ou thermique.

1.4.3.1. Les réactions enzymatiques impliquant les folates

Comme expliqué précédemment, Hefni and Witthöft (2014) ont montré une forte production de folates lors d'un trempage et d'une germination. Cette production serait due à une synthèse enzymatique déclenchée par la germination. Cette étude a montré qu'une germination de 72 h à 25 °C induirait une augmentation très importante de la teneur en 5-méthyltetrahydrofolate (x13 pour la fève et x4 pour le pois chiche), ainsi qu'une diminution de la teneur en tetrahydrofolate (perte de 20 % pour la fève et de 35 % pour le pois chiche) et en acide 10-formylfolique (14 % pour la fève) (Hefni and Witthöft, 2014). La synthèse des folates est importante à la fois dans les tissus méristématiques et dans les cotyledons lors de la germination. La formation des folates est décrite par une cascade de réactions dans le cytosol, les mitochondries et les chloroplastes (Rébeillé et al., 2006). En effet le tetrahydrofolate sous forme monoglutamate est synthétisé dans la mitochondrie, ce qui nécessite une dizaine d'enzymes différentes. Puis la forme polyglutamate est synthétisée à partir de la forme monoglutamate dans la mitochondrie, le chloroplaste ou le cytosol (Scott et al., 2000). Cette forme polyglutamate est la forme de stockage et permet de retenir la molécule dans le compartiment dans lequel elle a été produite (Rébeillé et al., 2006). Enfin, le tetrahydrofolate peut être interconverti en une autre forme de vitamère (Figure 15) (Rébeillé et al., 2006).

Dans une graine crue telle que le pois, la forme majoritaire est formylée (forme de stockage), tandis qu'elle est méthylée (forme active) à la suite d'une hydratation (Clandinin and Cossins, 1972). En effet, il existe des interconversions entre les différents vitamères en fonction de la stabilité du milieu et des besoins de la graine. Dans le cas d'un trempage-cuisson, les vitamères les moins stables, comme le tetrahydrofolate, se transforment en les formes les plus stables via l'action d'enzymes. Cette interconversion nécessite la présence de nombreuses enzymes et de nombreuses étapes, décrites en Figure 15 (Rébeillé et al., 2006).

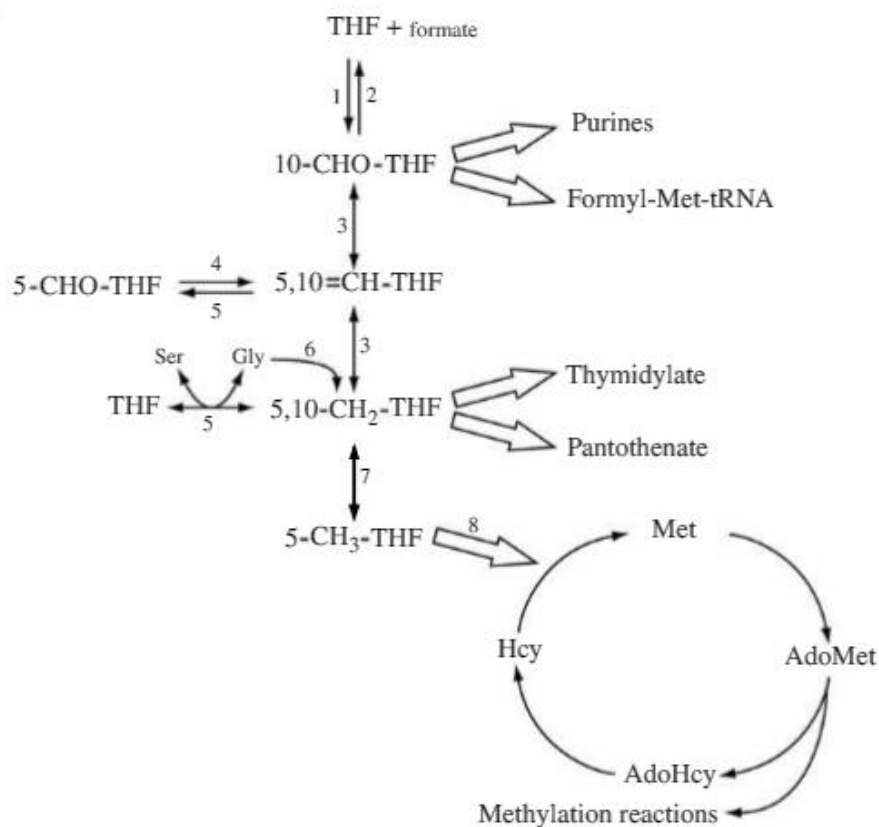


Figure 15 : Les principales voies d'interconversion des folates (1) 10-formyl-tetrahydrofolate synthase (2) 10-formyl-tetrahydrofolate deformylase (3) 5,10-méthylène-tetrahydrofolate dehydrogenase/ 5-10-méthényle-tetrahydrofolate cyclohydrolase (4) 5-formyl-tetrahydrofolate cycloligase (5) serine hydroxymethyl transferase (6) glycine decarboxylase (7) 5,10-méthylène-tetrahydrofolate reductase et (8) methionine synthase (Rébeillé et al., 2006)

Ainsi, étant donné la complexité de la production et de l'interconversion des différents vitamères, la modélisation des processus réactionnels est complexe et aucun article modélisant ce phénomène total en milieu modèle ou lors du trempage-cuisson n'a été trouvé à ce jour. Cependant l'activité enzymatique a été mesurée et elle est proche de $0,02 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines pour l'ensemble des enzymes impliquées dans le métabolisme des folates, sauf pour la dihydrofolate reductase (une des enzymes impliquées dans la formation du tetrahydrofolate) qui présente une activité 10 fois plus importante (Neuburger et al., 1996). La dihydrofolate reductase de feuille de pois est formée de deux sous-unités de 62 kDa (Neuburger et al., 1996). Son activité optimale a été déterminée à une température de 50°C pour un pH entre 6,5 et 7,0 (Neuburger et al., 1996). Cette enzyme a été décrite comme suivant une loi Michaelienne. Les paramètres Michaeliens ont été déterminés sur une concentration saturante de dihydrofolate n à 30°C et un $\text{pH}=7,5$; elle présente un K_m de $0,7 \text{ mM}$ pour $n=1$ glutamate et $1,1 \text{ mM}$ pour $n=5$ glutamates, la v_{max} de $6,5$

$\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines est identique dans les deux cas (Neuburger et al., 1996). Il est à noter que l'activité de cette enzyme présente une phase de latence d'une dizaine de minutes, qui pourrait être associée au temps nécessaire à l'enzyme, qui est présente sous forme inactive, pour se convertir en forme active (Neuburger et al., 1996). Cette phase de latence peut être raccourcie par l'ajout de NADPH dans le milieu (Neuburger et al., 1996). La production de folates est contrôlée par rétroaction (inhibition par le produit) (Rébeillé et al., 2006). De plus, certaines molécules agissent comme inhibiteurs à la réaction, tel que le méthotrexate.

1.4.3.2 Les réactions chimiques (thermique, lumière et oxygène)

Les folates sont des molécules très instables qui peuvent être dégradées par la lumière, l'oxygène et la chaleur (Scott et al., 2000). La forme la plus sensible est le tetrahydrofolate, puis les formes méthylées et formylées. Cette dégradation consiste en une oxydation des molécules (Figure 16).

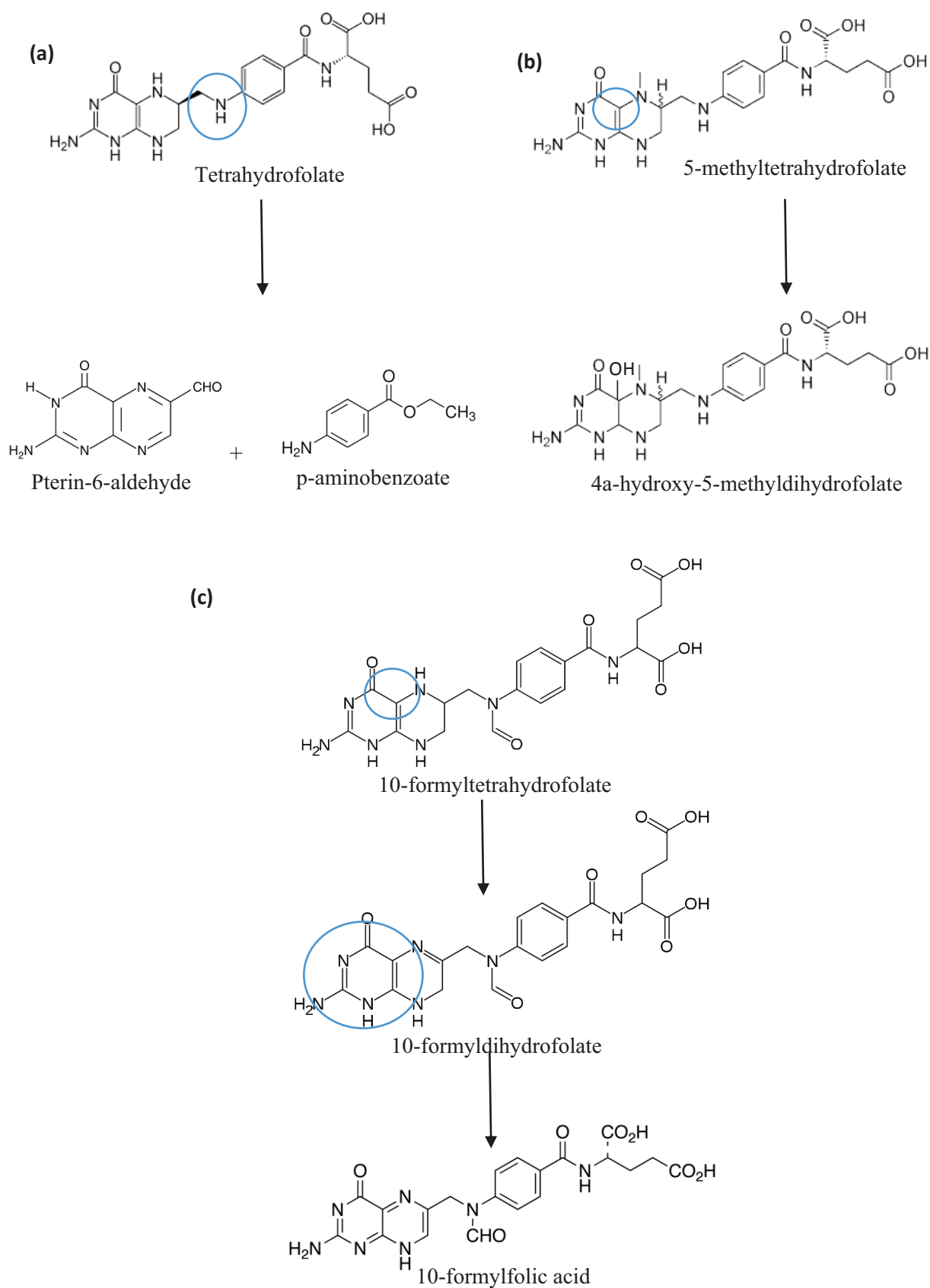


Figure 16 : Dégradation oxydative du (a) tetrahydrofolate, du (b) 5-methyltetrahydrofolate et du (c) 10-formyltetrahydrofolate (Scott et al., 2000)

Cette instabilité dans la graine peut cependant être palliée par la liaison du THF à une protéine dépendante des folates (Scott et al., 2000). Plusieurs auteurs ont décrit la dégradation thermique sur le 5-methyltetrahydrofolate. Ce phénomène a été modélisé dans un milieu modèle par une cinétique d'ordre 1 avec une constante de dégradation (k) suivant une loi d'Arrhenius vis-à-vis de la température (Oey et al., 2006; Ruddick et al., 1980; Viberg et al., 1997). La dégradation du 5-methyltetrahydrofolate dépend de la température, du pH et de la teneur en oxygène (Figure 17).

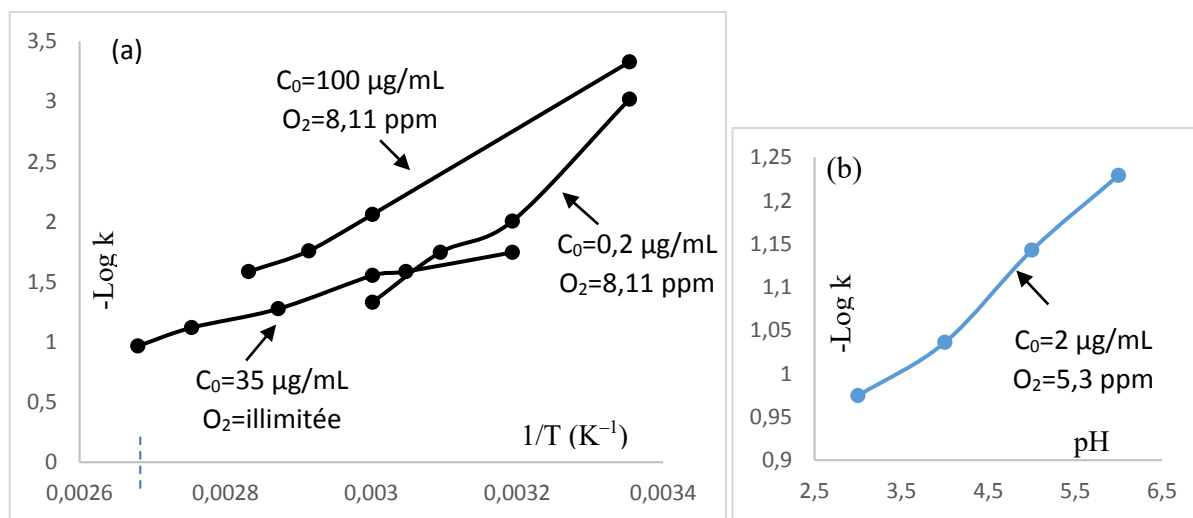


Figure 17 : Détermination du logarithme de la constante de dégradation k (s⁻¹) du 5-methyltetrahydrofolate en milieu modèle en fonction (a) de l'inverse de la température $1/T$ (K⁻¹) (avec pH=7) et (b) du pH (avec $T=100$ °C) pour différentes concentrations et teneurs en oxygène (Oey et al., 2006; Ruddick et al., 1980; Mnkeni and Beveridge, 1983)

Ainsi le taux de dégradation du 5-methyltetrahydrofolate dépend de sa concentration. En effet, une concentration 500 fois plus forte diminue par 5 la constante de dégradation k à 60 °C. La dégradation dépend également de la température et de l'oxygène (Figure 17). Ainsi la valeur de la constante de dégradation k est 3 fois plus importante lorsque l'oxygène est non limitant (Viberg et al., 1997) que dans l'étude de Oey et al. (2006) où le taux d'oxygénation est plus faible. La constante de dégradation dépend également du pH (Figure 17). Un milieu acide augmente l'oxydation du 5-methyltetrahydrofolate. L'énergie d'activation de la réaction d'oxydation se situe entre 62 kJ mol⁻¹ et 65,6 kJ mol⁻¹ (Oey et al., 2006; Viberg et al., 1997) pour une concentration en oxygène limitante et de 106 kJ mol⁻¹ en excès d'oxygène (pH neutre) (Viberg et al., 1997). Cette oxydation peut aussi être limitée par la présence d'autres molécules. En effet, il a été montré que le L-acide ascorbique ou des sucres réducteurs tel que le fructose

agissent comme protecteurs de l'oxydation du 5-méthyltetrahydrofolate (Oey et al., 2006; Verlinde et al., 2010).

Au cours du procédé de trempage-cuisson, l'effet oxydatif est similaire à celui décrit en milieu modèle et peut être décrit par la même réaction d'ordre 1 (Nisha et al., 2005). Cette dégradation due à l'oxydation a en effet été observée lors de traitements thermiques de la graine de niébé entre 50 °C et 120 °C (Nisha et al., 2005). Pour des températures inférieures à 70 °C, la constante de dégradation par oxydation est nulle. À 80 °C, 90 °C et 100 °C, elle a été estimée à 0,26 h⁻¹, 0,31 h⁻¹ et 0,34 h⁻¹ respectivement (Nisha et al., 2005), soit deux à six fois moins que dans un milieu modèle (Oey et al., 2006; Ruddick et al., 1980). Ainsi, à la suite d'une cuisson d'une heure à 100 °C, 25 % des folates sont dégradés thermiquement. Le taux de dégradation est donc bien moindre qu'en milieu modèle, la graine et sa physiologie pouvant agir comme protecteurs. Cependant, dans le haricot vert et l'épinard, Delchier et al. (2014) montrent que l'utilisation d'un modèle d'ordre 1 pour décrire la dégradation thermique des folates n'est pas satisfaisant pour de faibles températures (45 °C). En effet, ils observent une augmentation de la concentration en folates durant les premières minutes.

Il est à noter que cette dégradation oxydative est très dépendante du milieu étudié. Par exemple, dans l'étude menée par Dang et al. (2000) sur le pois chiche, aucune ou peu de dégradation thermique des folates est observée à 100°C, tandis que dans l'étude de Delchier et al. (2012), la moitié des pertes observées dans l'épinard ou le haricot vert est due à une dégradation thermique (22 % après 8 min à 100 °C).

1.4.4 La diffusivité des folates au cours du procédé

Lors des procédés de trempage-cuisson, les folates, molécules hydrosolubles, tout comme les alpha-galactosides diffusent de la graine vers l'eau de trempage. En effet, l'étude menée par Dang et al. (2000) a montré qu'à la suite d'un procédé de trempage-cuisson (température ambiante 16 h, puis 100 °C 2 h), sur les 47 % de réduction totale de teneur en folates du pois chiche, 17 % avaient diffusé dans l'eau de trempage et 28 % dans l'eau de cuisson. Dans les mêmes conditions, sur les 55 % de réduction totale en folates dans le pois, 21 % étaient retrouvés dans l'eau de trempage et 32 % dans l'eau de cuisson (Dang et al., 2000). Ce phénomène de transfert est également observé par McKillop et al. (2002). Ils conseillent plutôt une cuisson de 15 min à la vapeur, qui engendrerait une très faible perte en folates (5 %) comparée à une cuisson classique à l'eau (60 %), notamment en limitant les phénomènes de transfert dans l'eau de trempage. De la même façon, Hefni and Witthöft, (2014) montrent qu'une réduction de 32 % en folates était observée à la suite d'une cuisson à 100 °C pendant 30 min, mais 90 % de cette réduction était due au transfert des folates dans l'eau de trempage. Ce constat était le même dans l'étude de Delchier et al. (2012) qui montre une perte de 45 % des folates de l'épinard après une cuisson de 8 min à 100 °C, dont la moitié a diffusé dans l'eau de cuisson.

Delchier et al., (2014) ont modélisé le transfert des folates durant la cuisson des épinards et des haricots verts (seconde loi de Fick). Les diffusivités apparentes ont été estimées à $7,4 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $5,8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivement. Ces valeurs sont très différentes l'une de l'autre. Cela peut s'expliquer par la difficulté à mesurer et définir l'épaisseur de la feuille d'épinard (0,27 mm). Si l'épaisseur de la feuille est sous-estimée, la diffusivité apparente s'en retrouve également sous-estimée. Le pH (compris entre 5,0 et 7,0) et la température (comprise entre 25 °C et 65 °C) ne modifieraient pas ces diffusivités. En revanche, les diffusivités apparentes sont très dépendantes de la matière végétale étudiée et les diffusivités apparentes des folates dans le niébé sont à ce jour inconnues.

1.5 Conclusions et objectifs

Ainsi, l'analyse bibliographique montre la complexité des phénomènes de transfert et de réactions prenant place au cours du procédé de trempage-cuisson des légumineuses dont le niébé. Au cours de ce procédé, la graine absorbe de l'eau, l'amidon gélatinise, les protéines se dénaturent, rendant ainsi la graine consommable. Le phénomène de transfert d'eau dépend de la capacité de l'eau à diffuser de manière passive à travers le tégument, les protéines et l'amidon, mais aussi de manière active par la pénétration de l'eau au niveau du micropyle et du raphé.

Au cours de ce même procédé de trempage-cuisson, les concentrations en micronutriments et en facteurs antinutritionnels évoluent également. Cette évolution dépend de la diffusivité et de la réactivité (dégradation ou production) des molécules, qui dépendent à leur tour des conditions de trempage-cuisson (pH, T°C, etc...). Ainsi, la concentration en alpha-galactosides diminue dans la graine lors de l'opération de germination/trempage/cuisson par diffusivité et/ou dégradation enzymatique (essentiellement lors de la germination). La concentration en folates diminue par dégradation oxydative et transfert de matière (essentiellement lors de la cuisson), mais augmente par production enzymatique (essentiellement lors de la germination).

Ces différents phénomènes de transfert et de réaction dans le cas des alpha-galactosides et des folates (en plus de l'eau) ont été très peu modélisés et seulement étudiés en milieu modèle.

Ainsi, les objectifs de la thèse sont multiples :

- Mieux connaître la structure, la composition et l'évolution du niébé lors du procédé de trempage-cuisson
- Comprendre et décrire les mécanismes physiques et physiologiques associés aux phénomènes de transfert d'eau durant le procédé de trempage-cuisson

-Mettre au point une stratégie expérimentale et de modélisation permettant de comprendre, décrire et découpler les phénomènes de transfert et de réactions (thermique, enzymatique) mis en jeu sur les alpha-galactosides et les folates lors du procédé de trempage-cuisson/germination du niébé.

-Identifier des stratégies de prétraitements et de conduite du procédé de trempage-cuisson permettant de cuire la graine, tout en maximisant la perte en alpha-galactosides et en minimisant la perte en folates.

Matériels et méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1 La matière première

Une variété brune de niébé (*Wankoun*) a été récoltée dans la région de Cotonou au Bénin et fournie par l'IITA (International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Bénin). Deux lots de graines (≈ 10 kg, puis 5 kg) ont été reçus en septembre 2015 et 2017 et conservés au maximum 2 années en chambre froide à 4 °C sous vide partiel jusqu'à leur utilisation. La composition physico-chimique des deux lots de Niébé est donnée dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6. Caractérisation physico-chimique du niébé (*Wankoun*)

Paramètre	Lot 1	Lot 2
Teneur en eau (kg kg ⁻¹ MF)	0,121 ± 0,004	0,138 ± 0,001
Teneur en amidon (kg kg ⁻¹ MS)	0,418 ± 0,017	
Teneur en protéines (kg kg ⁻¹ MS)	0,253 ± 0,002	
Teneur en fibres (kg kg ⁻¹ MS)	0,279 ± 0,008	
Teneur en lipides (kg kg ⁻¹ MS)	0,016 ± 0,001	
Teneur en alpha-galactosides (kg kg ⁻¹ MS)	0,047 ± 0,001	
Teneur en folates (mg kg ⁻¹ MS)		4,211 ± 0,310

MF : matière fraîche, MS : matière sèche.

2.2 Équipements et protocoles de traitement

2.2.1 Les procédés de trempage-cuisson

Les procédés de trempage-cuisson ont été réalisés dans un bain-marie fermé et thermostaté (Memmert par Société LEGALLAIS, France) à une température de $\pm 0,5$ °C. Lors du procédé, les graines ainsi que l'eau de trempage sont contenues dans un bécher en acier inoxydable (type 316) de diamètre interne de 58 mm et de hauteur interne de 85 mm, ce qui lui confère une capacité de 224,6 mL. L'ensemble des manipulations réalisées est résumé dans la figure 18 ci-dessous.

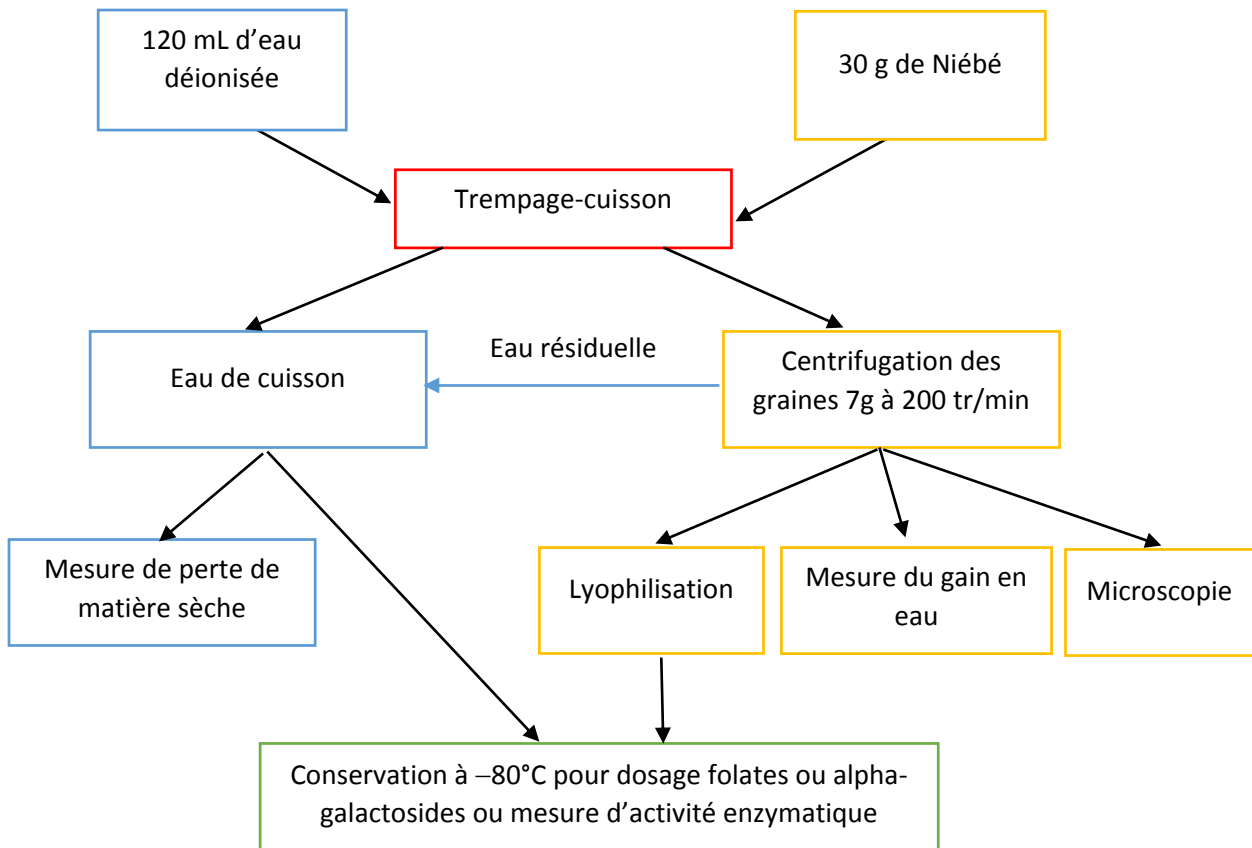


Figure 18 : Schéma global des manipulations effectuées au cours de l'étude

Environ 30 g de graines ont été versés dans un béccher sous agitation rempli de 120 mL d'eau de trempage pré-équilibrée à la température choisie (de 30 à 95 °C). Le béccher a été ensuite recouvert par un verre de montre (diamètre 8,2 mm) pour éviter l'évaporation de l'eau de trempage. Pour prévenir la croissance bactérienne lors des temps longs de trempage à 30 °C (≥ 24 h), les graines ont été préalablement nettoyées et désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v) pendant 20 min. Les graines ont ensuite été rincées avec de l'eau distillée pendant 2 min.

Après le trempage et/ou cuisson, les graines ont été rapidement retirées de l'eau de trempage et centrifugées à 7 g pendant 5 min à 25 °C (Sigma, Allemagne) pour éliminer l'eau résiduelle en périphérie des graines. Cette eau résiduelle a alors été ajoutée à l'eau de trempage/cuisson. Une partie de cette eau a ensuite été utilisée pour mesurer les pertes en matière sèche (des graines vers l'eau de trempage/cuisson), tandis qu'une partie des graines a été utilisée pour mesurer le gain en eau des graines. Les graines restantes ont ensuite été lyophilisées et conservées à -80 °C pendant une durée maximale de deux mois avant de réaliser les mesures biochimiques telles que la teneur en alpha-galactosides, en folates ou l'activité alpha-galactosidase. Ces procédés de trempage-cuisson ont été réalisés en duplicat.

2.2.2 La germination

L'opération de germination a été réalisée à 30 °C par immersion de 30 g de graines dans 30 mL d'eau, en suivant le protocole de trempage utilisé à 30 °C. Cette eau a été absorbée par les graines en moins de 6 h. Au-delà de ces 6 h, les graines maintenues à 30 °C dans le bain-marie ont été lavées toutes les 8 h, par immersion pendant quelques minutes (avec agitation) dans de l'eau distillée afin d'éviter toute croissance bactérienne. Les temps de germination étudiés varient entre 6 h et 96 h.

2.3 Analyses physico-chimiques

2.3.1 Teneur en eau

La mesure de la teneur en eau des graines a été réalisée selon la méthode officielle (ISO 712 :1998 ; International Organization for standardization, 1998). Les graines ont été broyées dans un broyeur (Retsch ZM200, Allemagne) équipé d'une grille de 0,5 mm durant quelques secondes. Une prise d'essai de 10 g a été répartie en monocouche dans trois coupelles puis séchée dans l'étuve à 130 °C pendant 2 h au minimum jusqu'à obtenir un poids constant. La teneur en eau des graines exprimée en base sèche est notée $[W]_{\Omega_s}$.

Le coefficient de variation de la mesure a été estimé à 0,05 %.

2.3.2 Teneur en amidon total

Teneur en glucides :

La méthode de mesure de la teneur en glucides a été adaptée de Holm et al., (1986). 500 mg de farine de Niébé sèche et 30 mL d'eau distillée ont été disposés dans un erlenmeyer de 250 mL. La solution a alors été agitée 10 minutes à 300 tpm à l'aide d'un agitateur magnétique. 100 μ L de solution Termamyl et 120 μ L d' α -amylase thermorésistante (L AYN04010 type, Novo Nordisk, Denmark) ont été ajoutés à la solution, puis l'erlenmeyer a été disposé à 98 °C pendant 25 minutes, avec une agitation d'une minute toutes les 5 minutes. L'échantillon a ensuite été refroidi pendant 20 minutes, jusqu'à atteindre la température ambiante, puis transféré dans une fiole de 100 mL, tout en s'assurant du transvasement complet par des rinçages successifs de l'erlenmeyer. 500 μ L de la solution ont été prélevés et disposés dans un tube à essai (en triplicat). Un blanc a également été fait en prélevant de la même façon 500 μ L d'eau distillée. 1 mL d'amylo-glucosidase a été ajouté (issu d'*Aspergillus Niger* lyophilisé, Sigma Ref. 10115, 70U/mg) à chaque tube, qui ont alors été mis à incuber à 60 °C pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été refroidis en les laissant 3 minutes à température ambiante, avant d'ajouter 8,5 mL d'eau distillée à chacun d'entre eux. Les tubes ont été vortexés, puis 75 μ L ont été prélevés et disposés dans un tube à hémolyse, auxquels ont été ajoutés 1,5 mL de solution enzymatique GOD-POD (Sigma, Germany). Après agitation,

les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 10 minutes. L'absorbance des échantillons et de la courbe d'étalonnage a été mesurée à 510 nm, permettant ainsi d'obtenir la teneur en glucides.

Teneur en glucose libre :

La teneur en glucose libre a été réalisée indépendamment de la teneur en glucides, à partir de la méthode normalisée NF V03-606 (AFNOR, 1988). 100 mg de farine sèche ont été disposés dans un tube Eppendorf de 2 mL, avec 1 mL d'acide sulfurique 5 mM. L'échantillon a été agité orbitalement (20 rpm) pendant 1 h, puis centrifugé à 10000 g pendant 3 minutes avant d'être filtré à 0,45 µm. 100 µl de l'échantillon ont été prélevés et déposés dans un tube à hémolyse, auquel ont été ajoutés 200 µl d'amyloglucosidase (Sigma, Allemagne). L'échantillon a alors été mis à incuber 30 minutes à température ambiante, avant d'ajouter 2,5 mL de solution enzymatique GOD-POD (Sigma, Germany). L'absorbance des échantillons et de la courbe d'étalonnage a été mesurée à 510 nm, permettant ainsi d'obtenir la teneur en glucose libre.

Teneur en amidon :

La teneur en amidon correspond à la teneur en glucides à laquelle est soustraite la teneur en glucose libre. Le coefficient de variation de la mesure de la teneur en amidon total a été estimé à 0,21 %.

2.3.3 Teneur en protéines

La méthode de mesure de la teneur en protéines a été adaptée de la méthode normée de Kjeldhal (NF EN ISO 20483) (AFNOR, 2014). 500 mg de farine de Niébé sèche, une pastille de catalyseur et 12 mL d'acide sulfurique 0,1 N ont été disposés dans un matras. Chaque échantillon a été minéralisé en plaçant les matras dans le Foss *techator Digester auto* (Foss, Danemark) et en lançant l'aspiration pendant 25 minutes à 420 °C, jusqu'à ce que le minéralisât devienne vert. Les échantillons ont alors été refroidis pendant 15 min, jusqu'à atteindre la température ambiante. Le titrage de l'azote a ensuite été effectué en utilisant un Kjeltex (Foss, Danemark) (méthode automatisée). Les cinq premiers essais ont été des blancs (1 à 2 mL d'eau). Concernant les échantillons, la première étape de la méthode a été l'ajout de soude (environ 60 mL) permettant de transformer les ions ammonium NH₄⁺ en ammoniac NH₃. La méthode a induit ensuite une distillation de l'ammoniac durant 2 à 3 minutes permettant ainsi à l'ammoniac de s'évaporer, et d'être recueilli pour être dosé. Le dosage a été effectué par l'appareil, par ajout d'un colorant contenant 20 g d'acide borique, 20 mL de vert de bromométhyl, 14 mL de rouge méthyl dans 2 L d'eau distillée. L'appareil a alors indiqué le volume de solution colorée nécessaire pour titrer l'azote contenu dans l'échantillon. Le coefficient de variation de la mesure de la teneur en protéines a été estimé à 0,8 %.

2.3.4 Teneur en fibres

La teneur en fibres (insolubles, solubles et totales) a été déterminée par la méthode de Prosky et al. (1987) et réalisée par l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). 1,0 g de farine de niébé sèche et 40 mL de tampon MES-Tris (pH=8,2) ont été placés dans un bécher et mis à agiter à l'aide d'un barreau aimanté jusqu'à ce que l'échantillon soit entièrement solubilisé. 50 µL d' α -amylase thermostable ont été ajoutés à chaque bécher et les échantillons ont été mis à incuber à 100 °C pendant 30 minutes avec agitation. Puis, la température d'incubation a été abaissée à 60 °C. 100 µL de protéase ont été ajoutés à chaque bécher et les échantillons ont été mis à incuber à 60 °C pendant 30 minutes avec agitation. Les échantillons ont ensuite été sortis du bain-marie, puis 5 mL d'HCL à 0,561 N ont été ajoutés aux échantillons (pH de l'échantillon qui doit être situé entre 4,1 et 4,8). 200 µL d'amyloglucosidase ont été ajoutés à chaque bécher et les échantillons ont été mis à incuber à 60 °C pendant 30 minutes avec agitation. A cette étape, les mesures des teneurs en fibres insolubles, solubles et totales ont été réalisées séparément.

Fibres insolubles :

0,1 mg de céélite a été pesé dans un creuset, auquel ont été ajoutés 3 mL d'eau distillée. L'échantillon a alors été filtré à travers le creuset dans un ballon de filtration. Le résidu a ensuite été lavé avec 10 mL d'eau distillée préchauffée à 70 °C (conservés pour mesurer la teneur en fibres solubles), puis avec 10 mL d'éthanol à 95 %, puis avec 10 mL d'acétone. Le creuset a alors été séché à 103 °C pendant une nuit, refroidi puis pesé afin de déterminer la teneur en fibres insolubles.

Fibres solubles :

L'eau de lavage utilisée dans l'étape précédente a été récupérée, puis les fibres solubles ont été précipitées en ajoutant 4 volumes d'éthanol à 95 % préalablement chauffé à 60 °C. La précipitation a été effectuée à température ambiante pendant 1 h. Puis l'échantillon a été filtré grâce à l'utilisation d'un creuset contenant 0,1 mg de céélite et 15 mL d'éthanol à 78 %, puis lavé deux fois à l'éthanol 78 %, à l'éthanol 95 %, et à l'acétone. Le creuset a alors été séché à 103 °C pendant une nuit, refroidi puis pesé afin de déterminer la teneur en fibres solubles.

Fibres totales :

Les fibres ont été précipitées grâce à l'ajout de 225 mL d'éthanol à 95 % préchauffé à 60 °C. La précipitation a été réalisée à température ambiante durant 1 h. Puis l'échantillon a été filtré grâce à l'utilisation d'un creuset contenant 0,1 mg de céélite et 15 mL d'éthanol à 78 %, puis lavé deux fois à l'éthanol 78 %, à l'éthanol 95 %, et à l'acétone. Le creuset a alors été séché à 103 °C pendant une nuit, refroidi puis pesé afin de déterminer la teneur en fibres totales.

Les coefficients de variation des teneurs en fibres insolubles, solubles et totales ont été estimés à 3,5 %, 13,6 % et 2,8 %, respectivement.

2.3.5 Teneur en lipides

La teneur en lipides a été déterminée par la méthode de Randall modifiée consistant à solubiliser les lipides dans l'éther de diéthylique au moyen d'un Soxtec, suivant la norme (AOAC, 2003). 5 g de farine de Niébé sèche ont été pesés dans une cartouche cellulosique, puis recouverts d'un coton et la cartouche refermée par une bague en inox. À la suite d'un séchage à 100 °C pendant 15 minutes de capsules en aluminium et de leur tarage, 50 mL d'éther diéthylique y ont été ajoutés. Les capsules ont été ensuite posées sur la plaque chauffante du Soxtec (Foss, Danemark) et les cartouches ont rapidement été plongées dans l'éther diéthylique contenu par les capsules. Le système a été placé en ébullition (100 °C) durant 20 minutes, permettant l'extraction des lipides. Puis les cartouches ont été éloignées de la plaque chauffante et le système a été rincé durant 40 minutes. Les robinets de recyclage ont alors été fermés, permettant l'évaporation du solvant durant 7 à 8 min. Le résidu d'éther a été éliminé par balayage d'air pendant 5 minutes, puis les capsules en aluminium ont été mises à sécher à 100 °C, puis pesées, déterminant ainsi la masse de lipides contenue dans l'échantillon. Le coefficient de variation de la mesure de la teneur en lipides a été estimé à 0,2 %.

2.3.6 Teneur en alpha-galactosides

2.3.6.1 *Extraction des alpha-galactosides*

Les échantillons lyophilisés ont été broyés à une taille de particules inférieure à 0,5 mm (ZM200 Retsch). Environ 80 mg de farine ont été pesés et mis à incuber à 80 °C pendant 1 h dans 10 mL d'une solution d'éthanol/ eau de 4 : 1 (v/v) (Johansen et al., 1996). Une seule extraction de 1 h a été suffisante pour extraire la totalité des alpha-galactosides de l'échantillon. À la suite de l'extraction, les échantillons ont été centrifugés (Sigma, Allemagne) à 9000 g à 4 °C pendant 15 min. Le surnageant a alors été évaporé dans un évaporateur centrifuge (Genevac, Royaume-Uni). Cette évaporation a été effectuée à 60 °C grâce à une lampe infrarouge et a été maintenue à une pression inférieure à 20 mbar. Le culot a été repris dans 2 mL d'eau déionisée, puis filtré à 0,45 µm. Les extractions ont été réalisées en triplicat.

2.3.6.2 *Quantification des alpha-galactosides*

À la suite de l'extraction des alpha-galactosides, les différentes formes ont été séparées par chromatographie à échange d'anion (HPAE) (Shimadzu, Kyoto, Japon) couplée à une détection ampérométrique pulsée (PAD) (Antec Leyden, Pays-Bas). La séparation a été réalisée à température ambiante grâce à une pré-colonne 4 × 50 mm CarboPac PA100 et une colonne 4 × 250 mm CarboPac PA100. Le volume d'injection était de 1 µL. La phase mobile était constante et constituée d'une solution de 100 mM d'hydroxyde de sodium et le flux était de 0,4 mL/min (Gangola et al., 2014). Les alpha-galactosides ont alors été quantifiés grâce à une courbe de calibration réalisée avec des standards externes. Ces courbes de calibrations se situaient à des concentrations entre 0,265 mg/mL et 3,71 mg/mL pour le

raffinose, entre 0,26 mg/mL et 3,64 mg/mL pour le stachyose et entre 0,25 mg/mL et 3,5 mg/mL pour le verbascose. Les teneurs en verbascose, stachyose et raffinose dans les graines ont été exprimées en base sèche et notées $[X]_{\Omega_S}$ avec $X = Verba, Stach$ et $Raffi$, respectivement, et calculées suivant la relation :

$$[X]_{\Omega_S} = \frac{C_X V_{ex} 100}{m_{ex}} \quad (23)$$

Avec C_X , la concentration en alpha-galactoside X (mg/mL) ; V_{ex} , le volume d'extrait d'alpha-galactoside (2 mL) et m_{ex} , la masse de farine de niébé utilisée pour l'extraction des alpha-galactosides (80 mg). Les coefficients de variation des teneurs en verbascose, stachyose et raffinose dans la graine ont été estimés à 12,3 %, 10,5 % et 11,1 %, respectivement.

Les teneurs en verbascose, stachyose et raffinose dans l'eau de trempage/cuisson ont également été exprimées en base sèche et notées $[X]_{\Omega_{SW}}$ avec $X = Verba, Stach$ et $Raffi$, respectivement et calculées suivant la relation :

$$[X]_{\Omega_{SW}} = \frac{C_X V_{SW} 100}{m_S} \quad (24)$$

Avec C_X , la concentration en alpha-galactoside X (mg/mL) ; V_{SW} , le volume d'eau de trempage à la suite du procédé (mL) et m_S , la masse de matière sèche de niébé à la suite du procédé (mg). Les coefficients de variation des teneurs en verbascose, stachyose et raffinose dans l'eau de trempage/cuisson ont été estimés à 18,2 %, 11,9 % et 16,8 %, respectivement.

2.3.7 Teneur en folates

La méthode de dosage des folates utilisée a été adaptée de celle décrite par Striegel et al. (2018). Cette méthode a pour objectifs de doser les 5 vitamères que sont l'acide folique, noté PteGlu, le tetrahydrofolate, noté H4folate, le 5-méthyltetrahydrofolate, noté 5-CH₃-H4folate, le 5-formyltetrahydrofolate, noté 5-CH₀-H4folate et l'acide 10-formylfolique, noté 10-CH₀-PteGlu.

2.3.7.1 Préparation des solutions

Tampon MES : 21,3 g de MES hydraté et 10,0 g d'acide ascorbique ont été pesés et ajoutés à environ 400 mL d'eau déionisée. Le pH a été ajusté à 5,0 grâce à une solution de soude 7,5 M. Cette solution a été

transvasée dans un erlenmeyer contenant 0,5 g de dithiotrétole et le volume a été ajusté à 500 mL avec de l'eau déionisée.

Tampon phosphate : Solution A : 1,41 g de Na_2HPO_4 ont été pesés dans 100 mL d'eau déionisée. Solution B : 1,36 mL de KH_2PO_4 ont été pesés dans 100 mL d'eau déionisée. La solution A a été alors ajustée avec la solution B jusqu'à obtenir un $\text{pH}=7,0$.

Tampon d'éluion : 5,0 g de NaCl ; 1,361 g de trihydrate d'acétate de sodium ; 1,0 g d'acide ascorbique et 0,1 g de dithiotrétole ont été pesés dans 100 mL d'eau déionisée.

Tampon d'équilibration : 0,08 g de dithiotrétole ont été pesés dans 40 mL de tampon phosphate et 360 mL d'eau déionisée.

Pancréas de poulet : 0,3 g d'acide ascorbique ont été dissous dans 30 mL de tampon phosphate, puis le pH a été ajusté à 7,0 grâce à l'ajout de NaOH . 30 mg de pancréas de poulet ont été ajoutés à la solution, qui a alors été agitée pendant 15 minutes.

2.3.7.2 Extraction des folates

Les échantillons lyophilisés ont été broyés à l'aide d'un broyeur à café (Rommelsbacher, Allemagne). Si le broyeur ne permettait pas d'obtenir une farine, les graines étaient alors broyées avec un mortier (cas apparu seulement pour l'embryon). Puis 100 mg (50 mg pour les échantillons dont la concentration en folate était supposée élevée) de farine ont été pesés et ajoutés à 10 mL de tampon MES. La solution a été agitée pendant 15 minutes grâce à un barreau aimanté. Les standards internes ont alors été ajoutés : 15 μL d'acide ^{13}C -5methyl-tetrahydrofolate ; 10 μL d'acide ^{13}C -tetrahydrofolate ; 10 μL d'acide ^{13}C -5formyl-tetrahydrofolate et 50 μL d'acide ^{13}C -folic, puis les échantillons ont été homogénéisés 15 minutes. Les échantillons ont été chauffés 10 minutes à 100 °C, permettant ainsi de faciliter l'extraction, puis refroidis 10 minutes dans de la glace fondante. 2 mL de pancréas de poulet et 400 μL de sérum de rat ont été ajoutés à l'échantillon, qui a alors été mis à incuber une nuit à 37 °C avec une faible agitation (50 tpm dans un bain-marie). Cette étape permet de déconjuguer les polyglutamates. À la suite de l'incubation, les échantillons ont été chauffés 10 minutes à 100 °C, puis refroidis 10 minutes dans un bain de glace fondante, afin d'inactiver les enzymes. Après l'ajout de 10 mL d'acétonitrile aux échantillons, ces derniers ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 20 minutes, à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et mis à décanter pendant 1 h. Les échantillons ont alors été purifiés par extraction sur phase solide (SPE), utilisant une colonne échangeuse d'anion (SAX). La purification s'est déroulée en plusieurs étapes. La colonne a d'abord été équilibrée avec 2 volumes de méthanol, puis 2 volumes de tampon d'équilibration. Les échantillons ont alors été passés sur la colonne avec un débit de 1 goutte toutes les 1 à 2 secondes. Lorsque l'intégralité de l'échantillon fut passée, la colonne a été lavée avec 3 volumes de tampon d'équilibration. Puis la colonne a été séchée sous vide total durant 20 à 30 secondes. Les folates ont ensuite été élués dans

2 mL de tampon d'éluion, ce qui a permis de concentrer l'échantillon. Enfin les échantillons ont été filtrés à 0,22 μm . Les extractions ont été réalisées en duplicat.

2.3.7.3 Quantification des folates

Les folates ont été séparés par chromatographie liquide en tandem avec de la spectrométrie de masse (LC-MS-MS) Nexera X2 LC-30 AD. Les folates ont été séparés à 30 °C sur une colonne Restek C18-LC de dimension 2,7 μm , 100 \times 21 mm, couplée à un détecteur diode PDA Nexera SPD-M30A. L'ionisation a été effectuée par électrospray positive (ESI+). Le volume d'injection était de 10 μL . La phase mobile était constituée de A : 0,1 % (v/v) d'acide formique dans de l'eau et B : 0,1 % (v/v) d'acide formique dans de l'acétonitrile. Le gradient du solvant utilisé est fourni dans le tableau 7.

Tableau 7 : Gradient de solvant A (0,1 % v/v d'acide formique dans de l'eau) et B (0,1 % v/v d'acide formique dans de l'acétonitrile) lors de la séparation des folates en HPLC-MS-MS

t (min)	A (% v/v)	B (% v/v)
0	97	3
2,5	90	10
5	90	10
10	85	15
11	50	50
12	50	50
13	95	5

Ces mesures ont permis de doser les différents vitamères présents dans les échantillons, ainsi que les standards internes (qui sont un reflet des dégradations subies lors des extractions). La quantification des folates a été permise grâce à l'élaboration de courbes de calibration et la quantification de standards externes par Chromatographie Liquide (HPLC). Une solution d'acide folique a été préparée à 0,1 mg/mL, et des solutions de tetrahydrofolate, de 5-méthyltetrahydrofolate, de 5-formyltetrahydrofolate et d'acide 10-formylfolique ont été préparées à une concentration de 0,2 mg/mL chacune. Ces solutions ont été quantifiées par HPLC (Shimadzy, Japon), couplée à un détecteur ionique SPA-M20A. Les folates ont été séparés à température ambiante sur une colonne C18. Le volume d'injection était de 10 μL . La phase

mobile était constituée d'A : 0,1 % (v/v) d'acide acétique dans de l'eau et B : 0,1 % (v/v) d'acide acétique dans du méthanol. Le gradient du solvant utilisé est fourni dans le tableau 8.

Tableau 8 : Gradient de solvant A (0,1 % v/v d'acide acétique dans de l'eau) et B (0,1 % v/v d'acide acétique dans du méthanol) lors de la séparation des folates en HPLC

t (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
7	50	50
21	0	100
23	0	100
24	90	10
26	90	10

La concentration (nmol/L) des standards externes a été obtenue après passage en HPLC. Les standards externes ont ensuite été séparés en HPLC-MS-MS.

La concentration de l'acide folique était supposée correcte et de 0,1g/L (peut varier en fonction de la masse exacte pesée). La concentration des autres standards externes C_{SE} (nmol/L) a été déterminée par le calcul suivant :

$$C_{SE} = \frac{C_{PteGlu} V_{PteGlu} / MM_{PteGlu}}{A_{SE} / A_{PteGlu}} \frac{1}{V_{SE}} 10^{-9} \quad (25)$$

Avec C_{PteGlu} , la concentration en acide folique (nmol/L) ; V_{PteGlu} , le volume d'acide folique (L), V_{SE} , le volume de standard externe (L), A_{SE} , l'aire sous la courbe du standard externe en HPLC, A_{PteGlu} , l'aire sous la courbe de l'acide folique en HPLC, et MM_{PteGlu} , la masse molaire de l'acide folique (g/mol).

La concentration en standard interne C_{SI} (nmol/L) a été déterminée par le calcul suivant :

$$C_{SI} = \frac{C_{SE} V_{SE}}{[a(A_{SE} / A_{SI}) + b]} \frac{1}{V_{SI}} \quad (26)$$

Avec C_{SE} , la concentration des standard externe (nmol/L) ; V_{SE} , le volume de standard externe (L) et V_{SI} , le volume de standard interne (L), A_{SE} , l'aire sous la courbe du standard externe en HPLC-MS, A_{SI} , l'aire sous la courbe du standard interne en HPLC-MS et $a(A_{SE} / A_{SI}) + b$, la gamme étalon établie pour chaque vitamère. Le tableau 9 présente l'ensemble des caractéristiques des droites d'étalonnage.

Tableau 9. Equations des droites d'étalonnage $a(A_{SE} / A_{SI}) + b$ pour 5 vitamères et domaine de validité en fonction de A_{SE} (l'aire sous la courbe du standard externe) et A_{SI} , l'aire sous la courbe du standard interne.

Vitamines	Coefficient de la droite		(A_{SE} / A_{SI})	
	a	b	Borne inférieure	Borne supérieure
PteGlu	1,0185	- 0,0264	0,098	15,9
H4folate	0,2941	0,0566	0,151	37,19
5-CH ₃ -H4folate	0,7971	- 0,0628	0,045	5,95
5-CH ₀ -H4folate	1,3298	0,1082	0,04	7,18
10-CH ₀ -PteGlu	4,1482	0,0991	0,109	3,99

Les teneurs en vitamines PteGlu, H4folate, 5-CH₃-H4folate, 5-CH₀-H4folate et 10-CH₀-PteGlu dans les graines ont été exprimées en base sèche ($\mu\text{g}/100 \text{ g bs}$) et notées $[X]_{\Omega_S}$ avec $X = \text{PteGlu}, \text{H4folate}, 5\text{-CH}_3\text{-H4folate}, 5\text{-CH}_0\text{-H4folate}$ et $10\text{-CH}_0\text{-PteGlu}$, respectivement, et ont été calculées suivant la relation :

$$[X]_{\Omega_S} = 100 \frac{C_{SI} V_{SI} MM}{(a(A_{ex} / A_{SI}) + b) 10^{-9} m_{ex}} \frac{1}{m_{ex}} 10^{-6} \quad (27)$$

Avec MM , la masse molaire de chaque vitamère (g/mol), m_{ex} , la masse de farine utilisée pour l'extraction des folates (0,05-0,1 g) et A_{ex} , l'aire sous la courbe de l'échantillon analysé en HPLC-MS. Les coefficients de variation des teneurs en vitamère PteGlu, H4folate, 5-CH₃-H4folate, 5-CH₀-H4folate et 10-CH₀-PteGlu dans la graine ont été estimés à 13,4 %, 26,9 %, 13,6 %, 9,7 % et 12,2 %, respectivement.

Les teneurs en vitamines PteGlu, H₄folate, 5-CH₃-H₄folate, 5-CH₀-H₄folate et 10-CH₀-PteGlu dans l'eau de trempage/cuisson sont exprimées en base sèche (µg/100g bs), ont été notées $[X]_{\Omega_{SW}}$ et calculées suivant la relation :

$$[X]_{\Omega_{SW}} = 100 \frac{C_{SI} V_{SI} MM}{(a(A_{ex} / A_{SI}) + b) 10^{-9}} \frac{1}{m_{ex}} 10^{-6} \frac{mw_{SW}}{m_s} \quad (28)$$

Avec mw_{SW} , la masse d'eau de trempage à la suite du procédé et m_s , la masse de matière sèche de niébé (bs) à la suite du procédé (g). Les coefficients de variation des teneurs en vitamine PteGlu, H₄folate, 5-CH₃-H₄folate, 5-CH₀-H₄folate et 10-CH₀-PteGlu dans l'eau de trempage/cuisson ont été estimés à 25,7 %, 69,6 %, 31,0 %, 16,2 % et 9,4 %, respectivement.

2.3.8 Mesure de l'activité enzymatique de l'alpha-galactosidase

2.3.8.1 Préparation des solutions

Tampon phosphate : solution A : 11,36 g de KH₂PO₄ ont été pesés dans 100 mL d'eau déionisée. Solution B : 1,74 g de K₂HPO₄ ont été pesés dans 100 mL d'eau déionisée. La solution A a été ajustée avec la solution B jusqu'à obtenir un pH de 6,5.

Solution de borate : 1,24 g de borate ont été pesés dans 100 mL d'eau déionisée. Le pH a été ajusté à 9,8 par ajout de soude à 1 M.

2.3.8.2 Extraction de l'enzyme

Les graines de niébé crues ont été broyées de sorte à obtenir une taille de particules inférieure à 0,5 mm (ZM200 Retsch). La farine a été pesée dans du tampon phosphate dans un ratio farine/eau de 1 :4 (m/m) puis la solution a été mise à agiter pendant 30 minutes à 4 °C. La solution a été centrifugée à 1000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant contenant l'alpha-galactosidase a été conservé au maximum une journée à 4 °C avant utilisation. L'extraction a été réalisée deux fois.

2.3.8.3 Caractérisation de l'extrait d'enzyme

Mesure de l'activité sur le PNP

L'activité enzymatique a été caractérisée sur un substrat modèle : le p-nitrophenyl-alpha-D-galactopyranoside (PNP). 600 µL de tampon phosphate, 200 µL de substrat et 100 µL d'extrait enzymatique ont été mis à incuber à 30 °C pendant 5 minutes. La concentration en PNP testée variait entre 0,02 mM et 3,96 mM. La réaction a été stoppée par l'ajout de 2 mL de borate. Le produit formé (le p-

nitrophenyl) lors de la réaction a alors été quantifié par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 405 nm. L'activité enzymatique initiale, noté v ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ d'enzyme) a été calculée par l'équation suivante :

$$v = \frac{(Abs - Abs_0)V_{tot}}{\varepsilon V_{enz}t} \quad (29)$$

où Abs est l'absorbance de l'échantillon à 405 nm; Abs_0 est le blanc d'absorption; V_{tot} est le volume total d'incubation de l'échantillon (1 mL); V_{enz} est le volume d'enzyme (0,1 mL); ε est le coefficient d'extinction du p-nitrophenyl ($18,5 \text{ mL} \times \mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 405 nm et t est le temps (min). Concernant le blanc, les 100 μL d'enzyme ont été ajoutés après que la réaction ait été stoppée (après l'ajout de borate).

