

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTE DES SCIENCES

\*\*\*\*\*

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

\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE EN SCIENCES  
DE LA VIE

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

CENTER FOR RESEARCH AND  
TRAINING SCHOOL FOR LIFE  
SCIENCE, HEALTH AND  
ENVIRONMENT

\*\*\*\*\*

DOCTORATE TRAINING OF LIFE  
SCIENCE

\*\*\*\*\*

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DES SCIENCES ALIMENTAIRES ET METABOLISME  
LABORATORY OF FOOD SCIENCE AND METABOLISM

INFLUENCE DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LA  
STRUCTURE ET QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-  
CHIMIQUES ET FONCTIONNELLES DES PROTEINES DE  
POIS BAMBARA

THESE

Présentée comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D.

en Biochimie

Spécialité : Science des Aliments et Nutrition

Par :

**NGUI Simon Pierre**

*Maître ès Sciences*

Matricule : 07R710

Sous la co-direction de :

**MUNE MUNE Martin Alain**

*Maître de Conférences*

Université de Maroua

**MINKA Samuel René**

*Maître de Conférences*

Université de Yaoundé I



UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*  
FACULTE DES SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT  
\*\*\*\*\*  
UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE  
\*\*\*\*\*  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*  
FACULTY OF SCIENCE  
\*\*\*\*\*  
CENTER FOR RESEARCH AND  
TRAINING  
IN GRADUATED STUDIES IN LIFE,  
HEALTH AND ENVIRONMENTAL  
\*\*\*\*\*  
RESEARCH DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, **Prof. TCHIEGANG Clergé, Professeur, Prof. KANSCI Germain, Professeur, Prof. TCHANA KOUATCHOUA Angèle, Maître de Conférences et Prof. MOUNDIPA FEWOU Paul, Professeur** respectivement Examineurs et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie, spécialité Science des Aliments et Nutrition, soutenue par **Mr. NGUI Simon Pierre** (Matricule: 07R710) le 29 Juin 2023 à 10h dans la salle de conférences de l'annexe de la Faculté de Sciences de l'université de Yaoundé I sur le thème «**Influence des traitements thermiques sur la structure et quelques propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines de pois Bambara**», attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

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

Fait à Yaoundé le **27 NOV 2023**

Examineurs

*Tchiegang C.*

*[Signature]*

*Dr. TCHANA A.*


*[Signature]*  
*KANSCI*

Président du jury

*[Signature]*  
**Moundipa Fewou Paul**  
Professeur  
Enzymologie - Toxicologie

Le chef de Département

*[Signature]*  
**Paul F. MOUN**  
Professor  
Enzymology & Toxicology

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

## LISTE PROTOCOLAIRE

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 31 OCTOBRE 2022**

### ADMINISTRATION

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** :  
 AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

### 1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	BOUDJEKO Thaddée	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	FOKOU Elie	Professeur	En poste
5	KANSCI Germain	Professeur	En poste
6	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
7	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
8	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste

9	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
10	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
11	ATOHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
12	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
13	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
16	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
18	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
19	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
20	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
21	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
22	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
23	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
24	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste

25	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
26	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
27	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
28	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
29	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
30	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
31	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
32	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
33	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
34	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
35	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
36	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
37	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
38	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Chargée de Cours	En poste
40	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargée de Cours	En poste

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

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste

6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	En poste
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>Chef Service/ MINESUP</i>
16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	ATSAMO Albert Donatien	Maître de Conférences	En poste
21	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Maître de Conférences	En Poste
22	DONFACK Mireille	Maître de Conférences	En poste
23	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Maître de Conférences	En poste

24	ETEME ENAMA Serge	Maître de Conférences	En poste
25	FEUGANG YOUMSSI François	Maître de Conférences	En poste
26	GONWOUO NONO Legrand	Maître de Conférences	En poste
27	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
28	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
29	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
30	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Chargée de Cours	En poste
31	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
32	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
33	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
34	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
35	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
36	LEME BANOCK Lucie	Chargée de Cours	En poste
37	MAHOB Raymond Joseph	Chargée de Cours	En poste
38	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargée de Cours	En poste
39	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
43	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	En poste

44	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
46	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
49	FOKAM Alvine Christelle épouse KEGNE	Assistante	En poste
50	MAPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
51	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste

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

1	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef DAARS /UYII</i>
2	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
11	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
12	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
13	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>



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

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

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	Chef de Département
2	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	Recteur Univ. Ngaoundéré
3	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	Ministre Chargé de Miss.PR
4	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
5	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
6	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	Vice-Doyen Univ. Bamenda
7	NENWA Justin	Professeur	En poste
8	NGAMENI Emmanuel	Professeur	DOYEN FS Univ. Ngaoundéré
9	NGOMO Horace MANGA	Professeur	Vice Chancellor/UB
10	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>CT/ MINPROFF</i>
19	NJOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
21	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste

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

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

1	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
2	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
3	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
4	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste

13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
15	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAMO TONTSA Armelle	Chargée de Cours	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
35	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste

38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste
----	------------------	-----------	----------

### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (23)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste
5	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur/ MINFOPRA</i>
6	AMINO HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
15	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur adjoint ENSET. Ebolowa</i>
16	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
21	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste

22	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
23	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Assistant	En poste

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
7	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
10	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Uté Bertoua</i>

18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargé de Cours	En poste
20	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
22	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
23	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
24	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
25	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
26	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

#### **8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)**

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE/FS/UYI</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste
4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste

9	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
10	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
17	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
19	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
20	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
21	NKOUÉ TONG ABRAHAM	Assistant	En poste
22	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (44)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste



9	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
11	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	BOYOMO Marthe	Maître de Conférences	<i>DA / ENSPY</i>
19	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
20	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
21	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
22	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
25	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Apollinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UIYI</i>
30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste

33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
34	MELI'I Joëlle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	<i>Absente depuis Janvier 2022</i>
37	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
38	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Agnès	Chargée de Cours	En poste
39	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste
41	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
42	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
43	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
44	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

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

1	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA / Uds</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>

9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
12	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département /Uté Maroua</i>
14	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
15	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
17	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel/UYII</i>
20	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
21	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
23	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
24	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
25	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
27	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
28	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
31	MAMDEM TAMTO LIONELLE ESTELLE	Chargée de Cours	En poste

32	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
33	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
34	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
35	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
36	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>CD/ Uté Maroua</i>
37	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
38	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
39	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
40	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
41	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
42	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (00)	16 (11)	15 (05)	00 (00)	<b>40 (16)</b>
BPA	14 (01)	12 (08)	21 (06)	04 (02)	<b>51 (17)</b>
BPV	06 (01)	10(01)	16 (09)	01 (00)	<b>33 (11)</b>
CI	09(01)	14(04)	08 (01)	00 (00)	<b>31 (06)</b>
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	<b>38(09)</b>
IN	02 (00)	02 (00)	12 (01)	06 (00)	<b>22 (01)</b>
MAT	01 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	<b>30 (02)</b>
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	<b>22 (08)</b>
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	<b>43 (06)</b>
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	<b>42(08)</b>
<b>Total</b>	<b>72 (07)</b>	<b>115 (35)</b>	<b>133 (36)</b>	<b>30 (06)</b>	<b>351 (84)</b>
Soit un total de		<b>351 (84) dont :</b>			
-	Professeurs	<b>72 (08)</b>			
-	Maîtres de Conférences	<b>114 (34)</b>			
-	Chargés de Cours	<b>133 (36)</b>			
-	Assistants	<b>32 (07)</b>			
	( ) = Nombre de Femmes	<b>84</b>			

## **DEDICACE**

À

NGO OUNKAK Colette.

NGUI Simon Pierre qui aurait aimé lire ce manuscrit.

NGUI Jessica Maria Kimberly mon rayon de soleil.



## REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'aurait été possible sans la grâce et l'inspiration du Tout-Puissant et l'aide de plusieurs personnes à qui je témoigne mes sincères remerciements :

Ce travail de recherche a été effectué sous la direction des professeurs **MINKA Samuel René** et **MUNE MUNE Martin Alain**

- Au **Pr MINKA Samuel René**, pour avoir toujours su mettre à ma disposition le nécessaire pour que mes travaux ne soient confrontés à aucune difficulté. Son amour du travail bien fait, ses conseils et sa rigueur ont indéniablement et grandement amélioré ce travail.
- Au **Pr MUNE MUNE Martin Alain**, qui n'a ménagé aucun effort tant matériel, moral que financier pour que ce travail puisse tendre vers une excellente œuvre scientifique. Je vous remercie pour votre sacrifice. Pour vos multiples conseils, votre disponibilité aussi bien sur la paillance que lors de la rédaction.
- Au **Chef du Département** de Biochimie et à travers lui, à tous **les enseignants du Département de Biochimie** de l'Université de Yaoundé I pour leurs enseignements et la formation académique reçue.
- Au **Président et honorables membres du jury**, qui malgré leur emploi de temps chargé ont accepté d'évaluer ce travail.
- Au **Dr BAKWO'O Christian** et à Mme **NYOBE Carine** pour leurs multiples conseils et leur disponibilité sur la paillance.
- Aux **Chefs du Centre de Recherche en Alimentation, Sécurité Alimentaire et Nutrition (CRASAN)** de l'**Institut de Recherche Médicale et d'Etude des Plantes Médicinales (IMPM)** : **Dr MEDOUA NAMA Gabriel**, **Dr FANTA YADANG Sabine** et bien d'autre pour leur accueil chaleureux, leurs multiples conseils et leur disponibilité sur la paillance.
- À Messieurs **ACHEGUI Nestor** et **NDANGA Thomas**, du CRASAN, pour leur assistance technique.
- Au **Dr Erasmus Nchuaji Tang** pour son soutien, ses multiples conseils et sa disponibilité sur la rédaction de l'article.