La mesure de l'activité enzymatique sur le PNP a également été mesurée après une incubation de l'enzyme pendant 600 minutes, 720 minutes, 840 minutes et 960 minutes à 30 °C.

Le coefficient de variation de la mesure de l'activité enzymatique sur le PNP a été estimé à 1,1 %.

Mesure de l'activité enzymatique sur les alpha-galactosides

Les mesures de l'activité enzymatique sur le raffinose, le stachyose et le verbascose ont également été effectuées. Les alpha-galactosides contenus dans la farine de niébé ont été co-extraits avec l'enzyme et la mesure d'activité a été effectué sur ces co-extraits en incubant 100 μL d'enzyme avec 900 μL de tampon phosphate à 30 °C à des temps allant jusqu'à 23h20 min. Les concentrations initiales en raffinose, stachyose et verbascose dans ce cas-là étaient de 0,15 mM , 1,9 mM et 0,25 mM, respectivement. Des mesures d'activité enzymatique ont également été réalisées sur des ajouts dosés (200 μL) de raffinose (5,0 mM et 37 mM) ou de stachyose (13,0 mM) en présence d'enzyme (100 μl) et de tampon phosphate (700 μL) à 30 °C et pour des temps allant jusqu'à 34 h. Comme pour le PNP, la réaction a été stoppée par l'ajout de 2 mL de borate. Les échantillons ont ensuite été filtrés à 0,45 μm et les alpha-galactosides ont été quantifiés par chromatographie à échange d'anion de la même manière que décrit ci-dessus (partie 2.3.6.2).

Mesure de l'effet de certains inhibiteurs sur l'activité de l'enzyme

L'effet du galactose comme inhibiteur de l'enzyme a été testé par ajouts dosés à des concentrations de 0,6 mM ; 1,5 mM et 3,0 mM en mesurant l'activité enzymatique pour des concentrations en PNP comprises entre 0,02 mM et 3,96 mM dans le tampon phosphate à 30 °C pendant 5 minutes.

L'effet du galactinol comme inhibiteur de l'enzyme a été testé par ajouts dosés à des concentrations de 1,0 mM et 2,5 mM et du myo-inositol à des concentrations de 6,0 mM et 60 mM en mesurant l'activité enzymatique pour une concentration en PNP de 1,98 mM et pour des temps allant jusqu'à 300 minutes.

Mesure de l'effet du pH et de la température sur l'activité de l'enzyme

L'effet du pH sur l'activité de l'enzyme a été évalué entre 2 et 8,5 sur le PNP à 1,98 mM à 30 °C pendant 5 minutes. L'effet de la température sur l'activité de l'enzyme a été évalué entre 25 °C et 60 °C sur le PNP à 1,98 mM et sur des temps d'incubation allant de 2 minutes à 1 heure.

2.3.9 Mesure du degré de gélatinisation de l'amidon

À la suite de la lyophilisation, les graines de niébé ont été broyées au Retsch ZM200 avec une grille de 0,5 mm. La farine de niébé a été pesée (environ 10 mg) dans des piluliers en acier inoxydable. Les enthalpies de gélatinisation des graines en cours de cuisson à l'eau ont été mesurées par calorimétrie différentielle (DSC, Differential Scanning Calorimetry). De l'eau déionisée (40 pi) a été ajoutée à la farine et chaque récipient a été fermé hermétiquement. Les échantillons ont été stabilisés pendant 4 minutes à 20 °C, puis chauffés de 20 °C à 160 °C avec une rampe de 20 °C/min. Les thermogrammes ont été obtenus en utilisant une DSC 8500 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA). L'aire sous les pics a été intégrée et le degré de gélatinisation (% de natif (0%) à totalement gélatinisé (100%)) de l'amidon a été calculé en comparant la zone sous le pic de l'échantillon à la zone sous le pic de niébé brut.

2.3.10 Biométrie

Les dimensions géométriques de la graine ont été déterminées grâce à l'utilisation d'un pied à coulisse électronique (Linear Tools, Angleterre). La longueur (z), la largeur (r) et l'épaisseur sont respectivement de $8,24 \pm 0,63$ mm, $6,38 \pm 0,48$ mm et $4,25 \pm 0,28$ mm pour la variété *Wankoun*.

2.3.11 Microscopie classique

2.3.11.1 Obtention des sections

À la suite du procédé de trempage-cuisson, les graines ont été fixées dans un bain constitué de 1 (v/v) d'un mélange formol/eau de 3,7 : 6,3 (v/v), de 1 (v/v) d'acide acétique glacial pur et de 8 (v/v) de mélange alcool/eau de 9 : 1 (v/v) pendant au moins 48 h (jusqu'à un mois) à température ambiante. Puis les graines ont été déshydratées par des bains successifs dans l'éthanol à température ambiante : 3 bains dans l'éthanol/eau de 7 : 3 (v/v) pendant 1 h ; puis un bain dans l'éthanol/eau 8 : 2 (v/v) pendant 1 h ; puis dans l'éthanol 9 : 1 (v/v) pendant 1 h ; puis dans l'éthanol 9,5 : 0,5 (v/v) pendant 1 h ; puis dans l'éthanol pur pendant 1 h ; puis dans une solution contenant un mélange 1 : 1 (v/v) de résine technovit 7100 et d'éthanol pur pendant 1 h, et enfin dans la résine technovit 7100 pure pendant deux jours. À la suite du premier bain dans l'éthanol, les tissus ont été séparés à l'aide d'un scalpel en trois groupes : les cotylédons, l'embryon et le tégument (comportant le micropyle).

À la suite de la déshydratation, les cotylédons et les téguments ont été coupés au scalpel en cubes de 5 mm. Les tissus ont alors été percés manuellement avec une aiguille pour faciliter l'imprégnation du durcisseur. Les tissus ont ensuite été inclus dans un mélange de résine technovit et de durcisseur en ratio 9,35 :0,65 (v/v) et quelques gouttes de tween pendant une nuit à 37 °C. Les échantillons ont alors été coupés de manière sériée au microtome en section de 3 µm et collectés sur des lames pour coloration puis observation.

2.3.11.2 *Coloration des sections*

Coloration des polysaccharides : réactif de Schiff

Les coupes contenant les sections ont d'abord été hydratées pendant 5 min dans de l'eau déminéralisée. Les lames ont ensuite été placées dans l'acide périodique à 0,5 % (v/v) à 40 °C pendant 10 minutes, avant d'être lavées dans l'eau pendant 10 minutes, puis dans de l'eau déminéralisée pendant quelques secondes. Puis les polysaccharides ont été colorés au réactif de Schiff (pararosaniline) à l'obscurité, à 4 °C pendant 10 minutes. Les lames ont ensuite été lavées au métabisulfite de sodium à 0,5 % (v/v) pendant quelques secondes, puis à l'eau pendant 20 minutes. Ces lames ont ensuite été colorées au Naphtol Blue Black.

Coloration des protéines: Naphtol Blue Black

Les lames ont d'abord été hydratées 5 minutes dans de l'eau déminéralisée, avant d'être plongées dans la solution de Naphtol Blue Black (0,2 % (v/v) dans l'acide acétique à 7 % (v/v)) à 40 °C pendant 10 minutes. Les lames ont été ensuite rincées dans l'acide acétique à 7 % (v/v) pendant quelques minutes, puis lavées dans de l'eau déminéralisée pendant 5 minutes. Les lames qui ont été colorées au réactif de Schiff, puis au Naphtol Blue Black ont alors été mises à sécher, puis une lamelle a été posée sur la lame grâce à de la résine.

Coloration de la cellulose : Calcofluor

Les lames ont d'abord été hydratées 5 minutes dans de l'eau, puis lavées dans de l'eau déminéralisée pendant quelques secondes. Les lames ont ensuite été plongées dans une solution de calcofluor (0,1 % v/v dans de l'eau) pendant 5 minutes à température ambiante. Les lames ont ensuite été rincées deux fois successives dans de l'eau déminéralisée pendant quelques secondes. Les lames ont été séchées et montées dans l'huile de paraffine. Il est à noter que cette coloration peut être enlevée par un traitement au benzène, suivi par un lavage dans un bain d'éthanol. Cela permet de recolorer les mêmes sections au rouge de ruthenium pour observer les pectines.

Coloration des pectines : Rouge de ruthenium

Les lames ont d'abord été lavées dans un bain d'eau pendant 10 minutes. Elles ont ensuite été plongées dans une solution de rouge de Ruthenium (0,1 % v/v dans de l'eau) pendant 5 minutes à température ambiante. Les lames ont ensuite été rincées dans de l'eau pendant quelques secondes, puis séchées et montées dans du glycérol.

2.3.11.3 *Observation des sections*

Les lames ont été observées au microscope Leica DMR possédant un champ clair, un champ sombre, un contraste de phase et un éclairage UV. Les images ont été réalisées à l'aide d'une caméra (Leica DFC 300 FX) et traitées avec le logiciel LAS et image J.

2.3.12 Immunomarquage du 5-methyl-tetrahydrofolate

Les graines (crues ou ayant subi un trempage/cuisson) ont d'abord été immergées dans du paraformaldéhyde (PFA) 4 % (v/v) dilué dans du PBS/tween pendant 4 h sous vide. Puis les graines ont été rincées dans du PBS/Glycine pendant 15 minutes, puis deux fois dans du PBS (tampon phosphate) pendant 15 minutes. Les cotylédons et les embryons ont ensuite été séparés à l'aide d'un rasoir et les embryons ont été inclus dans de l'agarose à 5 % (v/v). Les cotylédons et les embryons ont alors été coupés avec un vibratome à l'aide d'une lame souple. L'épaisseur des échantillons était de 50 µm pour les cotylédons et de 35 µm pour les embryons. Puis les tissus ont été bloqués dans une solution contenant du BSA (albumine de sérum bovin) à 5 % (v/v) pendant 2 h. Les sections ont ensuite été immergées dans une solution contenant l'anticorps primaire : l'anticorps anti acide 5-methyltetrahydrofole dilué au 1/250 pendant une nuit à 4 °C avec agitation. Les coupes ont ensuite été rincées trois fois pendant 10 minutes dans une solution de PBS à température ambiante. Puis les sections ont été immergées dans une solution contenant l'anticorps secondaire : l'Alexa 488 dilué au 1/500 pendant 1 h à température ambiante, puis rincées 3 fois 10 minutes dans une solution de PBS. Les sections ont alors été montées entre lame et lamelle à l'aide de Mowiol. Les lames ont été observées au microscope Droit Zeiss 880 Laser Coherent Chameleon Ultra II et au microscope confocale Zeiss LSM880 Airyscan. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient de 488 nm et 523 nm, respectivement.

2.4 Expression et analyse des résultats

2.4.1 Absorption d'eau

À la suite du procédé, 25 graines ont été pesées (mw_s), puis mises à sécher 48 h dans une étuve à 100 °C (jusqu'à ce que le poids soit constant). Les graines ont été pesées de nouveau à la suite du séchage (m_s). La teneur en eau (WC) (kg d'eau/kg bs) est calculée selon l'équation suivante :

$$WC = \frac{mw_s - m_s}{m_s} \quad (30)$$

2.4.2 Perte de matière sèche

À la suite du procédé, 20 mL d'eau de trempage ont été pesés (m_{wSW}) (g), puis mis à sécher 48 h dans une étuve à 100 °C (jusqu'à ce que le poids soit constant), puis pesés de nouveau (m_{SW}) (g). La perte de matière sèche des graines vers l'eau, notée DML et exprimée en g/100g base sèche est calculée de la manière suivante :

$$DML = \frac{m_{SW} m_{wtot}}{m_S m_{wSW}} \quad (31)$$

Avec m_{wtot} la masse de l'eau de trempage totale à la suite du procédé (g).

2.5 Méthodes statistiques

La différence statistique des moyennes a été testée par analyse de la variance par un test de student avec un niveau de signification $P < 0,05$.

Résultats

3. Résultats

Le procédé de trempage-cuisson des légumineuses, et plus précisément du niébé induit des mécanismes de transfert et de réactions complexes sur les alpha-galactosides et les folates contenus dans la graine. L'ambition de ce travail a été de développer une approche expérimentale et de modélisation permettant de comprendre ces différents mécanismes afin de proposer des stratégies permettant de limiter les pertes de folates, tout en assurant une perte conséquente en alpha-galactosides lors du procédé de trempage-cuisson du niébé. Pour ce faire, différentes études ont été réalisées et cinq articles scientifiques ont été élaborés (2 acceptés, 3 soumis). Tout d'abord, les alpha-galactosides ont été dosés dans la graine et l'eau de trempage à la suite de procédés de trempage-cuisson à différentes températures. Les phénomènes de transfert et de dégradation des alpha-galactosides ont alors été modélisés sur une graine représentée en 2D axisymétrique (chapitre 3.1). Puis, pour compléter les données sur la dégradation des alpha-galactosides qui peuvent s'opérer lors d'un trempage à des températures inférieures à 60 °C, une étude sur l'hydrolyse enzymatique par l'alpha-galactosidase a été réalisée. Cette étude a permis de déterminer les optima de température et de pH de l'enzyme, mais aussi d'intégrer dans le modèle de transfert et de réactions la loi de Michaelis-Menten (chapitre 3.2). Au même titre que pour les alpha-galactosides, les diffusivités apparentes et les constantes de réaction des folates au cours des mêmes procédés de trempage-cuisson ont été identifiés grâce aux données expérimentales de dosage des folates obtenues dans la graine et l'eau de trempage (chapitre 3.3). Les résultats obtenus concernant l'évolution des folates au cours du procédé de trempage à 30 °C ont été comparés à ceux obtenus lors d'une germination à la même température en déterminant également les constantes de réactions (chapitre 3.4). Les phénomènes de transfert observés sur les alpha-galactosides et les folates ont été expliqués à une échelle cellulaire grâce à une étude de cytohistologie, qui a mis en exergue les altérations engendrées sur les parois cellulaires par une cuisson (chapitre 3.5). Enfin, les transferts d'eau qui s'opèrent lors des procédés de trempage-cuisson ont d'abord été modélisés par une loi de Fick (chapitre 3.1), mais des phénomènes de convection sont rendus possibles de par la structure particulière du tégument (chapitre 3.5). L'ensemble de ces résultats, ainsi que le simulateur obtenu permettent de faire des recommandations sur le séquençage des opérations de trempage et de cuisson afin d'obtenir une graine cuite de bonne qualité nutritionnelle.

3.1. Publication 1 : Modélisation multi réponse des mécanismes de réaction et diffusion pour expliquer le comportement des alpha-galactosides durant le procédé de trempage-cuisson du niébé

3.1.1. Article paru

Multi-response modeling of reaction-diffusion to explain alpha-galactoside behavior during the soaking-cooking process in cowpea

Fanny Coffigniez^a, Aurélien Briffaz^{a*}, Christian Mestres^a, Pascaline Alter^a, Noel Durand^a, Philippe Bohuon^b

Food Chemistry

Abstract

A modelling approach was developed to better understand the behavior of the flatulence-causing oligosaccharides in cowpea seeds during isothermal water soaking-cooking process. Concentrations of verbascose, stachyose and raffinose were measured both in the seed and in the soaking water during the process ($T = 30, 60$ and 95 °C). A reaction-diffusion model was built for the three considered alpha-galactosides both in the seed and in the soaking water, together with a model of water transport in the seed. The model reproduced coupled reaction-diffusion of alpha-galactosides during the soaking-cooking process with a good fit. Produced, diffused and degraded alpha-galactoside fractions were identified by performing a mass balance. During soaking at 30 °C, degradation predominated (maximum found for raffinose degradation rate constant of $3.22 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) whereas diffusion predominated at higher temperatures (95 °C).

Keywords

Alpha-galactosides; cowpea; diffusion; reaction kinetics; cooking.

1. Introduction

Today, increasing food production is not sufficient to achieve food security for the growing population (Tschamtko et al., 2012). A shift towards fewer animal-based and more plant-based diets would be beneficial both from the point of view of climate change and the environment (De Boer and Aiking, 2011). In this context, legumes are excellent candidates to help ensure the sustainability of food systems since they are rich in proteins and need much less water and fertilizer than animals raised for meat (Crews and Peoples, 2004). In terms of physical-chemical composition, legume seeds contain several essential nutritional components. For instance, cowpea, which is extensively cultivated and consumed in the semi-arid regions of West and Central Africa (Langyintuo et al., 2003), is rich in proteins (20-25%), starch (45-55%), and micronutrients including vitamins (folate, thiamin, riboflavin) and minerals (Fe, Zn) (Sreerama et al., 2012).

Cowpea is used in over 50 different traditional African dishes in both whole grain and milled forms (Dovlo et al., 1976). In Benin, cowpea can be cooked alone or mixed with cereals, roots or tubers, but often requires soaking and cooking in water (Madodé et al., 2011). Soaking often consists in leaving the cowpeas to soak at room temperature overnight before cooking in boiling water for from 40 to 60 min (Madode et al., 2013). Unfortunately, cowpea seed also contains antinutrients such as alpha-galactosides. The latter accumulate during the development of the seed to prevent desiccation and are metabolized during germination (Peterbauer and Richter, 2001; Obendorf and Gorecki, 2012). Alpha-galactosides are composed of one unit of sucrose and (n) unit(s) of galactose. Cowpea seeds contain three main thermally stable and water-soluble alpha-galactosides: raffinose (0.5-1.0% w/w), stachyose (1.7-6.0% w/w) and verbascose (0.6-1.3% w/w) (n = 1, 2 or 3 galactose units for raffinose, stachyose and verbascose respectively) (Gonçalves et al., 2016). Because humans lack an alpha-galactosidase enzyme, these molecules ferment in the colon and are responsible for flatulence, which creates a consumption bottleneck (Martínez-Villaluenga et al., 2008; Obendorf and Gorecki, 2012).

However, thanks to soaking and cooking, the amount of alpha-galactosides can be reduced in the seed. Abdel-Gawad, (1993) showed that soaking cowpeas at room temperature for 12 h reduced raffinose by 42% and stachyose by 24%. In addition to leaching of alpha-galactosides into the soaking water (Akinyele and Akinlosotu, 1991), Onyenekwe et al., (2000) reported that endogenous alpha-galactosidase activity also reduces alpha-galactoside content. When cowpeas were cooked at boiling temperature for 60 minutes, Abdel-Gawad, (1993) showed a 71% reduction in raffinose and a 42% reduction in stachyose. Similarly, after boiling for 40 min, Onyenekwe, Njoku, & Ameh, (2000) observed a 47% reduction in raffinose and a 37% reduction in stachyose. In most studies, alpha-galactoside content has only been assessed in the seed, not in soaking water, so the underlying physical-chemical mechanisms involving alpha-galactosides are

not explained. Germination occurs during long periods of soaking, and is another way to reduce the proportion of alpha-galactosides by increasing the hydrolysis of alpha-galactosides (Alani et al., 1990).

In the literature, only a few models are available that describe behavior of alpha-galactosides during soaking and cooking. Kadlec et al., (2008) modelled the degradation of alpha-galactosides during the germination of legume seeds (mung bean, chickpea, and lentil) using zero-order, first-order kinetic reactions as well as empirical equations. Their results showed that the best fit was obtained using empirical equations, which do not provide any information about the mechanisms underlying alpha-galactoside degradation. Rakshit et al., (2015) identified the optimal soaking conditions (time, temperature, pH and water-to-seed ratio) that minimized the residual alpha-galactoside content in blackgram seeds using a classical experimental design. In addition to alpha-galactosides, water taken up by the legume seed also needs to be taken into account in the model, especially under the water-limited soaking-cooking conditions often used in Southern countries. For instance, Sopade and Obekpa, (1990) described the transport of water in cowpea during soaking using an empirical model (Peleg's equation). To the best of our knowledge, no model available in the literature simultaneously considers mass transport and degradation of alpha-galactosides (and water) that occur during the soaking-cooking process.

The aim of the present study was to establish mass balance kinetics for the three alpha-galactosides between cowpea seed and soaking water at soaking-cooking temperatures of 30 °C, 60 °C and 95 °C to distinguish between diffusive and reactive (degradation or production) parts. The resulting model was used to simulate the cowpea soaking-cooking process and four scenarios were compared on the basis on their ability to diffuse and degrade alpha-galactosides.

2. Materials and methods

2.1. Material

The cowpea cultivar used in the study was the *Wankoun* brownish variety from Benin. It was sowed in November 2014 and harvested in February 2015. The seeds were kept in a vacuum pack and stored at 4 °C in the dark until use. Water (ISO 712: 1998), starch (NF V03-606), protein (NF EN ISO 20483), total dietary fiber (Prosky et al., 1987) and lipid (AOAC 2003.05) contents (expressed in dry basis) were respectively 12.12 ± 0.05 % (w/w db), $41.8 \pm 1.6\%$, $24.0 \pm 0.4\%$, $27.9 \pm 0.8\%$ and $1.63 \pm 0.01\%$. The geometrical dimensions of the seed were measured using an electronic caliper and were length $z = 8.24 \pm 0.63$ mm; width $r = 6.38 \pm 0.48$ mm and thickness = 4.25 ± 0.28 mm.

Raffinose, stachyose and verbascose standards (purity $\geq 98\%$) were purchased from Sigma (USA). Ultrapure water was used throughout the experiments (Simpak MilliQsystem, Millipore, USA). Sodium

hydroxide solution (50-52% in water) came from Sigma (Germany), and ethanol (purity $\geq 99.8\%$) from Honeywell Riedel-de-Häen (Germany).

2.2. Soaking-cooking experiments

Approximately 30 g of seeds were poured into a beaker filled with 120 mL thermally pre-equilibrated soaking water under agitation. The temperatures and times investigated were 30 °C /0.5–38 h, 60 °C/0.5–14 h and 95 °C/0.25–3 h. The bulk soaking temperature was regulated with an accuracy of ± 0.5 °C. To prevent bacterial growth during the long soaking period (≥ 24 h), the seeds were previously bleached in 1% (v/v) sodium hypochlorite for 20 min. The seeds were then rinsed with deionized water for 2 min. After soaking and cooking, the seeds were rapidly removed from the soaking-cooking water and centrifuged at 7 g for 5 min at 25 °C to eliminate residual water. The seeds were then freeze-dried and stored at -80 °C for a maximum of two months before analysis. Each soaking-cooking experiment was performed in duplicate.

2.3. Alpha-galactoside contents

Freeze-dried seeds were ground with a ZM200 Retsch machine. Alpha-galactosides were extracted from 80 mg of ground cowpea flour placed in 10 mL of 80% (v/v) ethanol at 80 °C for 30 min (Johansen et al., 1996). A single 30-min extraction was sufficient to extract all the alpha-galactosides in the sample. The sample was then centrifuged at 9000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was dried and then solubilized in 2 mL of deionized water. The extract was then filtered using a 0.45 μm membrane filter. Alpha-galactosides were then separated by HPAE chromatography with model LC-20AB pumps and an SIL-20A Autosampler (Shimadzu, Kyoto, Japan), coupled with a PAD Decade 2 detector (Antec Leyden, Netherlands). The sugars were separated at room temperature in a 4×50 mm CarboPac PA100 pre-column and a 4×250 mm CarboPac PA100 column (Dionex, Germany). The injection volume was 1 μL . The mobile phase was 100 mM sodium hydroxide solution (Gangola et al., 2014). The flow rate was 0.4 ml/min. Raffinose, stachyose and verbascose were quantified using a calibration curve with external standards. Both extraction and measurements were done in triplicate for each soaking-cooking experiment.

2.4. Water uptake kinetics

Twenty-five soaked seeds were weighed just after centrifugation at 7 g at 25 °C for 5 min and then dried at 100 °C for 48 h. The difference between the dry and wet weights enabled calculation of water content. All the measurements were done in duplicate.

2.5. Starch gelatinization

The ground cowpeas were weighed (around 10 mg) in stainless steel pans. Deionized water (40 μl) was added to the flour and each pan was hermetically sealed. Samples were stabilized for 4 min at 20 $^{\circ}\text{C}$, then heated from 20 $^{\circ}\text{C}$ to 160 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Thermograms were recorded using a DSC 8500 (Perkin–Elmer, Norwalk, USA). The area under the peaks was integrated and the level of starch gelatinization was calculated by comparing the area under the peak of the sample to the area under the peak of raw cowpea (Briffaz et al., 2013).

3. Multi-response soaking-cooking modelling

3.1. Assumptions

Two domains are considered in the model: a single cowpea seed (Ω_S) and the soaking water medium (Ω_{SW}). The cowpea seed is assumed to be a pseudo-ellipsoid (figure 1) revolving on a major axis z and having geometrical dimensions that result in a volume equivalent to real seed. During the isothermal soaking-cooking process, the cowpea seed absorbs water, while alpha-galactosides leach out of the seed and/or are degraded or produced in the cowpea seed and in the soaking water. The alpha-galactosides have a sucrose-galactose(n) structure. For verbascose [*Verba*]: $n = 3$ galactoses [*Gal*]; stachyose [*Stach*]: $n = 2$ galactoses and raffinose [*Raffi*]: $n = 1$ galactose. Therefore the degradation of 1 mol of verbascose produces 1 mol of stachyose and the degradation of 1 mol of stachyose produces 1 mol of raffinose.

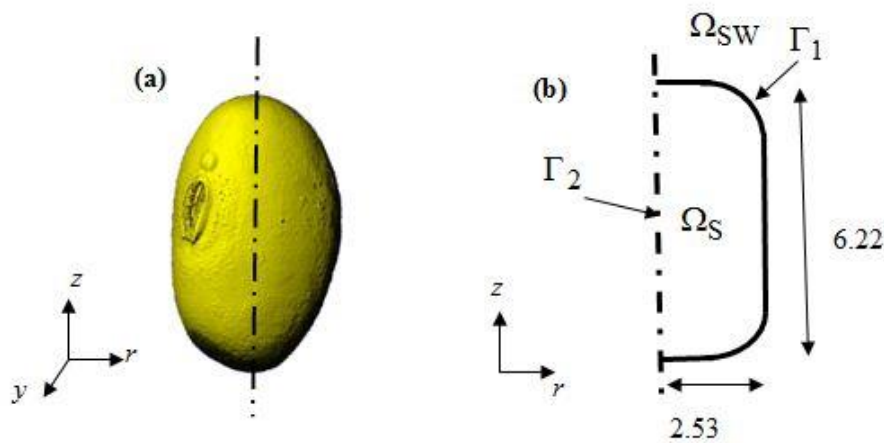
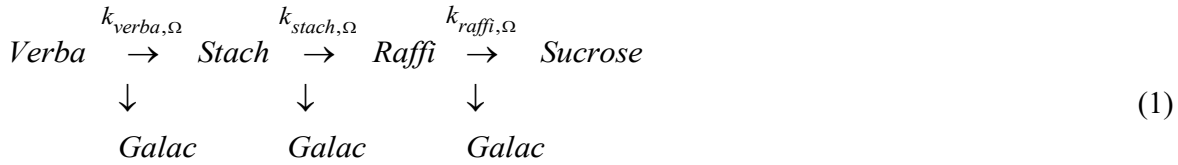


Figure 1: (a) Microtomography of cowpea seed. (b) Simplified geometrical representation of cowpea seed (Ω_S) assuming a pseudo-ellipsoidal and symmetrical shape with specific dimensions (unit: 10^{-3}m).

Ω_{SW} represents the soaking water domain.



where $k_{\text{verba},\Omega}$, $k_{\text{stach},\Omega}$ and $k_{\text{raffi},\Omega}$ are respectively the rate constants of verbascose, stachyose and raffinose (s^{-1}) in $\Omega_i = \Omega_s$ or $\Omega_i = \Omega_{\text{sw}}$. The following assumptions were formulated for the model:

(A1) A seed is considered to be an homogeneous mixture of insoluble dry matter, water and alpha-galactosides.

(A2) The soaking water is assumed to be perfectly stirred.

(A3) The seed does not swell during soaking-cooking process and the shape of cowpea seed is assumed to be symmetrical along the z axis.

(A4) Except for alpha-galactosides, no dry matter is lost into the soaking water during the process.

(A5) Water as well as the transport of alpha-galactosides are described by Fick's laws of diffusion.

(A6) The degradation of alpha-galactosides follows first-order kinetics in both the seeds and the soaking water. The seven state variables studied were water content $[W]_{\Omega_s}$ in the seed, verbascose concentrations $[Verba]_{\Omega_i}$, stachyose concentrations $[Stach]_{\Omega_i}$ and raffinose concentrations $[Raffi]_{\Omega_i}$ expressed in (kg m^{-3}) in seed ($\Omega_i = \Omega_s$) or soaking water ($\Omega_i = \Omega_{\text{sw}}$).

3.2. The unsteady diffusion-reaction model

The mass balance equation for water in cowpea seeds (Ω_s) can be written as:

$$\frac{\partial [W]_{\Omega_s}}{\partial t} - \nabla \left(D_w \nabla [W]_{\Omega_s} \right) = 0 \quad (2)$$

where D_w is the apparent diffusion coefficient of water inside the seed ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Cowpea seeds contain enzymes, including alpha-galactosidases, that hydrolyze alpha-galactosides by cutting their terminal galactose. Alpha-galactosides can be transported from the seed to the soaking water by diffusion. Convection is neglected because little water is taken up by cowpea seeds, compared to rice, for example. Hence the mass balance equations for alpha-galactosides in cowpea seeds (Ω_s , Eq. (3)) and soaking water (Ω_{sw} , Eq. (4)) can be written as:

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial [Verba]_{\Omega_s}}{\partial t} - \nabla \left(D_{Verba} \nabla [Verba]_{\Omega_s} \right) &= -k_{verba,\Omega_s} [Verba]_{\Omega_s} \\ \frac{\partial [Stach]_{\Omega_s}}{\partial t} - \nabla \left(D_{Stach} \nabla [Stach]_{\Omega_s} \right) &= k_{verba,\Omega_s} [Verba]_{\Omega_s} - k_{stach,\Omega_s} [Stach]_{\Omega_s} \\ \frac{\partial [Raffi]_{\Omega_s}}{\partial t} - \nabla \left(D_{Raffi} \nabla [Raffi]_{\Omega_s} \right) &= k_{stach,\Omega_s} [Stach]_{\Omega_s} - k_{raffi,\Omega_s} [Raffi]_{\Omega_s} \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

$$\left. \begin{aligned} V_{\Omega_{SW}} \frac{\partial [Verba]_{\Omega_{SW}}}{\partial t} &= J_{Verba} - k_{verba,\Omega_{SW}} [Verba]_{\Omega_{SW}} V_{\Omega_{SW}} \\ V_{\Omega_{SW}} \frac{\partial [Stach]_{\Omega_{SW}}}{\partial t} &= J_{Stach} + k_{verba,\Omega_{SW}} [Verba]_{\Omega_{SW}} V_{\Omega_{SW}} - k_{stach,\Omega_{SW}} [Stach]_{\Omega_{SW}} V_{\Omega_{SW}} \\ V_{\Omega_{SW}} \frac{\partial [Raffi]_{\Omega_{SW}}}{\partial t} &= J_{Raffi} + k_{stach,\Omega_{SW}} [Stach]_{\Omega_{SW}} V_{\Omega_{SW}} - k_{raffi,\Omega_{SW}} [Raffi]_{\Omega_{SW}} V_{\Omega_{SW}} \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

Equations (2), (3) and

(4) have the following initial and boundary conditions (with $X = Verba, Stach$ and $Raffi$ and boundaries Γ_i shown in figure 1):

$$[W]_{\Omega_s} = [W]_{\Omega_s}^{\infty} \quad \text{on } \Gamma_1 \quad (5)$$

$$[X]_{\Omega_s} = [X]_{\Omega_{SW}} \quad \text{on } \Gamma_1 \quad (6)$$

$$\nabla [X]_{\Omega_s} \cdot \vec{n} = 0 \quad \text{on } \Gamma_2 \quad (7)$$

$$[X]_{\Omega_s} = [X]_{\Omega_s,0} \quad \text{in } \Omega_s \text{ for } t = 0 \quad (8)$$

$$[X]_{\Omega_{SW}} = 0 \quad \text{in } \Omega_{SW} \text{ for } t = 0 \quad (9)$$

The outgoing mass fluxes J_X (kg s^{-1}) of alpha-galactosides crossing the cowpea seed/soaking water interface (Γ_1) can be expressed as:

$$J_X = -AD_X \nabla [X]_{\Omega_s} \quad (10)$$

where D_X is the apparent diffusion coefficient of species X ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), V_{Ω_B} is the volume of soaking water (m^3), A is the surface area of the seed in contact with the soaking water (m^2), Γ_i is the boundary ($i = 1$: seed/soaking water interface; $i = 2$: Seed axial-symmetry), $[W]_{\Omega_s}^\infty$ is the equilibrium water content at the seed/soaking water interface, and $[X]_{\Omega_i,0}$ are the initial contents of component X in Ω_i . Model input parameters are listed in table 1.

Table 1. Input parameters used in the 2D-axisymmetric reaction-diffusion model.

parameter	value	unit
$[Raffi]_{\Omega_{S,0}}$	4.44	kg.m^{-3}
$[Stach]_{\Omega_{S,0}}$	44.4	kg.m^{-3}
$[Verba]_{\Omega_{S,0}}$	5.61	kg.m^{-3}
ρ_{DM}^0	1302	kg.m^{-3}
ρ_w^0	1000	kg.m^{-3}
$[W]_{\Omega_s,0}$	150	kg.m^{-3}
V_{Ω_s}	$1.09 \cdot 10^{-7}$	m^3

In order to perform a mass balance analysis of the diffusion-reaction processes, the cumulative fractions of alpha-galactosides produced by reaction ($m_{X,prod}$), degraded by reaction ($m_{X,degr}$), transferred by diffusion ($m_{X,diff}$) and residual ($m_{X,res}$) expressed in relation to initial mass ($m_{X,0}$) inside the seed, were obtained by solving the following integral equations:

$$\frac{m_{X,prod}}{m_{X,0}} = \int_t \left(\iint_{\Omega_s} k_{X,\Omega_s} [X]_{\Omega_s} dV_{\Omega_s} \right) dt \quad (11)$$

$$\frac{m_{X,degr}}{m_{X,0}} = \int_t \left(\iint_{\Omega_s} -k_{X,\Omega_s} [X]_{\Omega_s} dV_{\Omega_s} \right) dt \quad (12)$$

$$\frac{m_{X,diff}}{m_{X,0}} = \int_t J_X dt \quad (13)$$

$$\frac{m_{X,res}}{m_{X,0}} = \frac{m_{X,0} + m_{X,prod} - m_{X,diff} - m_{X,deg}}{m_{X,0}} \quad (14)$$

3.3. Numerical solution

The system of four partial differential equations (Eqs (2)–(3)) and of three ordinary differential equations (Eqs (4)) was solved using the FEM-based commercial Comsol Multiphysics™ (version 5.2a, Comsol Inc., Stockholm, Sweden) with the initial conditions given by Eqs. (8) and (9), and boundary conditions given by Eqs. (5)–(7) and Eq. (10). A 100-element mesh was created in Comsol. Lagrange polynomials (second order function) were the interpolation functions. The linearized problem was solved by the MUMPS time-dependent solver (Multifrontal Massively Parallel Solver) which implements a parallel distributed LU factorization of large sparse matrixes. The maximum time step was 0.05 s and the Jacobian was updated for each iteration. The typical simulation time was five minutes using a 3.25 Gb free memory (RAM) and 3-GHz Intel core Duo CPU computer (32 bits).

3.4. Parameter identification

The three apparent diffusivities (D_i) and three rate constants ($k_{i,\Omega}$) were simultaneously identified by regression analysis using a Bayesian approach. At 30 °C, both in seeds and soaking water, $k_{raffi,\Omega}$ was set to $2 \times k_{stach,\Omega}$ because of expected higher enzyme affinity for raffinose than for stachyose. Indeed, in the case of cowpea, the alpha-galactosidase Michaelis constant K_m for raffinose was found to be 4.6-5.0 mM versus 11-15 mM for stachyose (Alani et al., 1989). According to Van Boekel, (2009), in the multi-response approach, the best-fit criterion is the minimization of the determinant of dispersion of matrix C with the elements:

$$C_{ij} = \sum_{u=1}^n \left(\frac{\tilde{X}_u^i - \hat{X}_u^i}{\max\{\tilde{X}^i\}} \right) \left(\frac{\tilde{X}_u^j - \hat{X}_u^j}{\max\{\tilde{X}^j\}} \right) \quad (15)$$

where u is the index of experimental runs ($u = 1, \dots, 6$) corresponding to the experimental sampling times, \tilde{X}_u are the experimental data points for experimental run u , and \hat{X}_u the values predicted by the model. Here, X are 3 concentrations in the seed domain (Ω_S): $[Verba]_{\Omega_S}$, $[Stach]_{\Omega_S}$, $[Raffi]_{\Omega_S}$ and 3 concentrations in the soaking water domain (Ω_{SW}): $[Verba]_{\Omega_{SW}}$, $[Stach]_{\Omega_{SW}}$, $[Raffi]_{\Omega_{SW}}$. So, i, j are the indexes of the 6 concentration responses ($i, j = 1, \dots, 6$). As shown in Eq. (15), the residuals are evaluated according to the relative difference between the experimental and predicted values. In this approach, not

only the sum of squares for each response is taken into account (diagonal elements of matrix C) but also the cross products of the responses (covariance). The model parameters were iteratively adjusted to the goodness-of-merit $\min\{\det(C)\}$ using a minimization procedure of the Nelder-Mead simplex with the “fminsearch” function of Matlab software. The standard deviation of each adjusted parameter was determined via Monte Carlo simulations (Hessler, 1997) with 200 draws.

$$X_{noise} = \tilde{X} + \sigma_y \delta \quad (16)$$

where σ_y is the experimental standard deviation estimated for each experimental datum and δ is a random number between 0 and 1 and is normally distributed. The random draw was performed 200 times. The adjusted parameters follow a normal distribution.

The mutual correlation coefficients between adjusted model parameters were also estimated on the basis of the Monte-Carlo results.

4. Results and discussion

4.1. Water uptake kinetics

Figure 2 shows the water uptake kinetics of the cowpea seeds during the isothermal soaking-cooking process. The cowpea seeds reached a lower equilibrium water content at low temperatures (30 °C and 60 °C), than at 95 °C (average of 1.3 ± 0.01 versus 1.55 ± 0.03 kg.kg⁻¹ (db)). These results are in agreement with results in the literature. For instance, in two different cowpea cultivars, Kaptso et al., (2008) found an equilibrium water content of 1.3–1.4 kg.kg⁻¹ (db) reached after soaking at 35 °C for 6 h. In two other varieties, Taiwo et al., (1997) observed that cowpea seeds reached an equilibrium water content of about 1.1 kg.kg⁻¹ (db) at 60 °C.

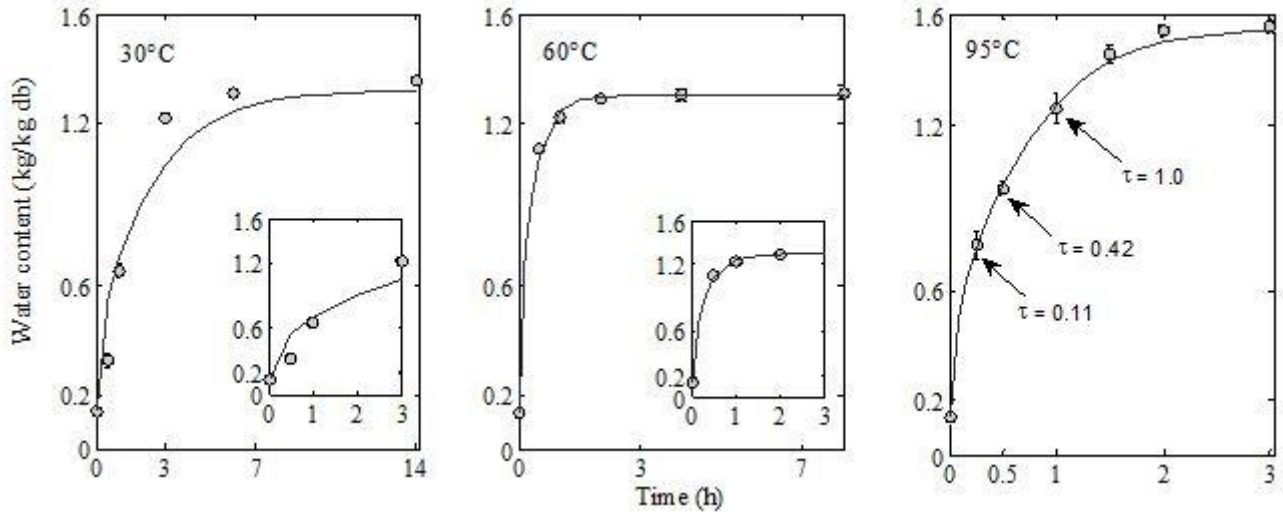


Figure 2: Experimental (dots) and predicted (lines) water uptake kinetics (water content expressed on a dry basis) of cowpea seeds during the soaking-cooking process at 30 °C, 60 °C and 95 °C. Error bars represent the standard deviation ($n = 4$). The degrees of gelatinization (τ) are indicated for $T = 95$ °C.

Increasing the soaking temperature from 30 °C to 60 °C reduced the time needed to reach equilibrium water content from 10 h to 2 h. This increase in the speed of water uptake was confirmed by the values of adjusted apparent water diffusivities where D_w increased 7 fold at 60 °C ($8.2 \pm 1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) in comparison with at 30 °C ($1.2 \pm 0.013 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) (table2). These values are in the same order of magnitude as those cited in the literature. For example, Kaptso et al., (2008) identified a water diffusivity of $3.90 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for cowpea being soaked at 35 °C.

Table 2. Estimated apparent diffusion coefficients (D_X) and rate constants

($k_{X,\Omega_s}, k_{X,\Omega_b}$) for each alpha-galactoside in cowpea seeds (Ω_s) and in the soaking water (Ω_{sw}) at different soaking-cooking temperatures (T) (mean values \pm standard deviations determined with Monte-Carlo simulations: 200 sets).

<i>Species X</i>	$T(^{\circ}\text{C})$	$D_X \times 10^{11} (m^2 s^{-1})$	$k_{X,\Omega_s} \times 10^6 (s^{-1})$	$k_{X,\Omega_{sw}} \times 10^4 (s^{-1})$	$10^2 \times \text{RMSE}^*$	
					In seed (S)	In soaking water (SW)
Verbascose	30	0.008 \pm 0.002	0	0.5 \pm 0.2	5.4	0.3
	60	3.0 \pm 1.0 ^a	0	0	7.3	6.9
	95	6.5 \pm 2.9	0	0	4.6	8.1
Stachyose	30	0.02 \pm 0.006	2.9 \pm 0.8	1.6 \pm 0.4	41.0	1.4
	60	3.0 \pm 0.9 ^a	0	0.12 \pm 0.04	43.0	41.0
	95	4.3 \pm 2.0	0	0	39.0	56.0
Raffinose	30	0.9 \pm 0.4	5.8 \pm 1.5	3.2 \pm 0.7	10.0	1.7
	60	3.0 \pm 1.0 ^a	0	1.1 \pm 0.4	5.8	6.7
	95	4.6 \pm 2.0	0	0	5.3	6.9
Water	30	12 \pm 0.5			12.0	
	60	82 \pm 11.0			3.6	
	95	43 \pm 2.0			1.8	

Values with same letters (a) were not significantly different ($p < 0.05$)

*RMSE: Root mean square error between experimental and predicted concentrations.

Units: ($kg / 100kg db$) for alpha-galactosides; ($kg / kg db$) for water.

The *Wankoun* cultivar exhibited starch gelatinization (figure 2) between 68 °C and 90 °C, which was close to the range observed by Okechukwu and Anandha Rao, (1996) in another cowpea cultivar. Gelatinized starch has a higher water absorption capacity than native starch, which explains the higher water absorption capacity of cowpea seeds at 95 °C ($1.55 \pm 0.03 \text{ kg.kg}^{-1} (db)$) than at 60 °C ($1.3 \pm 0.05 \text{ kg.kg}^{-1} (db)$) as already observed in rice (Briffaz et al., 2014). In addition, the starch gelatinization phenomenon can explain the lower water mobility, and consequently the lower water diffusivity observed in cowpea seed at 95 °C than at 60 °C (table 2), as also observed in rice (Briffaz et

al.,2014). In agreement with the observed range of gelatinization temperatures, no gelatinization was detected during soaking at 60 °C, whereas after soaking at 95 °C for 15 min, 30 min and 1 h, the level of gelatinization was 11%, 42% and 100% respectively. From the point of view of gelatinization, cooking was thus complete after 1 h at a temperature close to boiling, in agreement with the traditional process (Madode et al., 2013).

4.2. Alpha-galactoside kinetics

4.2.1. Experimental changes in alpha-galactosides during the soaking-cooking process

Figure 3 shows the kinetics of the alpha-galactosides contents in both the seeds and the soaking water at soaking temperatures of 30 °C, 60 °C and 95 °C. The initial concentration of verbascose, stachyose and raffinose was 0.48 ± 0.014 g/100g (db), 3.8 ± 0.18 g/100g (db) and 0.38 ± 0.032 g/100 g (db), respectively.

After cooking at 95 °C for 3 h, the verbascose, stachyose and raffinose concentrations in seeds were reduced by 69%, 61% and 63%, respectively. Overall, these losses were transferred in the soaking water and the net contents (sum in the seeds and in the soaking water) remained almost constant during soaking at 95°C. The alpha-galactosides were thus not thermally degraded at 95 °C. These results are consistent with those in the literature. Onigbinde and Akinyele, (1983) reported a 46% reduction in raffinose and a 50% reduction in stachyose contents after boiling for 40 min. Ibrahim et al., (2002) reported that cooking in boiling water for 40 min with a water-to-seed ratio of 10:1 (w/w) resulted in a 100% loss of raffinose and an 81% loss of stachyose.

The data collected at 60 °C followed the same trend as that observed at 95 °C. Indeed, after soaking at 60 °C for 14 h, the concentration of verbascose, stachyose and raffinose in seeds was reduced by 63%, 76% and 74% of their respective initial values, and in most cases, were transferred to the soaking water with no net decrease. However, we observed a slight decrease in stachyose in the soaking water when the soaking period was > 5 h.

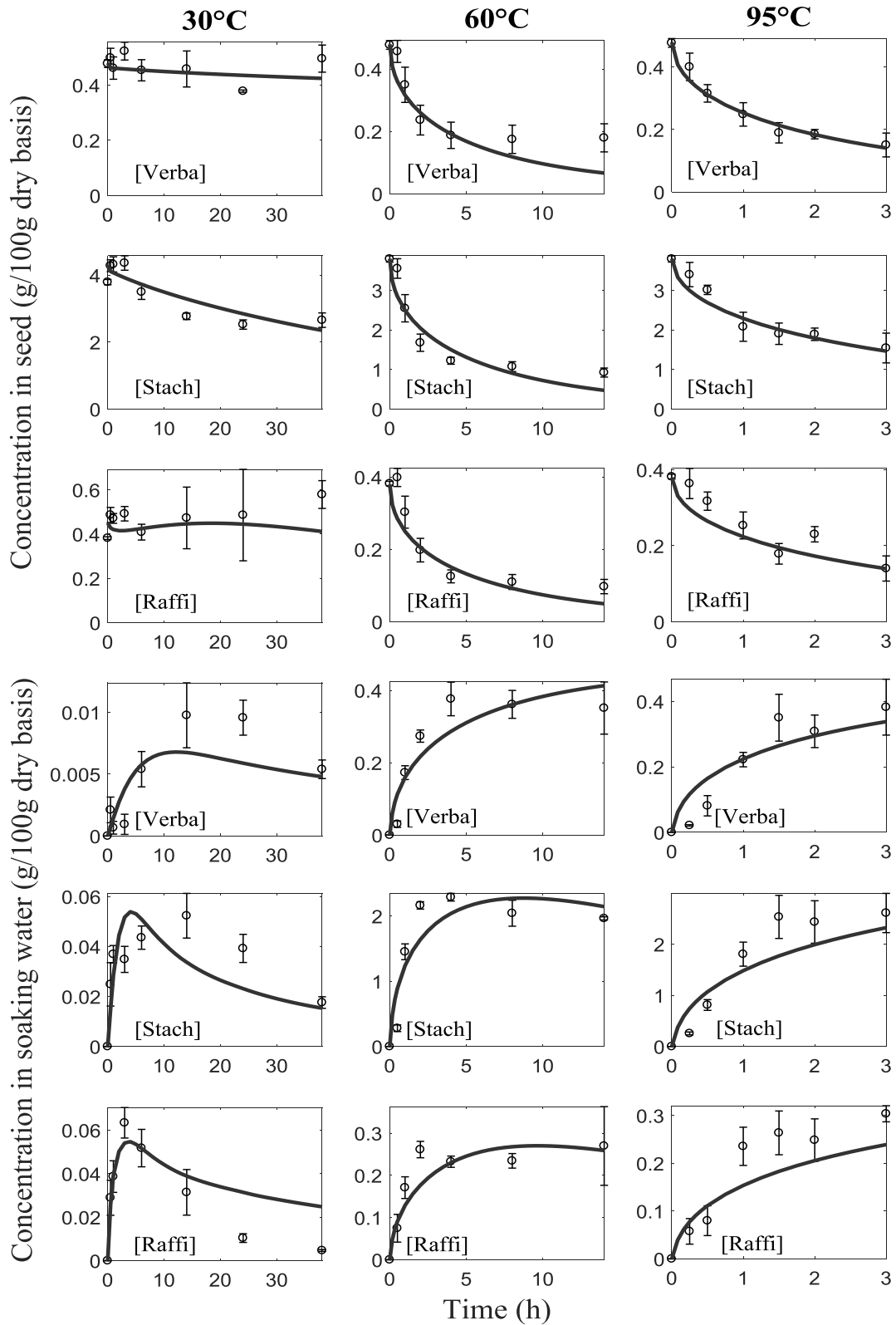


Figure 3: Predicted (lines) and experimental data (symbols) for concentrations of raffinose [Raffi], stachyose [Stach], and verbascose [Verba] in cowpea seeds and in the soaking water (both expressed as g/100g on a dry basis) during the soaking-soaking process at 30 °C, 60 °C and 95 °C. Error bars represent standard deviations ($n = 3$).

When soaked at 30 °C, the seeds germinated after 14 h as evidenced by the emergence of the radicle. After 38 h, the verbascose and raffinose concentrations did not change significantly in the seed, but the stachyose concentration decreased by 35%. The quantity of alpha-galactosides assessed in the soaking water was 10 to a 100-fold lower than in the seeds and, in addition, decreased after 24 h in the case of verbascose, 14 h for stachyose and 4 hours for raffinose. The net decrease in alpha-galactosides observed at 30 °C (29% after 38 h) cannot be imputed to thermal degradation but rather to enzymatic degradation. Endogenous alpha-galactosidase is indeed present in cowpea seeds (Alani et al., 1989), which produce raffinose from stachyose and stachyose from verbascose at low soaking temperatures. This enzyme mainly acts on low molecular weight alpha-galactosides, which explains the limited enzymatic degradation of verbascose. Alani et al., (1990) also showed that 24 h of germination at 24 °C resulted in a 23% loss of stachyose. Nnanna and Phillips, (1988) reported a 16% decrease in stachyose after soaking for 9 h without bubbling. However, the same authors also reported that oxygenation during soaking caused germination and a greater reduction in alpha-galactosides: 24 h of germination degraded 68% of stachyose and 13% of raffinose.

4.2.2. Modeling alpha-galactoside transport properties

Table 2 gives the adjusted apparent alpha-galactoside diffusivities ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) in the cowpea seed. The fit of the model was satisfactory with a mean RMSE of about 12 %. At all the soaking temperatures investigated, including 30 °C, raffinose, stachyose and verbascose accumulated in the soaking water, so the adjusted apparent diffusivities were significantly different from zero.

At 30 °C, the adjusted apparent diffusivity was 41 fold higher for raffinose ($9.0 \pm 4.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) than for stachyose ($2.0 \pm 0.6 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and 2.6 fold higher for stachyose than for verbascose ($0.8 \pm 0.2 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Hence, the adjusted apparent diffusivities were ranked in decreasing order with an increase in the molar mass ($D_{\text{Raffi}} > D_{\text{Stach}} > D_{\text{Verba}}$). In water at 25 °C and infinite dilution, the same rank was observed according to molecular mass: raffinose and stachyose diffusivities have been reported as $4.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Uedaira and Uedaira, 1985, p.) and $3.80 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Craig and Pulley, 1962), respectively. By extrapolation with the Stoke-Einstein equation (assuming that the hydrodynamic radius of a molecule is inversely proportional to the cubic root of its molar mass), the verbascose diffusivity in water at 25 °C and infinite dilution was estimated at $3.15 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ which is lower than for stachyose. In contrast, adjusted values of apparent diffusivities in the seed were much lower (factor of 50 to 4,000) than in pure water at 25 °C and infinite dilution. This is due to the cellular structure of cowpea seed that impedes the molecular mobility of alpha-galactosides. The cowpea coat is also a limiting factor to the diffusion of molecules, and dehulling could improve alpha-galactoside diffusivity (Madode et al., 2013). In the case of

legumes, the spatial distribution of alpha-galactosides in the seed can be heterogeneous (Sreerama et al., 2010). This may partly explain the difference between adjusted apparent diffusivities of each alpha-galactoside.

Temperature has a major impact on the diffusion of alpha-galactosides. Shifting from 30 °C to 95 °C resulted in a marked increase in their apparent diffusivities (table 2). For instance, verbascose apparent diffusivity increased from $0.8 \pm 0.2 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ to $6.5 \pm 2.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. These temperatures are not the usual physiological conditions encountered by seeds and hence result in the degradation of the seed.

Due to high experimental standard deviations, the standard deviations of model parameters (including apparent diffusivities) that were estimated by means of Monte Carlo procedure are quite large. This noise may cause interference and hence render data interpretation more difficult.

4.2.3. Modeling alpha-galactoside reactivity

Table 2 gives the adjusted reactivity rate constants of the alpha-galactosides (expressed in s^{-1}) both in the seed and in the soaking water at soaking temperatures of 30 °C, 60 °C and 95 °C.

At 30 °C, non-null rate constants were found for all the galactosides in the soaking water. The adjusted degradation rate constant was 6.4 fold lower for verbascose ($0.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) than for raffinose. This is logical given the affinity of enzyme for these different substrates (see section 4.2.1). Indeed, alpha-galactosidases hydrolyze low molecular weight oligosaccharides, especially raffinose, more rapidly than higher molecular weight homologs (Peterbauer and Richter, 2001). In the same way, constraining $k_{\text{raffi},\Omega_i}$ to be equal to $2 \times k_{\text{stach},\Omega_i}$ resulted in a good fitting performance. This is again due to the fact that, as explained in section 3.4, raffinose affinity is around twice that of stachyose (Alani et al., 1989). These results confirm that these rate constants are closely linked to endogenous alpha-galactosidase activity in both the seed and the soaking water. Moreover, it is interesting to note that at 30 °C, and irrespective of the alpha-galactoside considered, adjusted rate constants were much higher in the soaking water than in the seed. For example, the adjusted raffinose rate constant in the soaking water was 55 fold higher than in the seed. This may be explained by a molecular crowding effect in seeds that decreases the likelihood of a meeting between an enzyme and the substrate (Van Boekel, 2009).

At $T = 60 \text{ °C}$, the adjusted rate constants in the soaking water and for any alpha-galactoside were lower than at 30 °C. For example, the rate constant of stachyose was $0.12 \times 10^{-4} \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ at 60 °C versus $1.6 \times 10^{-4} \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ at 30 °C. This result is in agreement with the optimal temperature range for endogenous alpha-galactosidase activity in legume seeds. Dey and Pridham, (1969) reported that the alpha-galactosidase activity of *Vicia Faba* reached maximum at 45 °C and that, beyond this temperature, activity

decreased until it stopped at 75 °C. Bhaskar et al., (1990) also found an optimal temperature around 50 °C for endogenous alpha-galactosidase originating from *Cassia Sericea SW.* seed with a marked decrease in enzyme activity at temperatures > 50 °C.

At 95 °C, the rate constant was fixed to zero both for seed and soaking water since we demonstrated that above this temperature, the total alpha-galactoside mass lost by the seeds was fully quantified in the soaking water (i.e. a pure diffusion process).

It is worth mentioning that, regarding the low alpha-galactosides concentrations in soaking water, particularly at 30 °C, assuming first-order kinetics (assumption A6) is equivalent to considering the Michaelis-Menten approach. Indeed, when $S \ll K_m$, the velocity of the enzymatic reaction is proportional to the concentration of S in the substrate with a constant of proportionality of $v_{\max} / K_m \approx k$.

The use of simplified first-order kinetics was a good way to explore the reactivity of alpha-galactosides in the context of a soaking-cooking process. But to optimize the enzymatic degradation of alpha-galactosides, cowpea alpha-galactosidase and the parameters that enable greater enzyme activity during soaking need to be explored. This work is currently in progress.

4.2.4. Alpha-galactosides: reaction vs. diffusion

Figure 4 shows changes in the predicted diffused (from the seed to soaking water), degraded, produced and residual alpha-galactoside fractions in the cowpea seeds as a function of soaking time and temperature. At 95 °C and 60 °C, the diffusion (Eq. (13)) phenomenon predominated, whereas at 30 °C, the production (Eq. (11)) and degradation (Eq. (12)) phenomena predominated, particularly for raffinose.

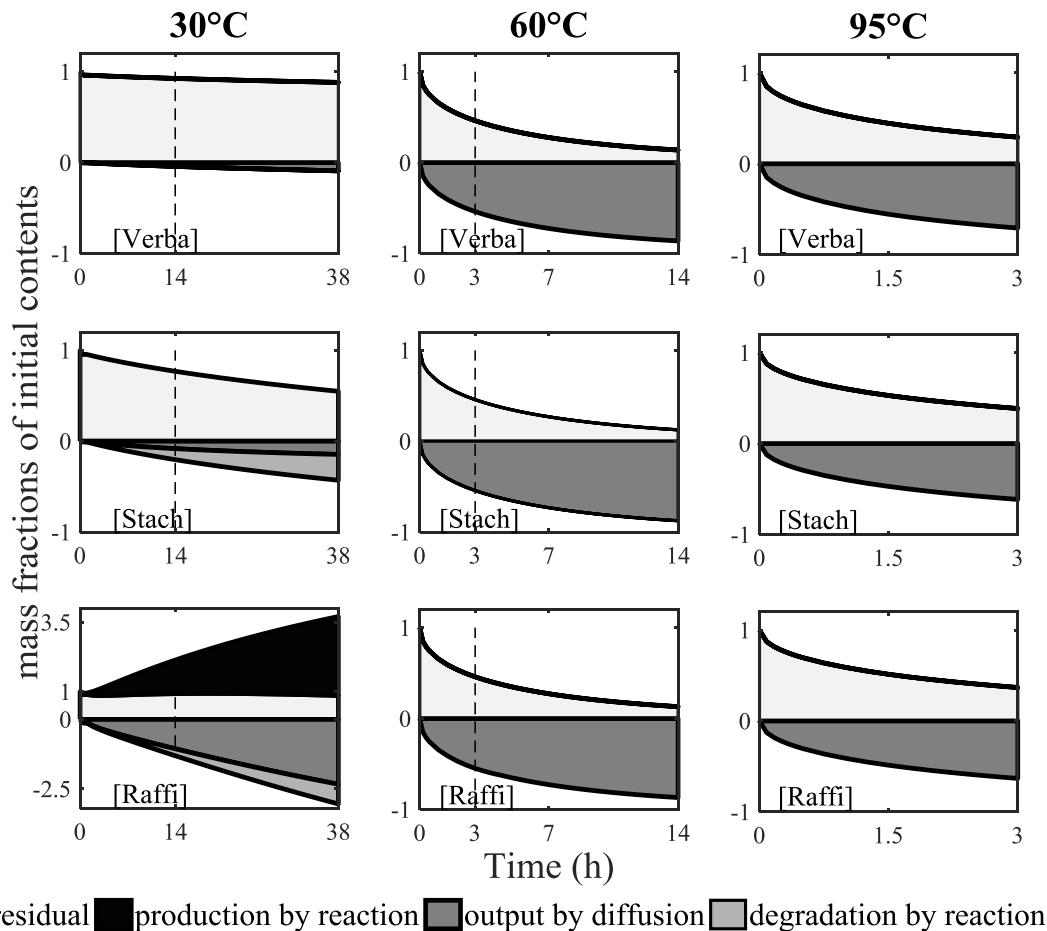


Figure 4: Predicted algebraic residual, produced, diffused and degraded mass fraction kinetics for verbascose [Verba], stachyose [Stach] and raffinose [Raffi] species in cowpea seed during the soaking-cooking process at 30 °C, 60 °C and 95 °C.

At 30 °C, the model demonstrated high turnover of raffinose; production due to the degradation of stachyose (as the initial quantity of stachyose was higher than that of raffinose, significant quantities of raffinose were formed in the seeds), representing 286% of initial raffinose content after 38 h, while at the same time, 231% of the initial concentration of raffinose diffused in the soaking water and 71% was degraded. As a result, the net concentration of raffinose in the seeds remained almost the same during soaking (85% of initial value after soaking for 38 h). In the case of stachyose and in the same soaking conditions (30 °C for 38 h), 46% of initial content disappeared and two thirds of the losses were due to the degradation phenomenon. The proportion of verbascose degraded, and consequently the production of stachyose, was negligible, while the reaction rate constant of verbascose was only 3 fold lower than for stachyose. This was linked to the much lower initial concentration of verbascose in seeds (10 times lower than stachyose); the reaction rate was thus 30 fold lower for verbascose than for stachyose. As a whole and according to the model, 8% of the initial alpha-galactosides was degraded into galactose and sucrose in the

cowpea seed after soaking for 38 h at 30°C while 24% was degraded in the soaking water, resulting in a net degradation of 32%.

At 60 °C and 95 °C, neither degraded nor produced fractions of alpha-galactosides were detected in the seed, and the diffused fractions were much higher than at 30 °C. For instance, in the case of stachyose with a soaking time of 3 h, only 2.2% of initial content leached out of the seed at 30 °C whereas up to 54.3 % and 61.5 % of stachyose initial content leached out of the seed at 60 °C and 95 °C, respectively. This result confirms the major impact of temperature on the apparent molecular diffusivity of alpha-galactosides identified by the model (see section 4.2.2).

Constitutively, as shown in Eqs. (3) and (4), the model simultaneously accounts for two phenomena (mass transport and first-order reactions) that both reduce alpha-galactoside content in the seed. To get an idea of the degree of correlation between the adjusted model parameters considered two-by-two, the correlation coefficients were calculated on the basis of Monte Carlo results. The average correlation coefficient between parameters (rate constants and apparent diffusivities) was < 0.21 , meaning that the model parameters we identified are quite independent. This can be explained by the fact that, by minimizing of the determinant of dispersion of matrix C , the method used for the identification of the model parameters limits the level of correlation between parameters.

4.3. Soaking-cooking simulations

In West African countries like Benin, cowpea seeds are traditionally prepared using two different methods: either by soaking seeds for 12 h followed by cooking for 25 min (method n°1), or by directly cooking the seeds in boiling water for 1 h with a limited water-to-seed ratio (method n°2) (Madodé, 2012). The total initial alpha-galactosides content in *Wankoun* cowpea seeds in our study was 4.66 kg/100kg (db). Different cooking processes were simulated using the model, and the final predicted alpha-galactoside concentrations both in the seeds and in the soaking water (expressed in kg/100kg (db)) were generated (see the Supplementary Table 2 for details). For processes including a draining step and for a given water-to-seed ratio, an additional volume of fresh water was used immediately after draining such that all water was absorbed by the seed. We also assume that a draining step removes all the alpha-galactosides present in soaking water. For low water-to-seed ratios, the residual volume of water at the end of processes estimated by the model, was assumed to be a highly concentrated solution of alpha-galactosides that adsorbed onto the seeds and was hence consumed.

Supplementary Table: Total alpha-galactoside contents (raffinose+stachyose+verbascose) in the seed and in the soaking water, and expected consumption determined by simulation of different soaking-cooking processes. Process 1: cooking at 95 °C for 1 h (ratio 1:4 (w/w)).

Process 2: Cooking at 95 °C for 1 h (ratio 1:1 (w/w)). Process 3: Pre-cooking at 95 °C for 30 min (ratio 1:1) followed by draining, and cooking at 95 °C for 30 min using the same volume of water as the discarded soaking water. Process 4: Soaking at 30 °C for 12 h (ratio 1:1 (w/w)) followed by draining, and cooking at 95 °C for 25 min using the same volume as the discarded soaking water.

	Predicted total alpha-galactoside contents (kg/100 kg (db))				Content consumed	Volume of residual soaking water (ml/100 g (db))
	Original seeds	Final seeds	Final Soaking water	Final seeds + soaking water		
Process 1	4.66	2.73	1.93	4.66	2.73	341.7
Process 2	4.66	2.85	1.81	4.66	4.66	0.8
Process 3	4.66	2.75	0.54	3.29	3.29	1.9
Process 4	4.66	3.03	0.83	3.86	3.86	3.0

Process 1 was cooking for one hour at 95 °C using a water-to-seed ratio of 4:1. In process 1, the large quantity of water (342 ml/100 g (db)) remaining after cooking was thrown away. After process 1, a residual concentration of 2.73 kg/100 kg (db) in the seeds and of 1.93 kg/100 kg (db) in the soaking water were observed. The expected consumption of alpha-galactosides in process 1 is 2.73 kg/100kg (db), that is, 59% of initial alpha-galactosides mass.

Process 2 resembled traditional method n°2, i.e., cooking for one hour at 95 °C with a low water-to-seed ratio (1:1) during which the water is completely absorbed by the seeds to reach equilibrium. After the traditional process n° 2, the final alpha-galactosides concentration in the seeds (2.85 kg/100 kg (db)) and soaking water (1.81 kg/100 kg (db)) was not much different from that in process 1. But as the water-to-seed ratio is much lower than in process 1, the final quantity of residual water that contains alpha-galactosides is consumed with the seeds. Thus, in this case, the expected consumption of alpha-galactosides is 4.66 kg/100 kg (db), i.e. 100% of the initial quantity of alpha-galactosides.

Process 3 was pre-cooking at 95 °C for 30 min using a low water-to-seed ratio of 1:1 (water fully absorbed by seeds to reach equilibrium) followed by boiling for 30 min. In the model, the soaking water was drained off between the pre-cooking and cooking steps. Process 3 resulted in a final concentration of alpha-galactosides in seeds of 2.75 kg/100 kg (db) and 0.54 kg/100 kg (db) in the soaking water. Draining after pre-cooking was the reason why the final alpha-galactosides content (seeds + residual soaking water)

was lower than in process 2 (4.66 kg/100 kg (db)). Like in process 2, the ratio was limiting and the expected consumption of alpha-galactosides present in the seeds and residual water was 3.29 kg/100kg (db), i.e. 71 % of initial alpha-galactoside content.

Process 4 was close to traditional method n°1: soaking at 30 °C for 12 h using a low water-to-seed ratio of 1.2:1 (the water is fully absorbed by seeds to reach equilibrium) followed by draining and then cooking at 95 °C for 25 min. After process 4, the final concentration of alpha-galactosides in seeds was 3.09 kg/100 kg (db) and that in the soaking water was 0.86 kg/100 kg (db). In this process, the expected consumption of alpha-galactosides was 3.95 kg/100 kg (db), i.e. 85% of the initial concentration. This loss was essentially due to degradation by reaction (fig 4).

The most efficient way to minimize alpha-galactosides consumption is thus to profit from the diffusion of these molecules in the cooking water by discarding the excess cooking water (processes 1 and 3). The price to pay for this solution is however both loss of flavor of the cooked cowpea and of nutrients. Process 3 could be a compromise; precooking and changing cooking water before the end of cooking, is often used to cook hard-to-cook legume seeds. Another way is to enhance the enzymatic degradation of alpha-galactosides as observed at low soaking temperature (process 4).

5. Conclusion

Our study advanced our understanding of the contrasted behavior of alpha-galactosides in cowpea seeds as a function of the soaking-cooking conditions. A 2D axi-symmetric model was developed, considering a single cowpea seed being soaked in a limited amount of water. This approach simultaneously accounts for the diffusion and reaction of alpha-galactosides as well as for its transport of water. At higher temperatures (60 °C and 95 °C), the diffusion process predominated and no thermal degradation was observed. At a low temperature (30 °C), and assuming first-order reactions, the model satisfactorily described the production and degradation of alpha-galactosides both in the seed and in the soaking water, probably due to endogenous alpha-galactosidase activity. However, in these conditions, the diffusion of alpha-galactosides from the seed to the soaking water was very slow. The resulting model was then used to simulate some soaking-cooking scenarios with regards to final alpha-galactoside content. The simulations showed that including a draining step is one way to reduce the quantity of alpha-galactosides consumed. Another efficient way to reduce alpha-galactoside content is to use a relatively long soaking step at a low temperature to promote enzymatic degradation. Characterizing and modeling alpha-galactosidase activity as a function of the processing conditions, will enable the identification of optimized pathways to enhance enzymatic activity and hence reduce alpha-galactoside content more efficiently. This work is now in progress.

Acknowledgement

We are grateful to SCANCO Medical AG (Brüttisellen, Switzerland) for the microtomograph of crude cowpea seed.

3.1.2. Synthèse et perspective

Bien que le niébé soit fortement consommé en Afrique et connu comme générant des désordres intestinaux, peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes de perte des alpha-galactosides se produisant durant les opérations de trempage et cuisson. Ainsi, ce travail a eu pour objectif d'identifier les processus et d'établir la part des mécanismes de diffusion et de réaction se produisant sur les alpha-galactosides au cours des opérations de trempage-cuisson. Des solutions permettant de réduire la teneur en alpha-galactosides dans les graines de niébé ont ensuite été discutées. Pour cela, les teneurs de trois alpha-galactosides (raffinose, stachyose et verbascose) ont été mesurées dans la graine et l'eau d'immersion à 30 °C, 60 °C et 95 °C. Aucune dégradation thermique n'a été observée au cours de ces trois conditions. Un modèle en 2D axisymétrique représentant la graine de niébé associe, pour les trois équations de conservation des trois oligosaccharides, des processus de diffusion (loi de Fick) et d'hydrolyse enzymatique (par une cinétique apparente d'ordre 1). Ce modèle prend également en compte la diffusion de l'eau dans la graine (loi de Fick). Les quatre équations aux dérivées partielles couplées sont résolues par la méthode des éléments finis avec un logiciel commercial (Comsol). À température élevée (60 °C et 95 °C), la diffusion des oligosaccharides de la graine vers l'eau d'immersion est prédominante, tandis qu'à 30 °C la diffusion est très limitée. En revanche, à 30 °C, l'hydrolyse enzymatique des alpha-galactosides est prépondérante. Elle intervient essentiellement sur le raffinose et le stachyose. Le modèle a alors permis de simuler différents scénarii de trempage et cuisson et l'effet du ratio eau/graines. Le modèle a montré qu'un changement d'eau au cours du procédé de trempage-cuisson est un moyen efficace pour réduire la consommation d'alpha-galactosides. Un trempage préalable à la cuisson est également efficace pour éliminer 35 % des alpha-galactosides, en permettant l'action de l'alpha-galactosidase.

Pour pouvoir mieux comprendre le fonctionnement de cet alpha-galactosidase et optimiser son potentiel d'hydrolyse, une étude spécifique s'est avérée nécessaire. La suite des travaux a pour objectifs de déterminer les optimums de température et de pH de l'alpha-galactosidase et d'établir les paramètres Michaeliens (K_m et v_{max}) pour les cinétiques d'hydrolyse du raffinose, stachyose et verbascose (Publication # 2). L'équation de Michaelis-Menten permettra par la suite de remplacer la cinétique apparente d'ordre 1 (Publication #1).

3.2. Publication 2 : Etude cinétique de l'hydrolyse enzymatique des alpha-galactosides dans les graines de niébé

3.2.1. Article paru

Kinetic study of enzymatic α -galactoside hydrolysis in cowpea seeds

Fanny Coffigniez^a, Aurélien Briffaz^{a*}, Christian Mestres^a, Julien Ricci^a, Pascaline Alter^a, Noel Durand^a, Philippe Bohuon^b

Food Research International

Abstract

The endogenous alpha-galactosidase activity of cowpea seeds was characterized and modelled assuming Michaelian behavior. The aim is to use the resulting knowledge to optimize alpha-galactoside degradation during the soaking-cooking process. In this study, the alpha-galactosidase enzyme from *Wankoun* cowpea was extracted and its enzymatic activity was analyzed as a function of temperature, pH and the presence of some inhibitors. Enzymatic activity was optimal around 35 °C and a pH of 5.8. Activation and inactivation energy was evaluated at 50 ± 3 and 103 ± 9 kJ.mol⁻¹, respectively. The strongest inhibitor was galactose with an inhibition constant K_I of 0.28 ± 0.03 mM. Incubation of the enzyme extract with alpha-galactosides revealed a 10-hour lag phase in the early stages that could be due to low pH, the action of inhibitors including galactose and the biosynthesis of alpha-galactosides. After the lag phase, the degradation of each alpha-galactoside occurred without the appearance of any intermediary product. The degradation of alpha-galactosides was observed with a K_m of 1.7 ± 0.3 mM for raffinose; 3.6 ± 0.6 mM for stachyose and 15.9 ± 0.1 mM for verbascose. A long soaking step around 35 °C is suggested to maximize the alpha-galactosides enzymatic degradation.

Keywords

Legume; alpha-galactosidase; Michaelis–Menten; soaking; cooking; inhibitor; hydrolysis.

1. Introduction

The legume cowpea is widely cropped and consumed in West Africa due to its drought tolerance and high nutritional value (Langyintuo et al., 2003). Cowpea seed has a high protein content (20-25 % w/w), and could thus be a good alternative to meat (Boye et al., 2010). It is also rich in micronutrients such as vitamins and minerals (Sreerama et al., 2012; Campos-Vega et al., 2010). However, cowpea also contains anti-nutritional factors such as alpha-galactosides. Three main alpha-galactosides are present in cowpea seeds depending on the number n of galactose units: raffinose ($n = 1$; 0.5-1 g/100 g db), stachyose ($n = 2$; 1.7-6 g/100 g db) and verbascose ($n = 3$; 0.6-1.3 g/100g db) (Gonçalves et al., 2016). In terms of distribution within the seed, Sreerama et al., (2010) showed that in chickpea and horse gram, the alpha-galactosides were mainly present in the cotyledon (65% w/w) and in the embryonic axis (27% w/w) with a few in the seed coat (7% w/w). This distribution differs slightly depending on the alpha-galactoside concerned. Inside the cells, 85% (w/w) of alpha-galactosides are contained in cytosol and 15% w/w in storage vacuole (Obendorf and Gorecki, 2012). In the seeds, the role of these molecules is to provide energy through the action of the endogenous alpha-galactosidase enzyme that produces simple sugars for seed germination, but also to prevent hydric stress (Alani et al., 1989).

There are two types of complementary alpha-galactosidases in legumes. The first is an acidic form that accumulates during seed development and is mainly stored in cell vacuoles (Blöchl et al., 2008). During the early stage of germination, this enzyme mainly hydrolyzes the alpha-galactosides stored in the vacuoles (Obendorf and Gorecki, 2012) but also some of the alpha-galactosides present in cytosol, since this acidic form can be released from the vacuoles (Sekhar and DeMason, 1990). The other is an alkaline form that is synthesized after germination. However, its activity is observed only 40 hours after the beginning of germination (Obendorf and Gorecki, 2012; Blöchl et al., 2008). This alkaline enzyme is present in cytosol and can hydrolyze the alpha-galactosides present in this medium.

The alpha-galactosidase enzyme does not exist in humans and alpha-galactosides ferment in the colon, causing intestinal disorders and flatulence (Obendorf and Gorecki, 2012). For the purpose of human consumption, it is possible to use the endogenous alpha-galactosidase activity of cowpea during soaking to reduce alpha-galactoside content. The intensity of endogenous alpha-galactosidase activity depends to a great extent on the soaking conditions (time, temperature, pH). A soaking period of 22 h at room temperature enabled Khattab and Arntfield, (2009) to reduce total alpha-galactoside content by 41% in some Canadian cowpea cultivars. Coffigniez et al. (2018) showed that soaking cowpeas for 38 h at 30 °C reduced raffinose content by about 20% and stachyose content by 50%. This is explained by the fact that 30 °C is close to optimal for enzyme activity. Enzymatic degradation could be enhanced through a better understanding of enzyme activity as a function of soaking parameters (pH, temperature, etc.).

Only a few studies describing the alpha-galactosidase activity of legumes are available in the literature. Three alpha-galactosidase isoforms have been found in cowpea seeds: isoforms I ($M_r = 111000$), II¹ ($M_r = 29000$) and II² ($M_r = 30000$) (Alani et al., 1989). Dey and Pridham, (1969a) showed that alpha-galactosidase activity in *Vicia Faba* was optimal between pH = 3 and pH = 6 with a PNP (p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside) substrate and between pH = 3 and pH = 5 with a raffinose substrate. Concerning the effect of temperature, Dey and Pridham, (1969a) showed that the activity of the enzyme was stable up to 45 °C. Beyond this temperature, activity started to decrease, and stopped at 75 °C. Finally, Dey et al., (1983) showed that increasing the temperature in the range [20–50 °C] resulted in an increase in K_M and v_{max} with an activation energy of 62.1 kJ.mol⁻¹.

Alpha-galactosidase are Michaelian enzymes, and their affinity and activity both depend on the substrate. Alani et al., (1989) identified a K_M value of 4.6-5 mM for raffinose and 11-15 mM for stachyose in cowpea seeds, whereas Dey and Pridham, (1969b) obtained a K_m value of 4-5 mM for raffinose and 5.26-7.5 mM for stachyose in *Vicia Faba* seeds. The same authors found a v_{max} value of 4.18-28.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ for raffinose and 1.360-9.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ for stachyose at 30 °C. They also observed a strong impact of galactose, galactinol and myo-inositol as enzyme inhibitors. K_m and v_{max} are widely determined using the Lineweaver-Burk method, however, this method of derivation leads to significant errors in the estimation of the K_m and v_{max} parameters since the y-axis takes the reciprocal of the rate of reaction – in turn increasing any small errors in measurement (Doeswijk and Keesman, 2009). A more robust method consists in integrating the Michaelis-Menten law. Another bias is due to the fact that enzyme characterization is mostly performed with purified enzyme, which, considering its chemical environment, is far from reflecting real behavior in actual applications.

Alpha-galactoside diffusion and chemical degradation in *Wankoun* cowpea seeds and during the soaking-cooking process has already been modelled (Coffigniez et al., 2017). However, enzymatic degradation was described assuming first-order kinetics whereas it is recommended to use Michaelis-Menten approach. The aim of the present study was to go further by characterizing and modelling the activity of alpha-galactosidase in cowpea as a function of substrate, pH, temperature and the presence of some inhibitors, while assuming Michaelian behavior.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Wankoun cowpea seeds was provided by IITA, Benin. Cowpea seeds were sown in November 2014 and harvested in February 2015. The seeds were stored in a vacuum pack at 4 °C in the dark until use. The cowpea seeds were freeze-dried and ground with a RETSCH Ultra Centrifugal Mill ZM 200. The grid size was 0.5 mm.

Raffinose, stachyose, galactose and galactinol standards (purity $\geq 98\%$), and myo-inositol (purity $\geq 99\%$) were purchased from Sigma (USA and China) and galactose from Fluka (Germany). The P-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (PNP, purity $\geq 98\%$) was purchased from Megazyme (Ireland). Ultrapure water was used in all the experiments (Simpak MilliQsystem, Millipore, USA). Sodium hydroxide solution (50-52% in water) used for HPAE was purchased from Sigma (Germany), and ethanol (purity $\geq 99.8\%$) from Honeywell Riedel-de-Häen (Germany). Potassium phosphate monobasic (purity $\geq 99\%$) was purchased from Sigma (Mexico) and potassium phosphate dibasic (purity $\geq 98\%$) from Honeywell (Spain). Borate (purity $\geq 99.5\%$) and sodium hydroxide (purity $\geq 98\%$) were purchased from Sigma (USA and Sweden).

2.2. Enzyme extraction

The enzyme was extracted from cowpea flour with 100 mM phosphate buffer (pH=6.5) with a cowpea/buffer ratio of 1:4 (w/w) for 0.5 h at 4 °C under gentle stirring. The solution was then centrifuged at 1000 g for 5 min at 4 °C and the supernatant, which constitutes the enzyme extract, was stored at 4 °C until use (up to 6 hours).

2.3. Enzyme characterization

The initial activity of alpha-galactosidase extract (v) was measured as the amount of PNP hydrolyzed at 30 °C (no thermal degradation) in 0.1 M phosphate buffer (pH=6.5, the same pH as in the seeds) after 5 min; 200 μ l of PNP solution was hydrolyzed by 100 μ l of enzyme extract with 700 μ L of phosphate buffer. The concentration of PNP ranged from 0.02 mM to 3.96 mM (until ten times the K_M (Dey & Pridham, 1969b)). The enzyme extract was also pre-incubated for 600 min, 720 min, 840 min and 960 min at 30 °C before measuring the enzymatic activity on PNP at the concentration of 1.98 mM for 5 min. The reaction was stopped by adding 2 mL of 0.2 M borate solution (at pH = 9.8). The product of the reaction was quantified by measuring absorbance at 405 nm with a spectrophotometer (Schimadzu UV 2450, Japan). The initial enzyme activity v , or rate constant, expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ of enzyme (or $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) was calculated using the following equation (Sigma-Aldrich, 1997) :

$$v = \frac{(Abs - Abs_0)V_{tot}}{\epsilon V_{enz}t} \quad (1)$$

where Abs is the sample absorbance at 405 nm; Abs_0 is the blank absorbance; V_{tot} is the total volume of the assay (mL); V_{enz} is the volume of enzyme (mL); ϵ is the extinction coefficient of p-nitrophenol at 405 nm ($18.5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and t is the time (min). The alpha-galactosidase activity was also evaluated

by the direct consumption of verbascose, stachyose or raffinose in the extracted supernatant. The substrate consumption was calculated by difference (Eq.(2)).

$$HS = S_0 - S \quad (2)$$

where HS is the hydrolyzed substrate (mM), S_0 the initial substrate concentration (mM), S the substrate concentration at observed time (mM) and S could be raffinose, stachyose or verbascose. The initial concentrations of verbascose, stachyose, raffinose, and galactose in the enzymatic supernatant were 0.25 mM, 1.9 mM, 0.15 mM and 0.21 mM, respectively. Their concentrations were periodically assayed during hydrolysis at 30 °C for up to 2160 min. Changes in concentration were also quantified after spiking the enzymatic extract with 11 mM of stachyose, 5.0 mM or 37 mM of raffinose. The reaction was stopped by adding 2 mL of 0.2 M borate solution (pH=9.8). The solution was filtered using a 0.45 µm membrane filter and alpha-galactosides were quantified after separation by high performance anion exchange (HPAE) chromatography using the procedure of Gangola et al., (2014) modified by Coffigniez et al., (2017). Each experiment was performed in duplicate (two enzyme extractions and two enzyme activity measurements for each extraction).

The inhibition effect of galactose (spiked at 0.6 mM; 1.5 mM and 3.0 Mm) on alpha-galactosidase was determined by measuring enzymatic activity at different concentrations of PNP (between 0.02 and 3.96 mM) in phosphate buffer at 30 °C for 5 min. The inhibition induced by galactinol (spiked at 1.0 mM and 2.5 mM) and myo-inositol (spiked at 6.0 mM and 60 mM) was also tested on 1.98 mM of PNP in phosphate buffer for a time ranging from 5 to 300 minutes.

The effect of pH (in the range [2–8.5]) on alpha-galactosidase activity was determined by measuring enzymatic activity using 1.98 mM of PNP (maximum concentration observed before inhibition) at 30 °C for 5 min in 100 mM phosphate buffer. The effect of temperature (25–60 °C) on the enzyme extract was also determined by measuring alpha-galactosidase activity on 1.98 mM PNP (same reason as for pH effect) with an incubation period ranging from 1 to 60 minutes.

2.4. Particule size

The particle size of cowpea powder was measured using a Mastersizer 3000 laser diffraction particle size analyzer. The cell was an aeros (Malvern). The refractive index and absorption index was 1.42 and 0.1 respectively. Particle size ranged from 5 nm to 3 mm.

3. Modelling of alpha-galactosidase activity

3.1. Determination of Michaelian parameters

The Michaelis-Menten equation is used to describe the initial enzymatic activity or reaction rate $v = -(V_{tot} / V_{enz}) d[S] / dt$ from a single substrate concentration $[S]$ (mM) as:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

where v_{\max} is the maximum enzymatic activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of enzyme) and K_m is the Michaelis constant (mM). The coexistence of a single substrate and of an inhibitor $[I]$ can lead to three inhibitory types: competitive inhibition (Eq. (4)), non-competitive inhibition (Eq. (5)) and uncompetitive inhibition (Eq. (6)) (van Boekel, Martinus A.J.S, 2008):

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m^{app1} + [S]} \quad (4)$$

$$v = \frac{v_{\max}^{app} [S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

$$v = \frac{v_{\max}^{app} [S]}{K_m^{app2} + [S]} \quad (6)$$

With

$$K_m^{app1} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (7)$$

$$K_m^{app2} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (8)$$

$$v_{\max}^{app} = \frac{v_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (9)$$

where K_I is the inhibition constant (mM), K_m^{app1} and K_m^{app2} are the apparent Michaelis constants (mM) for competitive inhibition and uncompetitive inhibition, respectively. v_{\max}^{app} is the apparent maximum enzymatic activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of enzyme). So, for competitive inhibition $K_m^{app1} > K_m$ and v_{\max} is

constant; for non-competitive inhibition $v_{\max}^{app} < v_{\max}$ and K_m is constant; and for uncompetitive inhibition $K_m^{app2} < K_m$ and $v_{\max}^{app} < v_{\max}$.

Eqs. (3)–(6) are similar in the form and the integration of Eq. (3) between 0 to t (min) gives:

$$t = \frac{1}{v_{\max}} ([S_0] - [S]) + \frac{K_m}{v_{\max}} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (10)$$

where t is the time (min) and $[S_0]$ is the initial substrate concentration (mM). The integral form of Eqs. (4)–(6) (with inhibitor effect) takes a form similar to Eq. (10) by changing either K_m by K_m^{app1} (competitive inhibition), either v_{\max} to v_{\max}^{app} (non-competitive inhibition) or K_m by K_m^{app2} and v_{\max} to v_{\max}^{app} (uncompetitive inhibition).

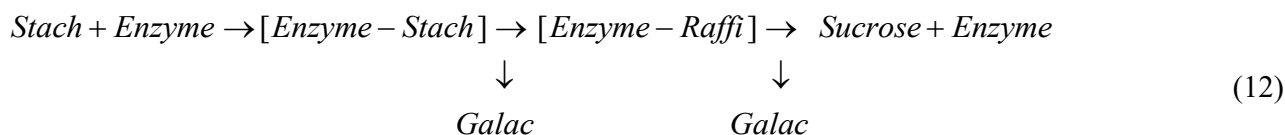
For each model fitting, the goodness of fit was evaluated through the coefficient of determination (R^2) and through the distribution of residuals, in the range of experimental values. The RMSE can be calculated for the y-axis as:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{u=1}^n (\hat{y}_u - y_u)^2}{n - p}} \quad (11)$$

where \hat{y}_u and y_u are the predicted and experimental data, respectively, for observation u and p is the number of parameters. The sum is computed for n different observations.

The Michaelian parameters of PNP and galactose (inhibitor) are correlated. They were therefore determined using Eqs. (3) and (4) by non-linear regression with TableCurve2D software (Jandel, USA). The model was adjusted to the experimental data representing the enzymatic activity as a function of PNP concentration, without addition of galactose to extract the K_m and V_{\max} parameter from the model. The model was also adjusted to the same experimental data considering the addition of galactose to extract the K_I parameter of galactose from the model.

Concerning the alpha-galactosides degradation, we observed no raffinose release when the enzymatic supernatant was spiked with stachyose, as already reported by Garro et al., (1999), even at a very high concentration (11 mM) of stachyose. The raffinose is thus assumed to remain linked to the enzyme after hydrolysis of stachyose and directly hydrolyzed to galactose and sucrose (Eq.(12)). The formation of an unseen intermediary product during enzymatic hydrolysis has already been described in the case of aldolase (Belitz H.D. and Grosch W., 1999). The assumption concerning hydrolysis of verbascose is the same.



The hydrolysis of verbascose, stachyose and raffinose was thus described with Michaelian kinetics directly producing the end products (sucrose and galactose) with the enzyme activities v_{verba} , v_{stach} and v_{raffi} respectively.

The Michaelian parameters for alpha-galactosides, galactinol (inhibitor) and myo-inositol (inhibitor) were identified from Eq.(10) using the progress curve method iteratively adjusted to the goodness-of-merit RMSE (mM) function using a minimization procedure of the Nelder-Mead simplex with the “fminsearch” function of Matlab software. The standard deviation of each adjusted parameter was determined via Monte Carlo simulations with 2 000 draws considering experimental noise, as described by Coffigniez et al., (2017). In this case, the Vmax and Km parameter for each alpha-galactoside were extracted from the model, considering the experimental evolution of product concentration as a function of time after 600 min. During the first 600 min, the Km and Vmax were fixed to the model estimation found after 600 min, and a I/K_I parameter was extracted from the model. The K_I of galactinol and myo-inositol were both extracted from the model that was adjusted to experimental data representing the PNP-hydrolysis-product concentration as a function of time (Km, Vmax and K_I of galactose was fixed to the estimation found without additional inhibitor).

It is important to mention that the both model fitting methods being used in this study (i.e. nonlinear regression using TableCurve2D and minimization of the RMSE using “fminsearch” Matlab function) provided equivalent model adjustment results (data not shown).

3.2. Enzyme thermal activation and inactivation

The enzymatic activity (v) changed as a function of time and temperature T as (van Boekel, 2008):

$$v = a_{rel} v_{act} \tag{13}$$

where v_{act} is the activation of enzymatic activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ of enzyme) at T and a_{rel} is the enzyme activity attenuation constant (dimensionless) linked to the thermal degradation of the enzyme. Assuming that v_{act} follows an Arrhenius law, the activation energy for enzyme activity was identified by Eq. (14) in the temperature range [25–55 °C] (van Boekel 2008) :

$$v_{act} = v_{ref} \exp\left(-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (14)$$

where v_{ref} is the enzymatic activity at the reference temperature ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of enzyme), E_a is the activation energy for alpha-galactosidase activity ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R is the gas constant ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) and T is the temperature (K). Assuming that the enzyme activity attenuation constant (a_{rel}) follows first order kinetics (Eq. (15)), and that the thermal degradation rate (k) follows an Arrhenius law, the energy of enzyme inactivation ($E_{a,in}$) was modelled using Eq.(16) at the reference temperature T_{ref} (van Boekel, 2008).

$$a_{rel} = \exp(-k t) \quad (15)$$

$$k = k_{ref} \exp\left(-\frac{E_{a,in}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (16)$$

where k is a rate constant (min^{-1}) and k_{ref} (min^{-1}) is the rate constant at the reference temperature.

The T_{ref} was determined by using the following equation (Schwaab and Pinto, 2007):

$$T_{ref} = \frac{\sum_{i=1}^{NE} [v_i \ln(v_i)]^2}{\sum_{i=1}^{NE} \frac{[v_i \ln(v_i)]^2}{T_i}} \quad (17)$$

Eq. (17) defines the reference temperature that allows for estimation of uncorrelated parameters. Where v_i is the enzyme activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of enzyme) and NE is the total number of experiments.

The activation and inactivation energies for enzyme activity (Eqs. (14) and (16)) were estimated by fitting the model to the experimental data representing the enzymatic activity as a function of time and temperature with TableCurve2D software (Jandel, USA).

3.3. Effect of pH on enzyme activity

The signal describing enzymatic activity v as a function of pH was deconvoluted assuming symmetric Gaussian profiles (Eq. (18)).

$$v_{max} = -c + \sum_{i=1}^2 \frac{d_i}{\sigma_i \sqrt{\pi/2}} \exp\left[-\frac{2(pH - \overline{pH}_i)^2}{\sigma_i^2}\right] \quad (18)$$

where \overline{pH}_i is the pH at the center of the peak i and σ_i is the standard deviation of the peak i for each peak, c and d_i are constants. Concerning the impact of pH , the model parameters from Eq. (18) were identified using a peak fitting program (Origin software, OriginLab Corporation, Northampton, MA) considering the evolution of enzymatic activity as a function of pH .

4. Results and discussion

4.1. Identification of optimal conditions for enzyme extract functionality

4.1.1. Effect of temperature

Figure 1 shows changes in enzymatic activity as a function of time at temperatures ranging from 25 °C to 60 °C. At an early stage (2 min), enzymatic activity increased with temperature, due to the activation of the enzyme with an increase in temperature while the thermal degradation was negligible. For instance, shifting from 25 °C to 50 °C increased enzymatic activity by a factor of 4.7. An Arrhenius equation fitted the experimental results well (RMSE=0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ of enzyme) (Eq. (14)). An enzymatic activity v_{ref} of $0.17 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ of enzyme was found at the reference temperature of 29.0 °C, with an activation energy of $50 \pm 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Table 1), which is in the same order as the value ($62.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) found in the literature (Dey et al., 1983).

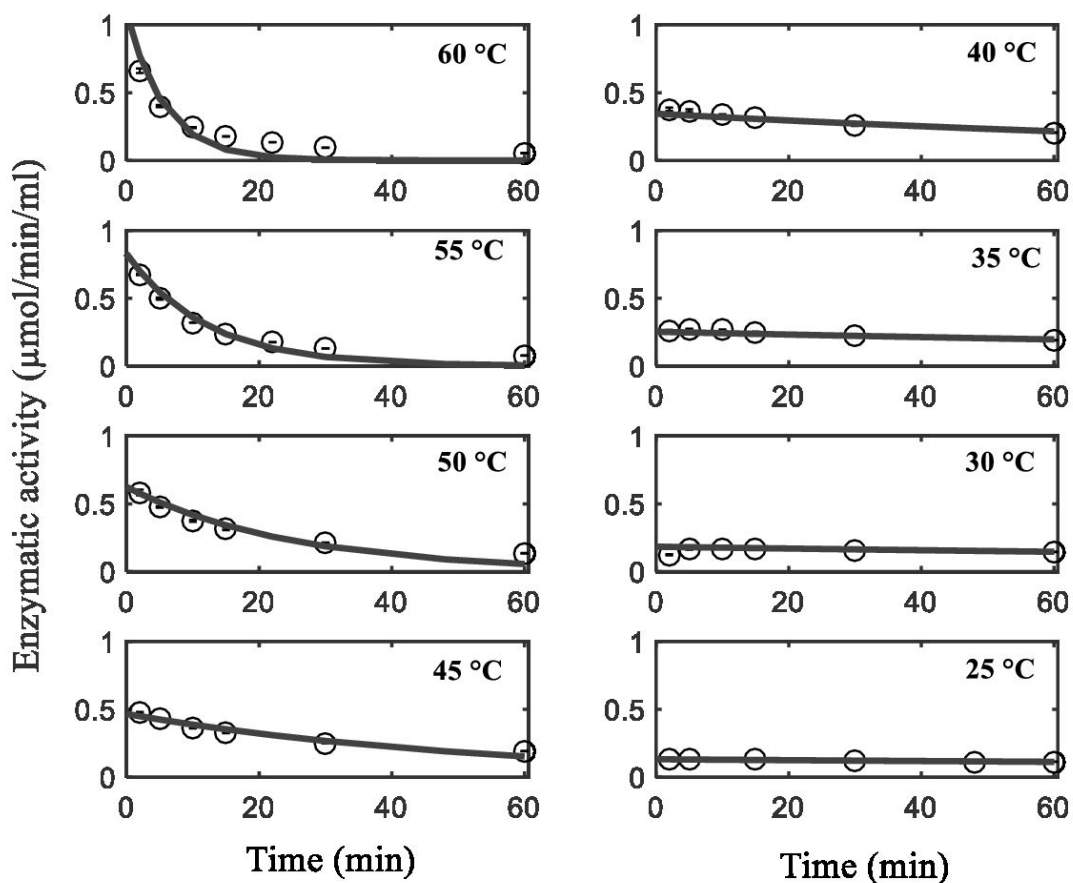


Figure 1: Experimental (dots) and predicted (lines) enzymatic activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) kinetics of alpha-galactosidase on PNP (pH=6.5) at different incubation temperatures ranging from 25 °C to 60 °C.

Error bars are standard deviations ($n = 4$).

In the case of longer incubation times, the higher the temperature, the lower the enzymatic activity over time, due to thermal degradation of the enzyme. The rate constant k_{ref} was adjusted following an Arrhenius equation (Eq.(16)) and a value of $0.09 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ was found at the reference temperature of 56.6 °C, with an inactivation energy of $103 \pm 9 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Table 1).

Table 1. Estimated kinetic parameters for thermal activation of the enzyme (E_a , v_{ref}) from 25 to 50 °C with a reference temperature of 29.0 °C and thermal inactivation of the enzyme (E_a , k_{ref}) from 25 to 60 °C with a reference temperature of 56 °C. Enzyme extract based on PNP measurements (mean values \pm standard deviations).

Thermal effect	E_a (kJ.mol ⁻¹)	v_{ref} (μ mol.min ⁻¹ .mL ⁻¹)	k_{ref} (min ⁻¹)	RMSE [§] (μ mol.min ⁻¹ .mL ⁻¹)
Activation	50 \pm 3	0.17 \pm 0.01		0.03
Inactivation	103 \pm 9		0.09 \pm 0.01	

[§] RMSE: Root mean square error between experimental and predicted enzymatic activity data from 25 to 60 °C

At low temperatures (25 °C and 30 °C), the model adjustment (using equation (13)) resulted in lower thermal degradation rates. With incubation times of less than 1 h, the enzymatic activity decreased by maximum 15%, and the enzyme can be considered thermally stable. When the incubation time increased from 5 min to 1 h, the temperature of the maximum residual activity decreased from 55 °C to 40 °C due to thermal degradation. Our results are close to those found in the literature. Dey and Pridham, (1969a) observed a maximum activity at 45 °C in *Vicia Faba* after an incubation time of 15 min. Bhaskar et al., (1990) found a maximum activity at 50 °C in *Cassia Serisea* after an incubation time of 5 min.

Using Eq.(13), the cumulative enzymatic activity after 12 h of incubation can be calculated for each temperature. The best temperature to obtain the maximum cumulative activity (and hence maximum degradation of alpha-galactosides) was found to be around 35 °C. Therefore, 12 h of soaking at 35 °C could reduce the alpha-galactosides content by enzymatic degradation.

4.1.2. Effect of pH

Figure 2 shows the enzymatic activity as a function of pH.

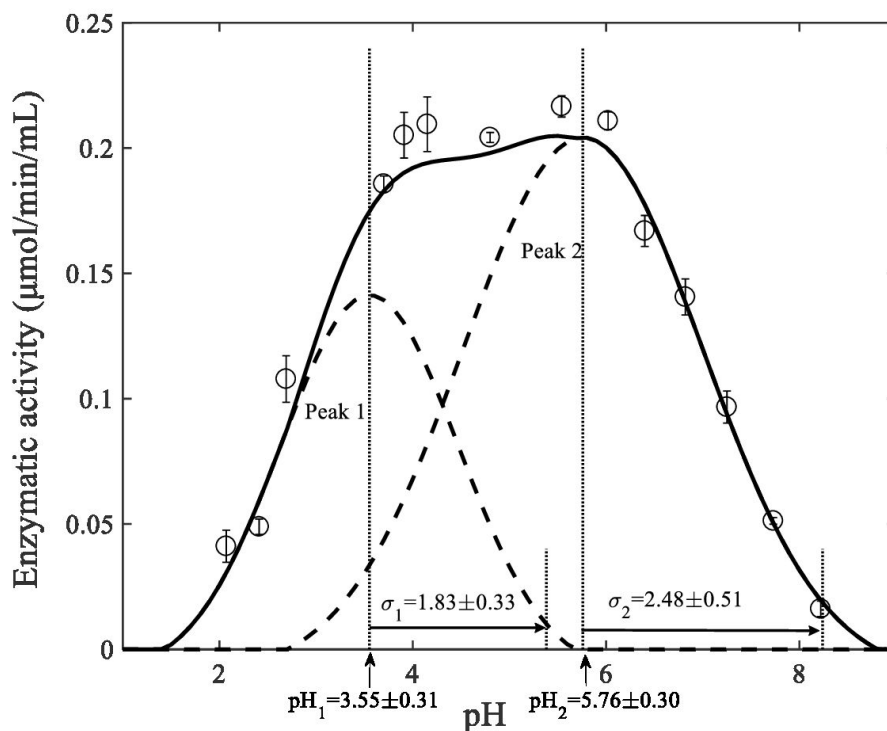


Figure 2: Experimental (dots) and predicted (lines) enzymatic alpha-galactosidase activity on PNP at 30 °C and as a function of pH . The predicted results have been deconvoluted into two Gaussian

Two peaks were identified using Origin software (Eq.(18)). The first peak occurred from a pH value of 1.72 ± 0.33 to 5.38 ± 0.33 with a maximum at pH 3.55 ± 0.31 with an enzymatic activity of $0.14 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ of enzyme. The second peak appeared in the pH range from 3.28 ± 0.51 to 8.25 ± 0.51 with a maximum activity of $0.22 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ of enzyme at pH 5.76 ± 0.30 . This result can be explained by the fact that alpha-galactosidase in legume seeds has two isoforms: enzyme I with an apparent molecular weight of 209 000, and enzyme II with an apparent molecular weight of 38 000, as observed in *Vicia Faba* (Dey and Pridham, 1969a). Each peak could correspond to one isoform of enzyme. The latter authors indeed found that the two peaks had different optimum pH of 3-3.5 and 6.5. Similarly, Dey et al., (1983) observed maximum alpha-galactosidase activity at $pH=4.7$ for enzyme II and 6.1 for enzyme I in lentils.

4.1.3. Existence of a early-stage lag phase

Figures 3a and 3b show experimental changes in alpha-galactosides and galactose contents (both natively present in the extract, with no further addition) in the presence of alpha-galactosidase extract at 30 °C and $pH = 6.5$.

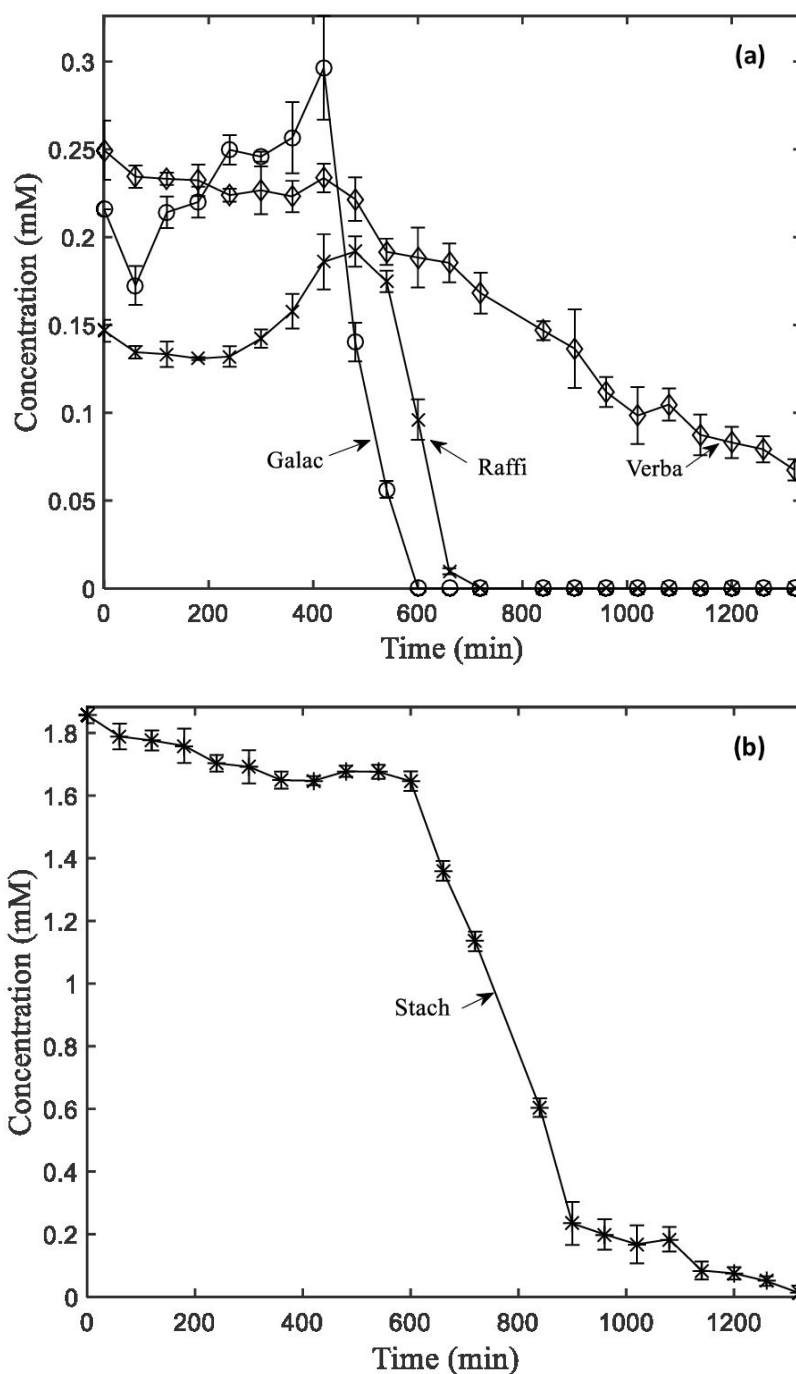


Figure 3: (a) Changes in galactose (○), raffinose (×) and verbascose (◇) concentrations (mM) kinetics during alpha-galactosidase hydrolysis at 30 °C and pH = 6.5. (b) Changes in stachyose (*) concentration (mM) kinetics in the same experimental conditions as in (a). Error bars are standard deviations ($n = 4$).

An approximately 600-minute lag phase was observed in all cases. During this phase, the degradation of verbascose and stachyose slowed down, whereas the concentrations of both raffinose and galactose increased slightly. At the end of the lag phase (i.e. between 420 and 600 min), the concentration of galactose decreased to zero. The degradation of alpha-galactosides then occurred after the degradation of galactose.

Kennedy et al., (1985) showed that degradation of alpha-galactosides started when simple sugars were exhausted. Despite the degradation of alpha-galactosides, no additional galactose accumulated in the medium. Some authors also reported the absence of galactose accumulation during the natural degradation of alpha-galactosides (Nnanna and Phillips, 1988). This is due to its integration as substrate in a parallel enzymatic reaction pathway to produce alpha-D-galactose-1-phosphate by galactokinase (Pridham et al., 1969; Kaplan et al., 1997). Dey and Pridham, (1969b) showed that alpha-D-galactose-1-phosphate is not an inhibitor of alpha-galactosidase activity at a concentration < 6.25 mM.

4.2. Model adjustments describing enzyme extract degrading behaviour

4.2.1. Michaelis constants in the case of PNP

Figure 4 shows changes in enzymatic activity as a function of the concentration of PNP and for different standard additions of galactose. The maximum enzymatic activity in the experiment was reached without the addition of galactose for a PNP concentration of 1.98 mM. Above this concentration, enzymatic activity decreased due to substrate inhibition (data not shown). The addition of galactose significantly decreased enzymatic activity (figure 4). Indeed, at a PNP concentration of 1.98 mM, the addition of 0.6 mM, 1.5 mM and 3.0 mM of galactose reduced enzyme activity by 23%, 46% and 64% respectively. The galactose was considered as a competitive inhibitor of alpha-galactosidase (Eq. (4)) as demonstrated by Dey and Pridham, (1969b). Table 2 shows the adjusted v_{max} , K_m for PNP and K_I values for galactose in these conditions, that were used to plot the estimated enzymatic activity values in figure 4. The model fitted well, with a RMSE of $0.005 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of enzyme. PNP enzymatic hydrolysis also produces galactose but in a such negligible quantity that it does not interfere with the reaction. Indeed, the production of galactose by the hydrolysis of PNP never exceeded 0.08 mM (for 5 min of incubation time) while its initial concentration was 0.21 mM.

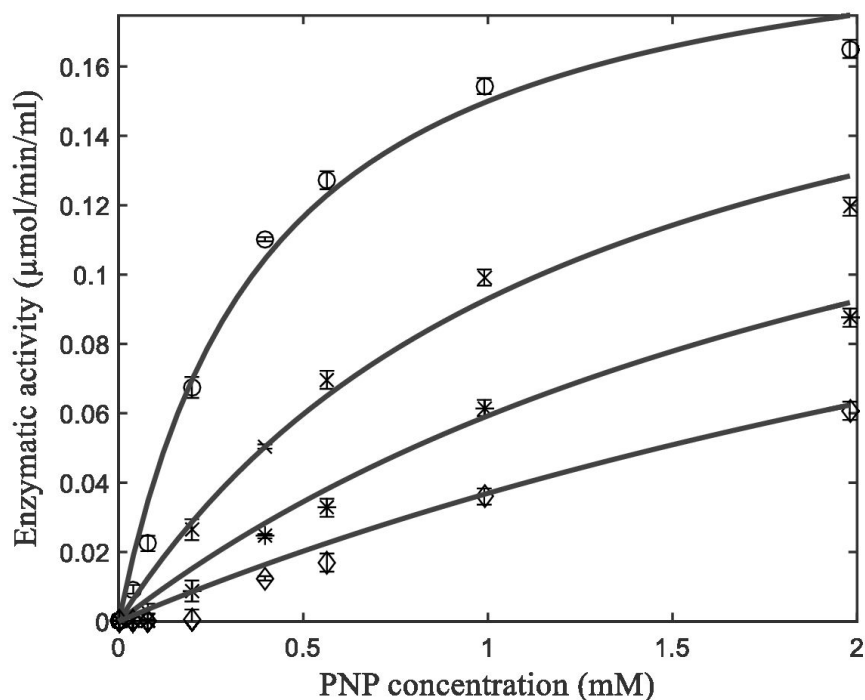


Figure 4: Experimental (dots) and predicted (lines) changes in alpha-galactosidase activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ enzyme) as a function of PNP concentration (mM) at pH = 6.5 and 30 °C for several standard additions of galactose: zero (○), 0.6 mM (×), 1.5 mM (*) and 3.0 mM (◇). Error bars are standard deviations ($n = 4$).

These Michaelian parameters (Table 2) were similar to the ones found in the literature. The Michaelis constant K_m for PNP has been estimated to be between 0.38 and 0.45 mM in beans (*Vicia Faba*) (Dey and Pridham, 1969b) and 0.4 mM in lentils (Dey et al., 1983). Hankins et al. (1980) measured the Michaelian parameters in 20 different legume species and showed that the K_m value on PNP ranged from 0.44 to 1.82 mM. The adjusted K_I value for galactose on PNP was also in good agreement with the values reported in previous studies. Hankins et al. (1980) found K_I values of between 0.22 mM and 1.19 mM depending on the legume considered.