- À mes **camarades de promotion** pour toutes les remarques et tous les échanges que nous avons eus tout au long de notre formation académique.
- À mes amis : **Dr DJOUHOU Michelle, Dr KEUMOUE Rodrigue, Dr KUAGNY Blaise, Dr SIMO Brice, Dr TAKUISSU Guy, Dr TCHINDA Cédric, Mr YOUOVOP Janvier** et à tous les autres. Merci pour toutes ces années et leur soutien moral.
- À mes frères **OUNKAP Tom Rodrigue, NGUI Fils** et sœur **NGUI Lucie Viviane** pour tout l'amour, les conseils et le soutien multiforme.
- Aux familles **LOG NTOMB, LOG BIEM, BAHANAG, NDOOH** pour votre soutien et vos conseils.
- Au **Dr MAKON Thomas Beauregard** pour son soutien, ses multiples conseils et sa contribution scientifique.
- À mon frère et ami **MIWANAG Paul Rodrigue**, Merci pour tous les conseils et soutien.
- À **TOGOLO Thierry, AKONO Brice, Dr BOUNOUGOU Gérald, MIMBOE Christian** et au **groupe des anciens enfants de chœur** de Nsam pour leurs soutiens multiformes et les chaleureux moments passés. Merci pour tout.
- À **toutes les personnes** que j'ai oublié de citer mais qui se reconnaîtront dans ce travail, veuillez accepter mes sincères excuses et toute ma reconnaissance.



## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE PROTOCOLAIRE</b> .....	<b>ii</b>
<b>DEDICACE</b> .....	<b>xxii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>xxv</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>xxx</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xxxii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xxxiii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>xxxiv</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>xxxv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xxxvi</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1. GENERALITES SUR LE POIS BAMBARA</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.1. Origine et taxonomie</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.2. Description et écologie</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.3. Production et distribution</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.4. Utilisations du pois Bambara</b> .....	<b>8</b>
I.1.4.1. Utilisation pour l'alimentation humaine.....	8
I.1.4.2. Autres utilisations .....	9
<b>I.1.5. Structure et composition générale de la graine</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.6. Composition protéique des légumineuses</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.7. Composition en acides aminés des légumineuses</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1.8. Différents niveaux de structuration des protéines</b> .....	<b>13</b>
<b>I.1.9. Classification des protéines</b> .....	<b>15</b>
<b>I.1.10. Caractéristiques protéiques des globulines de légumineuses</b> .....	<b>15</b>
<b>I.1.11. Facteurs impliqués dans la dénaturation des protéines</b> .....	<b>17</b>
<b>I.1.12. Valeur nutritionnelle des graines du pois Bambara</b> .....	<b>18</b>
I.1.12.1. Facteurs nutritionnels .....	18
I.1.12.2. Facteurs antinutritionnels et leurs interactions .....	18
I.1.12.2.1. Interactions protéines - composés phénoliques.....	19

I.1.12.2.2. Interactions protéines - phytates .....	20
I.1.12.2.3. Interactions protéines - oxalates.....	21
I.1.12.2.4. Interactions protéines - inhibiteurs de protéases .....	22
I.1.12.2.5. Facteurs de flatulence .....	22
<b>I.1.13. Effet des traitements traditionnels sur la valeur nutritionnelle .....</b>	<b>23</b>
I.1.13.1. Traitements thermiques .....	23
I.1.13.2. Traitements alcalins .....	24
<b>I.2. LES MATIERES PROTEIQUES VEGETALES (MPV).....</b>	<b>25</b>
<b>I.2.1. Les types de matières protéiques végétales.....</b>	<b>25</b>
I.2.1.1. Farines.....	25
I.2.1.2. Les concentrats protéiques .....	26
I.2.1.3. Les isolats protéiques .....	26
<b>I.2.2. Extraction des protéines de légumineuses .....</b>	<b>27</b>
I.2.2.1. Extraction des protéines solubles dans l'eau et le sel .....	28
I.2.2.2. Précipitation isoélectrique des protéines .....	28
I.2.2.3. Extraction acide.....	28
<b>II.2.3. Facteurs influençant l'extraction des protéines de légumineuses .....</b>	<b>29</b>
I.2.3.1. Effet de la température et du pH .....	29
I.2.3.2. Effet du solvant et de la taille des particules .....	30
<b>I.2.4. Propriétés fonctionnelles des protéines .....</b>	<b>31</b>
I.2.4.1. Solubilité des protéines .....	31
I.2.4.2. Capacité d'absorption d'eau .....	32
I.2.4.3. Capacité d'absorption d'huile .....	33
I.2.4.4. Propriétés moussantes .....	33
I.2.4.5. Propriétés émulsifiantes .....	34
I.2.4.6. Propriétés gélifiantes .....	36
<b>I.2.5. Modification des propriétés fonctionnelles.....</b>	<b>37</b>
I.2.5.1. Modification par les agents physiques .....	37
I.2.5.2. Modification par les agents chimiques.....	38
I.2.5.3. Modifications dues à l'action d'enzymes .....	39
I.2.5.4. Modifications chimiques spécifiques .....	40
<b>I.3. QUELQUES TECHNIQUES D'ETUDES DES STRUCTURES DES PROTEINES .....</b>	<b>41</b>
<b>I.3.1. Le dichroïsme circulaire (DC) .....</b>	<b>42</b>
<b>I.3.2. Spectroscopie de fluorescence .....</b>	<b>43</b>
<b>I.3.3. La calorimétrie différentielle à balayage ou Differential Scanning Calorimetry (DSC).....</b>	<b>44</b>
<b>I.4. METHODES DE SEPARATIONS ET D'IDENTIFICATION DES PROTEINES .....</b>	<b>45</b>
<b>I.4.1. Techniques chromatographiques .....</b>	<b>45</b>
I.4.1.1. Chromatographie par filtration sur gel .....	46
I.4.1.2. Chromatographie d'échange d'ions (CEI) .....	46
<b>I.4.2. Techniques électrophorétiques.....</b>	<b>47</b>
I.4.2.1. Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) .....	47
<b>I.5. DETERMINATION DE LA STRUCTURE D'UNE PROTEINE .....</b>	<b>47</b>