Table 2. Maximum enzymatic activity (v_{\max}), Michaelis constant (K_m) for PNP and inhibition constants (K_I) for galactose identified from enzymatic activity data as a function of substrate concentration (Eq. 3) and inhibition constants for galactinol and myo-inositol, identified from substrate concentration kinetic data (Eq. 10) (mean values \pm standard deviations).

Michaelian parameters	Values	RMSE
v_{\max} for PNP ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.21 ± 0.01	
K_m for PNP (mM)	0.40 ± 0.05	$0.005^{\S} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$
K_I galactose (mM)	0.28 ± 0.03	
K_I galactinol (mM)	0.88 ± 0.02	$0.06^{\S\S} \text{mM}$
K_I myo-inositol (mM)	11.90 ± 0.20	$0.06^{\S\S} \text{mM}$

[§] RMSE: Root mean square error between experimental and predicted enzymatic activity.

^{§§} RMSE: Root mean square error between experimental and predicted substrate concentration.

4.2.2. Inhibitory effect of galactinol and myo-inositol

Galactinol and myo-inositol are known to be competitive inhibitors of alpha-galactosidase (Hankins et al., 1980). Added concentrations of 2.5 mM of galactinol and of 6.0 mM and 60 mM of myo-inositol decreased enzymatic activity by 36.3%, 14.9% and 48.2%, respectively (data not shown). These results are close to those found for alpha-galactosidase in *Vicia Faba* with a reduction in enzymatic activity of 44%, 16% and 44% at concentrations of 6.25 mM of galactinol, 6.25 mM and 25.0 mM of myo-inositol, respectively (Dey and Pridham, 1969b). Figure 5 shows the model adjusted to the experimental results. The model provided satisfactory results with an overall RMSE of 0.06 mM. The adjusted inhibition constant (K_I) for galactinol (0.88 ± 0.02 mM) was 13 times lower than for myo-inositol (11.9 ± 0.2 mM) (table 2) and 3 times higher than for galactose (0.28 ± 0.03 mM). The galactose is thus the most effective inhibitor, followed by galactinol, then myo-inositol. These inhibitors may partly explain the occurrence of the early-stage lag phase.

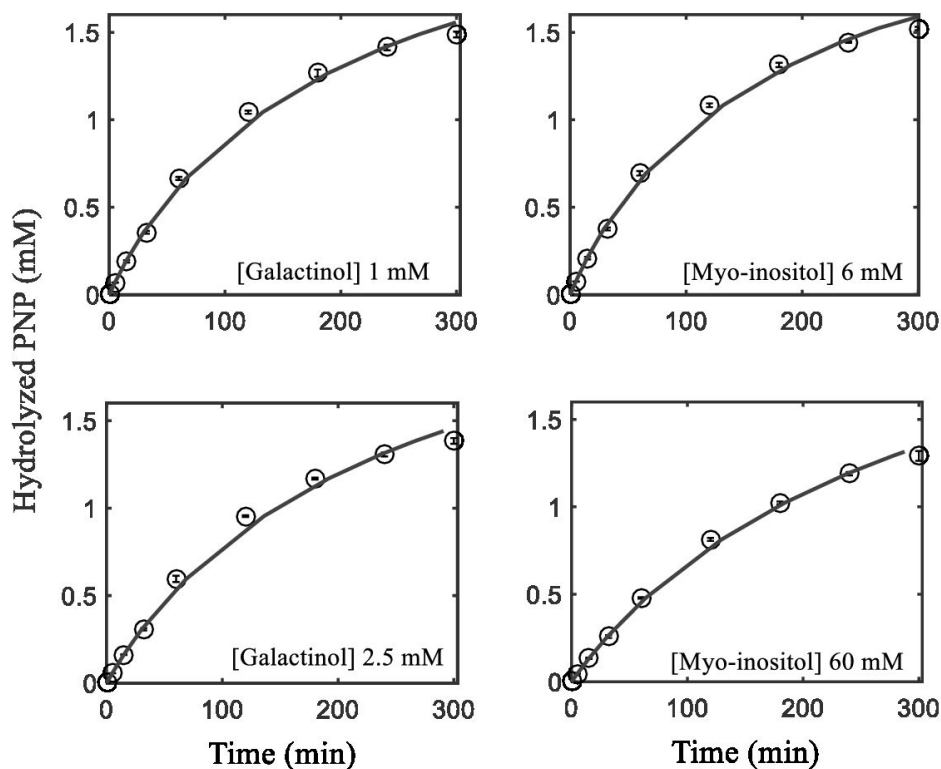


Figure 5: Experimental (dots) and predicted (lines) concentrations of hydrolyzed PNP (mM) kinetics by alpha-galactosidase at $pH=6.5$ and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in presence of spiked concentrations (mM) of galactinol and myo-inositol. Error bars are standard deviations ($n = 4$).

4.2.3. Michaelis parameters for the alpha-galactosides

The lag phase may be due to inhibition of alpha-galactosidase activity. According to Eqs.(4) to (9), the v_{max} , K_m and I/K_I parameters are correlated between each other, which may generate errors during parameter fitting. Consequently, in the present study, the K_m and v_{max} parameters were identified after the lag phase in order to avoid interference with the I/K_I parameter. First, this adjustment was performed considering the formation of raffinose due to the hydrolysis of stachyose and the formation of stachyose after hydrolysis of verbascose. However, the model was unable to reproduce the experimental results for raffinose. The model predicted a peak in the concentration of raffinose due to the hydrolysis of stachyose, the most abundant alpha-galactoside, but which was never observed experimentally. In particular, when the enzymatic extract was spiked with 11 mM stachyose, the level of raffinose remained almost zero throughout stachyose hydrolysis. Second, the adjustment was made considering that the intermediary product remained bound to the enzyme and that the final products are produced directly (Eq.(12)). The I/K_I parameters were identified during the lag phase, with K_m and v_{max} parameters fixed to the identified value after the lag phase. Figure 6 shows the adjustment between experimental results (hydrolyzed substrate

(Eq.(2)) and the values predicted by the successive models during the lag phase (with I/K_I) and after the lag phase (without I/K_I). The good adjustment to the experimental results confirmed the hypothesis that the product is linked to the enzyme.

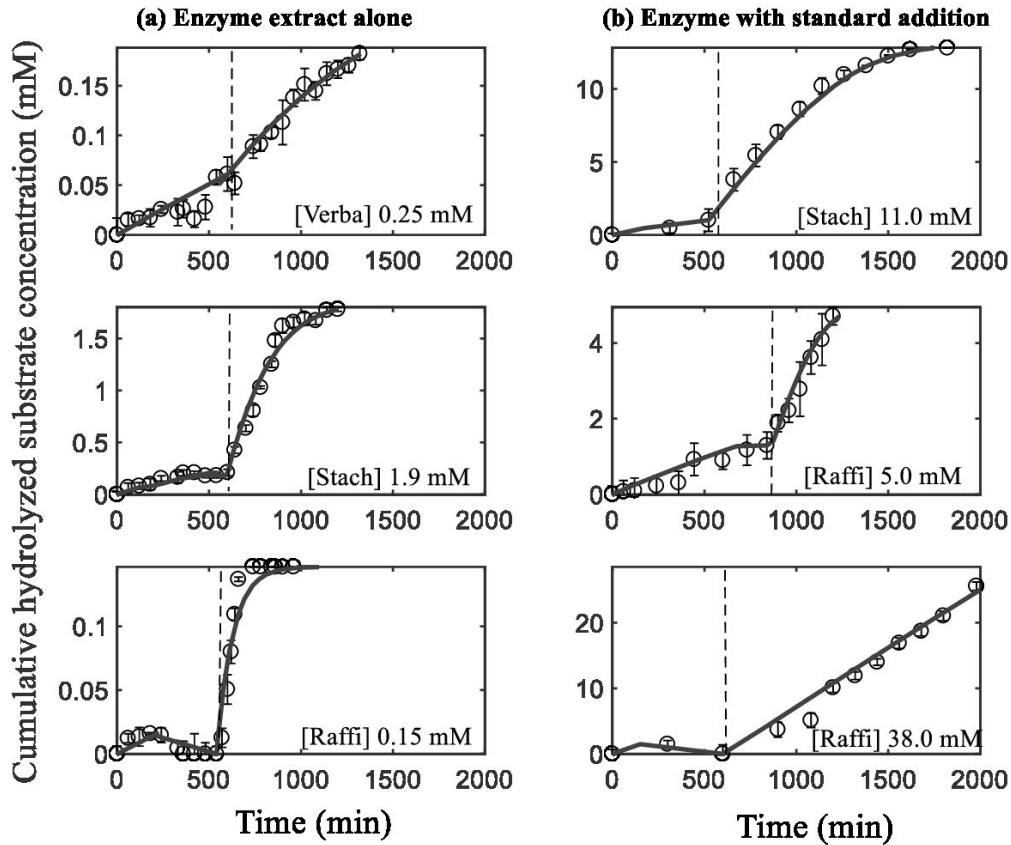


Figure 6: Experimental (dots) and predicted (lines) kinetics of verbascose [Verba], stachyose [Stach], and raffinose [Raffi] concentrations (mM) in the presence of enzyme extract and with or without standard additions of alpha-galactosides at 30 °C and pH = 6.5. (a) Enzyme extract alone already containing verbascose (0.25 mM), stachyose (1.9 mM) and raffinose (0.15 mM). (b) Enzyme extract with standard addition of stachyose (spiking of 11.0 mM) and raffinose (spiking of 5.0 mM and 38.0 mM). The dashed vertical line (--) represents the end of the lag phase (close to 600 min). The K_m and v_{max} parameters are identified after the lag phase, and the $[I]/K_I$ parameters are identified during the lag phase (K_m and v_{max} parameters fixed). Error bars represent the standard deviations ($n = 4$).

Table 3. The two Michaelian parameters (K_m , v_{max}) estimated together or only the Michaelis constant (K_m with fixed v_{max} at $0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) for verbascose, stachyose and raffinose (mean values \pm standard deviations).

Substrate	Michaelian parameters		RMSE [§] (mM)
	v_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)	K_m (mM)	
Verbascope	0.01 ± 0.01	0.25 ± 0.06^a	0.01
	0.21	15.9 ± 0.1^b	0.01
Stachyose	0.22 ± 0.06	4.1 ± 1.8^a	0.20
	0.21	3.6 ± 0.6^b	0.23
Raffinose	0.19 ± 0.01	1.2 ± 0.3^a	0.51
	0.21	1.7 ± 0.3^b	0.84

[§] RMSE: Root mean square error between experimental and predicted substrate concentration.

Values with different letters (a–b) are significantly different ($p < 0.05$) in the two conditions (v_{max} free or fixed).

The adjusted v_{max} for raffinose ($0.19 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ of enzyme) and for stachyose ($0.22 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ of enzyme) were quite similar, but about 20 times higher than for verbascose (Table 3). K_M constant was 3.4 times lower for raffinose (1.2 ± 0.3 mM) than for stachyose (4.1 ± 1.8 mM) and 4.8 times higher than for verbascose (0.25 ± 0.06 mM). The model fitted the experimental data well for all alpha-galactosides considered with an overall RMSE of 0.01 mM for verbascose, 0.2 mM for stachyose (RMSE=0.16 mM for 1.9 mM of stachyose and RMSE=0.23 mM for 11 mM of stachyose), and 0.5 mM for raffinose (RMSE=0.03 mM for 0.15 mM of raffinose; RMSE=0.6 mM for 5.0 mM of raffinose and RMSE=0.9 mM for 38.0 mM of raffinose) (Table 3). The correlation coefficient R^2 between v_{max} and K_m obtained after the Monte Carlo simulations with 2 000 draws was 0.55 for raffinose, 0.01 for stachyose and 0.99 for verbascose. In the case of verbascose, no spiking experiment was performed, which may explain the high coefficient R^2 and the high uncertainty for v_{max} and K_m . As v_{max} for PNP, raffinose and stachyose were of the same order of magnitude, so we also decided to set the v_{max} for verbascose and for

all substrates at a same mean value of $0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ of enzyme. In this case, the resulting predicted K_m was much more accurate, and the K_m of stachyose and raffinose did not change much. Raffinose thus appeared to have the most affinity for the enzyme (lowest K_m : $1.7 \pm 0.3 \text{ mM}$), followed by stachyose ($3.6 \pm 0.6 \text{ mM}$) then verbascose ($15.9 \pm 0.1 \text{ mM}$). Peterbauer and Richter, (2001) observed that enzyme affinity increases with a decrease in alpha-galactoside molecular weight. The values of adjusted K_M constants for alpha-galactosides were close to those found in the literature. Alani et al. (1989) found a K_m of 4.6-5.0 mM for raffinose and of 11-15 mM for stachyose in cowpea. Dey & Pridham (1969b) obtained a K_m of 4.0-5.0 mM for raffinose and of 5.26-7.5 mM for stachyose in *Vicia Faba*.

4.2.4. Factors explaining the lag phase

- Presence of inhibitors:

This first phase of latency may be due to the combined presence of competitive inhibitors such as galactose, galactinol or myo-inositol (Keller and Matile, 1985). Indeed the enzyme was extracted in water and all soluble molecules, including sugars and other water-soluble enzymes, may have been extracted with the enzyme.

To describe the lag phase, an overall factor I/K_I was considered (Eqs. (4) to (9)) in the Michaelian approach. Under the assumption of competitive inhibition (Eq.(4)), the overall I/K_I factor was estimated at 16.9 ± 0.4 . The contribution of galactose I/K_I was estimated at close to 1.0 (concentration between 0.25 mM and 0.30 mM and K_I of 0.28 mM) during the first 10 hours, which represents only 6% of the overall I/K_I . Myo-inositol and galactinol molecules are involved in the biosynthesis of alpha-galactosides (Obendorf and Gorecki, 2012; Peterbauer & Richter, 2001) and could explain some of the inhibition. These molecules could not be quantified by HPAE, because they were eluted at the same time as borate (Gangola et al., 2014). However, the inhibition constant K_I of these molecules was lower than that of galactose (Table 2) and as potential inhibitors, their concentrations were not sufficient to explain the inhibition. In the case of galactinol, a I/K_I factor of 15.9 would imply a concentration of 12.6 mM, which would be a hundred times higher than the concentration of galactose, which seems impossible. Moreover, the lag phase is not only due to competitive inhibitors because the addition of substrate (38 mM of raffinose or 11 mM of stachyose) did not prevent inhibition (figure 6).

Therefore, the lag phase could be explained by the presence of other co-extracted inhibitors in the enzyme extract that were not identified in this study. Under the assumption of non-competitive and uncompetitive inhibition, the factor I/K_I was evaluated at 5.77 ± 0.02 and 6.46 ± 0.01 respectively. The two latter scenarios (non-competitive and uncompetitive inhibitions) may have occurred in our study. The RMSE is lower for a non-competitive assumption (0.21 mM) than for a competitive (0.41 mM) or uncompetitive (0.35 mM) assumption and so the adjustment in figure 6 was done with a non-competitive

form. Nevertheless, it is possible that different types of inhibition occur simultaneously when the enzyme extract is used for alpha-galactoside hydrolysis.

- A basic pH:

The inhibition of alpha-galactoside hydrolysis that happened during the lag phase plays an important role in seed physiology, in particular before germination (Blöchl et al., 2007; Nichols et al., 1993). The alpha-galactosides are degraded to be used as a source of energy for germination (Peterbauer & Richter, 2001). In addition, *in vivo*, it has already been demonstrated that alpha-galactosidase enzyme is stored in protein storage vacuoles, as part of alpha-galactosides (Blöchl et al., 2008). To avoid the degradation of alpha-galactosides during seed maturation, the pH in the vacuole remains basic. After imbibition, the vacuoles are acidified thanks to a proton pump, and alpha-galactosidase enzymes become active (Blöchl et al., 2008). In our study, it is possible that vacuoles were not degraded after grinding and the same phenomena may have occurred. Indeed, the particle size of the cowpea powder showed two peaks: one at 20 μm and one at 150 μm . The latter peak could thus contain whole cells and vacuoles.

- Bio-synthesis of alpha-galactosides:

The enzymatic activity on both PNP and alpha-galactosides at 30 °C and during the lag phase (up to 600 min) has already been measured (section 4.2). As in the case of alpha-galactosides, the enzymatic activity was also assessed on PNP at 30 °C at $t = 960$ min, i.e. after the lag phase. A comparison of the results before and after the lag phase showed that enzyme activity on PNP was two times lower during lag phase ($t = 600$ min) than after ($t = 960$ min). This background inhibition on PNP hydrolysis was due to enzyme extract characteristics, with the presence of galactose that contributed to 15 % to the inhibition during the lag phase and of other inhibitors as well as a basic pH. This inhibition level observed on PNP during the lag phase was much less than that observed for alpha-galactosides for which enzyme activity was reduced by a factor of 7, despite the same enzyme extract inhibitory potential between the two experiments. Hence, there is another hypothesis to could explain the lower enzyme activity on alpha-galactosides compared to PNP during the lag phase. The biosynthesis of alpha-galactosides by raffinose synthase and stachyose synthase that remain active until the seeds germinate may occur (Blöchl et al., 2007; Obendorf and Gorecki, 2012). This hypothesis would explain the limited production of raffinose (from 0.15 to 0.20 mM) observed during the lag phase (Figure 3). This would make it possible to maintain a sufficiently high level of alpha-galactosides to protect the seeds from extended dormancy until the beginning of the germination.

4.3. Comparison between the behaviour of whole cowpea seeds and enzyme extract

A previous complementary study carried out by Coffigniez et al. (2018) on whole cowpea seeds (on the same variety *Wankoun*) in real soaking-cooking conditions showed that including a soaking step before

cooking induced the reduction of alpha-galactosides content (assessed by means of HPLC measurements) in the seeds thanks to enzymatic degradation. For instance soaking for 14 h at 30 °C resulted in the degradation of 24% (w/w) of stachyose. The present study allows us to go further by providing additional knowledge about cowpea seed enzymatic activity in relation with alpha-galactosides. Indeed, the cowpea enzyme extract showed a lag phase which may explain the need for a long soaking time (longer than 10 h) in domestic conditions. For maximum degradation, the optimal temperature for enzyme activity was found to be around 35 °C (balance between thermal activation and thermal degradation of the enzyme). After 1 000 min (around 17 h) at this temperature, 100%; 91% and 58% of raffinose, stachyose and verbascose were degraded in the case of the enzyme extract (present study), respectively. The discrepancy between cowpea seeds and enzyme extract that was observed for example in the case of stachyose is due to structural hindering effects, with the enzyme being inside cowpea cells in the case of cowpea seed configuration.

5. Conclusion

The present study shows that enzymatic degradation of alpha-galactosides took place with an unseen intermediary product and that the degradation of each alpha-galactoside can be considered independently. The degradation of raffinose was faster than the degradation of stachyose, which in turn, was faster than the degradation of verbascose. At the early stage, alpha-galactosidase activity showed a lag phase that corresponded in part to the action of some competitive (galactose) and other non-competitive and uncompetitive inhibitors and by the location of the enzyme in vacuoles with basic pH. However, the lag phase is probably mainly due to the regular production of alpha-galactosides. To reduce the human consumption of alpha-galactosides, a 17 h soaking step around 35 °C is recommended. In the future, the alpha-galactoside Michaelian parameters can be integrated in the cowpea seed model (Coffigniez et al., 2018) to better describe the behavior of alpha-galactosides during the soaking-cooking process. The potential generalization of this model should now be checked on other legumes seeds.

Acknowledgments

This work was part of the ICOWPEA project funded by the Agropolis Fondation under the reference ID 1507-031 through the “*Programme Investissements d’Avenir*” (Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01).

The authors declare no conflicts of interest. FC, JR performed the experiments. PA and ND performed the HPAE analysis. FC, AB, CM and PB set up the study, the modelling and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

3.2.2. Synthèse et perspective

Cette étude avait pour objectif de caractériser l'alpha-galactosidase et de modéliser son activité sur trois alpha-galactosides (raffinose, stachyose et verbascose) afin d'optimiser son action lors du procédé de trempage-cuisson. Pour se faire, l'enzyme a été extraite de la graine crue et son activité a été mesurée sur le PNP dans différentes conditions de pH et de température. L'activité optimale de l'enzyme se situe à 35 °C et pour un pH de 5,8. Deux relations d'Arrhenius (activation et dénaturation) ont permis de représenter l'activité enzymatique en fonction de la température ; l'énergie d'activation étant de $50 \pm 3 \text{ kJ.mol}^{-1}$, et l'énergie d'inactivation de $103 \pm 9 \text{ kJ.mol}^{-1}$. L'action de l'alpha-galactosidase sur les alpha-galactosides a mis en exergue une phase de latence de 10 h, qui s'achève lorsque la graine entre en germination. Cette phase de latence est expliquée d'une part par la présence d'inhibiteurs tels que le galactose, dont la constante d'inhibition K_i sur le PNP a été évaluée à $0,28 \pm 0,03 \text{ mM}$. D'autre part, la phase de latence peut être expliquée par un pH basique et par la possible bio-synthèse des alpha-galactosides par l'action d'autres enzymes. À la suite de cette phase de latence, la dégradation des alpha-galactosides s'effectue sans apparition d'intermédiaires grâce à la présence en excès de l'enzyme. La dégradation de chaque alpha-galactoside a été modélisée par une loi de Michaelis-Menten. La constante Michaelienne K_m a été identifiée à $1,7 \pm 0,3 \text{ mM}$ pour le raffinose; $3,6 \pm 0,6 \text{ mM}$ pour le stachyose et de $15,9 \pm 0,1 \text{ mM}$ pour le verbascose.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer qu'un trempage long (plus de 10 h) à 35 °C permet de maximiser la dégradation enzymatique des alpha-galactosides. La loi de Michaelis-Menten peut alors remplacer la cinétique apparente d'ordre 1 représentant la dégradation enzymatique des alpha-galactosides dans le modèle présenté dans le chapitre 3.1. (Publication #1).

3.3 Publication 3 : Localisation et modélisation des mécanismes de réaction et diffusion pour expliquer le comportement des folates durant le procédé de trempage-cuisson du niébé

3.3.1. Article soumis

Localisation and modeling of reaction and diffusion to explain folate behavior during soaking of cowpea

Fanny Coffigniez^a, Michael Rychlik^{b, c}, Christine Sanier^d, Christian Mestres^a, Lisa Striegel^b
Philippe Bohuon^e, Aurélien Briffaz^{a*}

Journal of food engineering

Abstract

A first modelling approach was used to understand the behaviour of folate in cowpea seeds during soaking at different temperatures (30 °C, 60 °C and 95 °C). Folic acid, 10-formylfolic acid, 5-methyltetrahydrofolate, and 5-formyltetrahydrofolate were quantified in both the seeds and the soaking water during the process. A 2D-axisymmetric seed soaking simulator was then built considering these 4 folate vitamers to simultaneously describe diffusion, oxidation and interconversion of the single vitamers. The model adjustments revealed the predominance of folate diffusion at 60 °C and 95 °C (apparent diffusivity $2\text{-}3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) whereas at 30 °C enzymatic interconversions of all vitamers into 5-methyltetrahydrofolate were observed (reaction rate of $8.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ for 5-formyltetrahydrofolate). The results of this study allow us to recommend a preliminary soaking step to retain folate in seeds and to improve the bioavailability of folates for human nutrition.

Keywords

Folates; legume; diffusion; reaction kinetics; soaking; interconversion.

1. Introduction

Today, the growing world population together with climate change threaten global food security (Tschamntke et al., 2012). In this context, consuming legumes rather than meat would be more sustainable for the environment (De Boer and Aiking, 2011) thanks to their capacity to fix nitrogen in the soil (Graham and Vance, 2003) and their lower water requirements for growth (Crews and Peoples, 2004). In terms of nutritional value, legumes are rich in essential nutrients including proteins (around 25%) which contain several essential amino acids (lysine, leucine, and phenylalanine), starch (50-60%), but also minerals (potassium, calcium, zinc, iron) and vitamins (lutein, niacin, thiamine, pyridoxine, folate, ascorbic acid) (Iqbal, Khalil, Ateeq, & Khan, 2006; El-Adawy, 2002; Gonçalves et al., 2016).

In this study, we focus on folate content (B9 vitamin) in cowpea, a legume widely grown and consumed in West Africa. Folates are present in different forms in the seeds, mainly polyglutamates partially bound to starch and protein (Arcot and Shrestha, 2005) and/or being methylated or formylated (Scott, Rébeillé, & Fletcher, 2000; Rébeillé et al., 2006). Folates play an important role in the synthesis of purine and methionine in plants (Gorelova et al., 2017). Due to the incapacity of the human body to produce folates, this vitamin must be provided by food. The daily recommended folate intake is 300 µg for adults (Krawinkel et al., 2014) with a maximum bioavailability for 5-methyltetrahydrofolate (Striegel et al., 2018). Hoppner & Lampi, (1993) showed that cowpea seeds represent a significant source of folates since they contain 367.1 µg/100 g (db), compared to other legumes such as pea seeds (282.0 µg/100g (db)) (Ringling & Rychlik, 2012). Therefore, the consumption of 100 g of cowpea seeds could almost fulfil the daily requirement for adults.

For consumption, legume seeds often require a long soaking step prior to cooking. A soaking-cooking process can destroy sensitive nutrients including folates and hence needs to be controlled. Indeed, Hefni & Witthöft, (2014) showed a 32% reduction in total folate content in *Faba* bean after boiling for 30 min, 90% of which was lost in the soaking water. Nevertheless, the same authors reported a 50% increase in folate content after a soaking at room temperature for 12 h, probably due to germination. Combining a soaking step at room temperature for 16 h and a boiling step for 2 h caused a 53% reduction in total folate in chickpea and a 46% reduction in pea (Dang et al., 2000). Clearly, the choice of an appropriate soaking-cooking temperature is determinant in

preserving or promoting total folate content in the seeds. Since they have different bio-availability (5-methyltetrahydrofolate (5-CH₃-H₄folate) being the most bioavailable for the human organism), the different folate vitamers need to be quantified separately which has only been done by a few authors (Rucker et al., 2001).

There are only a few models in the literature that mechanistically describe the way the folate behaves during the soaking-cooking of legumes. Delchier et al., (2014) used the Fick equation to describe the diffusion of folates during the cooking of spinach and green beans. Oey et al., (2006) and Viberg et al., (1997) modelled 5-CH₃-H₄folate oxidation assuming a first order kinetic reaction in a liquid medium. However, to the best of our knowledge, no available model describes folate oxidation and conversion coupled to diffusion. Many authors already reported the enzymatic interconversion between the different forms in plants (Rébeillé et al., 2006; Jägerstad and Jastrebova, 2013), but the possible presence of this reaction scheme during the soaking process has not yet been studied.

The aim of this study was thus to elaborate a mass balance of the different forms of folates in cowpea seed and in the soaking water during soaking at 30 °C, 60 °C and 95 °C and to establish the diffusive and reactive (degradation or production) fractions. The diffusion of folates was observed by immunostaining the 5-CH₃-H₄folate in seeds during soaking-cooking process. Our results will make it possible to recommend how to retain folate in cowpea seeds during the soaking-cooking process.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The cowpea cultivar used in the study was the *Wankoun* brownish variety provided by IITA Benin. It was purchased in September 2017. The seeds were kept in a vacuum pack and stored at 4 °C in the dark until use.

2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) (purity ≥ 99.5%), DL-Dithiothreitol (DTT) (purity ≥ 98%), and the sodium acetate trihydrate (purity ≥ 99.0%) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Disodium hydrogen phosphate dehydrate (purity 99.5%) was purchased from Merck (Germany) and potassium dihydrogen phosphate (purity ≥ 98%) from AppliChem (Germany). L(+)-Ascorbic acid (purity 99.1%), sodium chloride (purity 99.9%), acetonitrile (purity

99.9%) and Ultrapure water came from VWR (Germany). Freeze-dried chicken pancreas was purchased from Pel-Freez Biologicals (USA), rat serum came from Biozol (Germany). The unlabeled reference compounds: folic acid; 10-formylfolic acid; (6R,S)-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, calcium salt (5-formyl-tetrahydrofolate); (6R,S)-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, calcium salt (5-methyl-tetrahydrofolate); (6S)-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (tetrahydrofolate) were purchased from Schircks Laboratories (Switzerland). The internal standards [$^{13}\text{C}_5$]-folic acid, [$^{13}\text{C}_5$]- (6S)-tetrahydrofolate, [$^{13}\text{C}_5$]- (6S)-5methyl-tetrahydrofolate, calcium salt, [$^{13}\text{C}_5$]- (6S)-5-formyl-tetrahydrofolate and calcium salt were purchased from Schircks Laboratories (Switzerland). Phosphate buffer (PBS), bovine serum albumin (BSA), paraformaldehyde (PFA), and agarose were purchased from Euromedex (France). The monoclonal anti5-methyltetrahydrofolic acid from mouse (first antibody) and Mowiol was purchased from Sigma-Aldrich (France). The anti-mouse Alexa 488 from goat (second antibody) was purchased from Invitrogen (USA).

2.2. Soaking experiments

Soaking was performed as described by Coffigniez et al., (2018). Different soaking conditions were tested with a water-to-seed ratio of 4:1 (w/w) in a water bath. The following temperature-time values were investigated: 30 °C /3 h-6 h-14 h, 60 °C/1 h-2 h-4 h and 95 °C/0.5 h-1 h-1.5 h-2 h. After being processed, the seeds were freeze-dried and stored, like the soaking water, at – 80 °C for a maximum of two weeks before folate quantification. For the localization of the folate, after soaking, the seeds were immediately immersed in a 70% (v/v) ethanol solution. Each soaking experiment was performed in duplicate.

2.3. Folate quantification

Folate was quantified as described by Striegel et al., (2018).

2.3.1. Preparation of the solution

MES buffer was made of 21.3 g of MES hydrate and 10.0 g of ascorbic acid in 500 mL of MilliQ water, with the pH adjusted to 5.0. Phosphate buffer was made of 1.41 g of Na_2HPO_4 and 1.36 g of KH_2PO_4 in 100 mL of MilliQ water, with the pH adjusted to 7.0. The elution buffer was made of 5.0 g of NaCl, 1.36 g of sodium acetate trihydrate, 1.0 g of ascorbic acid and 0.1 g of DTT in 100 mL of MilliQ water.

The chicken pancreas was prepared by dissolving 30 mg and 0.3 g of ascorbic acid in 30 mL of phosphate buffer with the pH adjusted to 7.0. Rat serum was used as obtained from Biozol.

2.3.2. Folate extraction

The freeze-dried seeds were ground in a coffee grinder (Rommelsbacher, Germany). In some cases, grinding was continued using a mortar. The folates were extracted from 100 mg of soaked-cooked cowpea flour in 10 mL of MES buffer. To the samples, solutions of the internal standards were added in amounts to fall within the given range of calibration. The samples were boiled for 10 min to facilitate extraction and then cooled down on ice. To obtain complete deconjugation, 2 mL of chicken pancreas suspension and 400 μ L of rat serum were added and the samples were incubated overnight in a shaking water bath at 37 °C. Next, the samples were boiled again for 10 min and cooled on ice to inactivate the enzymes. Acetonitrile (10 mL) was added and the samples were centrifuged for 20 min at 4000 rpm and 4 °C. The supernatant was decanted. The extract was purified by solid phase extraction (SPE) on strong anion exchange (SAX, quaternary amine, 500 mg, 3 mL) (Phenomenex, Germany) and finally concentrated in 2 mL of elution buffer. The samples were filtered through a 0.22 μ m membrane filter.

2.3.3. Folate quantification

Folates were then separated by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). The separation was carried out on a Shimadzu Nexera X2 UHPLC system with a model DGU-20ASR degassing unit (Shimadzu, Japan). The folates were separated at 30 °C on a 2.7 μ m, 100 \times 2.1 mm C18-LC column (Restek, Germany), coupled with a PDA Nexera SPD-M30A diode array detector (Shimadzu, Japan). The ionization mode was positive electrospray. The injection volume was 10 μ l. The mobile phases were a gradient constituted of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The flow rate was 0.4 μ L/min. Both extraction and measurements were done in duplicate for each soaking experiment.

The concentration of unlabeled analytes was determined before each extraction. Quantification was performed using a calibration curve with external standards. Separation was performed by High-performance Liquid Chromatography (HPLC), coupled with a SPA-M20A diode array detector (Schimadzu, Japan). The folates were separated at room temperature on a nucleosil 100-5 C18 EC, 250 x 3 mm column (Macherey-Nagel, Germany). The injection volume was 10 μ l. The

mobile phases were a gradient comprising of 0.1% of acetic acid in water and methanol. The flow rate was $0.4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.4. Folate distribution in seeds by immunostaining

After soaking, the seeds were immersed in 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate buffer) (pH=7.0, 0.01M) for 48 h. The seeds were then rinsed for 15 min in a solution of PBS/Glycin 0.1 M and two times for 15 min in PBS. The cotyledon and embryonic axis of the seeds (Figure 1) were separated using a razor blade.

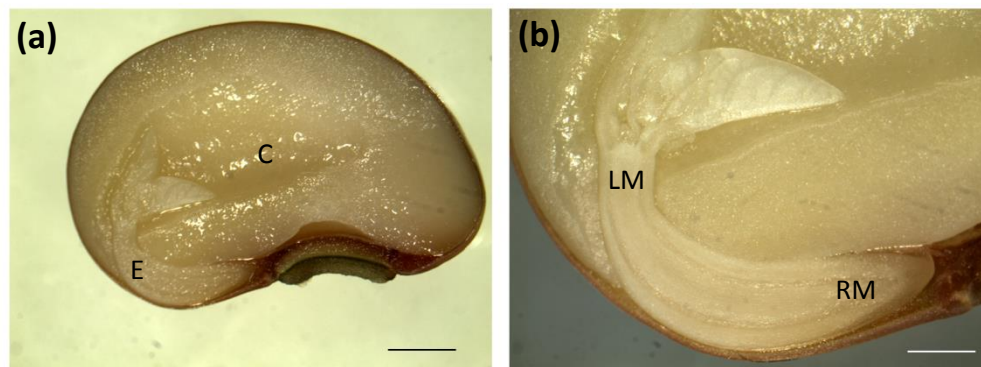


Figure 1: (a) Micrograph showing the gross morphology of cowpea seeds and (b) a magnified embryonic axis. C, cotyledon; E, embryonic axis; LM, leaf meristem; RM: root meristem. Scale bars = $1733 \mu\text{m}$ (a) and $831 \mu\text{m}$ (b)

The embryonic axis was embedded in 5% agarose and cut using a vibratome (Microm, France) while the cotyledon was directly cut using a vibratome. The thicknesses of the resulting cross sections samples were $50 \mu\text{m}$ and $30 \mu\text{m}$ for cotyledon and embryonic axis respectively. The sliced tissues then were immersed for 2 h in a blocking solution composed of 5% BSA in PBS. The first antibody: 5-methyltetrahydrofolic acid, was diluted 1/500 in blocking solution and left on the samples for one night at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with agitation. The samples were then rinsed three times for 10 min in a solution of PBS at room temperature. Next, the samples were immersed in the second antibody: Alexa 488 2 mg/ml (Invitrogen, France) diluted 1/500 in blocking solution, then rinsed three times for 10 min in a solution of PBS at room temperature. The cross sections were collected on microscopic slides with Mowiol. Each immunostaining experiment was performed in duplicate. The

microscopic analyses were performed using a Droit Zeiss 880 Laser Coherent Chameleon Ultra II Multiphoton microscope and a confocal Zeiss LSM880 Airyscan microscope. The excitation wavelength was 488 nm and the emission wavelength was 523 nm.

3. Multi-response modeling

3.1. Assumptions

Cowpea seed is assumed to be pseudo-ellipsoidal with a 2D-symmetric axis (Γ_2 boundary) as described by Coffigniez et al., (2018). Two domains are considered here: the single cowpea seed (Ω_S) and the soaking water medium (Ω_{SW}). These two domains are separated by an interface (Γ_1).

While the cowpea is soaking, folate vitamers are interconverted or metabolized within the cowpea seeds but also diffused out of it. Folic acid, 5-formyl-tetrahydrofolate and 10-formylfolic acid can be enzymatically or chemically converted into 5-methyl-tetrahydrofolate. The 5-methyl-tetrahydrofolate can be thermally degraded into pyrazino-s-triazin by oxidation.

Concerning the model, the following assumptions were formulated:

- (A1) Folate vitamers concentrations are homogeneous in the seeds.
- (A2) The soaking water is considered as perfectly stirred, with no solute gradients.
- (A3) The seed volume remains constant during soaking (no swelling).
- (A4) Except for folates, no dry matter is lost into the soaking water during soaking.
- (A5) The concentration of tetrahydrofolate is negligible.
- (A6) Fick's laws of diffusion describe the transport of folates.
- (A7) The folate interconversion, metabolization and oxidation follow first-order kinetics in the seeds and are not considered in the soaking water.

The eight state variables considered in our study were the concentrations (kg m^{-3}) both in seed ($\Omega_i = \Omega_S$) and soaking water ($\Omega_i = \Omega_{SW}$) of folic acid $[PteGlu]_{\Omega_i}$, 5-methyl-H4folate

$[5-CH_3-H_4folate]_{\Omega_i}$, 5-formyl-H₄folate $[5-CHO-H_4folate]_{\Omega_i}$ and 10-formylfolic acid concentrations $[10-CHO-PteGlu]_{\Omega_i}$. Concentrations are also expressed in µg/100g (db).

3.2. The unsteady-state diffusion-reaction model

The mass-balance equations for folates in cowpea seeds (Ω_S , Eq. (1)) and soaking water (Ω_{SW} , Eq. (2)) can be written as:

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial [X_1]_{\Omega_S}}{\partial t} - \nabla \left(D_{PteGlu} \nabla [X_1]_{\Omega_S} \right) &= -k_{PteGlu, \Omega_S} [X_1]_{\Omega_S} \\ \frac{\partial [X_2]_{\Omega_S}}{\partial t} - \nabla \left(D_{10-CHO-PteGlu} \nabla [X_2]_{\Omega_S} \right) &= -k_{10-CHO-PteGlu, \Omega_S} [X_2]_{\Omega_S} \\ \frac{\partial [X_3]_{\Omega_S}}{\partial t} - \nabla \left(D_{5-CHO-H_4folate} \nabla [X_3]_{\Omega_S} \right) &= -k_{5-CHO-H_4folate, \Omega_S} [X_3]_{\Omega_S} \\ \frac{\partial [X_4]_{\Omega_S}}{\partial t} - \nabla \left(D_{5-CH_3-H_4folate} \nabla [X_4]_{\Omega_S} \right) &= -k_{5-CH_3-H_4folate, \Omega_S} [X_4]_{\Omega_S} + k_{PteGlu, \Omega_S} [X_1]_{\Omega_S} + k_{10-CHO-PteGlu, \Omega_S} [X_2]_{\Omega_S} + k_{5-CHO-H_4folate, \Omega_S} [X_3]_{\Omega_S} \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

$$V_{\Omega_{SW}} \frac{\partial [X]_{\Omega_{SW}}}{\partial t} = J_X \quad (2)$$

With, $X = PteGlu$ (1), $10-CHO-PteGlu$ (2), $5-CHO-H_4folate$ (3) and $5-CH_3-H_4folate$ (4). The overall reaction scheme is displayed in figure 2.

Equations (1), and (2) have the following initial and boundary conditions:

$$[X]_{\Omega_S} = [X]_{\Omega_S, 0} \quad \text{in } \Omega_S \text{ for } t = 0 \quad (3)$$

$$[X]_{\Omega_{SW}} = 0 \quad \text{in } \Omega_{SW} \text{ for } t = 0 \quad (4)$$

$$[X]_{\Omega_S} = [X]_{\Omega_{SW}} \quad \text{on } \Gamma_1 \quad (5)$$

$$\nabla [X]_{\Omega_S} \cdot \vec{n} = 0 \quad \text{on } \Gamma_2 \quad (6)$$

where $[X]_{\Omega_S,0}$ are the initial content ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) of component X in Ω_S .

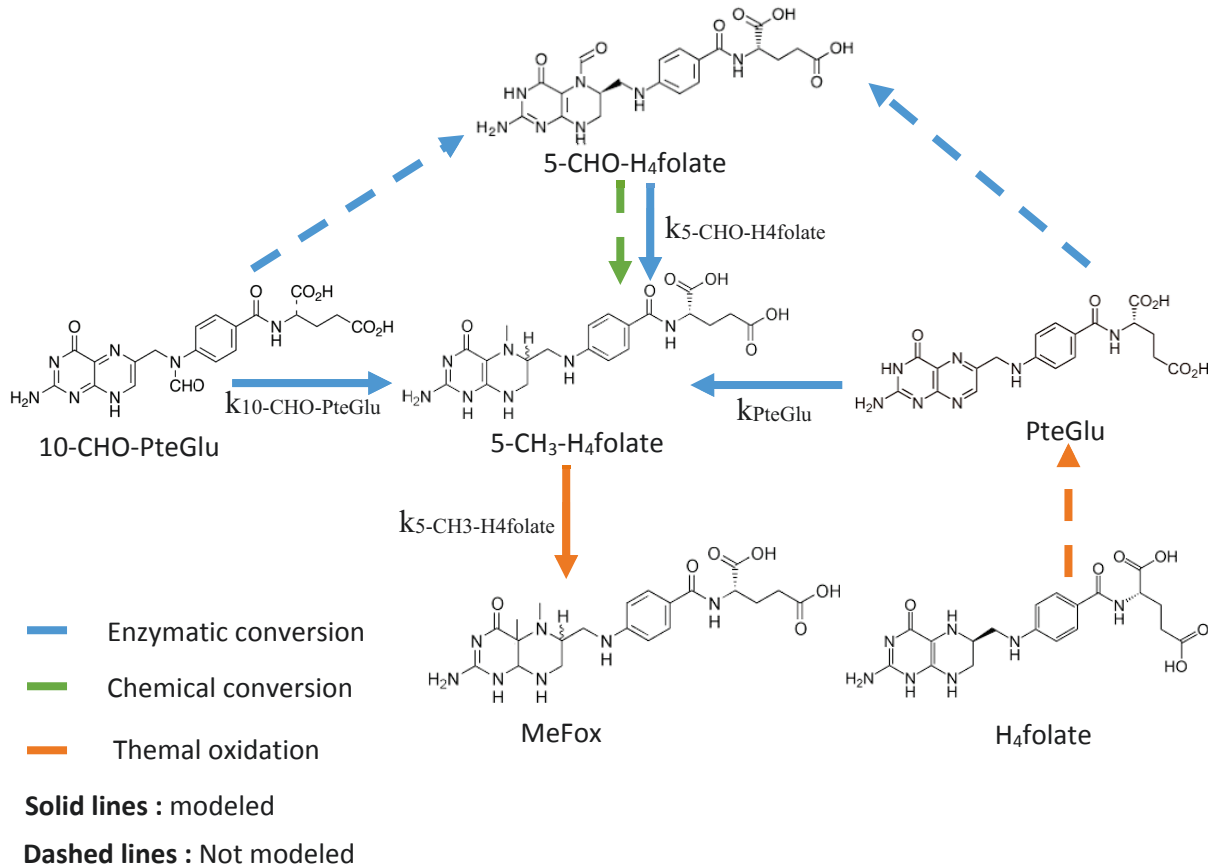


Figure 2: Folate reaction scheme of the cowpea soaking-cooking process. Blue, green and orange lines represent enzymatic interconversion, chemical interconversion and thermal oxidation, respectively. Solid lines represent the reactions taken into account in the model and dashed lines the reactions that are not taken into account in the model.

The outgoing folate mass fluxes J_X (kg s^{-1}) through the cowpea seed/soaking water interface (Γ_1) are expressed as:

$$J_X = -AD_X \nabla [X]_{\Omega_S} \quad (7)$$

where D_X is the apparent diffusion coefficient of species X ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), A is the surface area of the seed in contact with the soaking water (m^2), and $[X]_{\Omega_i}$ are the concentrations of component X .

Model input parameters are listed in table 1.

Table 1. Input parameters used in the 2D-axisymmetric reaction-diffusion model

Parameter	Value	Unit
$[PteGlu]_{\Omega_{S,0}}$	0.79	g.m^{-3}
$[10-CHO-PteGlu]_{\Omega_{S,0}}$	0.79	g.m^{-3}
$[5-CHO-H_4folate]_{\Omega_{S,0}}$	2.76	g.m^{-3}
$[5-CH_3-H_4folate]_{\Omega_{S,0}}$	0.58	g.m^{-3}
ρ_{DM}^0	1302	kg.m^{-3}
V_{Ω_S}	1.09×10^{-7}	m^3

As already performed on alpha-galactosides by Coffigniez et al. (2018), a mass balance analysis of the diffusion-reaction processes inside the seed was performed. The produced fractions of folates induced by reaction ($m_{X,prod}$), the degraded fractions induced by reaction ($m_{X,degr}$), the transferred fractions induced by diffusion ($m_{X,diff}$) and the residual fraction ($m_{X,res}$) expressed in relation to the initial mass ($m_{X,0}$), were obtained by solving the following integral equations:

$$\frac{m_{X,prod}}{m_{X,0}} = \int_t \left(\iint_{\Omega_S} k_{X,\Omega_S} [X]_{\Omega_S} dV_{\Omega_S} \right) dt \quad (8)$$

$$\frac{m_{X,degr}}{m_{X,0}} = \int_t \left(\iint_{\Omega_S} -k_{X,\Omega_S} [X]_{\Omega_S} dV_{\Omega_S} \right) dt \quad (9)$$

$$\frac{m_{X,diff}}{m_{X,0}} = \int_t J_X dt \quad (10)$$

$$\frac{m_{X,res}}{m_{X,0}} = \frac{m_{X,0} + m_{X,prod} - m_{X,diff} - m_{X,degr}}{m_{X,0}} \quad (11)$$

3.3. Numerical solution

The numerical solution was obtained in the same way as described by Coffigniez et al., (2018), with the initial conditions given by Eqs. (3) and (4), and the boundary conditions given by Eqs. (5) and (6) using the FEM-based commercial Comsol Multiphysics™ (version 5.2a, Comsol Inc., Stockholm, Sweden).

3.4. Parameter identification

Both apparent diffusivities (D_i) and rate constants ($k_{i,\Omega}$) were identified using the method described by Coffigniez et al., (2018). In this multi-response modeling approach, the model parameters were iteratively adjusted to the goodness-of-merit (determinant of dispersion matrix between experimental and predicted data) using a minimization procedure of the Nelder-Mead simplex with the “fminsearch” function of Matlab software. The standard deviation of each adjusted parameter was determined by Monte Carlo simulations with 200 draws.

4. Results and discussion

4.1. Folate concentration in raw seeds

Table 2. Initial concentrations ($\mu\text{g}/100\text{g db}$) of folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO- H_4 folate], 5-methyltetrahydrofolate [5- CH_3 - H_4 folate], tetrahydrofolate [H_4 folate] and total folate [Total] in whole seeds, in cotyledons and in the embryo. The embryo represents 2.3% of seed total mass.

Vitamers	Initial concentrations ($\mu\text{g}/100\text{g db}$)		
	Seeds	Cotyledons	Embryonic axis
[PteGlu]	68.1 \pm 11.7	70.8 \pm 7.2	98.4 \pm 11.0
[10-CHO-PteGlu]	67.9 \pm 10.0	69.7 \pm 3.4	64.0 \pm 2.9
[5-CHO- H_4 folate]	235.6 \pm 19.4	239.4 \pm 11.9	752.9 \pm 33.8
[5- CH_3 - H_4 folate]	49.5 \pm 2.9	28.4 \pm 2.4	71.9 \pm 2.7
[H_4 folate]	13.8 \pm 2.2	3.1 \pm 0.7	24.4 \pm 1.8
Total	434.9 \pm 20.8	411.3 \pm 7.2	1012 \pm 35.0

Table 2 shows the initial concentrations of tetrahydrofolate (H_4 folate), 5-methyltetrahydrofolate (5- CH_3 - H_4 folate), 5-formyltetrahydrofolate (5-CHO- H_4 folate), folic acid (PteGlu) and 10-formylfolic acid (10-CHO- PteGlu) in raw cowpea seeds and more specifically in cotyledons and in the embryonic axis. In raw seeds, 5-CHO- H_4 folate represented 54% of the total folate content. The latter vitamer is probably the storage form of folates and is more stable than the active form 5- CH_3 - H_4 folate (Saini et al., 2016). 5- CH_3 - H_4 folate, PteGlu and 10-CHO- PteGlu represented 12%, 16% and 16% of the total folate content, respectively, and the H_4 folate concentration was negligible. Strandler et al., (2015) also showed that the formyl forms were the most abundant forms in chickpea (49%). However, other studies reported that the majority form was 5- CH_3 - H_4 folate or H_4 folate in legumes (in pea, mung bean, lentil, cowpea and soybean)

(Rychlik et al., 2007; Delchier et al., 2016). For example, 5-CH₃-H₄folate was reported to represent 75% of total folate in pea (Ringling and Rychlik, 2012).

As can be seen in table 2 all vitamers were more concentrated in the embryonic axis than in the cotyledons. For example, the concentrations of 5-CH₃-H₄folate and 5-CHO-H₄folate were two to three times higher in the embryonic axis than in the cotyledon. However, the embryonic axis represented only 2.3% of the total seed mass, which explains why the concentration in raw seeds was similar to the concentration in cotyledons (around 400 µg/100 g db). These observations were confirmed by immunostaining of 5-methyltetrahydrofolate in cowpea seeds (figure 3). Indeed, a relatively larger quantity (i.e. fluorescence signal here) of folates was observed in the embryonic axis (root meristem) (fig. 3a) than in the cotyledons (fig. 3b), which seems to be consistent with the results of quantification (table 4).

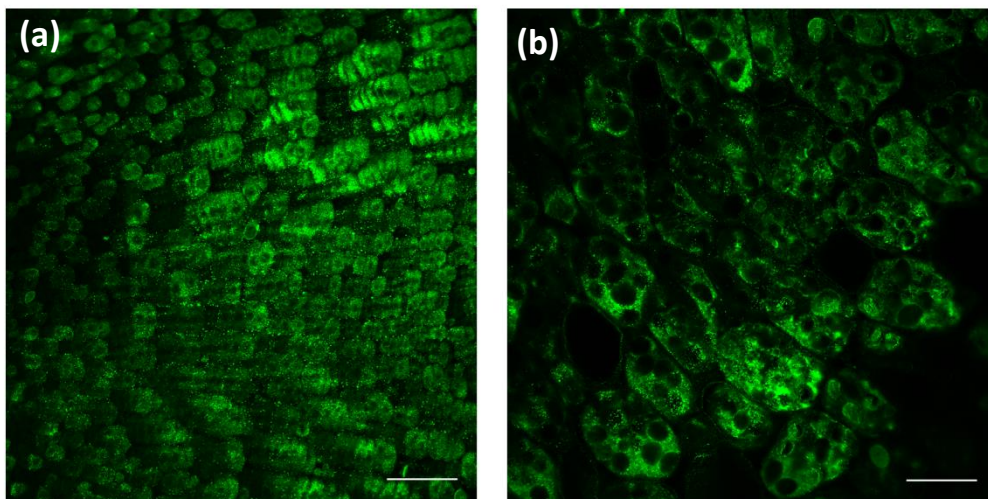


Figure 3: (a) Immunostaining (highlighted by fluorescence) of 5-methyltetrahydrofolate in (a) root meristem of embryonic axis and (b) in the cotyledon. The diffuse background fluorescence is due to the autofluorescence of cells. Scale bars = 72 µm.

These results are also comparable with results in the literature. For instance, Hoppner and Lampi, (1993) reported a concentration of 367.1 ± 28.6 µg/100 g db in cowpea seeds, and Gambonnet et al., (2001) also reported that the concentration of folates in pea was 5 to 10 times higher in the embryonic axis than in cotyledons. However, the embryonic axis accounts for only 2% of the seeds, so the majority of folate was located in the cotyledons (Gambonnet et al., 2001). Folate synthesis is high in the root meristem because folate is largely consumed in the dividing

cells to synthesize thymidylate and purine (Rébeillé et al., 2006; Gorelova et al., 2017). In cells, H₄folate and 5-CHO-H₄folate are mostly present in mitochondria, whereas 5-CH₃-H₄folate is most abundant in cytosol (Gorelova et al., 2017). Folates have also been reported to be present in vacuoles and chloroplasts (Rébeillé et al., 2006).

4.2. Folate kinetics during soaking

4.2.1. Experimental changes in folates contents during soaking

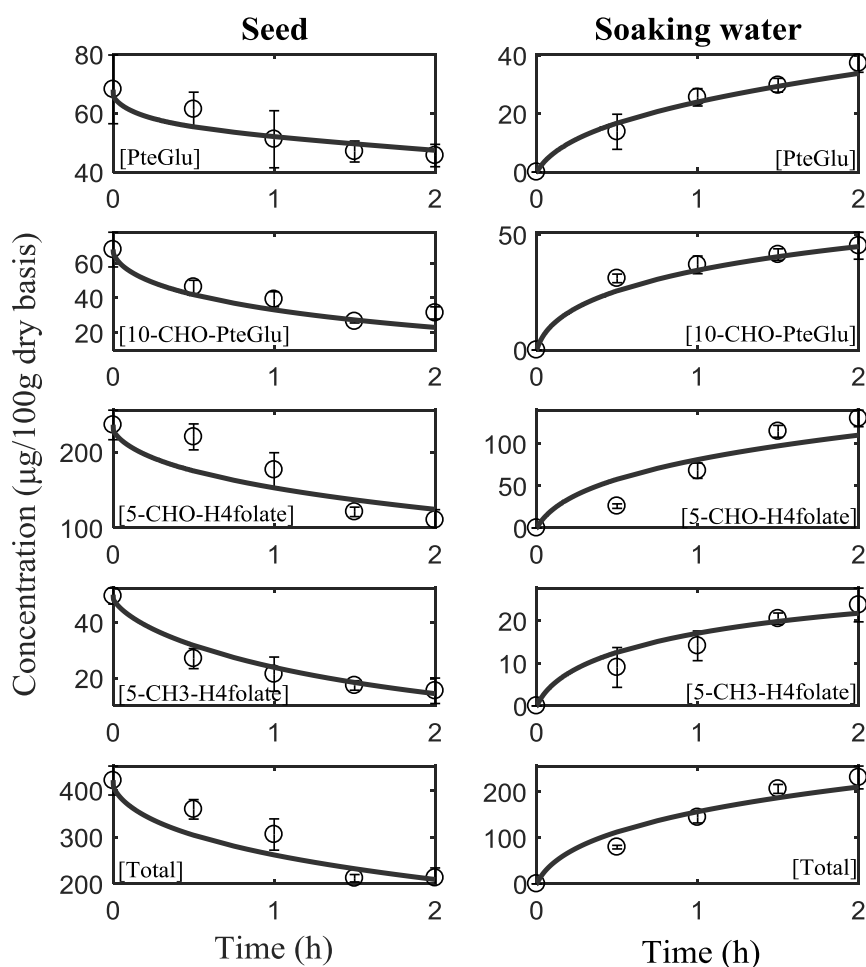


Figure 4: Predicted (lines) and experimental data (dots) concerning folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO-H₄folate], 5-methyltetrahydrofolate [5-CH₃-H₄folate] and total folate [Total] concentrations (µg/100g db) in cowpea seeds and in the soaking water during soaking at 95 °C. Error bars represent standard deviations ($n = 4$).

Figure 4 shows the folate content kinetics both in the seeds and soaking water at 95 °C. After 2 h, the concentrations of PteGlu, 10-CHO- PteGlu, 5-CHO-H₄folate and 5-CH₃-H₄folate were reduced by 33%; 54%; 53% and 69%, respectively, in seeds representing a 50% loss of total folates. The respective fractions of 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate were entirely transferred to the soaking water with constant net contents (i.e. sum in the seeds and in the soaking water). However, the net content of 5-CH₃-H₄folate was 21% lower than the initial amount in raw seeds. The decrease in this vitamer was probably due to thermal oxidation. Indeed, the chromatograms revealed the appearance of pyrazino-s-triazin (also called MeFox; not quantified), the oxidation product of 5-CH₃-H₄folate in both seeds and soaking water. The net content of PteGlu was 22% higher after soaking at 95 °C for 2 h than in raw seeds. This can be explained by the fact that PteGlu can be produced by oxidation of H₄folate. These results are consistent with those reported in the literature. Hefni and Witthöft, (2014) reported a 32% reduction in folate in faba bean after boiling for 30 min using a water-to-seed ratio of 5:1 (w/w). About 90% of this loss was due to diffusion into the soaking water. Hoppner and Lampi, (1993) also reported an average 28% reduction in total folates after a short period (1 h) of soaking at room temperature followed by boiling for 90 min in different legume seeds steeped with a water-to-seed ratio of 3:1 (w/w). Similarly, Dang et al., (2000) found a of 53% reduction in total folates in chickpea and a 46% reduction pea, after soaking for 16 h at room temperature followed by boiling for 2 h in a water to seed ratio of 3:1 (w/w).

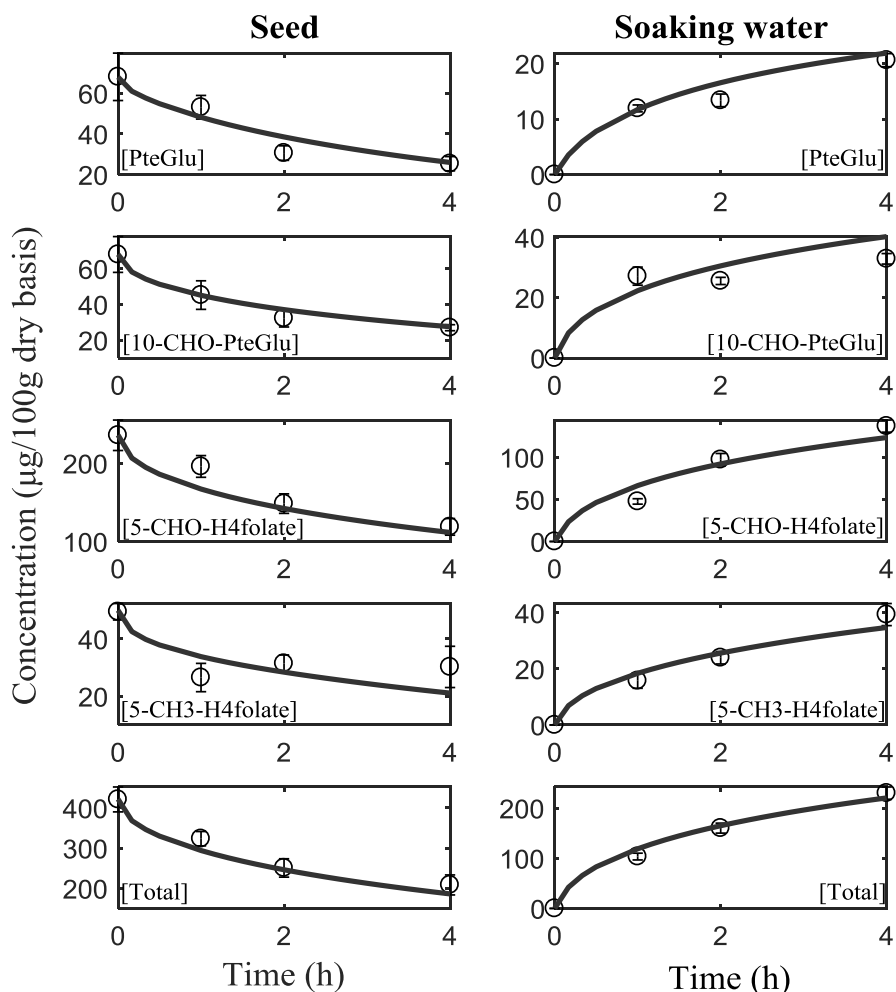


Figure 5: Predicted (lines) and experimental data (dots) concerning folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO-H₄folate], 5-methyltetrahydrofolate [5-CH₃-H₄folate] and total folate [Total] concentrations (µg/100g db) in cowpea seeds and in the soaking water during soaking at 60 °C. Error bars represent standard deviations ($n = 4$).

After soaking at 60 °C for 4 h (Figure 5), the PteGlu, 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate and 5-CH₃-H₄folate concentrations were reduced in seeds by 63%, 60%, 50% and 39%, respectively. The loss of 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate in the seeds were fully explained by mass transfer into the soaking water. However, the net content of PteGlu was 33% lower than its initial content, and the net content of 5-CH₃-H₄folate was 41% higher than its initial concentration. We thus assumed that this was due to the conversion of PteGlu into 5-CH₃-H₄folate, as proposed in the reaction scheme in figure 2.

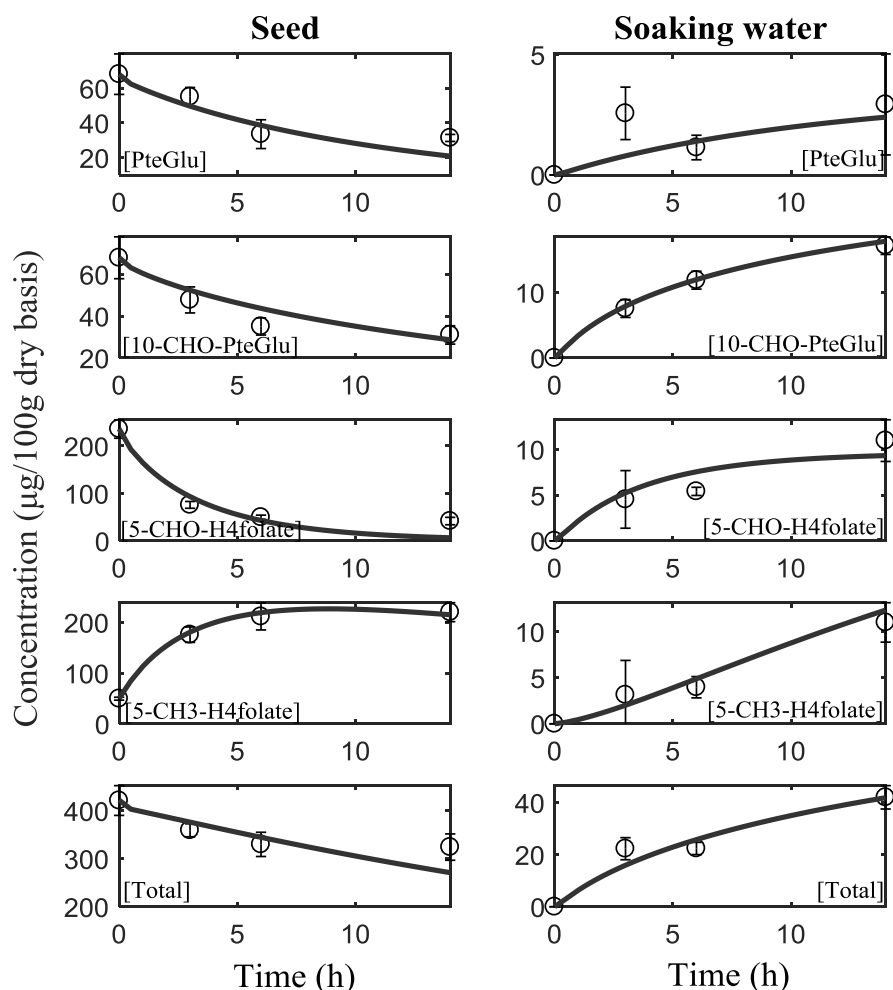


Figure 6: Predicted (lines) and experimental data (dots) concerning folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO-H₄folate], 5-methyltetrahydrofolate [5-CH₃-H₄folate] and total folate [Total] concentrations (µg/100g db) in cowpea seeds and in the soaking water during soaking at 30 °C. Error bars represent standard deviations ($n = 4$).

After soaking at 30 °C for 14 h (Figure 6), the PteGlu, 10-CHO-PteGlu, and 5-CHO-H₄folate concentrations in the seeds were reduced by 54%, 54%, and 82%, respectively, whereas the 5-CH₃-H₄folate concentration increased by 344%. The fraction transferred into the soaking water was only 25% for 10-CHO-PteGlu, and even less (5%) for the other vitamers. This marked reduction in PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate can be explained by the conversion of all these vitamers into the active form (5-CH₃-H₄folate) as proposed in the reaction scheme

(figure 2). This conversion usually occurs when the seed physiologically prepare to germinate. Indeed, after the soaking process (14 h), the net total folate concentration decreased only by 13% in seeds, which is in the same order of magnitude as the folate losses (12%) found by Hoppner and Lampi, (1993) in cowpea and in the same soaking conditions. The remaining folate content can be used for the development of the seed. Nevertheless, the behavior of folate during soaking also depends to a great extent on the legume species considered. For instance, Xue et al., (2011) reported a 31% reduction in 5-CH₃-H₄folate in navy bean after soaking at room temperature for 12 h with a water-to-seed ratio of 3:1 (w/w), whereas Hefni and Witthöft, (2014) found a 50% increase in folate content in faba beans in the same soaking conditions. These differences could be due to the germination capacity of the seeds under given conditions.

4.2.2. *Transport properties of folates*

Table 3 shows the adjusted apparent diffusivity of folates (m².s⁻¹) in cowpea seeds with the three different soaking temperatures (30 °C, 60 °C and 95 °C). The model fitted the experimental data satisfactorily with a mean RMSE of 10% (db). The different vitamers have a similar molar mass (between 441 g.mol⁻¹ and 473 g.mol⁻¹). As a consequence, we expected the same order of magnitude for the apparent diffusivity of all the vitamers at each temperature. However, apparent diffusivity was significantly higher for 10-CHO-PteGlu than for the other forms. This difference could be explained by the fact that the folates were not similarly distributed in the seeds and the distribution could vary depending on the vitamer considered (Gorelova et al., 2017).

Table 3. Estimated apparent diffusion coefficients (D_X , $m^2.s^{-1}$) and enzymatic or thermal degradation (*italics*) rate constants (k_{X,Ω_s} , s^{-1}) for each folate vitamer in cowpea seeds (Ω_s) and at different soaking-cooking temperatures (T) (mean values \pm standard deviations determined with Monte-Carlo simulations: 200 sets).

Vitamers X	$T(^{\circ}C)$	$D_X \times 10^{11} (m^2 s^{-1})$	$k_{X,\Omega_s} \times 10^5 (s^{-1})$	RMSE*	
				In seed (S)	In soaking water (SW)
Folic acid	30	0.010 \pm 0.001	2.21 \pm 0.04	8.9	1.3
	60	0.81 \pm 0.02	3.73 \pm 0.06	7.2	1.4
	95	3.12 \pm 0.06	0	7.3	3.5
10-formyl-folic acid	30	0.181 \pm 0.003	0.81 \pm 0.01	8.3	1.3
	60	2.93 \pm 0.05	0	6.3	5.2
	95	7.94 \pm 0.16	0	6.6	4.4
5-formyl-H ₄ folate	30	0.026 \pm 0.001	8.0 \pm 0.12	23.0	2.4
	60	2.12 \pm 0.04	0	20.1	12.4
	95	3.23 \pm 0.05	0	29.3	19.9
5-methyl-H ₄ folate	30	0.014 \pm 0.002	1.11 \pm 0.02	17.1	1.4
	60	3.52 \pm 0.07	3.39 \pm 0.06	7.1	3.3
	95	3.63 \pm 0.06	7.73 \pm 0.14	4.2	3.4

*RMSE: Root mean square error between experimental and predicted concentrations in (mg/100kg db).

Apparent diffusivity increased with temperature for all the vitamers. For example, the adjusted apparent diffusivity of 5-CHO-H₄folate was 1.5 fold higher at 95 °C than at 60 °C, and 82 fold higher at 60 °C than at 30 °C. Folate diffusion also depends on both food matrix structure and composition. Although the literature on folate transport properties is quite poor, for the sake of comparison, Delchier et al., (2014) obtained almost constant folate apparent diffusivity of $7.4 \pm 2.1 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$ in the case of green beans soaked in the 25 °C to 65 °C temperature range. In the case of soaked cowpea, adjusted folate apparent diffusivity was of the same order of magnitude as that found for alpha-galactosides in the same cowpea cultivar (Coffigniez et al., 2018). For instance, for stachyose, apparent diffusivity of $0.02 \times 10^{-11} m^2.s^{-1}$, $3.0 \times 10^{-11} m^2.s^{-1}$ and

$4.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectively, were identified at 30 °C, 60 °C and 95 °C. This marked increase in molecular diffusion with temperature can be linked with dramatic changes in seed structure that take place during soaking. Indeed, the cell wall may be degraded and solubilized by β -elimination during heating (Waldron et al., 2003). Cell walls and teguments probably rupture between 30 °C and 60 °C, thus facilitating folate diffusion. This underlying structural mechanism was confirmed by the immunostaining of 5-CH₃-H₄folate in cowpea seeds after different soaking treatments. As shown in figure 7, raw seeds (pictures (a) and (b)) had concentrated folates inside the cells. In contrast, immunostaining of 5-CH₃-H₄folate in the meristem roots of seeds soaked at 95 °C showed folate diffusing into the intercellular spaces (pictures (e) to (h)). The shape of cells was lost, which confirmed the possibility of pectin degradation that facilitated folate diffusion. At 60 °C, one part of folate was still inside the cells while another part had already diffused outside the cell. The cell walls probably started breaking down.

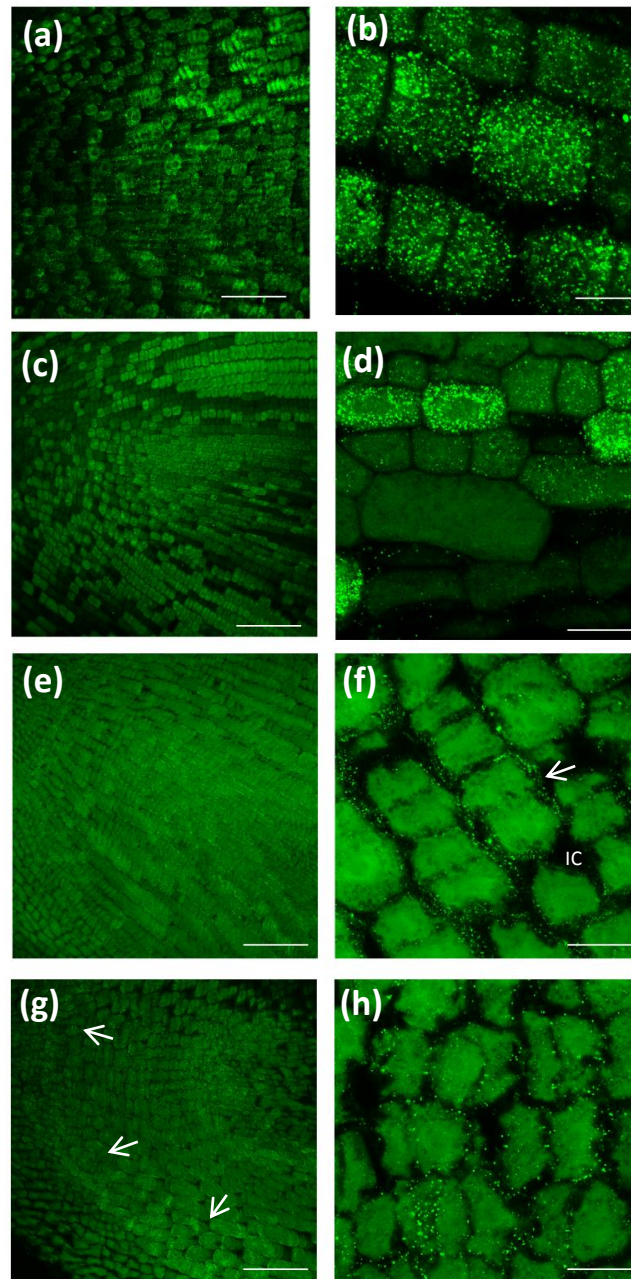


Figure 7: Immunostaining of 5-methyltetrahydrofolate (fluorescent dots) in root meristems using Droit Zeiss 880 Laser Coherent Chameleon Ultra II Multiphoton microscope (left column) and using a confocal Zeiss LSM880 Airyscan microscope (right column). (a, b) Raw seeds (control), (c, d) after soaking at 60 °C for 1 h, after soaking at 95 °C for 0.25 h (e, f) and for 0.5 h (g, h). The diffuse background fluorescence is due to the autofluorescence of cells. Arrows identify the location of 5-methyltetrahydrofolate in the intercellular spaces (f), and diffused outside the roots (g). Scale bars = 95 μm (left column) and 12.7 μm (right column).

Table 4. Absolute concentration of 5-methyltetrahydrofolate (5-CH₃-H₄folate) and 5-formyltetrahydrofolate (5-CHO-H₄folate (as a % of the initial concentration) in cowpea seeds by LC-MS/MS quantification (n=4) and image quantification (only 5-CH₃-H₄folate, n=2) after soaking at 60 °C for 1 h and cooking at 95 °C for 0.5 h.

Technic of quantification	Vitamer	Quantification in %	
		60°C_1h	95°C_30min
By immunostaining	5-CH ₃ -H ₄ folate	52 ± 26	43 ± 8
By LC/MS	5-CH ₃ -H ₄ folate	54 ± 19	55 ± 13
	5-CHO-H ₄ folate	83 ± 7	93 ± 8

Image analysis of the pictures shown in figure 7 allowed us to estimate the relative concentration (%) in 5-CH₃-H₄folate from the surface covered (dots) by the fluorescence signal. The concentration calculated using this method was lower than absolute 5-CH₃-H₄folate quantification (Table 4). This could be due to the fact part of the folate had diffused outside the embryonic axis, but had not yet left the seed. The 5-CH₃-H₄folate immunostain biomarker showed no cross reactivity with folic acid, but cross reactivity with 5-CHO-H₄folate is nevertheless conceivable. However, the larger difference in the results of image quantification and 5-CHO-H₄folate quantification led us think that there was no cross reactivity with 5-CHO-H₄folate in this case.

4.2.3. Thermal degradation and conversion of folates

Thermal degradation rates (k , s⁻¹) were adjusted to experimental data assuming first order kinetics (table 3). Results showed that thermal degradation increased with temperature. Thermal degradation was clearly visible in the case of 5-CH₃-H₄folate at 95 °C as described above (figure 4). Its increasing intensity in the respective MRM transition indicated that pyrazino-s-triazin was generated by oxidation of 5-CH₃-H₄folate (Ringling and Rychlik, 2017). In the literature, 5-CH₃-H₄folate oxidation has already been reported and modeled (assuming first-order kinetics) but only in the case of standard solutions (Oey et al., 2006; Verlinde et al., 2010; Munyaka et al., 2010). For example, Oey et al., (2006) estimated the thermal degradation rate of 5-CH₃-H₄folate to be in the range [7.8×10^{-6} – 4.3×10^{-4} s⁻¹] for temperatures ranging from 25 °C to 80 °C. These results are in agreement with those of Viberg et al., (1997). However, the latter authors showed that the thermal degradation rate decreased with increasing initial folate concentration and decreasing oxygen concentration. Our model was simplified by assuming that the whole oxidation process only takes

place in the seeds and not in the soaking water. Due to the high diffusion of 5-CH₃-H₄folate at high temperature (60 °C and 95 °C), the oxidation of 5-CH₃-H₄folate could also occur in the soaking water. However, it was not possible for us to distinguish between the oxidation contributions from the two compartments.

The increase in PteGlu concentration after soaking at 95 °C could be explained by oxidation of H₄folate ($k = 2.42 \pm 0.04 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$, data not shown) as already reported in the literature (Strandler et al., 2015). Due to the low concentration in H₄folate and the low rate of thermal degradation of folates at both 30 °C and 60 °C (decrease in H₄folate less than 5 µg/100g bs), the production of PteGlu at 60 °C and 30 °C was consequently negligible. PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate were found to be stable at 95 °C with no thermal degradation. At lower soaking temperatures (30 °C and 60 °C), the reduction of PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate was due to enzymatic conversion into 5-CH₃-H₄folate. The conversion rate constant (k) was adjusted to experimental data (table 3). All conversions mainly occurred at 30 °C in seeds and can therefore be attributed to enzyme action. The enzymatic conversion was assumed to be negligible in the soaking water because the diffusion of enzymes from the seed to soaking water was assumed to be negligible due to their high molar mass (section 4.2.2). The enzymatic conversion within the seed was 2.7 times higher for PteGlu than for 10-CHO-PteGlu and 3.6 times higher for 5-CHO-H₄folate than for PteGlu. These interconversions are shown in the folate reaction scheme in figure 2. This scheme was simplified for the purpose of modeling. Indeed, we assumed that PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate were converted into 5-CH₃-H₄folate without taking any intermediary products in account. In the literature, with the exception of 10-CHO-PteGlu, interconversions of the different folate vitamers have already been reported. PteGlu can be reduced into H₄folate by dihydrofolate reductase (Jägerstad and Jastrebova, 2013). Then, H₄folate can be converted into 5-CH₃-H₄folate by serinehydroxymethyltransferase and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (Rébeillé et al., 2006). H₄folate can also be converted into 5-CH₃-H₄folate via intermediate 10-CHO-H₄folate by 10-formyltetrahydrofolate synthase (Rébeillé et al., 2006) followed by 10-CHO-H₄folate conversion into 5-CH₃-H₄folate by 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (Rébeillé et al., 2006; Jägerstad and Jastrebova, 2013). Finally, 5-CHO-H₄folate can be converted into 5-CH₃-H₄folate by 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase, 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (Jägerstad and Jastrebova, 2013). Moreover, 10-CHO-H₄folate can also be chemically converted into 5-CHO-H₄folate besides being the direct precursor for 10-CHO-PteGlu formed by

oxidation (Jägerstad and Jastrebova, 2013). Therefore, 5-CHO-H₄folate may also be an intermediate in the interconversion of PteGlu.

The enzymatic reactions are usually modeled using the Michaelis-Menten equation. However, in the case of folates, the overall enzymatic conversion scheme is complex since it involves too many enzymes and substrates that would each need to be quantified. That is why we modeled the enzymatic conversions assuming first order kinetics that are equivalent to a Michaelis-Menten approach if the concentration of substrate is low compared to the Michaelis constant K_m .

The decrease in total folate concentration at 30 °C can be explained by the oxidation of 5-CH₃-H₄folate (generation of pyrazino-s-triazin, see section 4.2.4). However, under these conditions, this decrease could also be partly due to the metabolic activity of the seeds, i.e. the integration of the formyl group into DNA and the use of 5-CH₃-H₄folate in methylation reactions and in the methionine synthesis (Scott et al., 2000; Gorelova et al., 2017).

At 60 °C, it can be assumed that the enzymes were partly thermally degraded and hence that the enzymatic interconversion did not occur. Consequently, only the interconversion of PteGlu into 5-CH₃-H₄folate, hypothesized from our experiments (figure 5), was modeled. The net concentration of 10-CHO-PteGlu (sum of the concentration in the seeds and that in the soaking water) was quite low after soaking at 60 °C for 4 h (loss of 7 µg/100g), but this loss was disregarded in the model. 5-CHO-H₄folate remained constant during the soaking process at 60 °C and, therefore, the interconversion of 5-CHO-H₄folate was disregarded. However, like at 30 °C, it is possible that 5-CHO-H₄folate was an intermediate or by-product of 5-CH₃-H₄folate production.

4.3. Folates: reaction vs. diffusion during soaking

Figure 8 shows changes in the predicted diffused, degraded (oxidation or interconversion), produced (enzymatic) and the residual folate fractions in cowpea seeds during soaking at different temperatures. At both 95 °C and 60 °C, the diffused fraction predominated, whereas at 30 °C, the degraded and produced fractions were predominant, especially 5-CHO-H₄folate and 5-CH₃-H₄folate. After soaking at 95 °C for 2 h, the diffused fraction of folate vitamers represented between 43.7% (5-CH₃-H₄folate) and 65.9% (10-CHO-PteGlu) of their initial concentrations. Only a degraded fraction of 5-CH₃-H₄folate was detected that represented 27.6% (oxidation to pyrazino-s-triazin). Only the production of PteGlu was significant and represented 19.4 % (oxidation of H₄folate). After soaking at 60 °C for 4 h, the diffused fraction also predominated for all vitamers

with a proportion ranging between 32.2% (PteGlu) and 69.6% (5-CH₃-H₄folate). The degraded fraction represented around 29% for PteGlu (interconversion into 5-CH₃-H₄folate) and 5-CH₃-H₄folate (oxidation to pyrazino-s-triazin). Production was only detectable of 5-CH₃-H₄folate and represented 40.3% (interconversion of PteGlu). In the two latter, the produced and degraded fractions resulted in an even total folate balance. Soaking at 95 °C for 2 h or at 60 °C for 4 h led to the diffusion of 50% of total folate into the soaking water.

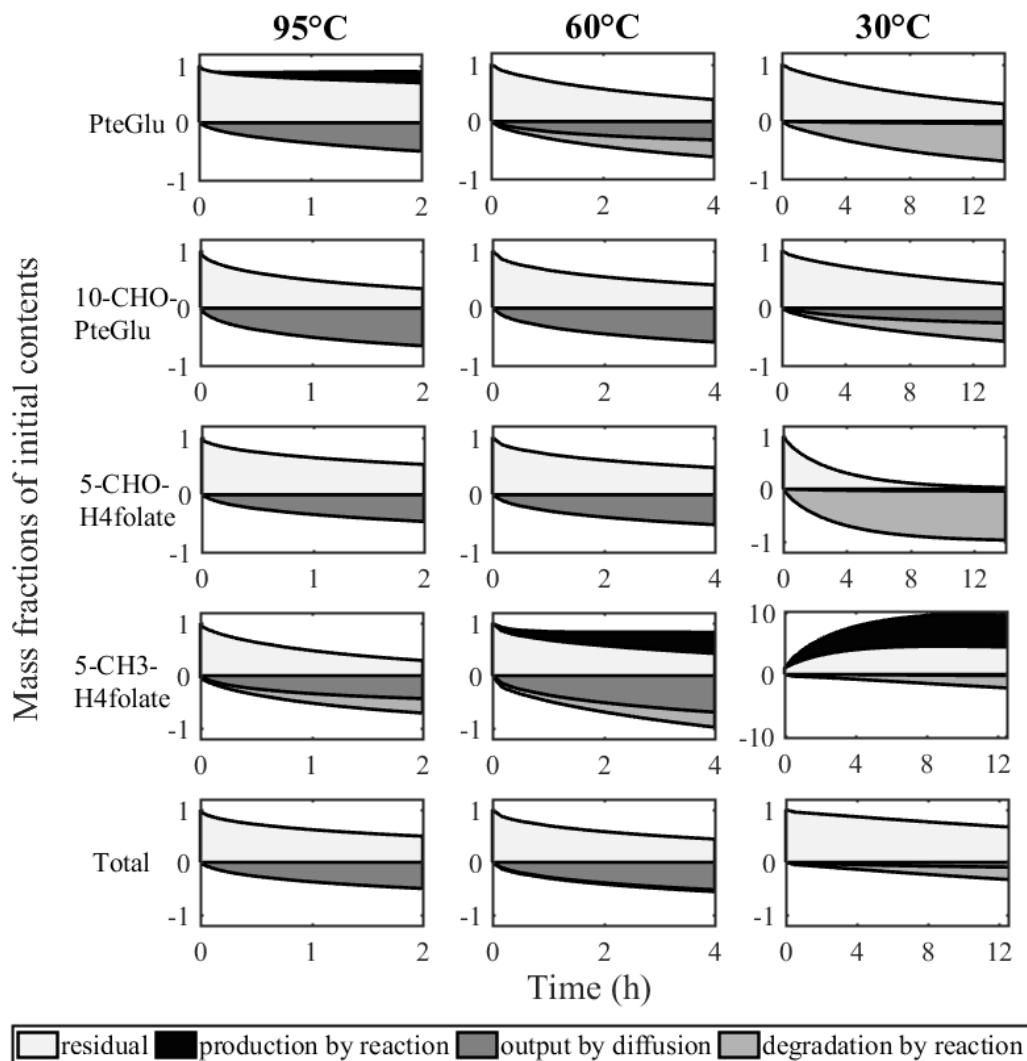


Figure 8: Predicted algebraic residual, produced, diffused and degraded mass fraction kinetics for folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO-H₄folate], 5-methyltetrahydrofolate [5-CH₃-H₄folate] and total folate [Total] in cowpea seed during the soaking-cooking process at 95 °C, 60 °C and 30 °C.

For all vitamers and after soaking at 30 °C for 14 h, the diffused fraction was much lower than after soaking at 60 °C and 95 °C. This difference was due to the high production of 5-CH₃-H₄folate (by folate interconversions) at 30 °C and the high diffusion coefficient in the case of 10-CHO-PteGlu at higher temperatures. Indeed, after soaking for 14 h, the produced fraction of 5-CH₃-H₄folate was about 572.8% while in parallel the degraded fraction represented 65.8%, 31.7% and 93.3% of PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate, respectively. This high percentage of 5-CH₃-H₄folate production was because the initial quantity of 5-CHO-H₄folate in the seeds was higher than that of 5-CH₃-H₄folate. As a result, the final net concentration in seeds (i.e. the residual fraction) of 5-CHO-H₄folate decreased to 2.8% of the initial concentration after soaking at 30 °C for 14 h and the 5-CH₃-H₄folate concentration increased to 429.8%. During this process, oxidation or the use of 5-CH₃-H₄folate in methylation reactions resulted in a degraded fraction representing 218.4%.

In this model, two phenomena were simultaneously taken into account, (i) mass transport and (ii) first-order reactions that both affected the concentrations of folates in the seeds. In any case, the mutual correlation coefficient between the different model parameters (Eq. (1)) was lower than 0.21, confirming that minimizing the determinant of dispersion matrix between experiments and predicted concentrations is a reliable method to identify the parameters, as recommended by Van Boekel, Martinus A.J.S, (2008).

4.4. Soaking recommendations

In West Africa, cowpea seeds are usually prepared using two different methods. The first consists in directly boiling the seeds in water for 1 h (Madodé, 2012), and the second involves a pre-soaking step at room temperature (about 30 °C) for one night followed by boiling in water for 25 min (Madodé, 2012). After soaking at 95 °C for 1 h (figure 8) the model showed a residual concentration of total folates of 62% (260 µg/100g bs), whereas an 8 h pre-soaking step (residual concentration of 77%) followed by boiling for 25 min (residual concentration of 74%) resulted in a residual concentration of total folate of 57% (242 µg/100g bs). Therefore, these two different methods resulted in a similar decrease in total folate concentration. However, this is not the case if each vitamer is considered separately. Indeed, after direct boiling (first method), the 260 µg/100g of total folate were composed of 59.1% of 5-CHO-H₄folate, 19.7% of PteGlu, 12.9% of 10-CHO-PteGlu and 8.3% of 5-CH₃-H₄folate. After soaking combined with boiling (second method), the 242 µg/100g of total folate consisted of 67.5% of 5-CH₃-H₄folate, 12.1% of PteGlu, 11.2% of 5-

CHO-H₄folate and 9.2% of 5-CHO-H₄folate. Of all the vitamers, 5-CH₃-H₄folate is considered to be the most bioavailable (Striegel et al., 2018). Therefore, a pre-soaking step at 30 °C leads to interconversion of folates into this vitamer and, hence, increases folate bioavailability.

The daily recommendations for folate intake are 120-300 µg for children and 300 µg for adults (Krawinkel et al., 2014). Therefore, 100 g bs of cowpea, which corresponded to 160 g after soaking-cooking (Coffigniez et al., 2018), is sufficient to fulfil the daily requirements of both children and adults.

5. Conclusion

Our study advanced our knowledge on the contrasted behavior of folate vitamers in cowpea seeds as a function of the soaking conditions. The folates were mainly composed of 5-CHO-H₄folate (storage form) and were more concentrated in the embryonic axis than in the cotyledons. For the first time, a 2D axi-symmetric model was built, considering a single cowpea seed being soaked in soaking water and taking into account the diffusion, conversion, and oxidation of folates. The model fitted the data satisfactorily and the results showed the predominant transport of folate out of the seeds after a soaking process at 60 °C or 95 °C. Immunostaining experiments on cowpea seed cross sections underlined these phenomena. At lower temperature (30 °C), PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate were mainly interconverted into 5-CH₃-H₄folate (active form) while diffusion of all vitamers was very slow. At all temperatures, 5-CH₃-H₄folate was oxidized into pyrazino-s-triazin. The model was then used to predict losses due to diffusion and degradation during soaking-cooking process. The two traditionally used soaking-cooking methods in West Africa resulted in a similar loss of folates in seeds. Concerning folate bioavailability for human consumption, a pre-soaking step is recommended to promote enzymatic conversion into 5-CH₃-H₄folate. To advance further, germination could be tested for even better folate preservation and production.

Acknowledgements

This study was conducted in the framework of the ICOWPEA project funded under the "Thought for Food" Initiative by *Agropolis Fondation*, *Fondazione Cariplo* and *Daniel et Nina Carasso Fondation* under the reference ID 1507-031 through the "*Programme Investissements d'Avenir*" (Grant number: ANR-10-LABX-0001-01) and the VITAMICOWPEA project funded by ANR (French National Research Agency) by the *Agropolis Fondation* under the reference ID 1502-501, through the "*Programme Investissements d'Avenir*" (Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01).

3.3.2. Synthèse et perspective

Comme pour les alpha-galactosides, les folates ou vitamine B9 peuvent être impactés lors des opérations de trempage et de cuisson. Ainsi, ce travail a eu pour objectif d'identifier les processus et d'établir la part des mécanismes de diffusion et de réaction des folates au cours de ces deux opérations. Pour cela les teneurs en quatre vitamères de folate (PteGlu, 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate et 5-CH₃-H₄folate) ont été déterminées dans la graine et l'eau d'immersion à 30 °C, 60 °C et 95 °C. Un modèle en 2D axisymétrique représentant la graine de niébé associe pour les quatre équations de conservation des quatre vitamères de folate, des processus de diffusion (loi de Fick) et de dégradation enzymatique et d'oxydation (par une cinétique apparente d'ordre 1). Les quatre équations aux dérivées partielles couplées sont résolues par la méthode des éléments finis avec un logiciel commercial (Comsol).

Les graines sont composées majoritairement de 5-CH₃-H₄folate et sont plus riches en folates au niveau de l'axe embryonnaire. Ainsi, aux températures de 60 °C et 95 °C, la diffusion des molécules et l'oxydation du 5-CH₃-H₄folate sont prédominantes, tandis qu'à faible température (30 °C) ces deux mécanismes sont quasi inexistantes. L'immunomarquage du 5-CH₃-H₄folate a confirmé qu'à température élevée, la molécule diffuse très largement dans les espaces intercellulaires. À faible température, les formes PteGlu, 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate sont fortement interconverties en 5-CH₃-H₄folate par l'action de diverses enzymes et des réactions chimiques. Le 5-CH₃-H₄ folate représente la forme active et l'interconversion peut être engendrée en vue de la germination de la graine. Cette forme est également davantage biodisponible pour l'homme que les autres formes. Aussi, une étape de trempage à 30 °C est recommandée avant la cuisson. Le procédé classiquement utilisé en Afrique semble pouvoir combler les besoins journaliers en folates.

Pour aller plus loin, l'impact d'une germination à 30 °C a été testé et comparé à un trempage à la même température. Cette étude est présentée en chapitre 4 (publication#4).

3.4 Publication 4 : Modélisation des mécanismes de réaction pour expliquer le comportement des folates durant la germination du niébé

3.4.1. Article soumis

Modeling reaction kinetics to explain folate behavior during cowpea seed (*Vigna unguiculata*) germination in comparison with soaking

Fanny Coffigniez^a, Michael Rychlik^{b,c}, Christian Mestres^a, Lisa Striegel^b, Philippe Bohuon^d, Aurélien Briffaz^{a*}

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Abstract

A modeling approach was used to characterize the behavior of folates in cowpea seeds during germination at 30 °C. For this purpose, the concentration of folic acid, 10-formylfolic acid, 5-methyltetrahydrofolate, 5-formyltetrahydrofolate and tetrahydrofolate were determined in seeds during germination times up to 96 h. Two reaction models were built sequentially to describe changes in all these vitamers (before 14 h and after 48 h of germination) and adjusted to experimental data. Results showed intense enzymatic interconversion of all vitamers into 5-methyltetrahydrofolate before 14 h of germination and high enzymatic production of 5-methyltetrahydrofolate along with 5-formyltetrahydrofolate and tetrahydrofolate after 48 h of germination. We conclude that a long germination process could be more beneficial than regular soaking to enhance the production of bioavailable folates within the seed to improve the supply of dietary folates available for human consumption.

Keywords

Folates; legume; production; reaction kinetics; germination, interconversion.

1. Introduction

Today the consumption of legume seeds is increasingly recommended due to their high nutritional value (Iqbal et al., 2006), but also because of their environmental benefits and sustainability in general (De Boer and Aiking, 2011; Graham and Vance, 2003). Legumes are rich in proteins containing essential amino acids along with starch, minerals and vitamins (El-Adawy, 2002). In particular, legumes are a good source of vitamins belonging to the folate group (vitamin B9) that are required by the human organism (Gonçalves et al., 2016). Indeed, legumes generally contain between 300 and 400 µg/100 g (db)(Hoppner and Lampi, 1993; Ringling and Rychlik, 2012). The main folate vitamers in legume seeds are polyglutamated, methylated or formylated forms (Rébeillé et al., 2006; Scott et al., 2000). Foliates play an important role in DNA synthesis and amino acid metabolism in both plants and humans (Gorelova et al., 2017; Scott et al., 2000). The recommended daily intake of natural folates for adults ranges between 300 µg and 400 µg (Krawinkel et al., 2014; Intakes, 1998) and 5-CH₃-H₄folate is the most bioavailable form (Striegel et al., 2018).

Prior to consumption, legumes seeds require processing. Several methods can be used alone or in combination: dehulling, soaking, cooking (boiling or steaming), frying and germination (Tharanathan and Mahadevamma, 2003). Some antinutritional factors in the seed such as alpha-galactosides (Abdel-Gawad, 1993) or phytates (Galiotou-Panayotou et al., 2008) can be reduced by heat treatment, but heat treatment also damages sensitive molecules such as minerals and vitamins (Kon, 1979), in particular folates (Coffigniez et al., 2019.; Delchier et al., 2014; Dang et al., 2000). The most commonly used method to prepare legume seeds is soaking and boiling before consumption (Madodé, 2012). To increase folate content, a pre-germination step before cooking appears to be the most appropriate method (Hefni and Witthöft, 2014), and some studies have already demonstrated the production of folates during germination. Shohag et al., (2012) showed that the folate content in legume seeds increased fourfold after 96 h of germination at room temperature. Similarly, Hefni & Witthöft, 2014 found a three-fold increase in folates in beans after 72 h of germination at 25 °C. The same trend was observed during long soaking, with a 50% increase in folate content in *faba* beans after soaking at room temperature for 12 h (Hefni and Witthöft, 2014).

However, few data are available in the literature on the factors that influence the concentration of folate during germination. For instance, to the best of our knowledge, there is no kinetic model

that describes the mechanistic behavior of folate as a function of germination conditions in the case of legumes, nor have the mechanisms involved during regular soaking been compared with those involved in germination.

Recently, a first modeling approach was developed to describe folate diffusion and reactivity during regular soaking of cowpea (Coffigniez et al., 2019). This study highlighted the rapid diffusion of vitamin B9 at high temperatures and intense interconversions of different vitamers at lower temperatures. This present study is an extension of that study in the sense that the same model is applied to describe the behavior of folate vitamers in the case of germination at 30 °C, with the identification of reactive fractions (degradation and production). Finally, the results obtained in the two studies (i.e. regular soaking and germination) are compared in terms of folate production capacity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The brownish cowpea used in the study was the *Wankoun* variety obtained from IITA (International Institute for Tropical Agriculture) in Benin in September 2017. The seeds were placed in a vacuum pack and stored at 4 °C in the dark until use.

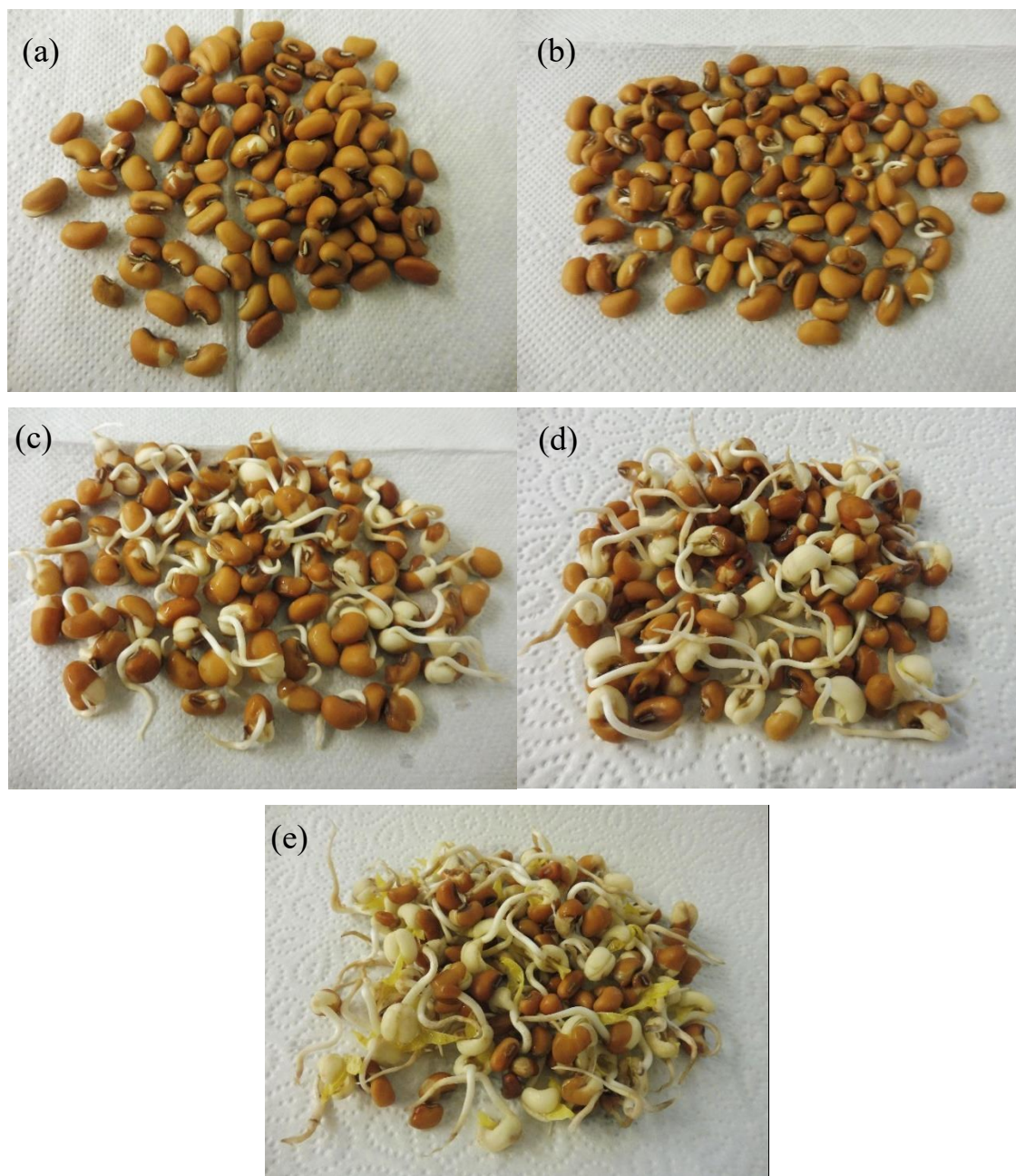
All the solutions used in the present study were the same as those used in the above-mentioned study on soaking cowpea seeds (Coffigniez et al., 2019.). 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) (purity $\geq 99.5\%$), DL-Dithiothreitol (DTT) (purity $\geq 98\%$), and sodium acetate trihydrate (purity $\geq 99.0\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Disodium hydrogen phosphate dehydrate (purity $\geq 99.5\%$) was purchased from Merck (Germany) and potassium dihydrogen phosphate (purity $\geq 98\%$) from AppliChem (Germany). L(+)-Ascorbic acid (purity $\geq 99.1\%$), sodium chloride (purity $\geq 99.9\%$), acetonitrile (LC-MS/MS grade) and Ultrapure water were purchased from VWR (Germany). Chicken pancreas was in lyophilized powder form purchased from Pel-Freez Biologicals (USA), and rat serum from Biozol (Germany). The unlabeled reference compounds: Folic acid; 10-formylfolic acid; (6R,S)-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, calcium salt (5-formyl-tetrahydrofolate); (6R,S)-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, calcium salt (5-methyl-tetrahydrofolate); (6S)-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (tetrahydrofolate) and the internal standards [$^{13}\text{C}_5$]-folic acid; [$^{13}\text{C}_5$]- (6S)-tetrahydrofolate; [$^{13}\text{C}_5$]- (6S)-5methyl-tetrahydrofolate,

calcium salt; [$^{13}\text{C}_5$]- (6S) -5-formyl-tetrahydrofolate, calcium salt were all purchased from Schircks Laboratories (Switzerland).

2.2. Germination experiments

The germination experiment was performed at 30 °C in a water bath in the dark, with an initial volume of water corresponding to a seed-to-water ratio of 1:1 (w/w, limited water conditions). The water was entirely absorbed by the seeds in 3 h. After 6 h of incubation, the seeds were washed three times a day and incubated with no additional water. The times investigated were 6 h, 14 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h. After germination, the seeds were freeze-dried and stored at – 80 °C for a maximum of two weeks before folate analysis. Each germination experiment was performed in duplicate. The germination rate was calculated as the percentage of germinated seeds (based on the emergence of the radicle).

The quantity of folate measured after germination at 30 °C was compared with the quantity of folate measured after regular soaking at 30 °C (Coffigniez et al., 2019). Both soaking and germination were done in the same water bath, but using different water-to-seed ratios: 4:1 (w/w) (presence of residual water) and 1:1 (w/w) (water completely absorbed by the seeds) respectively. We observed that using the limited water-to-seed ratio (i.e. 1:1 (w/w)), germination started after 14 h, which was not the case with a ratio of 4:1 (w/w) (supplementary Fig 1), probably due to the lack of soluble oxygen in the latter configuration (Nnanna and Phillips, 1988).



Supplementary Figure 1: Picture of the cowpea seeds after (a) 14 h, (b) 24 h, (c) 48 h, (d) 72 h and (e) 96 h of germination at 30 °C.

2.3. Folate quantification

Folate extraction and quantification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry were performed using the procedure of Striegel et al., (2018) with slight modifications

as proposed by Coffigniez et al. (2019) in order to adapt the latter method to the structure of the cowpea matrix.

3. Multi-response germination modelling

3.1. Model assumptions

In the model, a single cowpea seed (Ω_s) was assumed to have a 2D-axisymmetric pseudo-ellipsoidal shape as described by Coffigniez et al. (2018). The present study deals with the interconversion and metabolization of folic acid, 5-formyl-H₄folate, 10-formyl-folic acid and 5-methyl-H₄folate during cowpea seed germination.

Concerning the model, the following assumptions were formulated:

(A1) The seed is assumed to be insulated from the outside environment (null mass fluxes at the seed boundaries) with no diffusion.

(A2) The folate concentrations are homogeneous throughout the seed.

(A3) The seed volume remains constant during the germination process (no swelling).

(A4) The folate interconversions are assumed to follow first-order kinetics.

(A5) Both 5-formyl-H₄folate and 5-methyl-H₄folate are produced from the tetrahydrofolate form.

(A6) Tetrahydrofolate (THF) production is assumed to follow zero-order kinetics after 48 h of germination. However, the concentration of tetrahydrofolate remains low in comparison with the other forms before 48 h.

The four state variables studied here were folic acid [$PteGlu$], 5-methyl-H₄folate [$5-CH_3-H_4folate$], 5-formyl-H₄folate [$5-CHO-H_4folate$] and 10-formyl-H₄folate concentrations [$10-CHO-PteGlu$] all expressed in $g.m^{-3}$ in seeds.

3.2. The unsteady state reaction model

The reaction scheme assumed in the present study is described in figure 1.

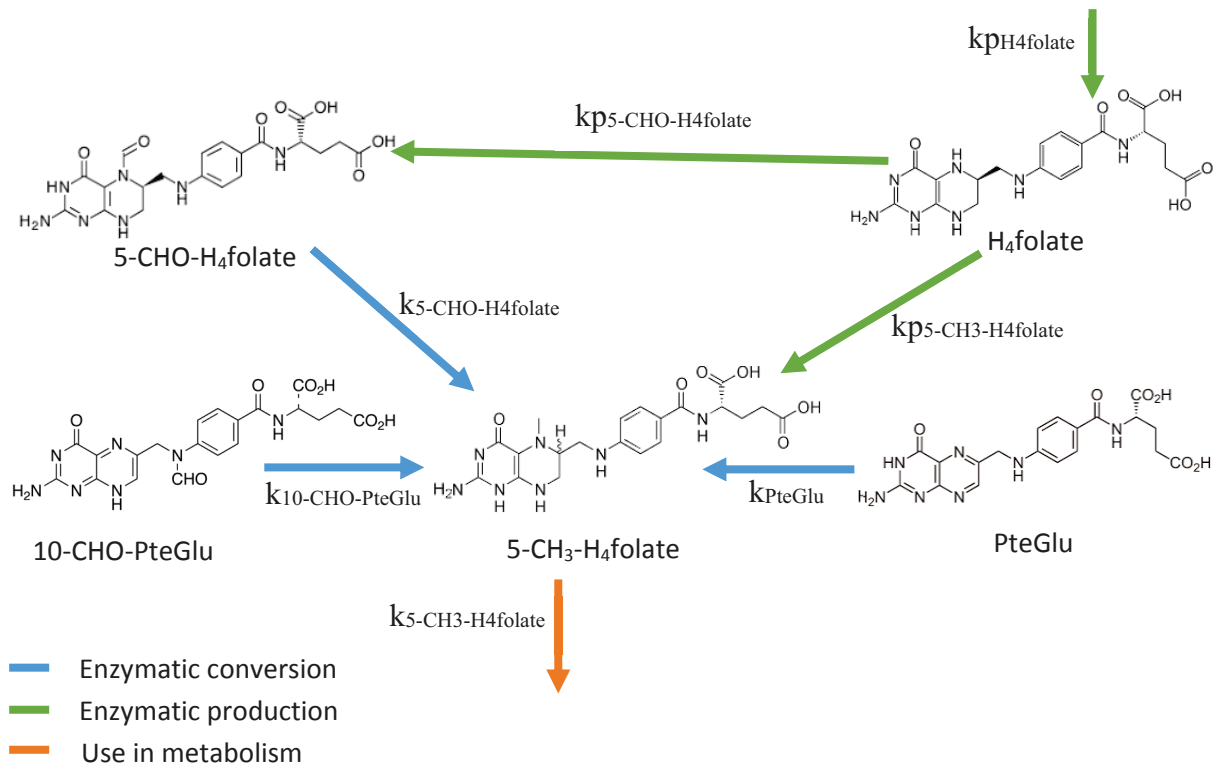


Figure 1: Folate reaction scheme in the cowpea germination process. Blue lines represent enzymatic interconversion, green lines enzymatic production and orange lines metabolic pathways.

The mass balance equations for folate species in cowpea seeds (Eq. (1)) can be written as:

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{d[X_1]}{dt} &= -k_{PteGlu} [X_1] \\
 \frac{d[X_2]}{dt} &= -k_{10-CHO-PteGlu} [X_2] \\
 \frac{d[X_3]}{dt} &= -k_{5-CHO-H_4folate} [X_3] + k_{p5-CHO-H_4folate} [X_5] \\
 \frac{d[X_4]}{dt} &= -k_{5-CH_3-H_4folate} [X_4] + k_{PteGlu} [X_1] + k_{10-CHO-PteGlu} [X_2] + k_{5-CHO-H_4folate} [X_3] + k_{p5-CH_3-H_4folate} [X_5]
 \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

The concentrations of species $X = PteGlu$ (1), $10-CHO-PteGlu$ (2), $5-CHO-H_4folate$ (3), $5-CH_3-H_4folate$ (4) and $H_4folate$ (5) are all expressed in $g.m^{-3}$. Model adjustments were run twice in succession considering experimental kinetics database. The first run was performed before 14 h of

germination for comparison with the model adjustments already obtained in the case of regular soaking¹⁸. The second run was performed after 48 h of germination. The concentration of H₄folate (THF) was not taken into consideration during the first 48 h of germination. However, the H₄folate produced in the seeds after 48 h was taken into consideration assuming zero-order kinetics (assumption A6) as:

$$\frac{d[THF]}{dt} = k_{THF} \quad (2)$$

Equations (1) and (2) have the following initial and boundary conditions:

$$[X] = [X]_0 \quad \text{for } t = 0 \quad (3)$$

$$\vec{\nabla}[X] \cdot \vec{n} = 0 \quad (4)$$

with $X =$ PteGlu, 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate, 5-CH₃-H₄folate and THF. Model input parameters are the same as those used in the study of Coffigniez et al., (2019) and are listed in table 1.

Table 1. Input parameters used in the 2D-axisymmetric reaction model.

parameter	value	unit
$[PteGlu]_0$	0.79	g.m^{-3}
$[10-CHO-PteGlu]_0$	0.79	g.m^{-3}
$[5-CHO-H_4folate]_0$	2.76	g.m^{-3}
$[5-CH_3-H_4folate]_0$	0.58	g.m^{-3}
$[PteGlu]_{48}$	0.72	g.m^{-3}
$[10-CHO-PteGlu]_{48}$	0.45	g.m^{-3}
$[5-CHO-H_4folate]_{48}$	0.81	g.m^{-3}
$[5-CH_3-H_4folate]_{48}$	2.34	g.m^{-3}
$[H_4folate]_{48}$	0.31	g.m^{-3}
ρ_{DM}^0	1302	kg.m^{-3}
V_{Ω_s}	$1.09 \cdot 10^{-7}$	m^3

A mass balance analysis of the reaction processes on folates was performed by calculating the produced ($m_{X,prod}$), degraded ($m_{X,degr}$), and residual ($m_{X,res}$) fractions all expressed in relation to the initial mass ($m_{X,0}$) inside the seed:

$$\frac{m_{X,prod}}{m_{X,0}} = \int_t \left(\iiint k_X [X] dV \right) dt \quad (5)$$

$$\frac{m_{X,degr}}{m_{X,0}} = \int_t \left(\iiint -k_X [X] dV \right) dt \quad (6)$$

$$\frac{m_{X,res}}{m_{X,0}} = \frac{m_{X,0} + m_{X,prod} - m_{X,deg}}{m_{X,0}} \quad (7)$$

3.3. Numerical solution

The system of five partial differential equations (Eqs. (1) and (2)) was solved using the FEM-based commercial Comsol Multiphysics™ (version 5.2a, Comsol Inc., Stockholm, Sweden) with the initial conditions given by Eq. (3), and the boundary conditions given by Eq. (4). A 1000-element mesh was created in Comsol. Lagrange polynomials (second order function) were the interpolation functions. The linearized problem was solved by the MUMPS time-dependent solver (Multifrontal Massively Parallel Solver), which implements a parallel distributed LU factorization of large sparse matrixes. The maximum time step was 0.05 s and the Jacobian was updated for each iteration. The typical simulation time was 5 min using a 3.25 Gb free memory (RAM) and 3-GHz Intel core Duo CPU computer (32 bits).