<b>I.5.1. Méthodes expérimentales.....</b>	<b>47</b>
<b>I.5.2. Méthodes de prédictions <i>in silico</i> .....</b>	<b>48</b>
I.5.2.1. Modélisation moléculaire basée sur la structure .....	49
I.5.2.1.1. Méthodes de reconnaissance de repliement « Threading ».....	49
I.5.2.1.2. Méthodes ab initio et de novo.....	49
I.5.2.1.3. Modélisation par homologie .....	50
I.5.2.2. Applications de la modélisation par homologie.....	51
I.5.2.3. Limites de la modélisation .....	51
I.5.2.4. Etapes de la modélisation par homologie.....	52
I.5.2.4.1. Outils de modélisation par homologie .....	52
I.5.2.4.2. Etape de la modélisation par homologie .....	52
<b>I.5.3. Evaluation des méthodes et des modèles .....</b>	<b>53</b>
<b>II.1. MATERIEL VEGETAL.....</b>	<b>56</b>
<b>II.2. METHODES.....</b>	<b>56</b>
<b>II.2.1. Extraction des protéines de pois Bambara et analyse des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.....</b>	<b>58</b>
II.2.1.1. Préparation de la farine .....	60
II.2.1.2. Délipidation de la farine .....	60
II.2.1.3. Préparation de l'isolat protéique .....	62
<b>II.2.2. Analyse compositionnelle .....</b>	<b>65</b>
II.2.2.1. Détermination de la teneur en eau .....	65
II.2.2.2. Détermination de la teneur en cendres .....	65
II.2.2.3. Détermination de la teneur en protéines brutes.....	66
II.2.2.4. Détermination de la teneur en lipides totaux .....	67
II.2.2.5. Extraction des sucres .....	68
II.2.2.6. Détermination de la teneur en sucres totaux .....	69
II.2.2.7. Détermination de la teneur en fibres brutes .....	70
II.2.2.8. Détermination de la teneur en lysine réactive (Hurrell <i>et al.</i> , 1979).....	71
II.2.2.8.1. Colorant fixant Arg + Lys + His (DBA).....	72
II.2.2.8.2. Colorant fixant Arg + His (DBB).....	73
<b>II.2.3. Traitement thermique de l'isolat protéique .....</b>	<b>73</b>
<b>II.2.4. Analyse SDS-PAGE de l'isolat protéique de pois Bambara.....</b>	<b>74</b>
<b>II.2.5. Evaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la farine délipidée et de l'isolat protéique.....</b>	<b>75</b>
<b>II.2.5.1. Hydrophobicité de la farine délipidée et de l'isolat protéique.....</b>	<b>75</b>
II.2.5.2. Capacité d'absorption d'eau .....	76
II.2.5.3. Capacité d'absorption d'huile .....	77
II.2.5.4. Propriétés émulsifiantes (Lawal, 2004) .....	78
<b>II.2.6. Effet des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites.....</b>	<b>79</b>
II.2.6.1. Structure secondaire.....	79
II.2.6.2. Solubilité.....	80
<b>II.2.7. Analyse des changements structuraux de la protéine de l'isolat de pois Bambara suivant un traitement thermique à différents pH par spectroscopie de fluorescence.....</b>	<b>81</b>