3.4. Parameter identification

In this multi-response approach, the rate constants (k_i and k_p) were identified by regression analysis using a Bayesian approach, with the minimization of the determinant of dispersion of the matrix C with the elements:

$$C_{ij} = \sum_{u=1}^n \left(\frac{\tilde{X}_u^i - \hat{X}_u^i}{\max\{\tilde{X}^i\}} \right) \left(\frac{\tilde{X}_u^j - \hat{X}_u^j}{\max\{\tilde{X}^j\}} \right) \quad (8)$$

where u is the index of experimental runs ($u = 1, \dots, 6$) corresponding to the experimental sampling times, \tilde{X}_u are the experimental data points for experimental run u, \hat{X}_u are the values predicted by the model and (i, j) are the indexes of the concentration responses. As shown in Eq. (8), the residuals are evaluated according to the relative difference between the experimental and predicted values. In this approach, not only the sum of squares for each response is taken into account (diagonal elements of matrix C) but also the cross products of the responses (covariance). The model parameters were iteratively adjusted to the goodness-of-merit $\min(\det(C))$ using a minimization procedure of the Nelder-Mead simplex with the “fminsearch” function of Matlab software. The standard deviation of each adjusted parameter was determined via Monte Carlo simulations with 200 random draws.

$$X_{noise} = \tilde{X} + \sigma_y \delta \quad (9)$$

where σ_y is the experimental standard deviation estimated for each experimental datum and δ is a random number between 0 and 1 that is normally distributed. The adjusted parameters follow a normal distribution. The mutual correlation coefficients between adjusted model parameters were also estimated based on the Monte-Carlo results.

4. Results and discussion

4.1. Folate kinetics during germination

During germination, two distinct time periods were observed, with contrasted folate behavior, especially for H₄folate, 5-CHO-H₄folate and 5-CH₃-H₄folate: the first period (called G1) up to 14 h (compared with 14 h of regular soaking) and the second period (called G2) after 48 h (Fig 1). These two steps were modeled separately and the time gap between 14 h and 48 h was not taken into account in this study.

4.1.1. Experimental changes in folates during germination

Figure 2 shows folate content kinetics in the seed during germination at 30 °C. After 14 h of germination, the 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate concentrations in seeds were reduced by 26%; and 82% respectively, whereas the 5-CH₃-H₄folate concentration increased by 308%. These changes can be explained by the conversion of both 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate into the active form 5-CH₃-H₄folate to prepare the seeds for germination. This conversion of folate was associated with the emergence of the radicle after 14 h of germination (supplementary Fig 1). Indeed, during germination, the seed needs the active form of folate for cell division and DNA duplication (Gorelova et al., 2017). Due to the high standard deviation of the PteGlu concentration, we assumed that the latter quantity remained constant until 14 h of germination, but it also possible that it was converted into 5-CH₃-H₄folate. The net total folate concentration in seeds decreased by 5%, probably due to the use of folates by the seeds to trigger germination. These results are similar to the results obtained by soaking for 14 h at 30 °C (Coffigniez et al., 2019)¹⁸ in which a 29% decrease in 10-CHO-PteGlu, and an 87% decrease in 5-CHO-H₄folate concentrations were observed, due to diffusion and interconversion into 5-CH₃-H₄folate (increase of 344% in the latter) (Coffigniez et al., 2019). This interconversion from formylated into methylated folate form has also been reported during germination of rye (Kariluoto et al., 2006).

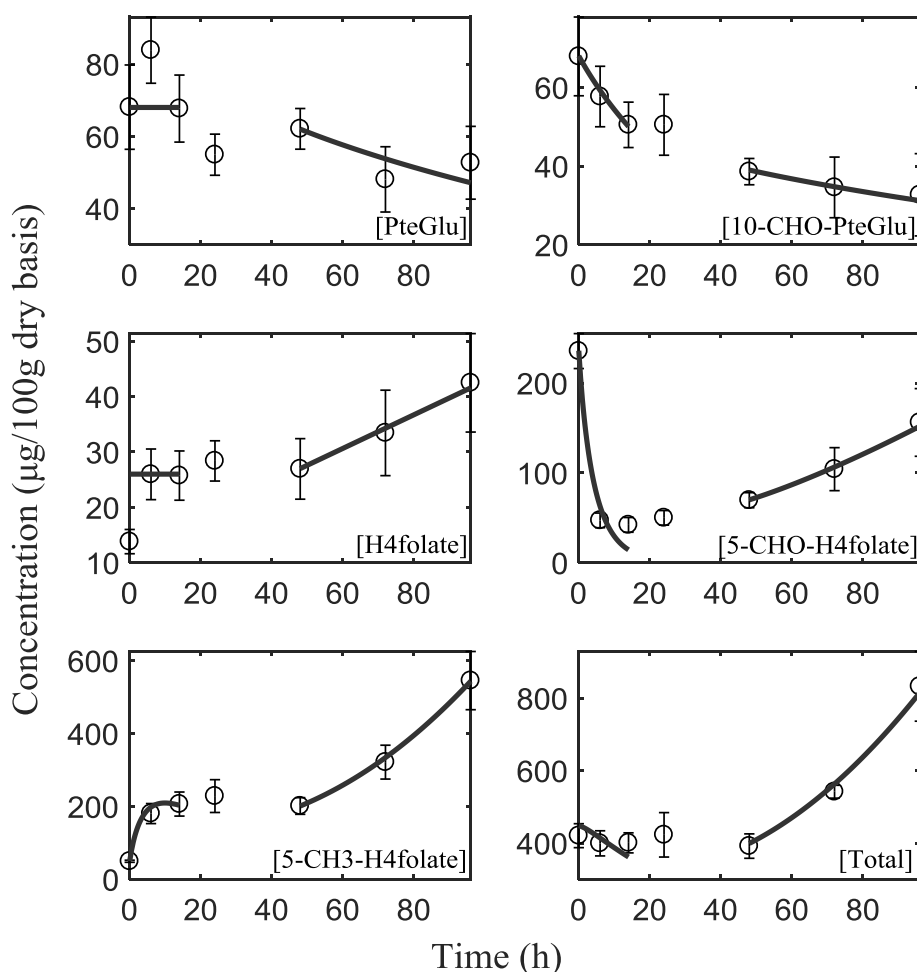


Figure 2: Predicted (solid lines) and experimental (dots) concentrations of folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], tetrahydrofolate [H4folate], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO-H4folate], 5-methyltetrahydrofolate [5-CH3-H4folate] and total folate [Total] in cowpea seeds (expressed as µg/100 g on a dry basis) during germination at 30 °C. Error bars represent standard deviations ($n = 4$).

Between 48 h and 96 h of germination, the concentrations of PteGlu and 10-CHO-PteGlu in the seeds decreased by 15% and 21% respectively, whereas the concentrations of H4folate, 5-CHO-H4folate, and 5-CH3-H4folate increased by 56%, 123% and 170% respectively. The decrease in PteGlu and 10-CHO-PteGlu again appears to be due to interconversion into 5-CH3-H4folate. However, the total concentration of folates doubled between 48 h and 96 h of germination

due to production of H₄folate, 5-CHO-H₄folate, and 5-CH₃-H₄folate. In this context, we assume that 5-CHO-H₄folate was also converted into 5-CH₃-H₄folate. The high level of folate production after 48 h of germination was correlated with the percentage of germinated seeds. Indeed, the germination rate increased from 14% to 78% when germination time increased from 14 h to 48 h (Fig 3).

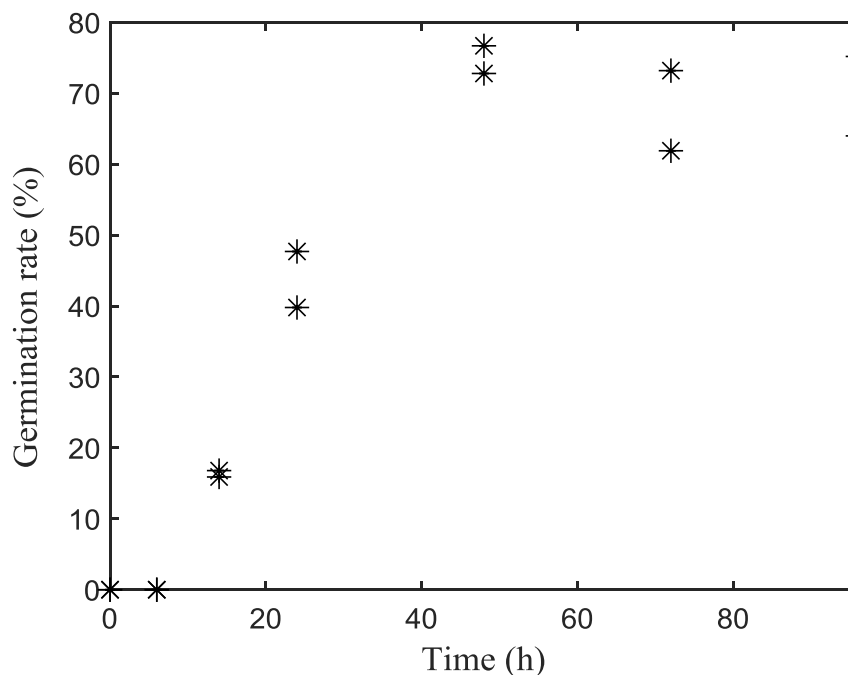


Figure 3: Germination rate (%) at 30 °C as a function of time (h). A seed was considered to germinate when the radicle appeared outside the testa ($n = 2$).

In the literature, other authors also reported the production of folates during legume germination. For instance, Shohag et al. (2012) showed that the folate content increased about 3 to 4 times during germination until a maximum was reached after 4 days. This increase was mainly due to the production of 5-CH₃-H₄folate. Hefni & Witthöft (2014) also found a three-fold increase in folate concentration in bean after 3 days of germination at 25 °C.

4.1.2. Enzyme conversion and production of folates

The conversion rate constants (k) were adjusted to experimental data assuming first order kinetics (Table 2) for the two germination times: before 14 h (G1) and after 48 h (G2).

Table 2. Estimated conversion (k_X) and production rate constants (kp_X) for each folate vitamer in cowpea seeds during soaking (S) at 30 °C (Coffigniez et al., 2019), the first 14 h of germination (G1) at 30 °C, and after 48 h of germination (G2) at 30 °C (mean values \pm standard deviations determined with Monte Carlo simulations: 200 sets).

<i>Species X</i>	<i>Process</i>	$k_{X,\Omega_S} \times 10^5 (s^{-1})$	$k_{pX,\Omega_S} \times 10^5 (s^{-1})$	RMSE*
				In seed (S)
Folic acid	S	2.21 \pm 0.04	0	8.9
	G1	0	0	12.5
	G2	0.16 \pm 0.01	0	8.8
10formyl-folic acid	S	0.81 \pm 0.01	0	8.3
	G1	0.63 \pm 0.02	0	7.6
	G2	0.13 \pm 0.01	0	6.7
5formyl-H ₄ folate	S	7.95 \pm 0.12	0	23.0
	G1	6.18 \pm 0.23	0	22.6
	G2	0.11 \pm 0.01	1.72 \pm 0.04	21.4
5methyl-H ₄ folate	S	1.11 \pm 0.02	0	17.1
	G1	1.02 \pm 0.03	0	21.5
	G2	0	4.53 \pm 0.09	12.7

*RMSE: Root mean square error between experimental and predicted concentrations ($mg/100kg db$).

S: soaking, G1: germination < 14 h; and G2: germination > 48 h

For both 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate, the conversion rate constants during the first 14 h were close to those found during regular soaking (S) at 30 °C for 14 h (Coffigniez et al, 2019), (Table 2). However, for the two latter vitamers, the conversion rate constant was lower after 48 h of germination and decreased to one fifth in the case of 10-CHO-PteGlu. It was almost the same for PteGlu, except that the conversion constant was not identifiable after 14 h of germination, due to lower measurement precision for this vitamer. The interconversions of PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate into 5-CH₃-H₄folate are already described in the literature and involve a pool of seed endogenous enzymes (Rébeillé et al., 2006). The conversion rate constant was higher for 5-CHO-H₄folate than for PteGlu (table 2) because the latter vitamer needs a supplementary

preliminary reducing step (Jägerstad and Jastrebova, 2013). Coffin and Cossins (1986) also showed a significant conversion of formylated folate into 5-CH₃-H₄folate during germination, with an increase in methionyl-tRNA transformylase activity, pointing to high protein synthesis during germination.

The degradation of 5-CH₃-H₄folate was modeled assuming first-order kinetics. Degradation was similar in regular soaking (water-to-seed ratio of 4:1 (w/w)) and in germination (limited water-to-seed ratio of 1:1 (w/w)) both performed at 30 °C for 14 h (table 2). Degradation was probably due to the use of folate by seeds in methylation reactions (Gorelova et al., 2017; Scott et al., 2000). By contrast, the degradation of 5-CH₃-H₄folate was negligible and was consequently not included in the model after 48 h of germination.

Except for PteGlu, during the first 14 h (G1), the reaction model applied to germination process provided as good a fit as in the case of regular soaking with an overall RMSE of less than 10% (db). After 48 h of germination (G2), the model satisfactorily described the interconversion of PteGlu, 10-CHO- PteGlu and 5-CHO-H₄folate into 5-CH₃-H₄folate but also the production of 5-CHO-H₄folate and 5-CH₃-H₄folate from H₄folate with an overall RMSE of 12.4% (db).

After 48 h of germination (G2), production rate constants k_{pX} were adjusted to the experimental data assuming first-order kinetics (table 2). The production rate constant k_{pX} was found to be 2.6 times higher for 5-CH₃-H₄folate (which is the active form of folate) than for 5-CHO-H₄folate. Moreover, after 48 h of germination, the production rate constants were 10 times higher than the conversion rate constants k_X . However, in the case of 5-CHO-H₄folate, both production and conversion rate constants were modeled considering the same experimental kinetic database and it was therefore possible to minimize both constants.

The production and enzymatic conversion reactions are usually represented by Michaelis-Menten laws (Neuburger et al., 1996). In our study, due to the complexity of the real folate reaction, for the sake of simplification, we preferred to use first-order kinetics. This equation depends on the substrate that was assumed to be H₄folate in the case of folate production. In practice, the production of 5-CH₃-H₄folate and 5-CHO-H₄folate involves numerous steps and several chemical intermediates. H₄folate is one of the intermediates and is the first folate vitamer to be produced during folate biosynthesis. Moreover, the production of 5-CH₃-H₄folate and 5-CHO-H₄folate from

H₄folate creates other intermediates such as 10-formyltetrahydrofolate (Rébeillé et al., 2006) that were not taken into consideration in our model. However, due to the lack of information about concentration of the substrate responsible for H₄folate production, changes in the concentration of H₄folate were modeled assuming zero-order kinetics, with a resulting rate constant $k=1.01 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (data not shown).

The degradation of 5-CH₃-H₄folate was disregarded during the long germination period (≥ 48 h, i.e. G2) but the seeds could also have used this form of folate in methylation reaction pathways. In our model, degradation of 5-CH₃-H₄folate could be masked by a misestimated production. The calculated correlation coefficient was found to be quite high (0.32) for the G2 model, between the conversion and the production rate constants of 5-CHO-H₄folate. However the, correlation coefficient between the different adjusted parameters was always less than 0.17 for the G1 model (i.e. that describing the germination process up to 14 h).

4.2. Folates: soaking vs. germination

Figure 4 shows changes in the predicted diffused, degraded (by interconversion), produced (by both enzymatic reactions and interconversion in the case of 5-CH₃-H₄folate) and the residual folate fractions in cowpea seeds during germination and regular soaking at 30 °C. The diffusive fraction was irrelevant in the germination process (no surrounding water due to the limited water-to-seed ratio of 1:1 (w/w) used), but even though not very intense, was taken into consideration in the case of regular soaking. Indeed diffusion accounted for 4% of the total amounts of PteGlu and 5-CHO-H₄folate, and was less than 25% for 10-CHO-PteGlu and 5-CH₃-H₄folate after regular soaking for 14 h.

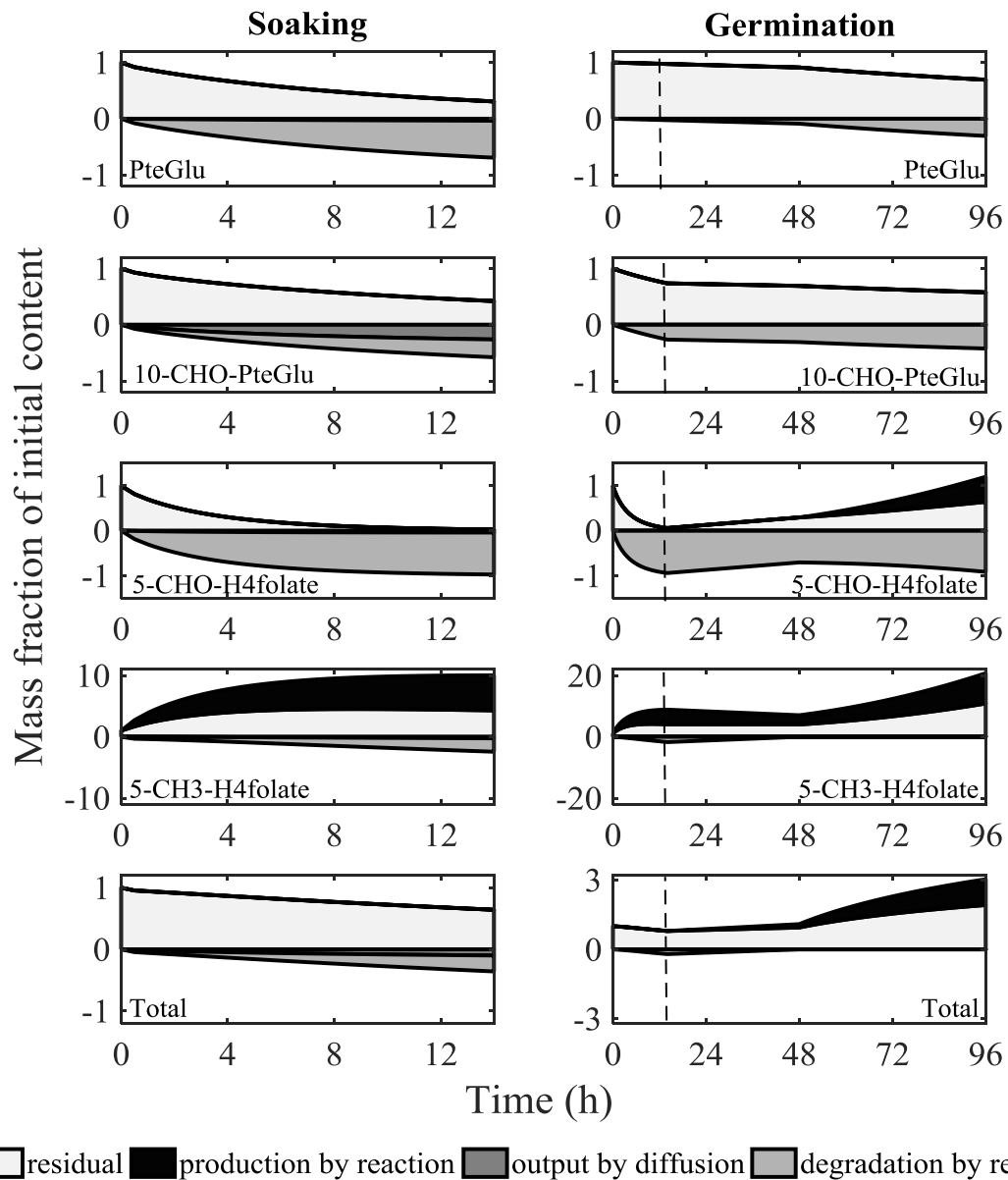


Figure 4: Predicted algebraic residual, produced, diffused and degraded mass fraction kinetics for folic acid [PteGlu], 10-formylfolic acid [10-CHO-PteGlu], 5-formyltetrahydrofolate [5-CHO-H₄folate], 5-methyltetrahydrofolate [5-CH₃-H₄folate] and total folate [Total] in cowpea seed both during the regular soaking process at 30 °C (Coffigniez et al., (2019), water-to-seed ratio of 1:1 (w/w))¹⁸ and during germination (present study, water-to-seed ratio of 1:1 (w/w)).

During the first 14 h of germination, both degraded and produced fractions were of the same order of magnitude as those observed during regular soaking at 30 °C. The degraded fraction of 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate represented respectively 31.7% and 93.3%, after 14 h of regular soaking and respectively, 26.4% and 93.9%, after 14 h of germination. These forms were interconverted into 5-CH₃-H₄folate with a produced fraction of the latter of 572.8% after 14 h of regular soaking and of 579.2% after 14 h of germination. As a result, the total amount of folates was reduced by 35.8% after soaking for 14 h (25.9% of which due to degradation and 9.9% due to diffusion) and by 20.5% after germination for 14 h (only due to degradation).

After 96 h of germination, the degraded fractions were 30.6%, 42.3%; and 91.4% for PteGlu, 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate, respectively, which was greater (except for PteGlu) than after germination for 14 h, with degraded fractions of 30.6%; 15.9% and 21.1% for the same species. However, 5-CHO-H₄folate and 5-CH₃-H₄folate were both produced, with fractions of 55.8% and 987.0%, respectively, after 96 h of germination. This high production rate doubled total folate content in the seeds after 96 h of germination.

4.3. Process recommended to maximize folate content in the seed

Cowpea seeds are usually soaked (overnight) before being boiled (for 25 min) prior to consumption (Madodé, 2012). A pre-soaking step at 30 °C using a water-to-seed ratio of 4:1 (w/w) for 8 h led to a 23% loss of total folate content in seeds (Coffigniez et al., 2019), whereas a pre-soaking step at the same temperature but using a water-to-seed ratio of 1:1 (w/w) (i.e. germination, water fully absorbed after 3 h) for 8 h resulted in only 11.3% loss of total folate in the seed. This smaller loss was due to the absence of folate diffusion during germination in contrast to what occurs during regular soaking. The pre-soaking step for 8 h with a limited amount of water (water-to-seed ratio of 1:1 (w/w)), (called germination in the present study) did not lead to proper germination at this stage, since no radicles were visible on the seeds. The model predicted that applying the latter pre-soaking conditions (which is equivalent to germination) followed by 25 min of soaking at 95 °C (Coffigniez et al., 2019) led to a remaining concentration of total folate of 66% (279 µg/100g db), rather than 57% (242 µg/100g bs) using a water-to-seed ratio of 4:1 (w/w).

The daily folate requirement for healthy adults is 300-400 µg (Krawinkel et al., 2014). One hundred grams (on a dry basis) of cowpea seeds could provide 90% of the daily folate requirements after the proposed short germination process (i.e. pre-soaking at 30 °C for 8 h using a water-to-seed

ratio of 1:1 (w/w)) followed by soaking at 95 °C. However, Sauberlich et al, (1987) showed that only 50% of total folate content from a food matrix is bioavailable for the human organism, for instance, folate polyglutamate forms are 33% less available than monoglutamate forms (Wei et al., 1996). Therefore, the lower bioavailability of folates in food could be offset by consuming more cowpea and/or a longer germination period (more than 4 days) before cooking even though it is time-consuming and it may alter product integrity. What is more, the longer germination process needs to be performed in good sanitary conditions to prevent microbiological growth. If extended and controlled, the germination step could greatly enhance the nutritional value of legumes (Shohag et al., 2012). In this context, complementary experimental investigations should be undertaken with longer soaking times (more than 4 days), but still with a water-to-seed ratio of 1:1 (w/w) (which in our study, corresponds to germination conditions).

To sum up, the present study revealed contrasted behaviour of folate vitamers in cowpea seeds during germination. These results were compared with regular soaking, using the same temperature of 30 °C. For the first time, a 2D axi-symmetric germination model was built considering a single cowpea seed and taking into account both the conversion and production of folates by adjusting rate constants, with satisfactory fit. The results revealed significant interconversion of 10-CHO-PteGlu and 5-CHO-H₄folate into 5-CH₃-H₄folate before 14 h of germination. The extent of interconversion was in the same order of magnitude as that observed during regular soaking at 30 °C. After 48 h of germination, an extremely high rate of folate biosynthesis, more specifically of 5-CH₃-H₄folate, was induced. A long germination process is a possible alternative to regular soaking, thus allowing an increase in folate concentration in cowpea products for human consumption. The use of the model could help identify an optimized germination pathway to increase the concentration of folate in the seed, to produce folate enriched cowpea-based products such as flour.

Acknowledgement

This work was part of:

- the ICOWPEA project funded under the "Thought for Food" Initiative by the *Agropolis Fondation, Fondazione Cariplo and Daniel et Nina Carasso Fondation* under reference ID 1507-031 through the “*Programme Investissements d’Avenir*” (Grant number: ANR-10-LABX-0001-01).
- the VITAMICOWPEA project funded by the ANR (French National Research Agency) by the *Agropolis Fondation* under reference ID 1502-501 through the “*Programme Investissements d’Avenir*” (Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01).

3.4.2. Synthèse et perspective

L'opération de germination (à 30 °C dans cette étude), comme l'opération de trempage, peut modifier la teneur en folate. Comme dans le chapitre 3.3, les teneurs en quatre vitamines de folates (PteGlu, 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate et 5-CH₃-H₄folate) ont été mesurées dans la graine au cours de la germination. À la différence d'un trempage dans de l'eau, lors de la germination la graine est un système fermé et les vitamines sont supposées ne pas diffuser. À partir d'un schéma réactionnel entre les vitamines, un modèle cinétique réactionnel a été construit et les quatre équations différentielles ordinaires couplées ont été résolues avec un logiciel commercial (Comsol). Lors des premières 14 h de germination, des interconversions du 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate en 5-CH₃-H₄folate ont été observées et les constantes de réaction sont similaires à celles obtenues lors d'un trempage. Après 96 h de germination, une forte production ($\times 2$) apparaît en folate et plus particulièrement en vitamine 5-CH₃-H₄folate (987 %). Ainsi, l'opération de germination plutôt qu'un trempage avant une cuisson semble une alternative efficace pour accroître la teneur en folates de la graine.

L'impact du trempage-cuisson sur les alpha-galactosides et les folates ont montré que le transfert des molécules était très faible à 30 °C, comparé à 60 °C et 95 °C (chapitre 3.1 et 3.3). De la même façon, l'absorption d'eau est plus rapide à 60 °C qu'à 95 °C (chapitre 3.1). Pour comprendre ces deux résultats inattendus, une étude cytohistologique a été réalisée et est présentée dans le chapitre 3.5 (publication #5).

3.5 Publication 5 : Impact du procédé de trempage-cuisson sur la microstructure des graines de niébé en relation avec la perte de nutriments et l'absorption d'eau

3.5.1. Article soumis

Impact of soaking process on the microstructure of cowpea seeds in relation to solid losses and water absorption

Fanny Coffigniez^a, Aurélien Briffaz ^a, Christian Mestres ^a, Lorène Akissoé^b, Philippe Bohuon ^c, Mohamed El Maâtaoui ^d

Food Research International

Abstract

A cytohistological investigation was performed to better understand the structural alterations of cowpea seeds in relation with soaking. Thin sections obtained from seeds soaked at 30 °C, 60 °C and 95 °C were treated to specifically visualize starch, proteins, cellulose and pectin. Micropyle behavior as well as water uptake and dry matter loss were also monitored. A Soaking at 30 °C induced slight alteration of parenchymatous cells of cotyledons, whereas drastic alterations were observed at 60 °C and intense alterations at 95 °C. All these structural modifications of cells could explain losses of nutrients and antinutritional factors at the highest soaking temperature (95 °C). The size of the apertures in the micropyle sections varied depending on both soaking temperature and time. At 30 °C and 60 °C, the micropyle aperture enabled notable water uptake by seeds. At 95 °C, water was entirely taken up through the testa. These results show that models describing nutrients losses and water uptake should account for these structure changes during soaking of legumes.

Keywords

Microscopy; legumes; cell wall; micropyle; cooking; β-elimination

1. Introduction

Legume seeds such as cowpea (*Vigna unguiculata*) are widely cropped and are of vital importance to the livelihood of several million people in West Africa (Achigan-Dako et al., 2011). Legume seeds are important in human nutrition (Graham and Vance, 2003) and unlike animal-based products, benefit the environment (Tschardt et al., 2012). Cowpea seeds are rich in proteins (20-25 %), starch (45-55%) and micronutrients including vitamins and minerals (Sreerama et al., 2012). Cowpeas are used in many different traditional African dishes (Dovlo et al., 1976) whose preparation often requires a preliminary soaking step. Soaking usually involves immersing the seeds in water at room temperature overnight. After soaking, the seeds are usually cooked in boiling water for 40 to 60 min (Madodé et al., 2013). During the soaking-cooking process, the seeds absorb water, starch gelatinizes, softening the texture, the proteins are denatured and the cell structure is altered.

In terms of structure, cowpea seeds are composed of a testa with a hilum and a micropyle, two cotyledons and an embryonic axis (epicotyl + hypocotyl + radicle) (Stanley and Aguilera, 1985). The cotyledon is the main nutritional component of legume seeds and previous studies have shown that cotyledons are rich in starch and proteins (Swanson et al., 1985). Heat treatment between 60 °C and 75 °C during soaking causes the starch to gelatinize thereby enhancing its digestibility (Coffigniez et al., 2017; Stanley and Aguilera, 1985). It also enhances protein digestibility by increasing protein solubility (Alonso et al., 2000; Hoover et al., 2010). The structural integrity of cotyledons is also affected by heating. For example, Hung et al., (1990) showed that soaking at 50 °C, 70 °C and 90 °C dissociated the cotyledon cells and that cooking at 110 °C and 130 °C damaged the middle lamella of cowpea seeds. This is mainly due to pectin depolymerization and β -elimination (Njoroge et al., 2016). Heating has also been shown to induce nutritional and anti-nutritional losses through diffusion and thermal degradation (Ibrahim et al., 2002; Coffigniez et al., 2017). A previous study by our team showed a low diffusion of alpha-galactosides during soaking at 30 °C, which was enhanced at higher soaking temperatures (60 °C and 95 °C) (Coffigniez et al., 2017). However, the cytohistological mechanisms involved in this heat-induced destructuring remain poorly understood.

Heat treatment also affects the water uptake capacity of the seeds. The testa can act as a barrier to water uptake and affect the extent of interlocking with the cotyledons (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979). In cowpea and lupin, most water absorption occurs via the micropyle and the testa of the

seeds (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979; Robles-Díaz et al., 2016). The size of the micropyle determines the quantity of water absorbed by the seed (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979). The degree of starch gelatinization also determines the water uptake capacity of the seed (Briffaz et al., 2014). However, the impact of heat treatments on the behaviour of the micropyle and consequently, on its role in regulating water uptake remains to be established.

The aim of the present study was thus to better understand the impact of seed structural modifications at different levels (including cotyledons and micropyle) on water uptake, dry matter losses and on the biochemical behavior of some macro constituents (starch, proteins, cell walls) during soaking of cowpea seeds using microscopic and cytohistological techniques.

2. Materials and methods

2.1. Material

The variety of cowpea used for this study was the *Wankoun* brownish one provided by IITA in Benin. Cowpea seeds were sown in November 2014 and harvested in February 2015. The seeds were kept in a vacuum pack and stored at 4 °C in the dark until use.

2.2. Soaking experiments

Thirty grams of cowpea seeds were soaked in 120 mL deionized water using the method described by Coffigniez et al., (2017) with a resulting seed-to-water ratio of 1:4 (w/w). The temperatures and time ranges investigated were 30 °C/0.5-38 h; 40 °C/0.25-8 h; 60 °C/0.16-8 h; 70 °C/0.16-6 h; 80 °C/0.16-6 h and 95 °C/0.25-3 h.

In an additional experiment, prior to soaking at 30 °C for 3 h or 60 °C for 1 h, the hilum and micropyle were both obstructed with superglue (cyanoacrylate) to assess their role in water uptake.

2.3. Microscopy studies

2.3.1. Seed overall morphology

To analyze the overall structure of the seeds, symmetric longitudinal half seed sections were cut using shape razor blades and stained with lugol (to reveal the starch). Observations were performed with a Nikon AZ100 stereomicroscope (Champigny sur Marne, France).

2.3.2. *Cytohistology*

Raw and soaked seeds (see section 2.2 for soaking procedure) were immersed in a cold fixative solution consisting of 4% (v/v) glutaraldehyde and 4% (v/v) paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer (pH=7.2). To facilitate the penetration of the fixative products, samples were placed in a vacuum for 20 min. After 48 h of fixation at 4 °C, the specimens were rinsed in distilled water and stored in 70% ethanol at 4 °C until required. They were then cut into 5×5 mm fragments from different regions of the seed: cotyledons, testa with hilum and micropyle. All the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (80-100% (v/v)) and embedded in methacrylate resin (Kit Technovit 7100, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sections (3 µm thick) were serially cut using a retraction microtome (Supercut 2065, Reichert-Young, Wien, Austria) and deposited on microscope slides. For routine observations, sections were stained with toluidine blue, a metachromatic dye (Clark, 1981). Sections were also cytochemically stained to specifically visualize major cell components using the following cytochemical reagents: periodic acid-Schiff's reagent (PAS) for starch and cellulose (pink); naphthol blue-black (NBB) protein (blue) (El Maâtaoui and Pichot, 1999), Ruthenium Red (RR) (Sigma, Germany) for pectin (red) and Fluorescent Brightener (FB) (Sigma, St Louis) for cellulose (Clark, 1981). In this latter case, the observations were made using UV illumination (365 nm) (Clark, 1981). All the observations were performed using a Leica DMR (Leica, Wetzlar, Germany) photomicroscope equipped for bright field, dark field, phase contrast and UV illuminations. Images were captured using a Leica DFC 300 FX digital camera and processed using LAS (Leica, Wetzlar, Germany) and image J software (<https://imagej.net/>). For each treatment, approximately 60 sections were analysed, and the best images were selected to illustrate our investigation.

2.3.3. *Micropyle aperture measurements*

Using the same experimental configuration as explained above, the aperture of the micropyle was measured on 50 microscopic cross sections obtained from seeds soaked in different time and temperature conditions (see section 2.2) and is expressed as an average length (µm).

2.4. Dry matter losses

For each soaking experiment, around 20 mL of soaking water was collected, weighed and dried at 100 °C for 48 h. The dry matter loss $DML(t)$ (kg / 100 kg db) in soaking water was calculated against time t (h) as follows:

$$DML(t) = \frac{m_{d,SW}(t)}{m_{d,S}(0)} * 100 \quad (1)$$

where $m_{d,SW}(t)$ and $m_{d,S}(0)$ are the mass (kg) of the 20 mL of soaking water after drying and the mass of dried seeds at initial time respectively (kg).

2.5. Water uptake kinetics

Water content $WC(t)$ (kg of water/kg db) of soaked seeds was measured as a function of soaking time t (h) using the method described by Coffigniez et al., (2017) and the following equation:

$$WC(t) = \frac{m_{w,S}(t) - m_{d,S}(t)}{m_{d,S}(t)} \quad (2)$$

where $m_{w,S}(t)$ and $m_{d,S}(t)$ are the mass of the wet seeds and dried seeds versus time t (h) respectively (kg).

3. Results and discussion

Observations of symmetric longitudinal seed sections showed that the gross structure of cowpea seed is consistent with the organisation of exalbuminous *Fabaceae* (Fig. 1).

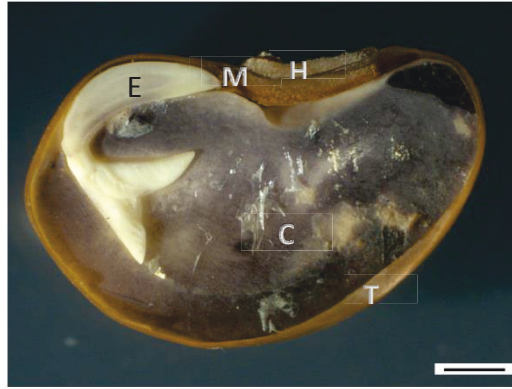


Figure 1: Micrograph showing the gross morphology of cowpea seeds. T, testa; H, hilum; M, micropyle; C, cotyledon E, embryonic axis. Lugol staining (dark blue) reveals accumulation of starch in the cotyledon. Embryonic axis appears to be starch free. Scale bars = 1630 μm .

The structure comprises an embryo with massive and reserve-rich cotyledons (C) as well as an embryonic axis (E) embedded in the testa (T), giving them a kidney-like appearance. The hilum (H) and micropyle (M) are located in the concave part of seeds.

3.1. Modifications of cotyledon cells

The cytohistological effects of soaking process were mainly investigated in the parenchymatous tissue of the cotyledons, which is the main component of the seed.

3.1.1. Modification of cell content: starch and protein

The cotyledons of the control seeds were composed of an epidermal layer embedding massive, compact parenchymatous tissue containing many vascular bundles (not shown). PAS and NBB staining (Fig. 2a) revealed numerous compact, heterogeneously sized starch granules (stained pink) and a protein-rich (stained blue) cytoplasm. Proteins were dispersed in the cytoplasm (amorphous), or organised as protein bodies. The parenchymatous tissue contained sizable intercellular spaces, sometimes filled with protein.

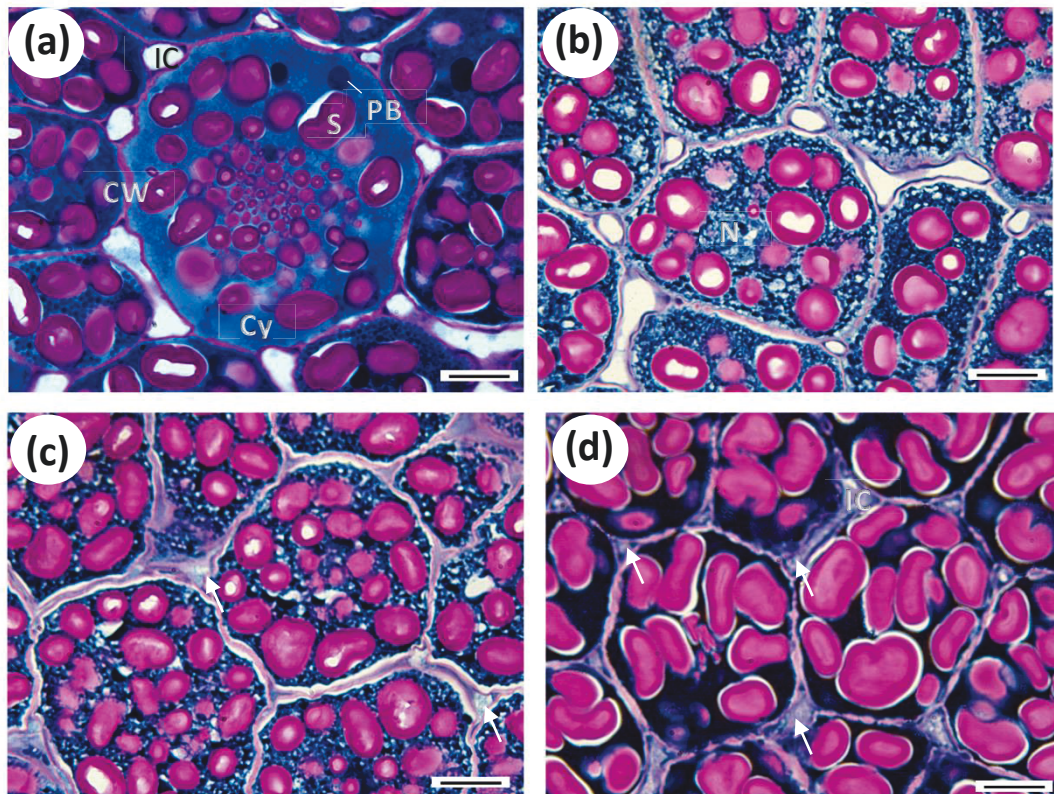


Figure 2: Effects of soaking on the parenchymatous cells of cowpea cotyledon. Sections were stained with PAS-NBB. (a) Control (raw seeds). (b) After soaking at 30 °C for 6 h. (c) After soaking at 60 °C for 2 h. (d) After soaking at 95 °C for 1 h. Note the decrease of stain intensity of starch and proteins in (b) and (c) compared to (a), and the presence of amorphous materials in intercellular spaces in (c) and (d) (arrows), and the intense blue colour of the cytoplasm in (d). CW: cell wall; IC: intercellular space; S: starch; Cy: cytoplasm; PB: protein body; N: nucleus.

Scale bars = 28 μm .

Figure 2 (b, c and d) shows the impact of soaking treatments on cowpea cotyledon cells. Compared to raw seeds (Fig. 2a), sections of cotyledon obtained from seeds soaked at 30 °C for 6 h showed a decrease in the intensity of the staining of the starch granules, proteins and cell walls of the parenchymatous cells (Fig. 2b). The proteins coagulated, thereby forming a network in the cytoplasm. Similar alterations were observed in parenchymatous cells soaked at 60 °C for 2 h. However, PAS and NBB positive material accumulated in the intercellular space (Fig. 2c). Sections of cotyledons from seeds soaked at 95 °C for 1 h showed marked alterations in the structure of the

parenchymatous cells (Fig. 2d), with a decrease in PAS staining of starch and an increase in the size of starch granules, which doubled in size (Fig. 2d) compared to raw seeds (Fig. 2a). The proteins were homogeneous in the cytoplasm, but the blue color was strengthened by NBB. Dense material filled the intercellular spaces.

3.1.2. Modifications of cell walls

Given that the major constituents of plants cell walls are cellulose and pectin, we decided to use PAS, FB and RR staining reagents. Figures 2, 3 and 4 are representative micrographs illustrating the effects of soaking on the behaviour of these components.

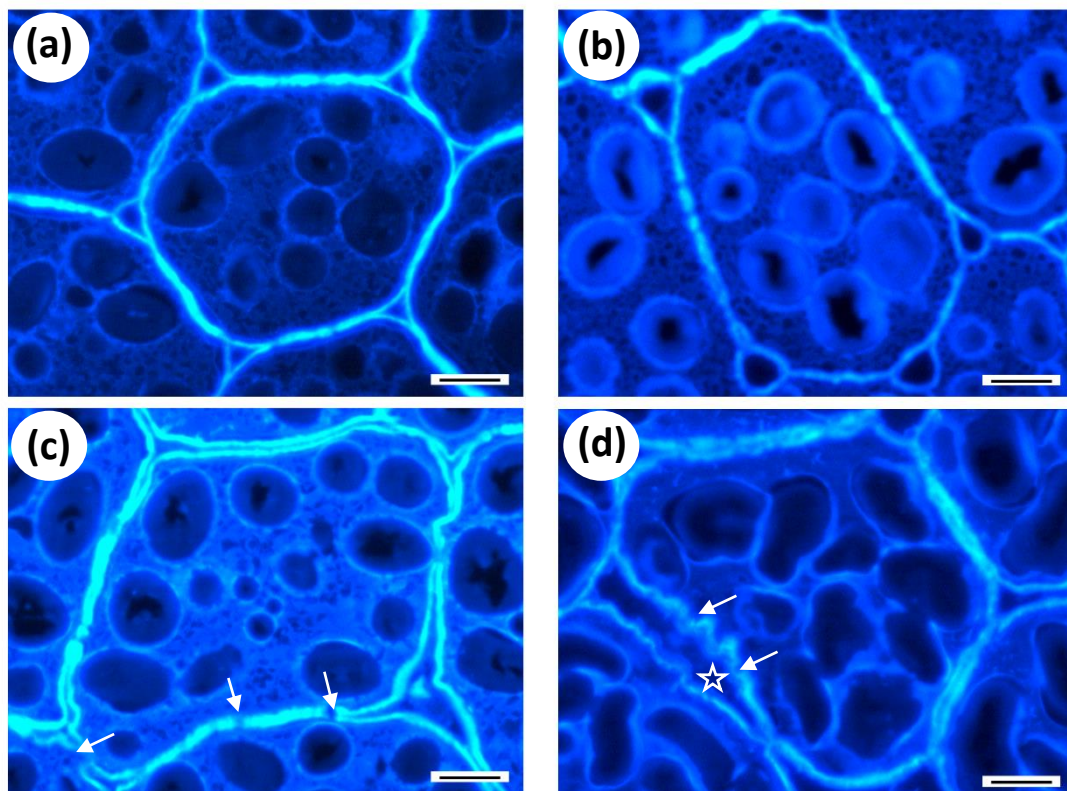


Figure 3: Effects of soaking on cellulose in the cell walls of cowpea cotyledons. Sections were stained with FB. (a) Control (raw seeds). (b) After soaking at 30 °C for 6 h. (c) After soaking at 60 °C for 2 h. (d) After soaking at 95 °C for 1 h. Note the disruption of the cell wall in (c) and (d) (arrows), and cell dissociation in (d) (star). Scale bars = 18 μ m.

In the control, PAS resulted in intense staining of the components of the cell walls, which appeared to be compact and homogeneously organized (Fig. 2a). This was confirmed by the results of FB (Fig. 3a) and RR (Fig. 4a) treatments for cellulose and pectin respectively. After staining, the cell walls displayed a cohesive cellulose structure and a middle lamella in the form of a pectin layer. After soaking at 30 °C for 6 h, the cell walls showed a reduced intensity using PAS reagent (Fig. 2b), and slight disruption causing the migration of cytoplasmic materials which accumulated in enlarged intercellular spaces. FB staining (Fig. 3b) showed loosening of the cellulose, considerably thickening the cell walls. Pectin specific staining with RR (Fig. 4b) showed a reduced intensity in the pectic middle lamella, particularly at the boundaries of the intercellular spaces. Soaking at 60 °C induced similar but greater alterations of the cell walls (Figs. 2c, 3c and 4c) with the accumulation of cytoplasmic material in intercellular spaces and separation of the cells. Sections of cotyledons soaked at 95 °C displayed parenchymatous cells with profoundly destructured cell walls (Figs. 2d, 3d and 4d). This was confirmed by the breaks in the cell walls at several places and the onset of cell dissociation where the middle lamella had disintegrated. After this treatment, there was intense accumulation of cytoplasmic material in the intercellular spaces.

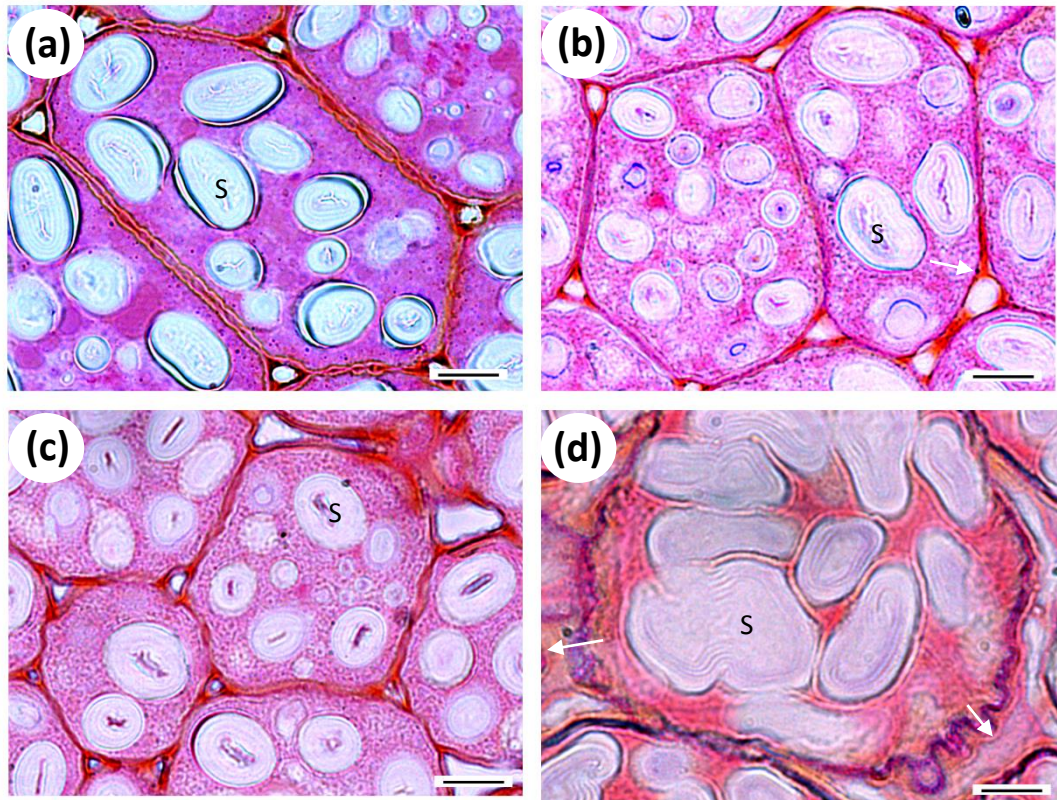


Figure 4: Effects of soaking on pectin in the cell walls of cowpea cotyledons. Sections were stained with RR. (a) Control (raw seeds). (b) After soaking at 30 °C for 6 h. (c) After soaking at 60 °C for 2 h. (d) After soaking at 95 °C for 1 h. Note the presence of pectin in the intercellular spaces in (b), (c) and (d) (arrows), and the fusion of starch granules in (d). S, starch. Scale bars = 15 μm .

The cell wall degradation and accumulation in intercellular space after soaking at 60 °C and 95 °C (figs. 2 to 4) showed that the cell walls were permeable and that cellular content had diffused into the intercellular space. Other authors also reported similar cell disruption after heat treatment of legumes. Mwangwela et al., (2006) showed the accumulation of pectins in the intercellular space after hydrothermal treatment. Waldron et al., (2003) and Varriano-Marston and Jackson, (1981) reported the loss of plasmalemma and disorganization of cytoplasm after treatment at high temperature. This communication with the intercellular space probably began in the plasmodesmata and could be due to β -elimination and pectin depolymerization (Bernal-Lugo et al., 1997; Waldron

et al., 2003). Buren, (1979), Liu et al., (1993) and Njoroge et al., (2016) showed that β -elimination was limited below 60 °C but total after boiling at 100 °C for 30 min.

A very slight disruption of the cotyledon cell walls appeared after soaking at 30 °C. The limited disruption could be linked to lack of β -elimination, but also to possible cell wall strengthening, partly due to phytate hydrolysis. In cowpea, phytate concentrations range from 0.3–1.5 mg/100 mg, mainly in the protein bodies of the cotyledon parenchyma. Phytates are associated with bivalent minerals such as calcium, magnesium, iron and zinc (Kruger et al., 2015; Gonçalves et al., 2016; Sandberg, 2002). Some authors have reported loss of phytates during soaking of legumes at 30 °C due to hydrolysis from endogenous phytase (Alonso et al., 2000; Chang et al., 1977; Shi et al., 2004). This phytate degradation triggers the release of bivalent minerals from the phytate-mineral complex and their migration towards the cell wall of the middle lamella (Phillips et al., 2003), where the pectins are usually soluble and linked to monovalent minerals. However, in this case, the released divalent minerals, especially calcium, replace the monovalent minerals and the pectin becomes insoluble (Kruger, Minnis-Ndimba, Mtshali, & Minnaar, 2015). The insoluble pectin forms a stronger cell wall, thereby preventing cell separation (Phillips et al., 2003).

When legumes are soaked at between 50 °C and 60 °C, there is competition between pectin strengthening and pectin degradation in the cell walls. However, in our cytohistological study and in this temperature range, pectin degradation predominated (Figs. 2b and 4b).

3.1.3. Impact of cell wall degradation on mass transfer properties

The observed structural changes in the cell wall during soaking can strongly affect the mass transport of several species, including nutrients and antinutrients, from the seed to the soaking medium. Dry matter losses were higher at 95 °C (3.4% and 6.9% after 30 min and 1 h respectively) than at 60 °C (5.2% and 8.6% after 1 h and 2 h respectively), and than losses at 30 °C (0.8% and 1.1% after 3 h and 6 h respectively) (Fig. 6a). The same trend was reported by Kon, (1979) in beans with a dry matter loss of 2%, 12% and 12% after soaking for 5 h at 40 °C, 1 h 30 at 60 °C and 0.8 h at 90 °C, respectively. These losses, which often include nutrients and antinutrients, are thus facilitated by high soaking temperatures that may increase cell wall degradation.

For instance, concerning antinutrients, a previous study by our team on the same cowpea variety (*Wankoun*) showed that 2.2%, 58% and 48% of alpha-galactosides had diffused in water after soaking at 30 °C for 6 h, at 60 °C for 2 h, and at 95 °C for 1 h, respectively (Coffigniez et al.,

2017). This diffusion of alpha-galactosides from cowpea seed was modelled using Fick's law and apparent diffusivities were identified, revealing a strong effect of temperature. For example, the apparent diffusivity of stachyose was found to be 150 times lower at 30 °C than at 60 °C and 1.5 lower at 60 °C than at 95 °C. The modification in the structure of the cell wall together with pectin degradation at higher temperature may explain the resulting higher apparent diffusivities obtained at 60 °C and 95 °C compared to 30 °C. This model could be upgraded by integrating this structural factor.

Similarly, other nutrients or antinutrients can leach out of the legume seed to an extent which varies with the soaking conditions. For instance, soaking cowpea seeds at room temperature for 8 h resulted in a loss of tannins, phytic acid and trypsin inhibitors of less than 1%, whereas boiling for 45 min resulted in a loss of 41%, 6.8 % and 87 % of the same species, respectively (Ibrahim et al., 2002). In beans, Kon, (1979) found that increasing soaking temperature (40 °C/5 h, 60 °C/1.5 h, 90 °C/50 min) increased the diffused fraction of thiamin by 1%, 32% and 40%, respectively). All these observations show that the soaking temperature can be optimized to preserve the nutritional value of seeds for human consumption.

By comparing the results of the present microscopic study and those of a quantitative study on alpha-galactosides by Coffigniez et al. (2018) using the same seed cultivar, we can confirm that there is a strong link between destructuring of the cell (disruption of the cell wall and degradation of pectin) that is enhanced by high soaking temperatures and molecular diffusion through the intercellular space. However, other seed structures could also affect the material losses from the seed during soaking such as the micropyle whose opening can facilitate diffusion, essentially at low temperatures.

3.2. Water uptake by the seeds

3.2.1. Water uptake from the micropyle

The behaviour of micropyle was monitored using cross sections stained by toluidine blue. Cross sections from the control (Fig. 5a) showed a closed aperture embedded in three different structures: a spongy tissue (around 500 µm), a palisade layer (around 150 µm) and a group of tracheids (around 400 µm).

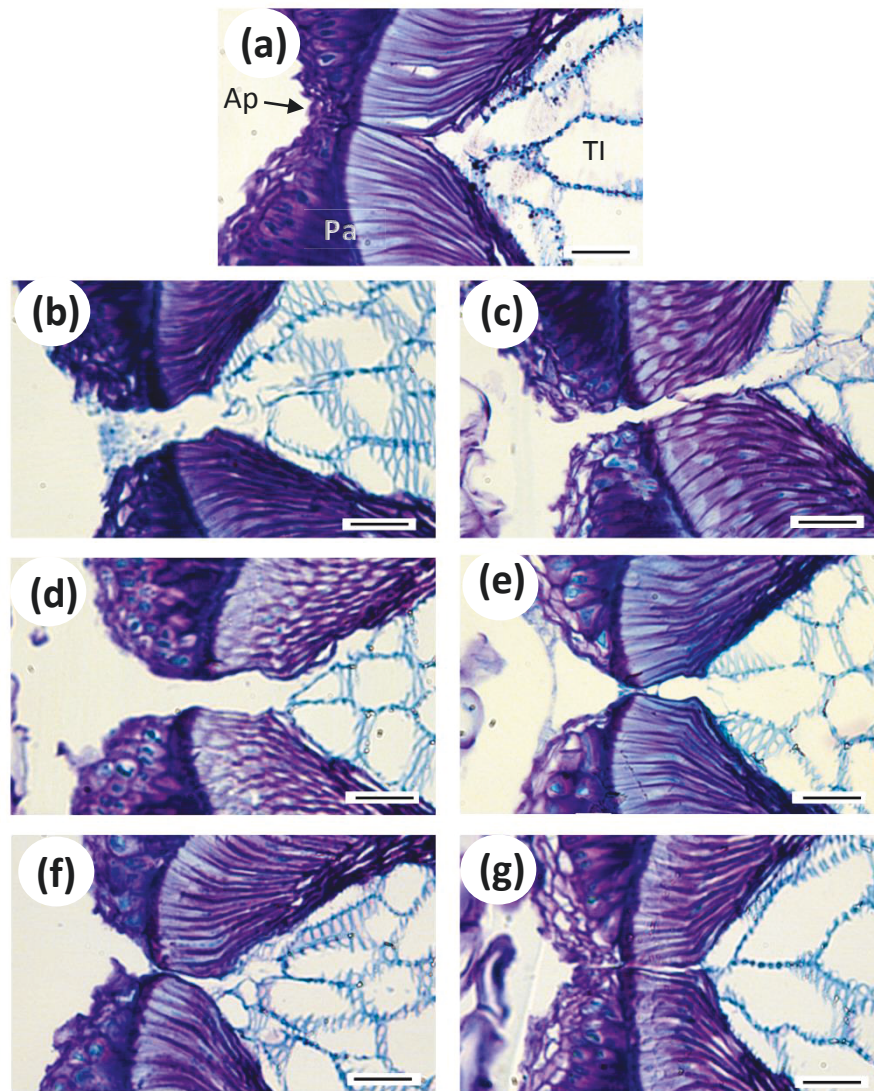


Figure 5: Effects of soaking on cowpea micropyle. Sections were stained with toluidine blue. (a) Control (raw seeds). (b) After soaking at 30 °C for 3 h. (c) After soaking at 30 °C for 6 h. (d) After soaking at 60 °C for 1 h. (e) After soaking at 60 °C for 2 h. (f) After soaking at 95 °C for 0.5 h. (g) After soaking at 95 °C for 1 h. Note the presence of the aperture in (b), (c) and (d). Ap: aperture; Pa: palisade; TI: tracheid island. Scale bars = 18 μm .