II.2.7.1. Préparation des échantillons pour l'analyse de la fluorescence .....	81
II.2.7.2. Fluorescence intrinsèque.....	82
II.2.7.3. Diagramme de phase.....	82
II.2.7.4. Spectres synchrones.....	83
<b>II.2.8. Analyse <i>in silico</i> à pH 7 et aux températures 25 °C, 70 °C et 100 °C.....</b>	<b>83</b>
II.2.8.1. Principe général .....	83
II.2.8.2. Identification des protéines .....	83
II.2.8.3. Construction de la structure tridimensionnelle .....	84
II.2.8.4. Préparation de la protéine .....	84
II.2.8.5. Dynamique moléculaire.....	84
II.2.8.6. Évaluation des modèles .....	85
II.2.8.7. Visualisation .....	85
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>87</b>
<b>III.1. Extraction des protéines de pois Bambara et évaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.....</b>	<b>88</b>
<b>III.1.1. Préparation de la farine .....</b>	<b>88</b>
<b>III.1.2. Rendement de la préparation de l'isolat protéique.....</b>	<b>88</b>
<b>III.2. Analyse compositionnelle de la farine et de l'isolat protéique .....</b>	<b>89</b>
<b>III.2.1. Teneurs en eau.....</b>	<b>89</b>
<b>III.2.2. Teneurs en cendres .....</b>	<b>90</b>
<b>III.2.3. Teneurs en protéines brutes .....</b>	<b>90</b>
<b>III.2.4. Teneurs en lipides totaux .....</b>	<b>91</b>
<b>III.2.5. Fibres alimentaires (NDF) .....</b>	<b>92</b>
<b>III.2.6. Sucres solubles totaux .....</b>	<b>92</b>
<b>III.2.7. Lysine réactive.....</b>	<b>93</b>
<b>III.3. Propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara.....</b>	<b>94</b>
<b>III.3.1. Propriété physico-chimique de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara .....</b>	<b>94</b>
III.3.1.2. L'hydrophobicité .....	94
<b>III.3.2. Propriétés fonctionnelles de la farine délipidée et de l'isolat protéique .....</b>	<b>94</b>
III.3.2.1. Capacité d'absorption d'eau .....	94
III.3.2.2. Capacité d'absorption d'huile.....	96
III.3.2.3. Propriétés émulsifiantes.....	96
<b>III.3.3. Conclusion partielle .....</b>	<b>98</b>
<b>III.4. Effet des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites .....</b>	<b>99</b>
<b>III.4.1. Effet sur les propriétés physico-chimiques .....</b>	<b>99</b>
III.4.1.1. L'hydrophobicité .....	99

<b>III.4.2. Effet sur les propriétés fonctionnelles .....</b>	<b>101</b>
III.4.2.1. Solubilité .....	101
III.4.2.2. Propriétés émulsifiantes.....	102
<b>III.4.3. Effet des traitements thermiques à différents pH sur les structures secondaires des protéines.....</b>	<b>106</b>
<b>III.4.3. Conclusion partielle .....</b>	<b>110</b>
<b>III.5. Analyse des changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à différents pH par spectroscopie de fluorescence et par analyse <i>in silico</i>.</b>	<b>111</b>
<b>III.5.1. Analyse SDS-PAGE de l'isolat protéique de pois Bambara.....</b>	<b>111</b>
<b>III.5.2. Analyse des changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique aux pH 4, 7 et 9 par spectroscopie de fluorescence. ....</b>	<b>112</b>
III.5.2.1. Changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 4.....	113
III.5.2.2. Changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 7.....	119
III.5.2.3. Changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 9.....	125
<b>III.5.3. Analyse <i>in silico</i> des changements structuraux de l'isolat protéique à différentes températures .....</b>	<b>130</b>
III.5.3.1. Identification des protéines.....	130
III.5.3.2. Évaluation des modèles .....	131
III.5.3.3. Caractéristiques de la structure à 70 °C.....	132
III.5.3.4. Caractéristiques de la structure à 100 °C.....	134
<b>III.5.4. Conclusion partielle .....</b>	<b>136</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>140</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>I</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AOAC** : Association of Official Analytical Chemists

**BBP** : Bleu de Bromophénol

**CAE** : Capacité d’Absorption d’Eau

**CAH** : Capacité d’Absorption d’Huile

**CD** : Dichroïsme Circulaire

**CE** : Capacité Emulsifiante

**CRASAN** : Centre de Recherche en Alimentation, Sécurité Alimentaire et Nutrition

**DO** : Densité Optique

**DSC**: Differential Scanning Calorimetry

**FAO** : Food and Agricultural Organization of the United Nations

**FTIR** : Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier

**I–TASSER** : Iterative Threading Assembly Refinement

**IMPM** : Institut de Recherche Médicale et d’Etude des Plantes Médicinales

**KDa** : Kilo Daltons

**LaBSAM** : Laboratoire des Sciences Alimentaire et Métabolisme

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMSD**: Root Mean Square Deviation

**RSL** : Rapport Solide/Liquide

**S** : Coefficient de Sédimentation

**SDS PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**SE** : Stabilité Emulsifiante

**TMS** : Teneur en Matière Sèche

**u.a** : unités arbitraires

**UNICEF**: United Nations International Children’s Emergency Fund

**UniProt**: Universal Protein Resource

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Principaux pays producteurs africains de pois Bambara (Khan <i>et al.</i> , 2021). .....	7
<b>Figure 2</b> : Distribution géographique du pois Bambara au Cameroun (Pasquet et Fotso, 1991). .....	8
<b>Figure 3</b> : Section longitudinale de la graine de légumineuse (Cheftel <i>et al.</i> , 1976a). .....	9
<b>Figure 4</b> : Nomenclature et composition des protéines de réserve du soja .....	17
<b>Figure 5</b> : Réactions des composés phénoliques avec des protéines (Hurrel <i>et al.</i> , 1982). .....	20
<b>Figure 6</b> : Interactions protéines-phytate À pH acide (A) et à pH basique (B) (Graf, 1986). .....	21
<b>Figure 7</b> : Interactions oxalate- $M^x$ - avec protéines. ....	21
<b>Figure 8</b> : Principaux oligosaccharides responsables de la flatulence retrouvés dans le pois Bambara. ....	23
<b>Figure 9</b> : Réactions de formation des produits d'Amadori et de Heyns. ....	24
<b>Figure 10</b> : Equations de formation de la déhydroalanine (DHA) et de la lysinoalanine. ....	25
<b>Figure 11</b> : Principales étapes de la préparation des concentrats et isolats protéiques (Mune Mune <i>et al.</i> , 2011 ; Lqari <i>et al.</i> , 2002 ; Arise <i>et al.</i> , 2017). .....	27
<b>Figure 12</b> : Solubilité des protéines totales de feuilles et des chlorophylles associées aux protéines en fonction du pH (Cuq, 1991). .....	32
<b>Figure 13</b> : Effet de la chaleur sur les résidus de glutamine et d'asparagine (Cuq, 1991). .....	38
<b>Figure 14</b> : Réactions catalysées par la transglutaminase. ....	40
<b>Figure 15</b> : Réaction d'acétylation de la lysine par l'anhydride acétique. ....	41
<b>Figure 16</b> : Réaction de succinylation de la lysine par l'anhydride succinique. ....	41
<b>Figure 17</b> : Spectres DC (UV lointain) spécifiques correspondent aux trois types de structure secondaire des protéines d'après Horton <i>et al.</i> (2000). .....	43
<b>Figure 18</b> : Thermogrammes typiques obtenus suite à la dénaturation thermique d'une petite protéine globulaire en solution (Giri et Pal, 2016). .....	45
<b>Figure 19</b> : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique. ....	46
<b>Figure 20</b> : Logigramme pour étudier la structure des protéines. ....	53
<b>Figure 21</b> : Graines sèches pois Bambara cultivar rouge (photographiées par NGUI Simon Pierre, 2016). .....	56
<b>Figure 22</b> : Schéma général des travaux effectués sur les graines de pois Bambara. ....	57
<b>Figure 23</b> : Extraction des protéines de pois Bambara et évaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles. ....	59
<b>Figure 24</b> : Protocole de délipidation de la farine de pois Bambara (Maguire <i>et al.</i> , 2004). .....	62
<b>Figure 25</b> : Préparation de l'isolat protéique du pois Bambara. ....	64
<b>Figure 26</b> : Principales étapes du dosage de la lysine réactive. ....	72
<b>Figure 27</b> : Traitement thermique de l'isolat protéique de pois Bambara (a) des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, (b) pour la fluorescence. ....	74
<b>Figure 28</b> : Effet des traitements thermiques à différents pH sur l'Hydrophobicité ( $\mu\text{g}$ de BBP lié/g protéines) de l'isolat protéique de pois Bambara. ....	100
<b>Figure 29</b> : Effet des traitements thermiques à différents pH sur la solubilité de l'isolat protéique de pois Bambara. ....	102
<b>Figure 30</b> : Effet des traitements thermiques à différents pH sur la capacité émulsifiante (a) et la stabilité émulsifiante (b) de l'isolat protéique de pois Bambara. ....	105
<b>Figure 31</b> : Effet des traitements thermiques à différents pH sur la structure secondaire de l'isolat protéique de pois Bambara (structures irrégulières (a), hélice $\alpha$ (b), feuillet $\beta$ (c), coudes $\beta$ (d) et agrégats protéiques (e). ....	109
<b>Figure 32</b> : Modèles SDS-PAGE des extraits protéiques du pois Bambara. ....	112

<b>Figure 33</b> : Changements structuraux induits après le traitement thermique à pH 4 sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm. Lors de l'excitation à 274 nm (a) ; 280 nm (b) et 295 nm (c). .....	115
<b>Figure 34</b> : Analyse du diagramme de phase des changements structuraux induits par le traitement thermique à pH 4. ....	116
<b>Figure 35</b> : Spectres synchrones de l'isolat protéique de pois Bambara à $\Delta\lambda$ 15 nm (a) et à $\Delta\lambda$ 60 nm (b) après traitement thermique à pH 4.....	118
<b>Figure 36</b> : Modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline à pH 4.....	119
<b>Figure 37</b> : Changements structuraux induits après traitement thermique à pH 7 sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm. Lors de l'excitation à 274 nm (a) ; 280 nm (b) et 295 nm (c). ....	121
<b>Figure 38</b> : Analyse du diagramme de phase des changements structuraux induits après traitement thermique sur l'isolat protéique à pH 7. ....	122
<b>Figure 39</b> : Spectres synchrones de l'isolat protéique de pois Bambara à $\Delta\lambda$ 15 nm (a) et à $\Delta\lambda$ 60 nm (b) après traitement thermique à pH 7.....	124
<b>Figure 40</b> : Modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline à pH 7.....	125
<b>Figure 41</b> : Changements structuraux induits après traitement thermique à pH 9 sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm. Lors de l'excitation à 274 nm (a) ; 280 nm (b) et 295 nm (c). ....	126
<b>Figure 42</b> : Analyse du diagramme de phase des changements structuraux des protéines de pois Bambara après traitement thermique à pH 9.....	127
<b>Figure 43</b> : Spectres synchrones de l'isolat protéique de pois Bambara à $\Delta\lambda$ 15 nm (a) et à $\Delta\lambda$ 60 nm (b) après traitement thermique à pH 9.....	129
<b>Figure 44</b> : Modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline à pH 9.....	130
<b>Figure 45</b> : Évaluation du RMSD (a) et de la température (b) au cours de la simulation de la structure de la protéine aux températures 70 °C et 100 °C à pH 7. ....	132
<b>Figure 46</b> : Superposition des modèles moléculaires de 7SG3 à 25 °C (bleu) et 70 °C (vert).....	133
<b>Figure 47</b> : Superposition des modèles moléculaires de 7SG3 à 25 °C (bleu) et 100 °C (vert).....	135