After soaking at 30 °C for 3 h and 6 h and at 60 °C for 1 h and 2 h, the micropyle was open. However, the opening was twice as big after the shortest soaking time at 30 °C and 60 °C (Table 1). After soaking at 95 °C, the micropyle remained almost closed (Table 1) at both soaking times.

Table 1. Changes in the micropyle aperture after soaking at 30 °C, 60 °C and 95 °C. The mean aperture was measured on the whole micropyle presented in Figure 5. (mean values ± standard deviations determined with n=6 measurements)

Temperature (°C)	Time (h)	Micropyle thickness (µm)
0	0	0 ± 0 ^a
30	3	12.2 ± 1.3 ^b
	6	5.8 ± 0.8 ^c
60	1	11.7 ± 2.0 ^b
	2	5.4 ± 2.6 ^c
95	0.5	1.8 ± 0.7 ^d
	1	1.3 ± 0.2 ^d

Values with different letters (a–b–c–d) are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 6b shows cowpea seed water uptake kinetics at different soaking temperatures ranging from 30 °C to 95 °C. The early water uptake rate (calculated as the linear slope from 0 to 0.5 h, data not shown) increased with soaking temperature, except at 95 °C, when the lower initial water uptake rate could be due to the closure of the micropyle (Figs. 5f and 5g). These results are consistent with those obtained by Coffigniez et al., (2017) using the same cowpea material and in the same experimental soaking conditions. Indeed, using a mechanistic modelling approach, these authors identified water diffusivity in cowpea seed which was two times lower at 95 °C than at 60 °C. In the present study, seed water content was also measured in the same experimental conditions but with the seed micropyle and hilum artificially closed using superglue (data not shown). In this configuration, the resulting water content was 39% and 33% lower after soaking at 30 °C for 3 h and at 60 °C for 1 h, respectively than in seeds with a free micropyle and hilum. These observations suggest that at low temperature, these structures are involved in the regulation of water uptake by the seed. Moreover, at low soaking temperatures (i.e. at 30 °C and 40 °C), water absorption behavior was not purely Fickian, with a short delay at the early stage of water uptake kinetics. Indeed, the initial ($t < 0.25$ h) water uptake rate was found to be lower (0.4 kg/kg db/h and 1.0 kg/kg db/h) than that just after 30 minutes (0.70 kg/kg db/h) and 15 minutes (1.52 kg/kg db/h) at soaking

temperatures of 30 °C and 40 °C, respectively, suggesting active transport which could involve micropyle and hilum. The contribution of these structures to the active control of seed water absorption at low soaking temperatures was confirmed with the aperture of the micropyle at 30 °C (figs. 5b and 5c).

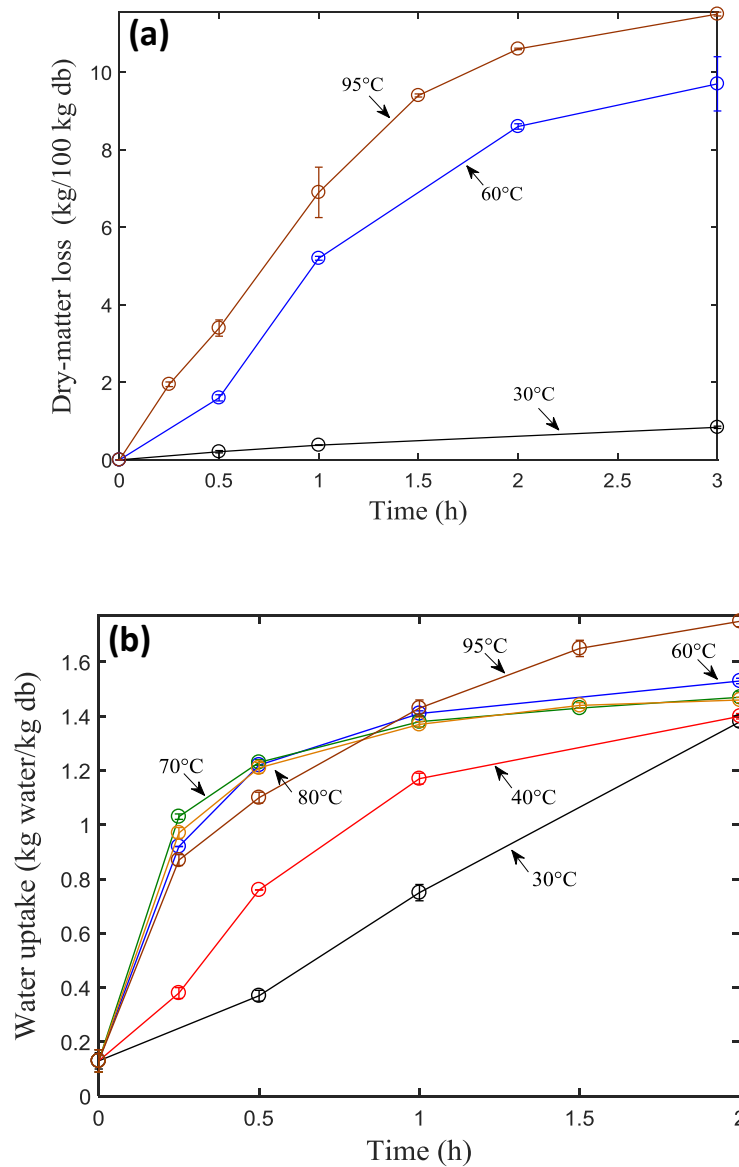


Figure 6: (a) Dry-matter loss kinetics (kg/100 kg db) of cowpea seeds during soaking at 30 °C (black), 60 °C (blue) and 95 °C (brown). (b) Water uptake kinetics (kg of water/kg db) of cowpea seeds during soaking at 30 °C (black), 40 °C (red), 60 °C (blue), 70 °C (green), 80 °C (orange) and 95 °C (brown). Error bars represent the standard deviation (n=4)

Other authors also highlighted the contribution of the micropyle to the water absorption process in some legume seeds. Using a dye in lentil and lupin seeds soaked at room temperature, Robles-Díaz et al., (2016) showed that water uptake preferentially occurred through the micropyle. Gama-Arachchige et al., (2013) blocked the hilum and micropyle of *Cercis canadensis* seeds, which partly blocked water uptake. Lush and Evans, (1980) reported that the behaviour of the micropyle of cowpea seeds depended to a great extent on experimental conditions. Indeed, they showed that the micropyle is waterproof (closed) when the seed is dry (water content of 10-12 %). To absorb water, a change in cell conformation and a water content threshold (24%) are required for micropyle opening.

3.2.2. Water uptake through testa layer

Despite the blockage of micropyle and hilum structures (section 3.2.1), 60% of water uptake was maintained during soaking at 30 °C and 60 °C. This water uptake probably occurred through the testa layer. In this case, the structure of the cowpea seed testa may play an important role in water uptake (Stanley and Aguilera, 1985). The water diffusivity through the testa increased with decreasing thickness and increasing temperature (Kaptso et al., 2008; Yildirim et al., 2011). At 95 °C, water was only taken up through the testa (micropyle closed), which explained the lower water uptake rate before 1 h compared with that at lower temperatures. However, the marked breakdown of cell walls observed at 95 °C (Figs. 2d to 4d) could facilitate water uptake and partly explain the higher water uptake after 1 h compared with that at lower temperatures.

4. Conclusion

Our study has advanced our knowledge of changes in major cell components and structure (including micropyle) of cowpea seeds during soaking and their impact on the diffusion of material and uptake of water. The changes in the cells were monitored by means of cytohistological investigation. During soaking at 30 °C, only slight structural modifications were observed, with minimal impact on mass transfer out of the cells and water mainly taken up through the micropyle. At higher soaking temperatures (i.e. 60 °C and 95 °C), cell wall disruption occurred due to β -elimination and depolymerization of pectin. The drastic effect of high soaking temperatures on the cell walls was responsible for the loss of material in the soaking water, which facilitated water uptake by the seeds. At high soaking temperatures, water uptake mainly occurred through the testa

layer. All these temperature-dependent structural changes should be integrated in existing models to better describe the diffusion of alpha-galactosides and the uptake of water by cowpea seeds during soaking.

Acknowledgments

The authors declare no conflicts of interest. FC, MEM and LA set up the study and performed the experiments. FC, MEM AB, CM and PB revised the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

3.5.2. Synthèse et perspective

Les modifications subies par les structures des graines de niébé lors d'un trempage-cuisson ont pu être mises en évidence grâce à une étude de cytohistologie. Pour cela, des coupes du cotylédon et du tégument (zone du hile) ont été réalisées à la suite de traitements à 30 °C, 60 °C et 95 °C. Des colorations ont permis de visualiser spécifiquement les protéines, l'amidon, les pectines et la cellulose. Un trempage par immersion dans de l'eau à 30 °C n'endommage pas les parois des cellules parenchymateuses, tandis qu'un traitement à 60 °C ou 95 °C altère fortement les parois cellulaires et permet la libération de matériel dans l'espace intercellulaire. Cette déstructuration de la paroi est due à la β -élimination. Ces observations expliquent certainement la forte diffusion des alpha-galactosides et des folates dans l'eau de trempage à la suite d'un trempage à 60 °C et/ou une cuisson à 95 °C.

Les résultats ont montré qu'un trempage à 30 °C et 60 °C induisent l'ouverture du micropyle, permettant alors l'entrée d'eau au sein de la graine, sans traverser le tégument. Le micropyle se referme lorsque la teneur en eau de la graine est maximale (entre 1,2 et 1,6 g d'eau/g bs). Par ailleurs, une cuisson à 95 °C ne permet pas l'ouverture du micropyle, l'eau étant alors entièrement transférée à travers le tégument. Ces observations peuvent expliquer la plus forte diffusivité apparente de l'eau dans la graine obtenue à 60 °C qu'à 95 °C (chapitre 3.1). L'ensemble de ces résultats montre que la caractérisation des propriétés de transport d'eau par une simple diffusivité apparente dans une graine assimilée à un milieu homogène masque d'autres voies de transferts (convection, capillaire...).

Discussion générale

4. Discussion générale

Ce chapitre vise à discuter des thèmes abordés dans le chapitre 3 et des quelques résultats supplémentaires. La discussion traitera d'abord de l'histologie du niébé, ainsi que la localisation des alpha-galactosides et des folates dans la graine. Puis, nous aborderons les choix réalisés pour obtenir une base de données expérimentales. Ensuite, nous discuterons des différents mécanismes (transport, convection, réactions...) que subissent les alpha-galactosides, les folates et l'eau lors du procédé. Puis, l'obtention du simulateur à partir de ces mécanismes, ainsi que ses limites seront examinées. Enfin, nous discuterons de l'optimisation du procédé de trempage-cuisson afin de limiter la consommation des alpha-galactosides tout en conservant les folates et en obtenant une graine cuite.

4.1. La connaissance du Niébé

4.1.1. Histologie

La graine de niébé est constituée de trois tissus différents : le cotylédon, l'axe embryonnaire et le tégument (Figure 19, b). Le cotylédon et l'axe embryonnaire forment l'embryon. Entre les cotylédons se situe un espace rempli d'air (Fig 19, a).

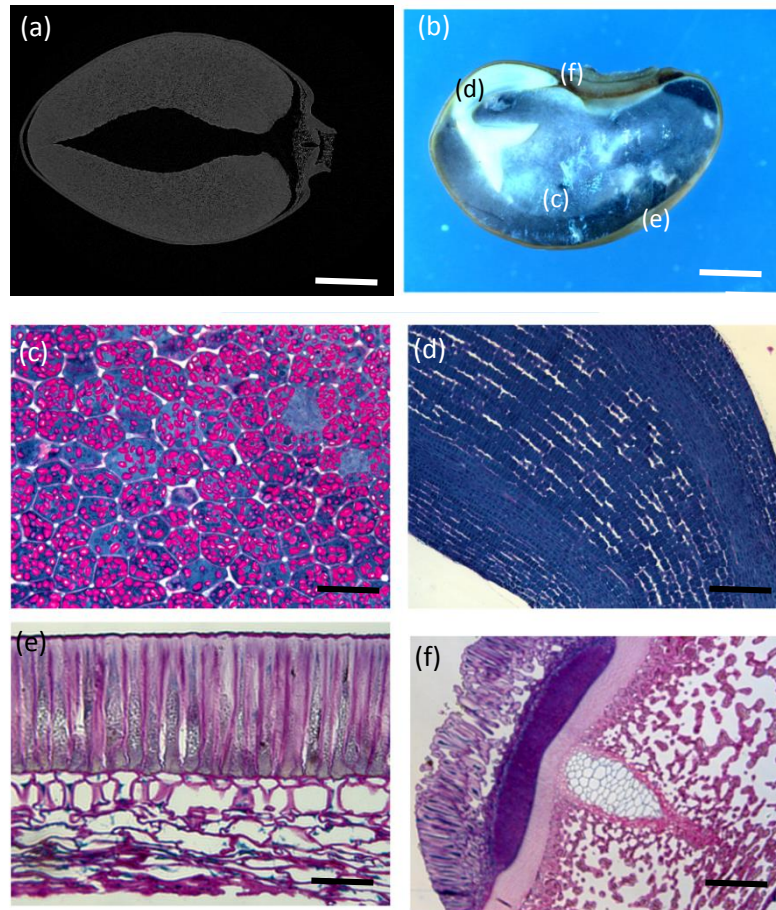


Figure 19 : Morphologie de la graine de niébé en micro-tomographie (a) colorée au lugol (noir=amidon), visualisée à la loupe binoculaire (b) ainsi que de ses structures particulières visualisées au microscope, dont les cellules parenchymateuses du cotylédon colorées au PAS (bleu=protéine ; rose=amidon (c), l'axe embryonnaire coloré au PAS (d) le tégument coloré au bleu de toluidine (e) et le micropyle coloré au bleu de toluidine (f). Sur le micrographe (b), les zones de prélèvement de (c), (d), (e) et (f) sont visualisables. L'échelle représente 1931 μm (b), 139 μm (c), (d) et (f) et 35 μm (e)

Les cotylédons contiennent les réserves nutritives nécessaires à la croissance de l'embryon lors de la germination. Le tissu présente des cellules riches en amidon (grains de tailles variées) et en protéines (Figure 19, c) (chapitre 3.5) (Stanley and Aguilera, 1985; Blaszcak et al., 2007). Les protéines peuvent former des globules (de tailles variées) ou être solubilisées dans le cytosol. Certains tissus conducteurs (xylème ou phloème) sont également présents et montrent des cellules riches en cytoplasme et en protéines (Figure 19, c). Le cotylédon est bordé par une cuticule interne et une cuticule externe. La cuticule interne est riche en protéines. Cependant, la cuticule externe est

riche en protéines d'un côté du tissu et riche en amidon de l'autre côté du tissu. Du côté du tissu où la cuticule externe est riche en amidon, les cellules présentent des espaces intercellulaires importants (méats qui parfois peuvent contenir des protéines). De même que les cellules situées vers l'extérieur du tissu sont plus riches en amidon, tandis que les cellules situées vers l'intérieur du tissu sont plus riches en protéines.

L'axe embryonnaire présente des cellules denses qui sont 5 à 10 fois plus petites que dans le cotylédon et qui contiennent essentiellement du cytoplasme, des protéines et de très faibles quantités d'amidon sur les parois (Figure 19, d). De l'épiderme vers le cortex, se distinguent quatre couches cellulaires (Figure 19, d). La première couche contient des petites cellules denses, sans espaces intercellulaires. La deuxième couche contient des cellules plus grosses et plus espacées. La troisième couche contient des cellules de taille similaire à la deuxième couche, mais sans espaces intercellulaires. Enfin, la quatrième couche contient des cellules très espacées au sein desquelles de très petits granules d'amidon sont présents dans le cytosol.

Le tégument possède une structure variée en fonction de sa localisation. Cette structure s'épaissit à proximité de l'embryon. L'essentiel du tégument est constitué d'un épiderme externe formé d'une couche cellulaire en palissade et riche en métabolites secondaires qui ont été révélés par le réactif de Neu comme étant des flavonoïdes (Figure 19, e). Vers l'intérieur du tissu se trouve une couche de cellules parenchymateuses en dégénérescence (Figure 19, e). Au niveau du hile, le tégument présente davantage de types cellulaires (Figure 19, f). Vers l'extérieur, les cellules présentent des parois épaisses, tandis que vers l'intérieur les cellules sont espacées, riches en métabolites et dégénérantes (parenchyme). Au niveau du hile, se trouvent des faisceaux de xylème.

La graine de niébé présente donc des structures hétérogènes tant à l'échelle macroscopique que microscopique, qui peuvent être modifiées lors du procédé de trempage-cuisson (chapitre 3.5).

4.1.2. Localisation des molécules d'intérêts

Le chapitre 3.3 a montré que les folates sont plus concentrés dans l'axe embryonnaire que dans les cotylédons. Cependant l'embryon représentant seulement 2 % de la masse totale de la graine, la majorité des folates de la graine se situe dans les cotylédons. Au niveau cellulaire, les folates peuvent être présents dans les mitochondries (H₄folate et 5-CHO-H₄folate), dans le cytosol (5-CH₃-H₄folate) (Gorelova et al., 2017), ou bien dans les vacuoles et les chloroplastes (Rébeillé et

al., 2006). Concernant les alpha-galactosides, Sreerama et al. (2010) ont mis en évidence leur présence essentiellement dans les cotylédons (65 %) et l'embryon (27 %). Au niveau cellulaire, les alpha-galactosides sont présents majoritairement dans le cytosol (85 %) et parfois dans des vacuoles (15 %) (Obendorf and Gorecki, 2012). Cette différence de localisation des différentes formes de folates et alpha-galactosides peut induire des comportements variés de ces molécules lors d'un procédé de trempage-cuisson.

4.2. Base de données expérimentales et d'étude cinétique

4.2.1. Procédé de trempage-cuisson

Le procédé de trempage-cuisson a été réalisé dans un bain-marie thermostaté sous agitation, permettant d'assurer une bonne homogénéité de la température. La montée en température de la graine est jugée quasi instantanée. À la suite du trempage-cuisson, les graines sont rapidement refroidies à 4°C, afin de stopper les réactions de dégradation et éviter une inertie thermique (Scott et al., 2000). De même, l'eau de trempage est rapidement congelée. Lors de ces manipulations, l'eau et les graines sont protégées de la lumière afin d'éviter la photodégradation des folates (Scott et al., 2000). À la suite des opérations de trempage-cuisson, les dosages des alpha-galactosides et des folates ont été réalisés aussi bien sur les graines que sur les eaux de trempage. Cette base de données expérimentales ainsi obtenue a permis d'établir des bilans massiques pour découpler les mécanismes de transfert de ceux de réactions.

4.2.2. Dosage des alpha-galactosides

L'extraction ainsi que le dosage des alpha-galactosides n'ont pas révélé de difficultés particulières, les molécules d'alpha-galactosides étant thermiquement stables. Une vérification de la méthode (extractions successives) a permis de montrer que dans les conditions d'extraction choisies, le taux d'extraction était maximal. Cependant, l'ajout d'étalon interne aurait permis de déterminer un rendement d'extraction et de confirmer si l'extraction était totale ou non. Notons toutefois, que pour l'élaboration de la cinétique, et des différents mécanismes impliqués, cette méthode est répétable et les teneurs en alpha-galactosides peuvent ainsi être comparées. Le dosage des différentes formes d'alpha-galactosides s'est montré intéressant, les formes de masse molaire les plus importantes pouvant se dégrader en formes de masse molaire moindre (verbascose en stachyose et stachyose en raffinose) (chapitre 3.1).

4.2.3. Dosage des folates

L'extraction ainsi que le dosage des folates se sont avérés plus critiques que pour les alpha-galactosides. Deux différentes formes de folates ont été extraites. Il s'agit des formes oxydées stables : l'acide folique (PteGlu) et l'acide 10-formylfolique (10-CHO-PteGlu), et des formes réduites instables : le tetrahydrofolate (H₄folate), le 5-méthyltetrahydrofolate (5-CH₃-H₄folate) et le 5-formyltetrahydrofolate (5-CHO-H₄folate). Ces formes réduites présentent une forte sensibilité à la lumière et sont oxydables à haute température (Scott et al., 2000 ; Oey et al., 2006 ; Ruddick et al., 1980 ; Viberg et al., 1997). Pour éviter la dégradation de ces vitamines lors de l'extraction et du dosage, les manipulations ont été réalisées sous une lumière restreinte. Cependant, l'extraction nécessite des étapes de chauffage à 100 °C. Pour s'extraire du biais que pourrait générer ces phases de chauffage, des étalons internes ont été ajoutés aux échantillons. De plus, la faible concentration en folates dans les matrices alimentaires confère une difficulté supplémentaire au dosage vis-à-vis des limites de détection et de quantification de l'HPLC et la LC-MS. La méthode nécessite donc une étape supplémentaire de purification sur colonne SPE, qui a pour but, mise à part de purifier l'échantillon, de le concentrer. Malgré ces efforts expérimentaux, la concentration du H₄folate (environ 10 µg 100g), espèce la plus thermolabile, reste trop faible pour avoir une bonne fiabilité des résultats.

Comme pour les alpha-galactosides, le dosage des différentes formes de folates s'est avéré judicieux, les vitamines pouvant s'interconvertir en la forme la plus biodisponible pour l'organisme (chapitre 3.3). Ceci n'aurait pas pu être examiné par une méthode de dosage des folates totaux (méthode microbiologique).

4.3. Compréhension des mécanismes de transfert et réactions

Plusieurs mécanismes impactent les teneurs en alpha-galactosides et en folates, ainsi que l'absorption d'eau durant le procédé de trempage-cuisson. Parmi ces mécanismes, nous retrouvons le transfert, la convection, les réactions enzymatiques, d'interconversions et d'oxydation.

4.3.1. Transfert

Perte de molécules dans l'eau de trempage

Les résultats ont montré des pertes en alpha-galactosides et en folates par des mécanismes de transfert des graines vers l'eau de trempage, au cours du procédé de trempage-cuisson. Ce transport a été modélisé par une loi de Fick (chapitre 3.1 et 3.3). Les diffusivités apparentes estimées

pour les alpha-galactosides et les folates à 30 °C, 60 °C et 95 °C sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Valeurs des diffusivités apparentes (D , $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) des différents alpha-galactosides et folates au cours d'un procédé de trempage-cuisson à différentes températures:

Molécules		$D \times 10^{11}$ (m^2/s)		
		30 °C	60 °C	95 °C
α-galactosides	Verbascose	$0,008 \pm 0,002$	$3,0 \pm 1,0$	$6,5 \pm 2,9$
	Stachyose	$0,02 \pm 0,006$	$3,0 \pm 0,9$	$4,3 \pm 2,0$
	Raffinose	$0,90 \pm 0,40$	$3,0 \pm 1,0$	$4,6 \pm 2,0$
Folates	PteGlu	$0,010 \pm 0,001$	$0,81 \pm 0,02$	$3,12 \pm 0,06$
	10-CHO-PteGlu	$0,181 \pm 0,003$	$2,93 \pm 0,05$	$7,94 \pm 0,16$
	5-CHO- H_4 folate	$0,026 \pm 0,001$	$2,12 \pm 0,04$	$3,23 \pm 0,05$
	5- CH_3 - H_4 folate	$0,014 \pm 0,002$	$3,52 \pm 0,07$	$3,63 \pm 0,06$

Ainsi, le tableau 10 montre que les diffusivités apparentes des alpha-galactosides et des folates sont dans les mêmes ordres de grandeur et ce pour les trois températures d'étude. Les diffusivités apparentes se situent entre $3,1 \times 10^{-11}$ et $9,9 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ à 95 °C, entre $0,8 \times 10^{-11}$ et $3,5 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ à 60 °C et $0,8 \times 10^{-13}$ et $9,0 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ à 30 °C. Il est à noter qu'à 30 °C, les diffusivités apparentes sont dix fois plus élevées pour le raffinose et le 10-CHO-PteGlu, comparées aux autres molécules. Ces valeurs peuvent en effet être surévaluées, car les constantes de dégradation (k) ont été déterminées sur les mêmes données expérimentales et sont corrélées aux diffusivités apparentes. Cet écart peut également provenir d'une localisation plus périphérique du raffinose et du 10-CHO-PteGlu, comparée aux autres molécules. Cela remettrait alors en cause l'hypothèse d'une concentration homogène en alpha-galactosides et folates dans la graine. Ces hypothèses restent cependant à confirmer.

Les résultats montrent une précision qui est 10 à 100 fois plus importante pour les folates que les alpha-galactosides. Cette plus grande précision provient d'une moins grande corrélation entre les différents facteurs du modèle et d'une plus grande contrainte du modèle lié aux folates. Le RMSE (root-mean-square-error) présente un champ minimum bien plus étroit pour les folates que pour les alpha-galactosides et les valeurs des paramètres en sont plus précises.

Le tableau 10 met également en exergue des valeurs de diffusivités apparentes qui sont doublées entre 60 °C et 95 °C et qui sont 100 à 200 fois plus grandes à 60 °C qu'à 30 °C. Kaymak and Kincal (1994) ont montré également que la diffusivité apparente des sucres réducteurs de la pomme de terre augmentait avec la température et suivait une loi d'Arrhenius. Cependant, la très grande différence de diffusivité apparente à 30 °C comparée aux autres températures de nos données montre que d'autres phénomènes entrent certainement en jeu. En effet, l'étude cytohistologique (chapitre 3.5) a révélé que les parois cellulaires sont altérées au cours de traitements thermiques à 60 °C et 95 °C. Ces altérations proviennent d'une solubilisation et d'une dégradation des constituants de la paroi cellulaire : les pectines et la cellulose. Les parois cellulaires pourraient donc agir comme une barrière au transfert des molécules lors d'un trempage à 30 °C, tandis que sa dégradation faciliterait le transfert des molécules lors d'un trempage/cuisson à 60 °C et 95 °C. En effet, les résultats ont témoigné la présence de matériel cellulaire dans les espaces intercellulaires à la suite d'un traitement thermique à 60 °C et 95 °C, (chapitre 3.5). De plus, l'immunomarquage des folates a révélé le même phénomène en permettant de visualiser la présence des folates dans les espaces intercellulaires à la suite d'une cuisson à 95 °C (chapitre 3.3). Il est à noter que le tégument peut également être une barrière au transfert des molécules, mais l'évolution de sa structure générale au cours du trempage-cuisson n'a pas été visualisée en microscopie.

L'ensemble de ces mécanismes va impacter le transfert des alpha-galactosides et des folates. Les pourcentages de pertes de ces molécules par transfert à la suite d'un procédé sont regroupés dans la figure 20.

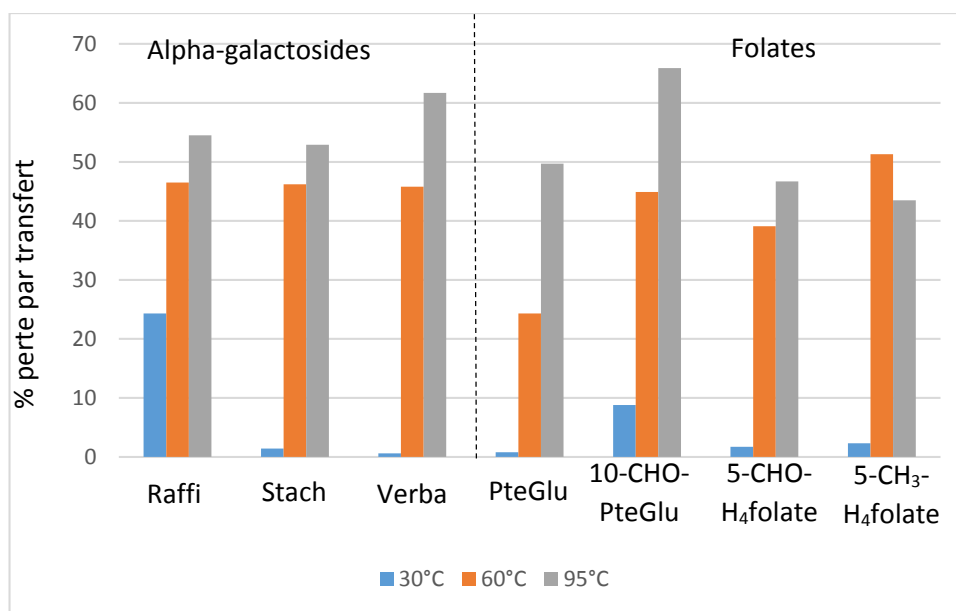


Figure n°20 : Pertes des alpha-galactosides et des folates par transfert à la suite d'un trempage-cuisson de 2 h à 30 °C (bleu), 60 °C (orange) et 95 °C (gris) dans un ratio graine/eau de 1 :4 :

Ainsi, de par l'effet barrière au transfert provoqué par les parois cellulaires, les pertes par transfert en alpha-galactosides et en folates sont de l'ordre de quelques pourcents à la suite d'un trempage de 2 h à 30 °C. Tandis que lors d'un trempage-cuisson à 60 °C et 95 °C, les pertes de ces molécules sont de l'ordre de 40-45 % et de 45-60 % respectivement. Il est à noter que la perte de ces molécules par transfert augmente avec la température pour toutes ces molécules sauf le 5-CH₃-H₄folate. Cette plus faible perte par transfert à 95 °C pour le 5-CH₃-H₄folate est due à l'oxydation de la molécule, qui diminue sa part potentiellement diffusable.

Absorption d'eau par la graine

Lors du trempage-cuisson, les molécules d'eau sont absorbées par la graine. Ce transfert se fait donc en sens opposé de celui des alpha-galactosides et des folates. Dans un premier temps, le transfert d'eau a été modélisé par une loi de Fick, ce qui a permis de déterminer des diffusivités apparentes de l'eau de $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 30 °C; $8,2 \pm 1,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 °C et $4,3 \pm 0,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 95 °C. Ces diffusivités apparentes sont 10 fois supérieures à celles estimées pour les alpha-galactosides et les folates à 60 °C et 95 °C. Cette différence s'explique par la plus faible masse molaire de l'eau, comparée à la masse molaire des alpha-galactosides et des folates. Cependant, la plus forte valeur de diffusivité apparente à 60 °C qu'à 95 °C est un résultat inattendu qui montre que, comme pour les alpha-galactosides et les folates, l'absorption de l'eau ne peut pas

être modélisée par la seule loi de Fick. La structure de la graine influence la capacité d'absorption d'eau. En effet, l'étude présentée au chapitre 3.5 a montré qu'à 95 °C, l'absorption de l'eau s'opère intégralement à travers les téguments, tandis qu'à 30 °C et 60 °C, le micropyle ouvert doit également intervenir dans l'absorption d'eau par un mécanisme de convection.

4.3.2. Convection

Les résultats obtenus dans le chapitre 3.5 ont montré qu'une part de l'absorption d'eau (30 %) est réalisée à travers le micropyle. Ce transport actif implique un changement structural, permettant l'ouverture du micropyle. Cette ouverture s'opère lorsque la graine possède une teneur en eau suffisante et non maximale (chapitre 3.5) (Lush and Evans, 1980). Ce transport actif n'a pas été modélisé, mais met en exergue que le modèle ne peut pas être résumé par la seule loi de Fick.

À partir des données acquises, la vitesse de transfert de l'eau à travers le micropyle a pu être déterminée par l'équation suivante, en considérant l'ouverture du micropyle comme un disque de diamètre d :

$$v = \frac{4Q_v}{\pi d^2} \quad (32)$$

Avec d , le diamètre du micropyle, estimé à $1,2 \times 10^{-5}$ m (chapitre 3.5) et Q_v le débit d'eau au niveau du micropyle ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). Le débit est calculé de la manière suivante :

$$Q_v = \frac{m_{0S}(1-WC_0)k_{0W}}{\rho} \quad (33)$$

Avec m_{0S} , la masse d'une graine initiale (kg), WC_0 la teneur initiale en eau dans la graine ($\text{kg eau} \cdot \text{kg}^{-1}$), ρ la masse volumique de l'eau ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) et k_{0W} la constante de vitesse d'absorption d'eau initiale par le micropyle (s^{-1}). Ce dernier paramètre a été mesuré en dérivant la cinétique expérimentale représentant l'absorption d'eau de la graine via le micropyle. De ce cadre, la vitesse de transfert de l'eau par le micropyle a été estimée à $2,9 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 30 °C et à $7,7 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 °C. Ainsi, ces valeurs excessives de vitesse de transfert d'eau démontrent que l'absorption ne se fait pas uniquement via le micropyle, mais implique d'autres zones situées certainement au niveau du hile (et possiblement le hile lui-même). Ces hypothèses restent cependant à confirmer.

4.3.3. Réactions biochimiques

Lors du trempage-cuisson de nombreuses réactions biochimiques se déroulent au sein de la graine: des réactions enzymatiques à faible température ; des oxydations et dégradations thermiques à haute température.

4.3.3.1. Réactions enzymatiques

Les alpha-galactosides et les folates sont tous deux soumis à des réactions enzymatiques sollicitant des enzymes endogènes à la graine au cours du trempage. Ce phénomène a essentiellement été observé à 30 °C, et légèrement à 60 °C, dans la graine et l'eau de trempage et est dans un premier temps représenté par une cinétique d'ordre 1. Ce choix a été orienté par notre capacité expérimentale, le grand nombre de paramètres à identifier et par l'objectif de disposer d'un modèle simple de transfert/réactions. La construction de modèles cinétiques plus élaborés impose le suivi d'un plus grand nombre d'espèces chimiques (intermédiaires de réactions) et requiert une capacité analytique importante.

Cinétique d'ordre 1 d'hydrolyse enzymatique dans la graine

Tableau 11 : Valeurs des constantes de dégradations enzymatiques dans la graine des différents alpha-galactosides et folates au cours d'un procédé de trempage-cuisson à différentes températures :

Molécules		$k \times 10^6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$		
		30 °C	60 °C	95 °C
α-galactosides	Verbascose	0	0	0
	Stachyose	2,9 ± 0,8	0	0
	Raffinose	5,8 ± 1,5	0	0
Folates	PteGlu	22,1 ± 0,4	37,3 ± 0,6	0
	10-CHO-PteGlu	8,1 ± 0,1	0	0
	5-CHO-H ₄ folate	79,5 ± 1,2	0	0
	5-CH ₃ -H ₄ folate	0	0	0

Ainsi, le tableau 11 montre que les constantes de dégradations enzymatiques des alpha-galactosides et des folates apparaissent essentiellement à 30°C, les enzymes étant partiellement ou totalement dénaturées à 60°C et 95°C.

La dégradation enzymatique des alpha-galactosides s'opère en une étape qui implique l'action de l'alpha-galactosidase, qui agit en éliminant le galactose terminal. Ainsi, le stachyose se dégradera en raffinose+galactose et le raffinose en saccharose+galactose. Les résultats obtenus dans le chapitre 3.2 ont montré que, en excès d'enzyme, la dégradation du stachyose peut directement donner un saccharose et deux galactoses sans observer la formation intermédiaire du raffinose. Toutefois, dans le cas du trempage-cuisson, n'étant probablement pas en excès d'enzyme, la production intermédiaire du raffinose est visualisable et chaque étape a été modélisée. Concernant les folates, la modélisation selon une cinétique d'ordre 1, regroupe en fait un grand nombre de réactions enzymatiques. La conversion enzymatique du PteGlu en 5-CH₃-H₄folate comporte 6

étapes et l'action de 5 enzymes différentes. La conversion du 5-CHO-H₄folate en 5-CH₃-H₄folate comporte 3 étapes et l'action de 3 enzymes différentes (Jägerstad and Jastrebova, 2013; Rébeillé et al., 2006). Les deux premières étapes de transformation du PteGlu consistent en une réduction. Cette étape peut être limitante et justifie la plus faible constante de dégradation constatée pour le PteGlu comparée au 5-CHO-H₄folate. Il est donc à noter que la représentation de la dégradation des folates a été très fortement simplifiée comparée à celle des alpha-galactosides (beaucoup d'étapes modélisées en une seule pour les folates, ce qui n'est pas le cas des alpha-galactosides). Les résultats montrent que les constantes de dégradations des folates sont 10 fois plus importantes que celles des alpha-galactosides. Cependant, les données de la littérature sont insuffisantes sur ce point (essentiellement pour les enzymes impliquées dans l'interconversion des folates) pour être comparées aux résultats de notre étude.

Les pourcentages de pertes en alpha-galactosides et folates par dégradations enzymatiques à la suite d'un procédé sont regroupés dans la figure 21.

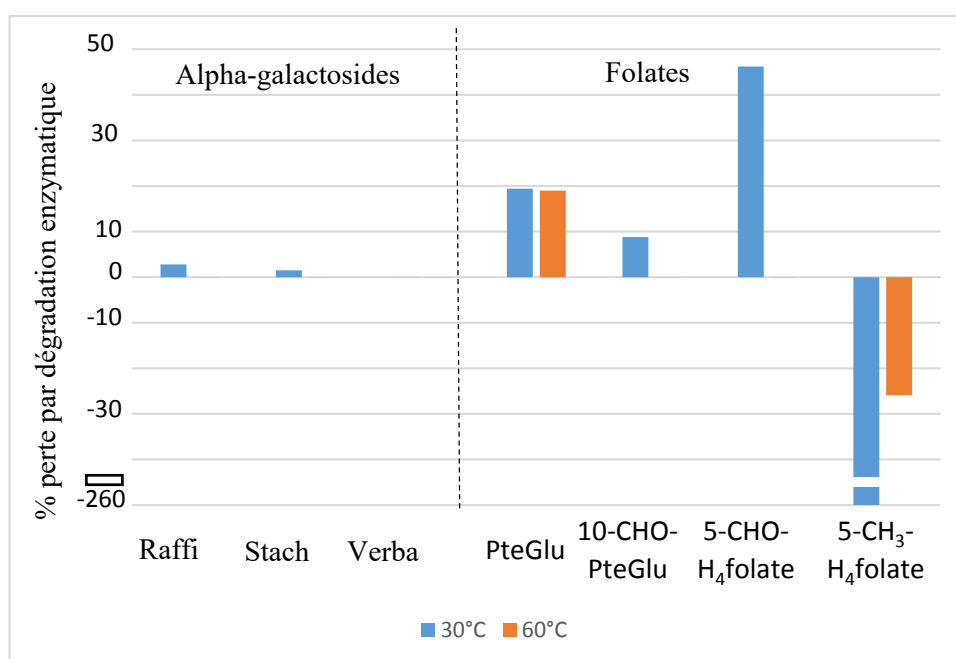


Figure n°21 : Pertes en alpha-galactosides et en folates par dégradation enzymatique dans la graine à la suite d'un trempage-cuisson de 2 h à 30 °C (bleu), et 60 °C (orange) dans un ratio graine/eau de 1 :4 :

Les pertes en folates et alpha-galactosides dans la graine par dégradations enzymatiques sont nulles à 95 °C. Cette perte est effective seulement pour le PteGlu à 60 °C (19 % à 2 h). À

30 °C, les dégradations enzymatiques des alpha-galactosides dans la graine après 2 h sont très faibles (inférieures à 3 %), tandis que dans les mêmes conditions, les dégradations enzymatiques des folates sont fortes (entre 10 et 45 %).

Il est à noter qu'un trempage à 30 °C effectué dans une quantité d'eau limitante entraîne une germination des graines. Les résultats obtenus ont montré que les réactions d'interconversion enzymatique des folates étaient similaires lors d'une germination et lors d'un trempage (comparaison montrée dans le chapitre 3.4). Cependant, pour des germinations supérieures à 48 h, d'autres enzymes interviennent dans la production des folates. Cette production est complexe et nécessite l'intervention d'une dizaine d'enzymes (Rébeillé et al., 2006). Les constantes de production sont dans des ordres de grandeurs similaires aux interconversions des folates (chapitre 3.4).

Cinétique d'ordre 1 d'hydrolyse enzymatique dans l'eau de trempage

Aussi bien pour les alpha-galactosides que pour les folates, les enzymes responsables de leur dégradation peuvent diffuser dans l'eau de trempage. Il est à noter que pour une basse température (30 °C), le transfert des alpha-galactosides et des folates est faible. Pour cette raison, et de par le schéma réactionnel déjà complexe des folates, les constantes de dégradation ont été considérées comme nulles dans l'eau de trempage. Cependant, la cinétique de concentration des alpha-galactosides dans l'eau de trempage montre une perte en alpha-galactosides sur des temps longs (chapitre 3.1). De ce fait, des constantes de dégradations enzymatiques des alpha-galactosides ont pu être déterminées dans l'eau de trempage.

Tableau 12 : Constantes cinétiques (k, s^{-1}) de dégradations enzymatiques dans l'eau de trempage des différents alpha-galactosides au cours d'un procédé de trempage-cuisson à différentes températures :

Molécules		$k \times 10^4 (s^{-1})$		
		30 °C	60 °C	95 °C
α-galactosides	Verbascose	0,5 ± 0,2	0	0
	Stachyose	1,6 ± 0,4	0,12 ± 0,04	0
	Raffinose	3,2 ± 0,7	1,1 ± 0,4	0

Comme dans la graine, les constantes de dégradations enzymatiques dans l'eau de trempage sont plus importantes à 30 °C qu'à 60 °C et nulles à 95 °C. Les résultats montrent des constantes qui sont 50 fois plus importantes dans l'eau de trempage que dans la graine. En effet, la plus grande mobilité de l'enzyme dans l'eau par rapport à la graine, grâce à une plus faible viscosité, permet à l'enzyme d'avoir une plus grande activité (Van Boekel, 2009). Les constantes de dégradations dans l'eau de trempage, comme dans la graine sont plus importantes pour le raffinose, que le stachyose et plus importantes pour le stachyose que pour le verbascose. Ceci s'explique par la plus grande masse molaire du verbascose que du stachyose ou du raffinose. En effet, l'enzyme présente une plus grande affinité sur des substrats moins volumineux (Alani et al., 1989), le site actif de l'enzyme étant probablement plus accessible aux petites molécules.

Cinétique Michaelienne

Les dégradations enzymatiques avaient d'abord été modélisées selon une cinétique d'ordre 1. Cependant, l'activité de l'enzyme est généralement représentée par la loi de Michaelis-Menten et n'est assimilable par une cinétique d'ordre 1 que si K_m est très grand comparé à la concentration en substrat (chapitre 3.2). L'identification des paramètres Michaeliens a été réalisée seulement pour les alpha-galactosides et les résultats ont été abordés dans le chapitre 3.2. La loi de Michaelis-Menten a donc remplacé la cinétique d'ordre 1 représentant les réactions enzymatiques se déroulant dans l'eau de trempage et la graine dans le modèle. Cependant l'ajustement du modèle aux courbes expérimentales n'était pas meilleur avec une loi de Michaelis-Menten. Cela laisse donc penser que dans ce cas d'étude, la concentration en substrat est effectivement négligeable devant K_m . Etant

donné l'effort expérimental nécessaire pour obtenir les paramètres Michaeliens et l'absence d'une plus-value dans le modèle, une cinétique d'ordre 1 est suffisante pour décrire le comportement de l'enzyme.

Cependant, l'étude enzymatique (chapitre 3.2) a mis en exergue une phase de latence de 10 h (qui est également visible sur les cinétiques de dégradation des alpha-galactosides, chapitre 3.1), ainsi qu'un facteur de dégradation thermique de l'enzyme. Ces paramètres intégrés au modèle ont impacté la diffusivité apparente des alpha-galactosides, car la diffusivité apparente est corrélée à la dégradation (facteur de corrélation de 0,56 pour le stachyose) (chapitre 3.1). En effet, les diffusivités apparentes des alpha-galactosides ont été surestimées, et ce essentiellement pour le raffinose (dont la dégradation est la plus forte). En effet, la diffusivité apparente du raffinose est 20 fois plus faible que celle obtenue précédemment, celle du stachyose est 3 fois plus faible et celle du raffinose est 1,3 fois plus faible. Les nouvelles diffusivités apparentes des alpha-galactosides sont alors dans le même ordre de grandeur pour les trois formes.

4.3.3.2. Interconversion des folates

Lors du trempage à 30 °C des graines, les folates présentent une forte conversion de tous les vitamères en 5-CH₃-H₄folate. Le modèle a été réalisé en introduisant un seul paramètre de dégradation enzymatique. Cependant, certaines formes peuvent être interconverties de manière chimique et notamment les formes formylées (10-CHO-H₄folate et 5-CHO-H₄folate) (chapitre 3.3). De ce fait, le modèle a été simplifié, mais les interconversions chimiques du PteGlu et du 10-CHO-PteGlu en 5-CH₃-H₄folate peuvent former l'intermédiaire 5-CHO-H₄folate (Jägerstad and Jastrebova, 2013).

4.3.3.3. Oxydation des folates

Les alpha-galactosides sont des molécules stables jusqu'à 95°C et aucun phénomène d'oxydation n'a été observé (chapitre 3.1). Cependant, les folates sont des molécules sensibles et des phénomènes d'oxydation ont été observés sur le 5-CH₃-H₄folate (chapitre 3.3). Le 5-CH₃-H₄folate s'est oxydé en pyrazino-s-triazin, ce qui est en accord avec la littérature (Scott et al., 2000). Il est à noter que sur des températures intermédiaires (inférieures à 60 °C), les folates peuvent s'oxyder, puis être réduits de nouveau grâce à l'action d'enzymes appelées réductases (Jägerstad and Jastrebova, 2013). L'oxydation du 5-CH₃-H₄folate a été modélisée dans un milieu modèle par d'autres auteurs (Oey et al., 2006; Viberg et al., 1997), qui ont déterminé via la loi d'Arrhenius une

énergie d'activation comprise entre 62 et 65,6 kJ.mol⁻¹. De la même manière, une loi d'Arrhenius a été ajustée à partir de nos données et l'énergie d'activation résultante est de 28,0 ± 0,1 kJ×mol⁻¹.

4.4. Développement d'un simulateur

4.4.1. Choix du modèle

Le modèle élaboré couple des phénomènes de transfert (loi de Fick) et de réactions. Ces réactions sont représentées par une loi de Michaelis-Menten dans le cas des alpha-galactosides. Cependant, les réactions d'interconversion des folates décrites lors du trempage et la germination du niébé ont été simplifiées par des cinétiques d'ordre 1, voir 0 (pour le H₄folate). L'interconversion de l'acide folique, du 10-formyl acide folique et du 5-methyltetrahydrofolate en 5-methyltetrahydrofolate implique de nombreuses enzymes et la formation d'intermédiaires (Jägerstad and Jastrebova, 2013; Rébeillé et al., 2006). Cette simplification est due à notre capacité analytique. En effet, la construction d'une loi de Michaelis-Menten analogue à celle des alpha-galactosides nécessiterait d'isoler les 5 enzymes impliquées dans les interconversions et d'en déterminer les paramètres Michaeliens. Le choix de représenter l'ensemble des réactions d'interconversion par une seule cinétique d'ordre 1 s'explique aussi par la difficulté à doser tous les intermédiaires des réactions. De plus, les mécanismes impliqués lors du trempage-cuisson sur les folates ont été représentés par un système de 4 équations aux dérivés partielles (EDP) et 4 équations différentielles ordinaire (EDO) avec 6 paramètres à identifier à 60 °C et 95 °C et 8 paramètres à 30 °C. Les données expérimentales étant limitées, la détermination de davantage de paramètres n'était pas recommandée (Van Boekel, 2009). L'identification des paramètres dans le cadre des folates est contrainte par les données expérimentales (8 cinétiques expérimentales et 4 à 5 temps par cinétique, soit 104 points au total). Cette contrainte (faible degré de liberté) conduit à l'identification de paramètres dont les écarts-types sont très faibles. La limite d'identification est la même pour les alpha-galactosides, dont le modèle comportait jusqu'à 3 EDP et 6 EDO, avec l'identification de 8 paramètres pour seulement 6 cinétiques expérimentales et 7 à 8 temps par cinétique (soit 133 points au total). Cela conduit cependant à l'identification de paramètres dont les écart-types sont élevés. Dans le cadre des alpha-galactosides, ces forts écarts-types sont induits notamment par la corrélation plus forte des paramètres entre eux, comparée aux folates.

Les résultats présentés dans le chapitre 3.5 montrent que le transport d'eau implique également des changements structuraux à plus faible échelle. En effet, l'absorption d'eau se réalise également par le micropyle en fonction de la température et de la teneur en eau. De plus l'amidon

et les protéines sont des molécules qui interviennent également dans la capacité d'absorption d'eau. Le modèle actuel ne prend cependant pas en compte l'implication de tous ces éléments complexes, qui nécessiterait un changement d'échelle.

4.4.2. Limite des hypothèses

L'élaboration du modèle et la mise en place des équations mathématiques ont été établies à partir d'hypothèses simplificatrices qui confèrent parfois des limites au modèle.

4.4.2.1. Géométrie des graines de niébé

Afin de diminuer le temps de calcul, les graines ont été représentées par un modèle 2D-axisymétrique, en supposant la largeur et l'épaisseur de même dimension. Cependant, la géométrie de la graine en 3D est visualisable dans la figure 22.

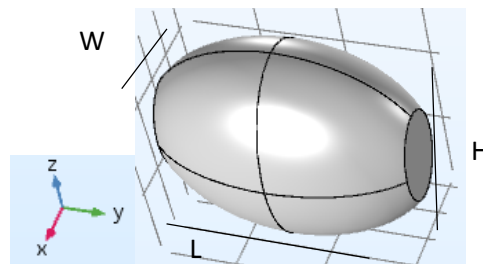


Figure n°22 : Géométrie 3D de la graine de niébé sous COMSOL Multiphysics ($L=8,2 \times 10^{-3} \text{m}$; $W=4,26 \times 10^{-3} \text{m}$; et $H=6,38 \times 10^{-3} \text{m}$)

Cette hypothèse est raisonnable, et permet d'obtenir des résultats similaires à ce qui aurait été obtenu par un modèle 3D (figure 23).

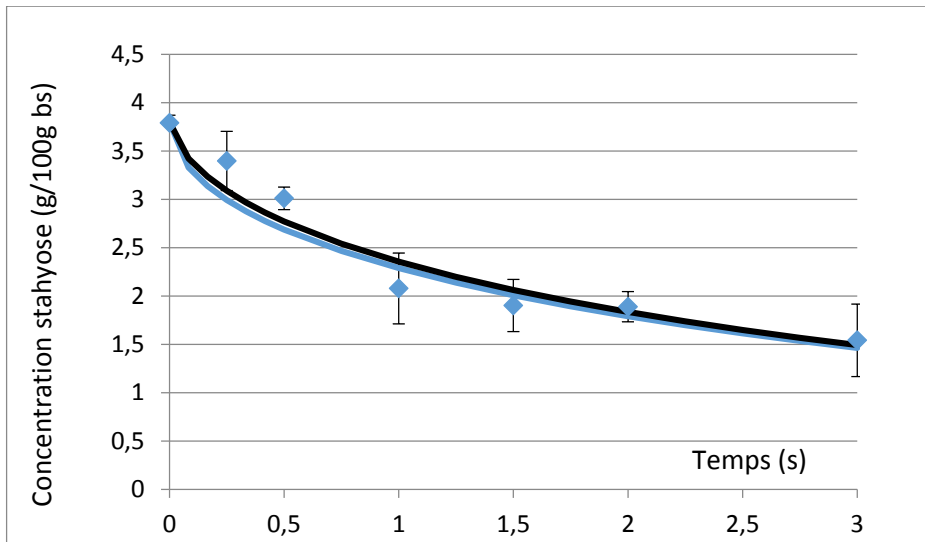


Figure n°23 : Concentration (g/100g bs) en stachyose expérimentale (points) et prédite par un modèle 3D (ligne noire) et 2D axisymétrique (ligne bleue) par une même loi et les mêmes paramètres ($D=4,3 \times 10^{-11}$) dans la graine à 95 °C

4.4.2.2. Structure des graines de niébé

Les graines de niébé ont été représentées par un seul milieu homogène. Cependant (partie 4.1), la graine est composée de différentes structures : le tégument, l'axe embryonnaire et les cotylédons (4.1.1) (Figure 24). Le tégument peut agir comme barrière au transport de l'eau (absorption), des alpha-galactosides et des folates (perte). Le micropyle est une structure qui favorise l'absorption d'eau et peut-être aussi la sortie des alpha-galactosides et des folates hors de la graine. L'axe embryonnaire est plus riche en folates (3.2.3) que les autres parties de la graine et le cotylédon est enrichi en amidon. Le modèle géométrique simplifié à un seul compartiment homogène est donc loin de la réalité. La représentation des quatre structures distinctes (tégument, micropyle, axe embryonnaire, cotylédon) permettrait de prendre en compte ces différentes observations. De plus, la graine possède un espace de vide entre les deux cotylédons (Figure 24), qui peut se remplir d'eau lors du trempage-cuisson.

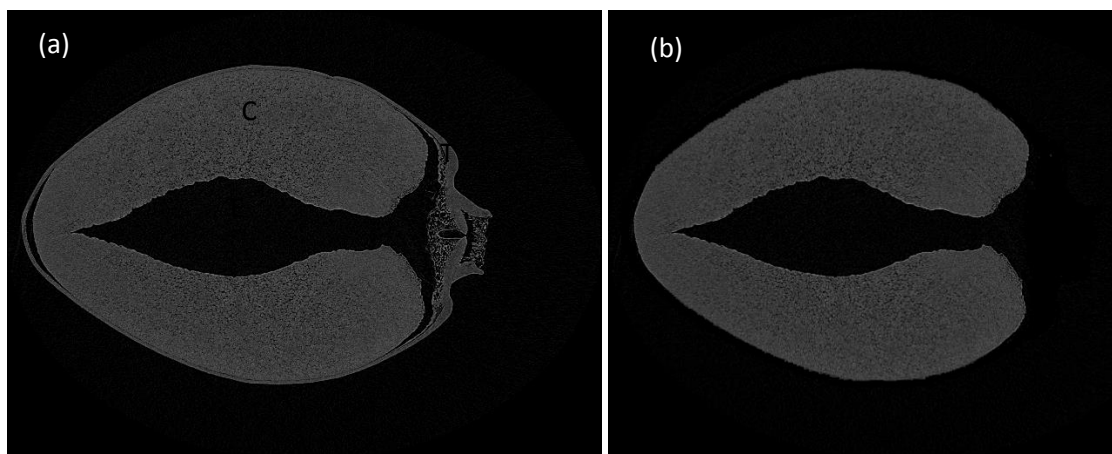


Figure n°24 : μ-tomographie d'une graine de niébé crue entière (a) et décortiquée (b). L'image montre les cotylédons, entourés du tégument (a) ou non (b).