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Composition chimique comparée de quelques légumineuses.....	11
<b>Tableau 2 :</b> Compositions en acides aminés de quelques graines légumineuses <sup>1</sup> .....	12
<b>Tableau 3 :</b> Distribution des acides aminés en fonction des caractéristiques de la chaîne latérale dans certaines protéines de légumineuses.....	13
<b>Tableau 4 :</b> Composition nutritionnelle des graines de pois Bambara.....	18
<b>Tableau 5 :</b> Tableau récapitulatif sur les méthodes de prédiction in silico.....	51
<b>Tableau 6 :</b> Correspondance entre les positions et les bandes des pics des liaisons amide I-III avec les différentes structures secondaires des protéines (Goormaghtigh <i>et al.</i> , 2006).....	80
<b>Tableau 7 :</b> Analyse compositionnelle de la farine délipidée et de l'isolat protéique.....	89
<b>Tableau 8 :</b> Quelques paramètres fonctionnels de la farine délipidée et de l'isolat protéique du pois Bambara.....	95
<b>Tableau 9 :</b> Caractéristiques structurales de la viciline de pois Bambara à 25 °C, 70 °C et 100 °C.....	134

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1 :</b> Étallonnage de l'orange 10 .....	I
<b>Annexe 2:</b> Changements structuraux induits par le traitement thermique sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission à 274 nm (a) ; 280 (b) et 295 nm (c), la protéine est équilibrée à 25 °C.....	II
<b>Annexe 3 :</b> Effets du traitement thermique à différents pH sur la structure secondaire de l'isolat protéique de pois Bambara. ....	III
<b>Annexe 4 :</b> Spectres synchrones au $\Delta\lambda$ 15 et 60 nm de l'isolat protéique de pois Bambara aux pH 4, 7 et 9 après traitement thermique. ....	IV
<b>Annexe 5 :</b> Proteines utilisées pour l'analyse <i>in silico</i> et pourcentage de similarités avec la protéine de pois de Bambara. ....	V
<b>Annexe 6:</b> Séquence primaire de la 7SG3 en format FASTA.....	VI
<b>Annexe 7 :</b> Fichier pdb de 7SG3 .....	VII
<b>Annexe 8 :</b> Conditions appliquées pour la minimisation de l'énergie lors de la simulation (Minim.mdp) .....	VIII
<b>Annexe 9 :</b> Conditions appliquées pour équilibrer la température (nvt.mdp) .....	IX
<b>Annexe 10 :</b> Conditions appliquées pour équilibrer la température et la pression (npt.mdp) .....	X
<b>Annexe 11 :</b> Liste de(s) publication(s) .....	XI

## RESUME

Le pois Bambara (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) légumineuse sous utilisée d'origine africaine, peut être considérée comme une matière première importante pour diverses applications industrielles en tant qu'ingrédient nutritionnel et fonctionnel. Le but de ce travail était d'étudier la dynamique moléculaire et fonctionnelle des protéines de pois Bambara en fonction des traitements thermiques. Des graines de pois Bambara, on a extrait des protéines dont les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles ont été évaluées tant sur la farine que sur l'isolat protéique. L'influence des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites a été ensuite étudiée. Et nous avons analysés les changements structuraux des protéines de l'isolat suivant des traitements thermiques aux pH 4, 7 et 9 par spectroscopie de fluorescence et par analyse *in silico*. L'analyse compositionnelle de l'isolat protéique a révélé 81,28 % de protéines et une teneur en lipides de (6,17 %). Le traitement thermique à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique a montré une hydrophobicité plus élevée à pH 4 et plus faible à pH 9. Cependant, le traitement thermique a diminué la solubilité de la protéine aux pH 4 et 7 et l'a augmentée à 100 °C, pH 9. Pour la capacité émulsifiante, elle est plus élevée à 80 °C, pH 9, tandis que la stabilité émulsifiante est plus élevée à pH 4. Le traitement thermique à différents pH sur l'isolat protéique met en évidence des structures secondaires (feuillettes  $\beta$  et hélice  $\alpha$ ) très compactes dans des proportions supérieures à 75 % (à pH 9 et 50 °C). De plus, un déploiement partiel, une dissociation des sous-unités et une agrégation des protéines ont été observés aux différentes valeurs de pH. L'analyse des changements structuraux : d'une part par fluorescence intrinsèque, a mis en évidence un décalage rouge de 5,5 nm lorsque le pH a augmenté de 7 à 9 tandis qu'un décalage bleu de 4,5 nm a été constaté lorsque le pH a diminué de 7 à 4. Le diagramme de phase aux pH 4 et 9 a mis en évidence 2 conformations de la protéine. À pH 7, deux transitions de conformations se sont produites, avec formation d'un intermédiaire suivie d'une dissociation des sous-unités. Les réarrangements structurels ont modifié l'exposition des résidus de Trp et de Tyr, comme observés par l'excitation des spectres synchrones à pH 4. Par ailleurs, l'analyse *in silico* des changements structuraux a révélé une modification structurelle importante de la viciline (dissociation des trimères à 70 °C et repliement des monomères dissociés à 100 °C). En définitive, les isolats protéiques chauffés peuvent servir comme ingrédients fonctionnels dans : les produits laitiers, l'industrie carnée, les boissons et produits de pâtisseries. Cette étude permettra d'optimiser la formulation et l'application industrielle de l'isolat protéique en tant qu'ingrédient fonctionnel selon le type de produits alimentaires souhaités.