C=cotylédon ; E=espace rempli d'air ; T=tégument

En effet, lorsque les graines de niébé sont décortiquées, la teneur en eau maximale diminue à 60 °C (absorption par le tégument + le micropyle), ceci étant probablement dû au continuum de l'espace avec le milieu de trempage (Figure 25 et 24 (b)). Cependant, à 95°C (absorption par le tégument), la teneur en eau maximale ainsi que la vitesse d'absorption sont plus importantes, ceci étant probablement dû à l'absence de barrière du tégument et à la perte de structure de la graine (elle devient de la bouillie).

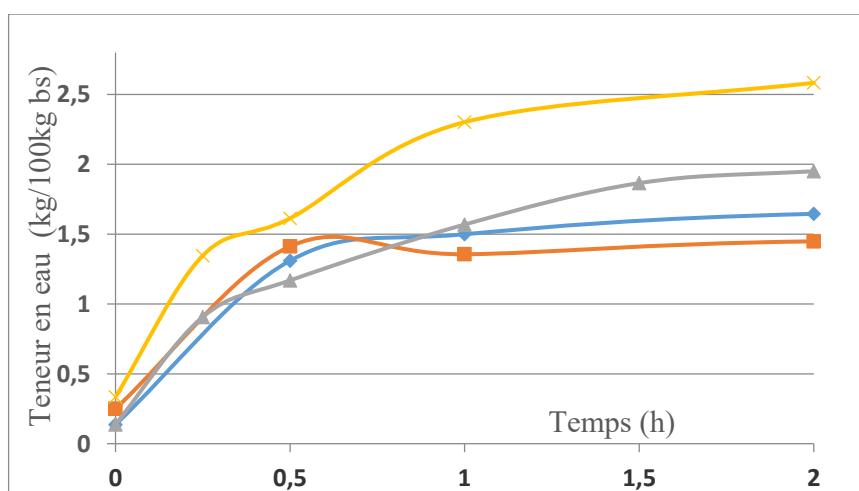


Figure n°25 : Cinétique de teneur en eau (kg/100kg bs) de graine de niébé entière à 60 °C (bleu), décortiquée à 60 °C (orange), entière à 95 °C (gris) et décortiquée à 95 °C (jaune) dans un ratio graine/eau de 1 :4

Ces résultats montrent que la graine ne peut pas être représentée par un seul compartiment homogène. En effet, le tégument et l'espace intercotylédonnaire rempli d'air peuvent interférer sur l'absorption d'eau de la graine. De plus, si le tégument impacte le transfert d'eau, il interfère probablement aussi sur le transfert des alpha-galactosides et des folates (comme barrière). Ainsi les mécanismes impliqués dans ces transferts pourraient être modélisés de manière différente dans le tégument et l'embryon, par exemple avec l'addition d'une résistance aux transferts à l'interface eau/graine.

4.4.2.3. Isotropie du milieu

Le modèle suppose une isotropie de distribution des molécules d'alpha-galactosides et de folates. Or, il a été discuté préalablement (4.1) que ce n'est probablement pas le cas (Hoppner and Lampi, 1993 ; Gambonnet et al., 2001; Sreerama et al., 2010). Cependant, étant donné la difficulté à connaître les concentrations locales de ces molécules, les teneurs initiales ont été supposées homogènes dans la graine. Cette simplification peut notamment impacter le transfert de matière et donc les valeurs des diffusivités apparentes identifiées par des biais dans l'estimation des gradients. De plus, la graine possède une structure compartimentée pluricellulaire, dont chaque cellule comporte différents organites (mitochondrie, vacuole etc) pouvant contenir ces molécules (Obendorf and Gorecki, 2012; Scott et al., 2000). Le transport de ces molécules peut différer selon qu'il se déroule dans le cytosol, à travers la paroi cellulaire ou dans le milieu intercellulaire.

Aussi, par simplification, l'absorption d'eau par la graine a été supposée isotrope sur toute la surface du tégument. Or, nous savons qu'en réalité la partie comprenant le micropyle absorbe davantage d'eau que le reste du tégument (chapitre 3.5). De plus, il est possible que des fissures apparaissent dans le tégument lors de la cuisson, générant ainsi des zones privilégiées d'absorption de l'eau et de transfert de matière, ce qui n'est pas non plus intégré actuellement dans le modèle.

4.4.2.4. Absence de déformation

La prise d'eau par la graine au cours du trempage-cuisson s'accompagne d'un gonflement de la graine. Ce gonflement d'eau est notamment dû au gonflement des granules d'amidon. Le gonflement de la graine a certes été observé expérimentalement, mais n'a cependant pas été implémenté dans le modèle. Cette simplification peut impacter le transfert de matière et les valeurs de diffusivités apparentes obtenues (biais sur les gradients). En effet, les dimensions étant sous-estimées dans notre modèle, les facteurs de diffusivités apparentes en sont également sous-estimés.

La déformation de la graine lors de la cuisson a déjà été modélisée par transformée d'Euler-Lagrange sur le grain de riz lors de la cuisson (Briffaz et al., 2014) ou lors de la déshydratation de produit carné (Bohuon, 1995) et des gels de gélatine (Broyart et al., 2007). Nous pourrions utiliser ce genre d'approche pour considérer la déformation dans le modèle.

4.4.2.5. Méthode d'identification des paramètres

L'identification des paramètres a été réalisée en minimisant le déterminant de la matrice de covariance, ce qui a permis de minimiser la corrélation des paramètres entre eux. Cette méthode est adaptée lorsque le nombre de paramètres à identifier est important (Van Boekel, 2009). La méthode a ainsi permis d'identifier correctement les différents paramètres liés aux mécanismes de transfert et de réactions des alpha-galactosides et folates.

4.5. Comment construire un procédé optimal de trempage/cuisson

Le procédé de trempage-cuisson des légumineuses a un impact important sur les teneurs en alpha-galactosides et folates et donc sur la valeur (anti)nutritionnelle de la graine. Le but est de déterminer les paramètres opératoires optimaux de trempage et de cuisson permettant de réduire la teneur des alpha-galactosides, tout en conservant la teneur en folates.

4.5.1. Une teneur en alpha-galactosides acceptable

Les alpha-galactosides sont des molécules, qui à forte dose, sont en partie responsables des problèmes de flatulence et de désordres intestinaux chez l'homme. Cependant, ces molécules, à faible dose ont également des effets bénéfiques sur l'organisme, tels que des effets probiotiques (Martínez-Villaluenga et al., 2008). Lomer., (2015) indique qu'une réduction de la teneur en alpha-galactosides suffirait à faire disparaître les effets néfastes de la molécule, mais n'indique pas à quelle valeur se situe ce seuil. Halmos et al., (2014) indiquent que les personnes intolérantes doivent consommer moins de 0,5 g de sucres fermentescibles par jour. Cependant, le seuil de consommation chez une personne ne souffrant pas d'intolérance n'est, à notre connaissance, pas estimé.

4.5.2. Une teneur en folate recommandée

L'apport journalier recommandé en folates est de 120-300 µg pour un enfant, de 300 µg pour un adulte et de 400 µg pour une femme enceinte (acide folique) (Krawinkel et al., 2014). Cependant la biodisponibilité des folates est limitée et considérée de 50 % dans une matrice alimentaire (Sauberlich et al., 1987). De même, les formes polyglutamates (majoritaires dans la

matrice alimentaire) ont une biodisponibilité 33 % inférieure à celle des monoglutamates (Wei et al., 1996). En effet, les formes polyglutamates contenues dans les matrices alimentaires sont hydrolysées en monoglutamates grâce à l'action d'une conjugase lors de la digestion. Les formes monoglutamates se lient alors à des protéines spécifiques des folates, puis sont absorbées par transport actif ou par diffusion passive. Il est à noter que toutes les formes monoglutamates sont interconverties en 5-CH₃-H₄folate, unique forme retrouvée dans le sang. Ainsi, la biodisponibilité des folates dépend : (i) de la libération des folates de la matrice alimentaire (ii) de l'absorption par la muqueuse intestinale (iii) de la déconjugaison par la conjugase s'ils sont sous forme polyglutamates (iv) du transport actif (v) et/ou de la diffusion passive (vi) de la conversion en 5-méthyltétrahydrofolate (vii) et de la libération dans le plasma sanguin (Scott et al., 2000). L'amélioration de cette biodisponibilité en facilitant la libération de la matrice alimentaire ou en assimilant des formes monoglutamates méthylées serait donc un avantage.

4.5.3. Choix du couple (*t*, *T*) au cours du procédé de trempage-cuisson

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont montré que la température et la durée des opérations pouvaient impacter fortement la teneur en alpha-galactosides et en folates. D'autres études ont montré l'impact des procédés sur les teneurs en alpha-galactosides (Onigbinde and Akinyele, 1983; Ibrahim et al., 2002; Nnanna and Phillips, 1988) et en folates (Hefni and Witthöft, 2014; Hoppner and Lampi, 1993; Xue et al., 2011). Cependant, ces auteurs n'ont pas identifié les mécanismes liés à ces pertes. Dans notre étude, cette connaissance des mécanismes permet donc de proposer des recommandations.

La cuisson à température élevée (90 °C-100 °C) est nécessaire pour obtenir une graine consommable cuite (moelleuse). Cette étape de cuisson permet notamment la gélatinisation de l'amidon, qui s'opère dans le cas du niébé entre 68 °C et 90 °C. La cuisson à ces niveaux de température, permet d'éliminer de manière importante les alpha-galactosides par transfert dans l'eau de trempage. Cependant, cela va également générer pour les folates des pertes conséquentes par transfert et par oxydation. Nous avons montré qu'un trempage préalable à la cuisson permettrait de diminuer la teneur en alpha-galactosides par dégradation enzymatique et d'augmenter la biodisponibilité des folates en interconvertissant les vitamères en 5-CH₃-H₄folate. De plus cette étape de trempage permettrait de réduire le temps de cuisson, et donc d'éviter de trop grandes pertes en folates.

Si le trempage est réalisé à 30 °C, (testé dans le chapitre 3.1 et 3.3) pendant une nuit, comme cela est couramment effectué au Bénin (12 h), le temps de cuisson peut être alors abaissé à 25 min (Madodé et al., 2013). Avec un ratio graine-eau de 1 :4 (m/m, celui de notre étude) et à pH 6.5 (celui de notre étude), la perte prédite en alpha-galactosides et en folates à la suite d'un tel procédé serait de 40,9 % et 49,3 % respectivement. La consommation en alpha-galactosides et en folates serait alors de 2,8 g/100g (bs) et de 212,8 µg/100g (bs) respectivement. Ainsi, la consommation de 100 g de niébé cru (soit environ 160 g après cuisson) pourrait donc remplir 70,9 % des besoins journaliers en folates. Cependant, la meilleure biodisponibilité du 5-CH₃-H₄folate pourrait augmenter l'assimilation réelle de ces folates. Pour améliorer davantage cette consommation en folates, un trempage et une cuisson dans une quantité d'eau plus limitante (ratio graine-eau plus élevé) pourrait diminuer les pertes en ces deux molécules. Ce test a été réalisé dans le chapitre 3.1 sur les alpha-galactosides et a montré que la perte par transfert était 2,3 fois moins importante. La perte finale en alpha-galactosides était de 17,2 %. Si ce même ratio de différence de perte (2,3) était appliqué aux folates lors d'une cuisson, sachant que la perte lors du trempage à 30 °C en eau limitante est connue (chapitre 3.4), la perte prédite finale en folates serait de 26,7 %. Ainsi, la consommation de 100 g de niébé (bs) pourrait remplir les besoins journaliers en folates.

La réalisation d'un trempage suivi d'une cuisson en eau limitante, ne permet pas d'éliminer beaucoup d'alpha-galactosides. Cependant, l'étude présentée au chapitre 3.2 montre que la température et le pH peuvent être adaptés afin d'optimiser la dégradation enzymatique des alpha-galactosides. En effet, l'étude a montré qu'un trempage de 12 h effectué à 35 °C, plutôt que 30 °C permettrait d'obtenir une activité cumulée 25,6 % de fois plus grande. Cependant, l'étude a également montré, une phase de latence de 10 h. En conséquence, après 12 h de trempage, l'effet de l'enzyme n'aura été que de deux heures seulement. Pour améliorer son action, le trempage doit être prolongé. De plus, un pH de 5,8 (proche du pH optimal de l'alpha-galactosidase,) plutôt que 6,5 permettrait d'avoir une activité enzymatique 31,7 % de fois plus importante. Il est à noter que l'effet de ce changement de pH et de température sur le comportement des folates doit être vérifié.

Ainsi, pour réduire la teneur en alpha-galactosides tout en conservant la teneur en folates, il est conseillé d'effectuer un trempage long (au moins 12 h) à 35 °C, pH=5,8, suivi d'une cuisson à 95 °C pendant 25 minutes en quantité d'eau limitante (ratio eau-graine de 1 :1 (m/m)). Ces valeurs de paramètres sont envisageables en contexte domestique, notamment en Afrique. Cela est également favorable économiquement, le trempage permettant de consommer moins d'énergie. De plus, cette étape de trempage répond également aux besoins des transformatrices traditionnelles

africaines (inconfort lié à leur surexposition à un foyer de chaleur). Cependant, un trempage long implique un temps plus long de préparation, qui peut toutefois se dérouler la nuit pour éviter les pertes de temps.

4.5.4. La germination

L'impact de la germination sur la teneur en folates a été montré dans le chapitre 3.4. Les résultats ont mis en exergue la production de folates, et plus particulièrement du 5-CH₃-H₄folate après 48 h de germination. Après 4 jours de germination, la teneur en folates a doublé. Une pré-étape de germination (même condition que le trempage, mais en quantité d'eau limitante) à la place de l'étape de trempage à proprement parlé permettrait de maximiser la consommation en folates.

L'impact d'une telle opération de germination sur la teneur en alpha-galactosides n'a pas été mesuré. Cependant, la corrélation entre la germination et l'activité de l'alpha-galactosidase a été démontrée dans le chapitre 3.4. Ainsi, une pré-étape de germination pourrait également induire une perte notable en alpha-galactosides. En effet, Ologhobo and Fetuga (1986) ont montré qu'une germination de 96 h à température ambiante pouvait entraîner la perte de plus de 70 % des alpha-galactosides contenus dans la graine de niébé. De la même façon, Akinlosotu and Akinyele (1991) ont montré qu'une germination de 48 h pouvait éliminer l'intégralité des alpha-galactosides contenus dans le niébé. La germination pourrait donc être un élément clé pour réduire la teneur en facteurs antinutritionnels, tout en maximisant la teneur en micronutriments dont les vitamines. Cependant, pour des raisons sanitaires, la germination ne peut être réalisée qu'en milieu contrôlé. Une telle solution n'est donc pas envisageable en contexte domestique, mais plutôt en milieu industriel. Il est à noter également, qu'une germination est très chronophage. De plus, il est à souligner que les graines de niébé germées génèrent une aversion auprès des consommateurs, probablement pour des raisons organoleptiques et de risques sanitaires.

4.5.5. Application aux autres légumineuses

Le procédé de trempage-cuisson a été étudié sur le niébé pour mieux comprendre les mécanismes impactant les teneurs en alpha-galactosides et en folates. Cependant, de nombreuses légumineuses possèdent une composition similaire à celle du niébé, et nécessitent un procédé de trempage-cuisson similaire à celui du niébé. Notamment, Abdel-Gawad (1993), Frias et al. (2000) et El-Adawy (2002) ont montré qu'un trempage-cuisson des lentilles, pois-chiche, haricot et fève entraînait des pertes en alpha-galactosides semblables à celles observées chez le niébé. De même,

Hefni and Witthöft (2014), Hoppner and Lampi (1993) et Dang et al. (2000) ont trouvé des pertes en folates dans différentes légumineuses (lentille, pois chiche, pois etc) du même ordre de grandeur que celles retrouvées pour le niébé.

Les mécanismes impliqués dans ces pertes peuvent être similaires pour les différentes légumineuses à ce qui a été montré dans cette étude pour le niébé. Les mêmes expériences peuvent alors être réalisées sur ces autres légumineuses, afin de vérifier si le modèle établi avec le niébé est généralisable aux légumineuses. La lourdeur expérimentale sera cependant moindre, le transfert des molécules étant similaire, mais dépendant de la taille des graines et les optimum de fonctionnalité des enzymes (T, pH) étant similaires, mais avec un potentiel d'activité différent.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'analyse bibliographique a montré que l'impact des opérations de germination, trempage et cuisson sur la teneur en alpha-galactosides et en folates des légumineuses a été largement décrit. Les pertes en alpha-galactosides induites lors du trempage-cuisson sont susceptibles de diminuer les problèmes de flatulence, lors de la digestion des légumineuses. En revanche, des pertes en folates indésirables, sont aussi induites lors du procédé de trempage-cuisson. Les efforts de recherche ont été réalisés par les pays du Nord et pour les légumineuses des pays du Nord. Les résultats sont surtout qualitatifs avec très peu de démarche de modélisation pour découpler les processus de transfert et de réactions de ces deux familles de molécules. Par ailleurs, peu d'études scientifiques existent sur les légumineuses spécifiques aux pays du Sud, telle que le niébé, pourtant très consommé dans les pays d'Afrique de l'ouest. S'appuyant sur ce constat, notre travail a consisté à comprendre et à modéliser les mécanismes de pertes ou de gains en alpha-galactosides et en folates du niébé lors du procédé de trempage-cuisson et de la germination. L'ambition était de pouvoir prodiguer des conseils sur la conduite du procédé : le prétraitement, et les conditions de trempage-cuisson (temps, température, pH) afin de minimiser la teneur en alpha-galactosides, tout en conservant la teneur en folates. Pour se faire, quatre démarches ont été menées à bien :

- Mettre au point une étude cytohistologique permettant de mieux connaître la structure de la graine de niébé, sa composition et son évolution lors du procédé de trempage-cuisson
- Décrire les mécanismes physiques et physiologiques associés aux phénomènes de transfert d'eau durant le procédé de trempage-cuisson
- Mettre au point une stratégie expérimentale et de modélisation permettant de comprendre, décrire et découpler les phénomènes de transfert et de réactions (thermique, enzymatique) mis en jeu sur les alpha-galactosides et les folates lors du procédé de trempage-cuisson/germination du niébé.
- Identifier des stratégies de prétraitements et de conduite du procédé de trempage-cuisson permettant de cuire la graine, tout en maximisant la perte en alpha-galactosides et en minimisant la perte en folates.

Ainsi, les graines de niébé sont formées d'un tégument et d'un embryon. Le tégument est hétérogène et présente une structure particulière appelée hile, à l'extrémité duquel se situe le

micropyle. L'embryon est formé d'un axe embryonnaire riche en protéines et de deux cotylédons riches en amidon et en protéines.

Dans un premier temps, l'absorption de l'eau par la graine a été modélisée par une loi de Fick et présente des diffusivités apparentes de $1,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $8,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $4,3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 30 °C, 60 °C et 95 °C respectivement. Cependant, l'étude cytohistologique a montré que l'absorption d'eau n'est pas exclusivement passive à travers le tégument, mais aussi active par le micropyle, qui s'ouvre au cours d'un trempage à des températures inférieures à 60 °C. Cette intervention du micropyle explique alors la surestimation de la diffusivité apparente obtenue à 60 °C comparée à 95 °C dans le premier modèle.

Une cuisson à 95 °C ou un trempage à 60 °C induisent de fortes pertes en raffinose, stachyose et verbascose, tandis qu'un trempage à 30 °C induit seulement de faibles pertes en stachyose. Ainsi les pertes en alpha-galactosides à température élevées (60 °C et 95 °C) sont dues à des mécanismes de transfert (modélisés par une loi de Fick), tandis que les pertes observées à faible température sont essentiellement dues à de l'hydrolyse enzymatique par l'alpha-galactosidase (modélisée par une loi d'ordre 1). L'étude de l'alpha-galactosidase de niébé a révélé une activité optimale à 35 °C pour un pH de 5,8. L'action de l'alpha-galactosidase sur les alpha-galactosides a mis en exergue une phase de latence de 10 h, qui s'achève lorsque la graine entre en germination. Cette phase de latence est expliquée d'une part par la présence d'inhibiteurs tels que le galactose, d'autre part, par un pH basique et enfin par la possible bio-synthèse des alpha-galactosides par l'action d'autres enzymes. L'hydrolyse de chaque alpha-galactoside a été modélisée par une loi de Michaelis-Menten, qui a alors permis de déterminer les constantes Michaeliennes. De la même façon que pour les alpha-galactosides, une cuisson à 95 °C ou un trempage à 60 °C induisent de fortes pertes en folates, par des mécanismes de transfert (loi de Fick) et d'oxydation (réaction d'ordre 1). Lors d'un trempage à 30 °C, le transfert des folates est très faible, cependant les formes PteGlu, 10-CHO-PteGlu, 5-CHO-H₄folate sont fortement interconverties en 5-CH₃-H₄folate par l'action de diverses enzymes (représentées par des réactions d'ordre 1). Cette interconversion a également été observée lors de l'opération de germination. De plus, après 48 h de germination, il apparaît une forte production en folate et plus particulièrement en 5-CH₃-H₄folate. Cette production permet de doubler la teneur en folate après 4 jours de germination. À la fois pour les alpha-galactosides et les folates, les résultats ont montré des diffusivités apparentes qui sont plus de 100 fois plus grandes à 60 °C et 95 °C qu'à 30 °C. En effet, un trempage à 30 °C n'endommage pas les

parois des cellules parenchymateuses, tandis qu'un traitement à 60 °C ou 95 °C altère fortement les parois cellulaires, permettant alors la libération de matériel dans l'espace intercellulaire. Cette déstructuration de la paroi est due à la β -élimination.

L'ensemble de ces résultats et des modèles a permis de proposer diverses solutions pour améliorer la dégradation des alpha-galactosides tout en conservant une teneur en folate acceptable. En effet, un trempage long à 35 °C permettrait de maximiser la dégradation enzymatique des alpha-galactosides et d'interconvertir les folates en 5-CH₃-H₄folate, forme la plus biodisponible pour l'homme. Cette étape de trempage permet de réduire l'étape de cuisson, et donc de réduire les pertes en folates générées par la cuisson. La réalisation d'une germination comme prétraitement semble générer tous les effets souhaités en permettant la production de folates et en réduisant de manière drastique la teneur en alpha-galactosides.

Perspectives

L'impact de la germination sur la teneur en alpha-galactosides, bien que décrite dans la littérature, n'a pas été confirmé sur cette variété de niébé. Il serait donc intéressant d'approfondir ce point, pour proposer une étape de germination de manière plus précise. De plus, le modèle réalisé prend en compte les mécanismes de transfert et de dégradation enzymatique, mais pourrait intégrer également l'évolution de la structure du niébé. Il serait intéressant de générer à partir de ces modèles un simulateur qui pourrait proposer des solutions de trempage-cuisson ou prétraitements idéales en fonction de critères de désirabilité établis. Ce simulateur pourrait alors infirmer ou confirmer les conseils qui ont été prodigués.

Enfin, cette étude a porté sur le niébé, mais la littérature montre des comportements similaires pour d'autres légumineuses tels que le pois chiche, la lentille ou le haricot. L'élaboration d'un plan de manipulation similaire à celui du niébé, mais allégé pourrait permettre de vérifier la potentielle généralité des modèles établis sur le niébé.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- Abdel-Gawad, A.S., 1993. Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. *Food Chemistry* 46, 25–31.
- Achigan-Dako, E.G., N'Danikou, S., Assogba-Komlan, F., Ambrose-Oji, B., Ahanchede, A., Pasquini, M.W., 2011. Diversity, geographical, and consumption patterns of traditional vegetables in sociolinguistic communities in Benin: Implications for domestication and utilization. *Economic Botany* 65, 129.
- AFNOR, 2014. NF EN ISO 20483 - Céréales et légumineuses - Détermination de la teneur en azote et calcul de la teneur en protéines brutes - Méthode de Kjeldahl.
- AFNOR, 1988. NF V03-66_ Amidons et féculés natifs. Dosage de l'amidon. Méthode enzymatique.
- Ajeigbe, H.A., Ihedioha, D., Chikoye, D., 2008. Variation in physico-chemical properties of seed of selected improved varieties of Cowpea as it relates to industrial utilization of the crop. *African Journal of Biotechnology*.
- Akibode, S., Maredia, M., 2011. Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops.
- Akinlosotu, A., Akinyele, I.O., 1991. The effect of germination on the oligosaccharide and nutrient content of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Food chemistry* 39, 157–165.
- Akinyele, I.O., Akinlosotu, A., 1991. Effect of soaking, dehulling and fermentation on the oligosaccharides and nutrient content of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Food chemistry* 41, 43–53.
- Alani, S.R., Smith, D.M., Markakis, P., 1990. Changes in alpha-galactosidase activity and oligosaccharides during germination and incubation of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Food Chemistry* 38, 153–158.
- Alani, S.R., Smith, D.M., Markakis, P., 1989. α -Galactosidases of *Vigna unguiculata*. *Phytochemistry* 28, 2047–2051. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97918-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97918-4)
- Alonso, R., Aguirre, A., 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 chemistry* 68, 159–165.

- Antova, G.A., Stoilova, T.D., Ivanova, M.M., 2014. Proximate and lipid composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivated in Bulgaria. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.12.005>
- AOAC, 2003. AOAC Official Method 2003.058 Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages.
- Arcot, J., Shrestha, A., 2005. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 16, 253–266.
- Baks, T., Bruins, M.E., Janssen, A.E.M., Boom, R.M., 2008. Effect of Pressure and Temperature on the Gelatinization of Starch at Various Starch Concentrations. *Biomacromolecules* 9, 296–304. <https://doi.org/10.1021/bm700814a>
- Belitz H.D., Grosch W., 1999. *Food Chemistry*, Springer. ed. Germany.
- Bello, M.O., Tolaba, M.P., Suarez, C., 2007. Water absorption and starch gelatinization in whole rice grain during soaking. *LWT-Food science and Technology* 40, 313–318.
- Bernal-Lugo, I., Parra, C., Portilla, M., Peña-Valdivia, C.B., Moreno, E., 1997. Cotyledon thermal behavior and pectic solubility as related to cooking quality in common beans. *Plant foods for human nutrition* 50, 141–150.
- Bhaskar, B., Ramachandra, G., Virupaksha, T.K., 1990. Alpha-galactosidase of germinating seeds of *Cassia Sericea* SW. *Journal of Food Biochemistry* 14, 45–59.
- Blaszczak, W., Doblado, R., Frias, J., Vidal-Valverde, C., Sadowska, J., Fornal, J., 2007. Microstructural and biochemical changes in raw and germinated cowpea seeds upon high-pressure treatment. *Food research international* 40, 415–423.
- Blöchl, A., Peterbauer, T., Hofmann, J., Richter, A., 2008. Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. *Planta* 228, 99–110.
- Blöchl, A., Peterbauer, T., Richter, A., 2007. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *Journal of plant physiology* 164, 1093–1096.
- Bohuon, P., 1995. Déshydratation-imprégnation par immersion en solutions ternaires: étude des transports d'eau et de solutés sur gel et produits d'origine animale.
- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourié, B., Brouns, F., Bornet, F.R., 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *The American journal of clinical nutrition* 80, 1658–1664.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A., 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food research international* 43, 414–431.

- Briffaz, A., Bohuon, P., Méot, J.-M., Dornier, M., Mestres, C., 2014. Modelling of water transport and swelling associated with starch gelatinization during rice cooking. *Journal of Food Engineering* 121, 143–151.
- Briffaz, A., Mestres, C., Matencio, F., Pons, B., Dornier, M., 2013. Modelling starch phase transitions and water uptake of rice kernels during cooking. *Journal of Cereal Science* 58, 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.08.001>
- Broyart, B., Nourhène, B., Catherine, B., Jean-Dominique, D., 2007. Modelling of moisture and salt transport in gelatine gels during drying at constant temperature. *Journal of food engineering* 81, 657–671.
- Buren, J. van, 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies* 10, 1–23.
- Califano, A.N., Calvelo, A., 1983. Heat and mass transfer during the warm water blanching of potatoes. *Journal of food Science* 48, 220–225.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D., 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food research international* 43, 461–482.
- Chang, R., Schwimmer, S., Burr, H.K., 1977. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *Journal of Food Science* 42, 1098–1101.
- Calloway, D.H., Hickey, C.A., Murphy, E.L., 1971. Reduction of intestinal gas-Forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. *Journal of Food Science* 36, 251–255.
- Clandinin, M.T., Cossins, E.A., 1972. Localization and interconversion of tetrahydropteroylglutamates in isolated pea mitochondria. *Biochemical Journal* 128, 29–40.
- Coffigniez, F., Briffaz, A., Mestres, C., Alter, P., Durand, N., Bohuon, P., 2017. Multi-response modeling of reaction-diffusion to explain alpha-galactoside behavior during the soaking-cooking process in cowpea. *Food Chemistry*.
- Coffigniez, F., Rychlik, M., Sanier, C., Mestres, C., Striegel, L., Bohuon, P., Briffaz, A., 2019. Localisation and modeling of reaction and diffusion to explain folate behavior during the soaking-cooking process in cowpea. *Journal of food engineering*.
- Coffin, J.W., Cossins, E.A., 1986. Mitochondrial folates and methionyl-tRNA transformylase activity during germination and early growth of seeds. *Phytochemistry* 25, 2481–2487.
- Craig, L.C., Pulley, A.O., 1962. Dialysis studies. IV. Preliminary experiments with sugars. *Biochemistry* 1, 89–94.

- Crews, T.E., Peoples, M.B., 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 102, 279–297.
- Dang, J., Arcot, J., Shrestha, A., 2000. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry* 68, 295–298.
- De Boer, J., Aiking, H., 2011. On the merits of plant-based proteins for global food security: Marrying macro and micro perspectives. *Ecological Economics* 70, 1259–1265.
- Delchier, N., Herbig, A.-L., Rychlik, M., Renard, C.M., 2016. Foliates in fruits and vegetables: Contents, processing, and stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 506–528.
- Delchier, N., Reich, M., Renard, C.M., 2012. Impact of cooking methods on folates, ascorbic acid and lutein in green beans (*Phaseolus vulgaris*) and spinach (*Spinacea oleracea*). *LWT-Food Science and Technology* 49, 197–201.
- Delchier, N., Ringling, C., Maingonnat, J.-F., Rychlik, M., Renard, C.M.G.C., 2014. Mechanisms of folate losses during processing: Diffusion vs. heat degradation. *Food Chemistry* 157, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.054>
- Dey, P.M., Campillo, E.M.D., Lezica, R.P., 1983. Characterization of a glycoprotein alpha-galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*). *J. Biol. Chem.* 258, 923–929.
- Dey, P.M., Pridham, J.B., 1969a. Substrate specificity and kinetic properties of α -galactosidases from *Vicia faba*. *Biochemical Journal* 115, 47–54.
- Dey, P.M., Pridham, J.B., 1969b. Purification and properties of α -galactosidases from *Vicia faba* seeds. *Biochemical Journal* 113, 49–55.
- Doeswijk, T.G., Keesman, K.J., 2009. Linear parameter estimation of rational biokinetic functions. *water research* 43, 107–116.
- Dovlo, F.E., Williams, C.E., Zoaka, L., others, 1976. Cowpeas. Home preparation and use in West Africa. International Development Research Centre.
- Drabo, I., Redden, R., Smithson, J.B., Aggarwal, V.D., 1984. Inheritance of seed size in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica* 33, 929–934.
- Ehlers, J.D., Hall, A.E., 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field crops research* 53, 187–204.
- El-Adawy, T.A., 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods for Human Nutrition* 57, 83–97.

- El Maâtaoui, M., Pichot, C., 1999. Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L. *Planta* 208, 345–351.
- FAO, 2018, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Faye, M., DeBoer, J.L., Sène, A., Ndiaye, M., 2002. Identifying cowpea characteristics which command price premiums in Senegalese markets. *Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production* 424–434.
- Fleming, S.E., Sosulski, F.W., Kilara, A., Humbert, E.S., 1974. Viscosity and water absorption characteristics of slurries of sunflower and soybean flours, concentrates and isolates. *Journal of Food Science* 39, 188–192.
- Frias, J., Vidal-Valverde, C., Sotomayor, C., Diaz-Pollan, C., Urbano, G., 2000. Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpeas. *European Food Research and Technology* 210, 340–345.
- Fukuoka, M., Ohta, K., Watanabe, H., 2002. Determination of the terminal extent of starch gelatinization in a limited water system by DSC. *Journal of Food Engineering* 53, 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00137-6)
- Galiotou-Panayotou, M., Kyriakidis, N.B., Margaritis, I., 2008. Phytase–phytate–pectin hypothesis and quality of legumes cooked in calcium solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 355–361.
- Gama-Arachchige, N.S., Baskin, J.M., Geneve, R.L., Baskin, C.C., 2013. Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. *Annals of Botany* 112, 69–84.
- Gambonnet, B., Jabrin, S., Ravel, S., Karan, M., Douce, R., Rébeillé, F., 2001. Folate distribution during higher plant development. *J. Sci. Food Agric.* 81, 835–841. <https://doi.org/10.1002/jsfa.870>
- Gangola, M.P., Jaiswal, S., Khedikar, Y.P., Chibbar, R.N., 2014. A reliable and rapid method for soluble sugars and RFO analysis in chickpea using HPAEC–PAD and its comparison with HPLC–RI. *Food chemistry* 154, 127–133.
- Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver, G., de Giori, G.S., 1999. Hydrolysis of soya milk oligosaccharides by *Bifidobacterium longum* CRL 849. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 208, 57–59.
- Gomez, C., 2004. *COWPEA: Post-Harvest Operations*.

- Gonçalves, A., Goufo, P., Barros, A., Domínguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, E.A., Ferreira, L., Rodrigues, M., 2016. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 2941–2951.
- Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C., Van Der Straeten, D., 2017. Foliates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. *Frontiers in Chemistry* 5.
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* 131, 872–877.
- Halmos, E.P., Power, V.A., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., Muir, J.G., 2014. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 146, 67–75.
- Hankins, C.N., Kindinger, J.I., Shannon, L.M., 1980. Legume α -galactosidase forms devoid of hemagglutinin activity. *Plant physiology* 66, 375–378.
- Hefni, M., Witthöft, C.M., 2014. Folate content in processed legume foods commonly consumed in Egypt. *LWT-Food Science and Technology* 57, 337–343.
- Hefni, M., Witthöft, C.M., 2011. Increasing the folate content in Egyptian baladi bread using germinated wheat flour. *LWT-Food Science and Technology* 44, 706–712.
- Henshaw, F.O., 2008. Varietal differences in physical characteristics and proximate composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *World Journal of Agricultural Sciences* 4, 302–306.
- Hessler, J.P., 1997. The use of Monte Carlo simulations to evaluate kinetic data and analytic approximations. *International journal of chemical kinetics* 29, 803–817.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., Asp, N.-G., 1986. A rapid method for the analysis of starch. *Starch-Stärke* 38, 224–226.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H.J., Liu, Q., 2010. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food research international* 43, 399–413.
- Hoppner, K., Lampi, B., 1993. Folate retention in dried legumes after different methods of meal preparation. *Food Research International* 26, 45–48.
- Horax, R., Hettiatachchy, N., Chen, P., Jalaluddin, M., 2004. Preparation and Characterization of Protein Isolate from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Journal of Food Science*.
- Hung, Y.-C., McWatters, K.H., Phillips, R.D., Chinnan, M.S., 1990. Effects of Pre-decortication Drying Treatment on the Microstructure of Cowpea Products. *Journal of food science* 55, 774–776.

- Ibrahim, S.S., Habiba, R.A., Shatta, A.A., Embaby, H.E., 2002. Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas. *Food/Nahrung* 46, 92–95.
- Intakes, I. of M. (US) S.C. on the S.E. of D.R., 1998. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academies Press (US).
- International Organization for standardization, 1998. ISO 712 :1998_ Cereals and cereal products - Determination of moisture content - Routine reference method [WWW Document]. URL (accessed 4.27.18).
- Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N., Khan, M.S., 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry* 97, 331–335.
- Jägerstad, M., Jastrebova, J., 2013. Occurrence, stability, and determination of formyl folates in foods. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 9758–9768.
- Johansen, H.N., Glitsø, V., Bach Knudsen, K.E., 1996. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1470–1474.
- Kabas, O., Yilmaz, E., Ozmerzi, A., Akinci, I., 2007. Some physical and nutritional properties of cowpea seed (*Vigna sinensis* L.). *Journal of Food Engineering* 79, 1405–1409.
- Kadlec, P., Dostalova, J., Bernaskova, J., Skulinova, M., 2008. Degradation of alpha-galactosides during the germination of grain legume seeds. *Czech Journal of Food Sciences* 26, 99.
- Kaplan, C.P., Tugal, H.B., Baker, A., 1997. Isolation of a cDNA encoding an Arabidopsis galactokinase by functional expression in yeast. *Plant molecular biology* 34, 497–506.
- Kaptso, K.G., Njintang, Y.N., Komnek, A.E., Hounhouigan, J., Scher, J., Mbofung, C.M.F., 2008. Physical properties and rehydration kinetics of two varieties of cowpea (*Vigna unguiculata*) and bambara groundnuts (*Voandzeia subterranea*) seeds. *Journal of Food Engineering* 86, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.09.014>
- Kariluoto, S., Liukkonen, K.-H., Myllymäki, O., Vahteristo, L., Kaukovirta-Norja, A., Piironen, V., 2006. Effect of germination and thermal treatments on folates in rye. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 9522–9528.
- Kashaninejad, M., Maghsoudlou, Y., Rafiee, S., Khomeiri, M., 2007. Study of hydration kinetics and density changes of rice (Tarom Mahali) during hydrothermal processing. *Journal of Food Engineering* 79, 1383–1390.

- Kaymak, F., Kincal, N.S., 1994. Apparent diffusivities of reducing sugars in potato strips blanched in water. *International journal of food science & technology* 29, 63–70.
- Keller, F., Matile, P., 1985. The role of the vacuole in storage and mobilization of stachyose in tubers of *Stachys sieboldii*. *Journal of Plant Physiology* 119, 369–380.
- Kennedy, I.R., Mwandemele, O.D., McWhirter, K.S., 1985. Estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds. *Food chemistry* 17, 85–93.
- Khalid, I.I., Elharadallou, S.B., 2013. Functional Properties of Cowpea (*Vigna Ungiculata* L. Walp), and Lupin (*Lupinus Termis*) Flour and Protein Isolates. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 3. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000234>
- Khattab, R.Y., Arntfield, S.D., 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1113–1118.
- Kincal, N.S., Kaymak, F., 1987. Modelling dry matter losses from carrots during blanching. *Journal of Food Process Engineering* 9, 201–211.
- Kinsella, J.E., 1979. Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil chemists' society* 56, 242–258.
- Kon, S., 1979. Effect of Soaking Temperature on Cooking and Nutritional Quality of Beans. *Journal of Food Science* 44, 1329–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb06432.x>
- Krawinkel, M.B., Strohm, D., Weissenborn, A., Watzl, B., Eichholzer, M., Bärlocher, K., Elmadfa, I., Leschik-Bonnet, E., Hesecker, H., 2014. Revised DA-CH intake recommendations for folate: how much is needed? *European journal of clinical nutrition* 68, 719.
- Kruger, J., Minnis-Ndimba, R., Mtshali, C., Minnaar, A., 2015. Novel in situ evaluation of the role minerals play in the development of the hard-to-cook (HTC) defect of cowpeas and its effect on the in vitro mineral bioaccessibility. *Food chemistry* 174, 365–371.
- Ku, S., Wei, L.S., Steinberg, L.P., Nelson, A.I., Hymowitz, T., 1976. Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybeans. *Journal of Food Science* 42, 361–364.
- Langyintuo, A.S., Lowenberg-DeBoer, J., Faye, M., Lambert, D., Ibro, G., Moussa, B., Kergna, A., Kushwaha, S., Musa, S., Ntoukam, G., 2003. Cowpea supply and demand in West and Central Africa. *Field Crops Research* 82, 215–231.
- Lin, M.J.-Y., Humbert, E.S., Sosulski, F.W., 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science* 39, 368–370.

- Liu, K., Phillips, R.D., McWatters, K.H., 1993. Mechanism of pectin changes during soaking and heating as related to hard-to-cook defect in cowpeas. *Journal of agricultural and food chemistry* 41, 1476–1480.
- Lomer, M.C.E., 2015. The aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 41, 262–275.
- Longe, O.G., 1980. Carbohydrate composition of different varieties of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Food Chemistry* 6, 153–161.
- Lush, W.M., Evans, L.T., 1980. The seed coats of cowpeas and other grain legumes: structure in relation to function. *Field Crops Research* 3, 267–286.
- Madodé, Y.E., 2012. Keeping local foods on the menu: a study on the small-scale processing of cowpea, GVO drukkers & vormgevers B.V., Ponsen & Looijen. ed. The Netherlands.
- Madodé, Y.E., Houssou, P.A., Linnemann, A.R., Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Van Boekel, M. a. J.S., 2011. Preparation, Consumption, and Nutritional Composition of West African Cowpea Dishes. *Ecology of Food and Nutrition* 50, 115–136. <https://doi.org/10.1080/03670244.2011.552371>
- Madodé, Y.E., Nout, M.J.R., Bakker, E.-J., Linnemann, A.R., Hounhouigan, D.J., van Boekel, M.A.J.S., 2013. Enhancing the digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) by traditional processing and fermentation. *Lwt-Food Science and Technology* 54, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.010>
- Magloire, N., 2005. The genetic, morphological and physiological evaluation of african cowpea genotypes.
- Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C., 2008. Alpha-galactosides: antinutritional factors or functional ingredients? *Critical reviews in food science and nutrition* 48, 301–316.
- McKillop, D.J., Pentieva, K., Daly, D., McPartlin, J.M., Hughes, J., Strain, J.J., Scott, J.M., McNulty, H., 2002. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *British Journal of Nutrition* 88, 681–688.
- Meyer, C., 2018. *Dictionnaire des Sciences Animales*.
- Ministère de l’agriculture, de l’élevage et de la pêche, 2016. *Catalogue Béninois des espèces et variétés végétales*.

- Mnkeni, A.P., Beveridge, T., 1983. Thermal Destruction of 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Buffer and Model Food Systems. *Journal of Food Science* 48, 595–599.
- Munyaka, A.W., Verlinde, P., Mukisa, I.M., Oey, I., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2010. Influence of Thermal Processing on Hydrolysis and Stability of Folate Poly- γ -glutamates in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), Carrot (*Daucus carota*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 4230–4240.
- Mwangwela, A.M., Waniska, R.D., Minnaar, A., 2006. Hydrothermal treatments of two cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) varieties: effect of micronisation on physicochemical and structural characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 35–45.
- Nestares, T., Barrionuevo, M., López-Frías, M., Vidal, C., Urbano, G., 2003. Effect of different soaking solutions on nutritive utilization of minerals (calcium, phosphorus, and magnesium) from cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in growing rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 515–520.
- Neuburger, M., Rébeillé, F., Jourdain, A., Nakamura, S., Douce, R., 1996. Mitochondria Are a Major Site for Folate and Thymidylate Synthesis in Plants. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9466–9472.
- Nichols, M.B., Bancal, M.-O., Foley, M.E., Volenec, J.J., 1993. Nonstructural carbohydrates in dormant and afterripened wild oat caryopses. *Physiologia Plantarum* 88, 221–228.
- Nisha, P., Singhal, R.S., Pandit, A.B., 2005. Degradation kinetics of folic acid in cowpea (*Vigna catjang* L.) during cooking. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56, 389–397. <https://doi.org/10.1080/09637480500398876>
- Njoroge, D.M., Kinyanjui, P.K., Chigwedere, C.M., Christiaens, S., Makokha, A.O., Sila, D.N., Hendrickx, M.E., 2016. Mechanistic insight into common bean pectic polysaccharide changes during storage, soaking and thermal treatment in relation to the hard-to-cook defect. *Food Research International* 81, 39–49.
- Njoroge, D.M., Kinyanjui, P.K., Christiaens, S., Shpigelman, A., Makokha, A.O., Sila, D.N., Hendrickx, M.E., 2015. Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. *Food Research International* 76, 105–113.
- Njoroge, D.M., Kinyanjui, P.K., Makokha, A.O., Christiaens, S., Shpigelman, A., Sila, D.N., Hendrickx, M.E., 2014. Extraction and characterization of pectic polysaccharides from

- easy-and hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food research international* 64, 314–322.
- Nnanna, I.A., Phillips, R.D., 1988. Changes in oligosaccharide content, enzyme activities and dry matter during controlled germination of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science* 53, 1782–1786.
- Obendorf, R.L., Gorecki, R.J., 2012. Soluble carbohydrates in legume seeds. *Seed Science Research* 22, 219–242.
- Oey, I., Verlinde, P., Hendrickx, M., Van Loey, A., 2006. Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study. *European Food Research and Technology* 223, 71–77.
- Okechukwu, P.E., Anandha Rao, M., 1996. Kinetics of cowpea starch gelatinization based on granule swelling. *Starch-Stärke* 48, 43–47.
- Ologhobo, A.D., Fetuga, B.L., 1986. Changes in carbohydrate contents of germinating cowpea seeds. *Food chemistry* 20, 117–125.
- Ologhobo, A.D., Fetuga, B.L., 1984. Distribution of phosphorus and phytate in some Nigerian varieties of legumes and some effects of processing. *Journal of Food Science* 49, 199–201.
- Onigbinde, A.O., Akinyele, I.O., 1983. Oligosaccharide content of 20 varieties of cowpeas in Nigeria. *Journal of Food Science* 48, 1250–1251.
- Onyenekwe, P.C., Njoku, G.C., Ameh, D.A., 2000. Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. *Nutrition Research* 20, 349–358.
- Pasquet, R.S., Fotso, M., 1994. Répartition des cultivars de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. du Cameroun: influence du milieu et des facteurs humains. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* 36, 93–143.
- Pedreschi, F., Trivisani, X., Reyes, C., Troncoso, E., Pedreschi, R., 2009. Kinetics of extraction of reducing sugar during blanching of potato slices. *Journal of Food Engineering* 91, 443–447.
- Peterbauer, T., Richter, A., 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11, 185–197.
- Petersen, M.A., 1993. Influence of sous vide processing, steaming and boiling on vitamin retention and sensory quality in broccoli florets. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 197, 375–380.
- Phillips, R.D., McWatters, K.H., Chinnan, M.S., Hung, Y.-C., Beuchat, L.R., Sefa-Dedeh, S., Sakyi-Dawson, E., Ngoddy, P., Nnanyelugo, D., Enwere, J., Komey, N.S., Liu, K., Mensa-

- Wilmot, Y., Nnanna, I.A., Okeke, C., Prinyawiwatkul, W., Saalia, F.K., 2003. Utilization of cowpeas for human food. *Field Crops Research* 82, 193–213. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00038-8)
- Price, K.R., Lewis, J., Wyatt, G.M., Fenwick, G., 1988. Review article Flatulence — Causes, relation to diet and remedies. *Molecular Nutrition & Food Research* 32, 609–626.
- Pridham, J.B., Walter, M.W., Worth, H.G.J., 1969. The metabolism of raffinose and sucrose in germinating broad-bean (*Vicia faba*) seeds. *Journal of Experimental Botany* 20, 317–324.
- Prosky, L., Asp, N.-G., Schweizer, T.F., DeVries, J.W., Furda, I., 1987. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 71, 1017–1023.
- Rakshit, M., Sharma, A., Saha, J., Sarkar, P.K., 2015. Optimization of soaking condition of blackgram to minimize flatogenic sugar content in blackgram-based products. *LWT - Food Science and Technology* 63, 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.026>
- Ratnayake, W.S., Hoover, R., Warkentin, T., 2002. Pea starch: composition, structure and properties—a review. *Starch-Stärke* 54, 217–234.
- Raul, L.G., Ricardo, A.B., Enrique, R.S., 1984. Effect of soaking-blanching conditions on glucose losses in potato slices. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 17, 111–113.
- Rébeillé, F., Ravanel, S., Jabrin, S., Douce, R., Storozhenko, S., Van Der Straeten, D., 2006. Foliates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum* 126, 330–342.
- Réseau National des Chambres d’Agriculture du Niger, 2012. Catalogue national des espèces et variétés végétales, Variétés de niébé /Niger.
- Ringling, C., Rychlik, M., 2017. Simulation of food folate digestion and bioavailability of an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolate. *Nutrients* 9, 969.
- Ringling, C., Rychlik, M., 2012. Analysis of seven folates in food by LC–MS/MS to improve accuracy of total folate data. *European Food Research and Technology* 236, 17–28.
- Robles-Díaz, E., Flores, J., Yáñez-Espinosa, L., 2016. Paths of water entry and structures involved in the breaking of seed dormancy of *Lupinus*. *Journal of plant physiology* 192, 75–80.
- Rucker, R.B., Suttie, J.W., McCormick, D.B., 2001. *Handbook of vitamins*. CRC Press.
- Ruddick, J.E., Vanderstoep, J., Richards, J.F., 1980. Kinetics of thermal degradation of methyltetrahydrofolic acid. *Journal of Food Science* 45, 1019–1022.

- Rychlik, M., Englert, K., Kapfer, S., Kirchhoff, E., 2007. Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.10.006>
- Saini, R.K., Nile, S.H., Keum, Y.-S., 2016. Folates: chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. *Food Research International* 89, 1–13.
- Sandberg, A.-S., 2002. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition* 88, 281–285.
- Sauberlich, H.E., Kretsch, M.J., Skala, J.H., Johnson, H.L., Taylor, P.C., 1987. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *The American journal of clinical nutrition* 46, 1016–1028.
- Schneider, F., 1968. *Technologie des zuckers*. M. Verlag and W. Schaper, Germany.
- Schwaab, M., Pinto, J.C., 2007. Optimum reference temperature for reparameterization of the Arrhenius equation. Part 1: Problems involving one kinetic constant. *Chemical Engineering Science* 62, 2750–2764.
- Scott, J., Rébeillé, F., Fletcher, J., 2000. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 795–824.
- Sefa-Dedeh, S., Stanley, D.W., 1979. The relationship of microstructure of cowpeas to water absorption and dehulling properties. *Cereal Chem* 56, 379–386.
- Sefa-Dedeh, S., Stanley, D.W., Voisey, P.W., 1978. Effects of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science* 43, 1832–1838.
- Sekhar, K.C., DeMason, D.A., 1990. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181, 53–61.
- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G., 2004. Phytate from edible beans: chemistry, processing and health benefits. *Journal of food agriculture and environment* 2, 49–58.
- Shohag, M.J.I., Wei, Y., Yang, X., 2012. Changes of folate and other potential health-promoting phytochemicals in legume seeds as affected by germination. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 9137–9143.
- Sigma-Aldrich, 1997. Sigma quality control test procedure.

- Sopade, P.A., Obekpa, J.A., 1990. Modelling water absorption in soybean, cowpea and peanuts at three temperatures using Peleg's equation. *Journal of food science* 55, 1084–1087.
- Sreerama, Y.N., Neelam, D.A., Sashikala, V.B., Pratape, V.M., 2010. Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 4322–4330.
- Sreerama, Y.N., Sashikala, V.B., Pratape, V.M., Singh, V., 2012. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry* 131, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.008>
- Stadlmayr, B., Charrondiere, U.R., Addy, P., Samb, B., Enujiugha, V.N., Bayili, R.G., Fagbohoun, E.G., Smith, I.F., Thiam, I., Burlingame, B., 2010. Composition of selected foods from West Africa.
- Stanley, D.W., Aguilera, J.M., 1985. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes—The influence of structure and composition. *Journal of Food Biochemistry* 9, 277–323.
- Strandler, H.S., Patring, J., Jägerstad, M., Jastrebova, J., 2015. Challenges in the determination of unsubstituted food folates: impact of stabilities and conversions on analytical results. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 2367–2377.
- Striegel, L., Chebib, S., Rychlik, M., Netzel, M.E., 2018. Improved stable isotope dilution assay for dietary folates using LC-MS/MS and its application to strawberries. *Frontiers in chemistry* 6, 11.
- Swanson, B.G., Hughes, J.S., Rasmussen, H.P., 1985. Seed microstructure: review of water imbibition in legumes. *Food Structure* 4, 14.
- Taiwo, K.A., Akanbi, C., Ajibola, O.O., 1997. The effects of soaking and cooking time on the cooking properties of two cowpea varieties. *Journal of food engineering* 33, 337–346.
- Tang, C.-H., 2008. Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: A comparative study. *LWT - Food Science and Technology*.
- Tharanathan, R.N., Mahadevamma, S., 2003. Grain legumes—a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 14, 507–518.
- Toole, E.H., Toole, V.K., Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., 1955. Interaction of temperature and light in germination of seeds. *Plant Physiology* 30, 473.

- Toro, A.G., Gibert, O., Ricci, J., Dufour, D., Mestres, C., Bohuon, P., 2015. Digestibility prediction of cooked plantain flour as a function of water content and temperature. *Carbohydrate polymers* 118, 257–265.
- Tropical Forages, 2017. *Vigna unguiculata* : http://www.tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/entities/vigna_unguiculata.htm.
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T.C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I., Vandermeer, J., Whitbread, A., 2012. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biological conservation* 151, 53–59.
- Turhan, M., Gunasekaran, S., 2002. Kinetics of in situ and in vitro gelatinization of hard and soft wheat starches during cooking in water. *Journal of Food Engineering* 52, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00058-9)
- Udensi, E.A., Ekwu, F.C., Isinguzo, J.N., 2007. Antinutrient factors of vegetable cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. *Pakistan Journal of Nutrition* 6, 194–197.
- Uedaira, Hisashi, Uedaira, Hatsuho, 1985. Sugar-water interaction from diffusion measurements. *Journal of solution chemistry* 14, 27–34.
- Van Boekel, M. a. J.S., 2009. *Kinetic modeling of reactions in foods*, CRC Press. ed. United States.
- Varriano-Marston, E., Jackson, G.M., 1981. Hard-to-Cook Phenomenon in Beans: Structural Changes During Storage and Imbibition. *Journal of Food Science* 46, 1379–1385.
- Vasconcelos, I.M., Maia, F.M.M., Farias, D.F., Campello, C.C., Carvalho, A.F.U., de Azevedo Moreira, R., de Oliveira, J.T.A., 2010. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 54–60.
- Verlinde, P.H., Oey, I., Lemmens, L., Deborggraeve, W.M., Hendrickx, M.E., Van Loey, A.M., 2010. Influence of Reducing Carbohydrates on (6 S)-5-Methyltetrahydrofolic Acid Degradation during Thermal Treatments. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 6190–6199.
- Viberg, U., Jägerstad, M., Öste, R., Sjöholm, I., 1997. Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. *Food chemistry* 59, 381–386.
- Vukov, K., Senyi, J.M., 1977. Saftgewinnung aus Zuckerruben und Äpfeln durch Gegenstromextraktion. *Zeitschrift für die Zuckerindustrie*.

- Waldron, K.W., Parker, M.L., Smith, A.C., 2003. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 128–146.
- Wei, M.-M., Bailey, L.B., Toth, J.P., Gregory III, J.F., 1996. Bioavailability for humans of deuterium-labeled monoglutamyl and polyglutamyl folates is affected by selected foods. *The Journal of nutrition* 126, 3100–3108.
- Xue, S., Ye, X., Shi, J., Jiang, Y., Liu, D., Chen, J., Shi, A., Kakuda, Y., 2011. Degradation kinetics of folate (5-methyltetrahydrofolate) in navy beans under various processing conditions. *LWT - Food Science and Technology* 44, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.002>
- Yi, J., Njoroge, D.M., Sila, D.N., Kinyanjui, P.K., Christiaens, S., Bi, J., Hendrickx, M.E., 2016. Detailed analysis of seed coat and cotyledon reveals molecular understanding of the hard-to-cook defect of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food chemistry* 210, 481–490.
- Yildirim, A., Öner, M.D., Bayram, M., 2011. Fitting Fick's model to analyze water diffusion into chickpeas during soaking with ultrasound treatment. *Journal of Food Engineering* 104, 134–142.