**Mots clés :** Pois Bambara, Protéines, Propriétés physico-chimiques, Propriétés fonctionnelles, pH, Fluorescence, Analyse *in silico*, Traitement thermique.

## ABSTRACT

Bambara pea (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) is an underutilized legume of African origin, considered as a nutritional and functional ingredient with various industrial applications. The objective of this work was to study the molecular and functional dynamics of Bambara pea proteins according to heat treatments. Bambara pea seed flour was used for the extraction of proteins whose physico-chemical and functional properties of flour and protein isolate were evaluated. The effect of pH and temperature changes on the physicochemical and functional properties of the extracted proteins was then studied. Finally, we analyzed the structural changes of Bambara pea protein isolate following heat treatment at different pH by fluorescence spectroscopy and *in silico* analysis. The protein isolate contained 81.28 % protein and an appreciable amount of lipid (6.17 %). The effect of temperature at different pH on the physico-chemical and functional properties of the protein isolate showed higher hydrophobicity at pH 4 and lower at pH 9. Temperature decreased protein solubility at pH 4 and 7 and increased it to 100 °C at pH 9. The emulsifying capacity is higher at 80 °C and at pH 9, while the emulsifying stability is higher at pH 4. The protein isolate has very compact secondary structures ( $\beta$  sheets and  $\alpha$  helix) in proportions greater than 75 % at pH 9 and at 50 °C. Vicilin is the main protein, with a molecular weight of around 50 kDa. Under thermal influence, partial unfolding, subunit dissociation and protein aggregation were observed at different pH values. Intrinsic fluorescence showed a red shift of 5.5 nm as the pH increased from 7 to 9 while a blue shift of 4.5 nm was seen as the pH decreased from 7 to 4. The diagram phase at pH 4 and 9 revealed 2 conformations of the protein. At pH 7, two conformational transitions occurred, with formation of an intermediate followed by dissociation of the subunits. Structural rearrangements altered the exposure of Trp and Tyr residues, as observed by excitation of synchronous spectra at pH 4. *In silico* analysis resulted in a significant structural alteration of vicilin (dissociation of trimers at 70 °C and refolding of dissociated monomers at 100 °C). Heated protein isolates can be used as functional ingredients in: milk-based products, the meat industry, beverages and cakes. This study will optimize the formulation and industrial application of protein isolate as a functional ingredient according to the type of food products desired.

**Keywords :** Bambara pea, Proteins, Physico-chemical properties, Functional properties, pH, Fluorescence, *in silico* analysis, Thermal treatment.



# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION

La population mondiale devrait passer d'ici 2050 à 9,8 milliards d'habitants et à 11,2 milliards en 2100 (Nations Unies, 2017) et, par conséquent, la demande d'aliments hautement nutritifs va également augmenter. Les protéines végétales sont plus durables et plus rentables que les protéines animales, c'est pourquoi il y a un intérêt croissant pour la recherche de nouvelles sources de protéines végétales comme ingrédients fonctionnels dans les produits alimentaires (Adebowale *et al.*, 2011 ; Nadathur *et al.*, 2016).

Les légumineuses représentent une grande famille dans le règne végétal. Leurs graines prennent une part importante dans l'alimentation humaine, à l'instar du haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, du pois chiche (*Cicer arietinum*), des lentilles (*Lens culinaris*) et de la fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, du soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'arachide (*Arachis hypogea*) et le pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier (Kangfu, 2011 ; FAO, 2008). L'approvisionnement en protéines animales est limité à cause de leur indisponibilité et leurs coûts élevés dans les pays en développement (Nadathur *et al.*, 2016), les graines de légumineuses constituent leur principale source (Broughton, 2003). Outre leurs teneurs en protéines, les graines de légumineuses sont également une source importante de fibres, de vitamines et de minéraux (Nadathur *et al.*, 2016). Elles sont en majorité consommées dans les pays méditerranéens et tropicaux et constituent la composante essentielle de l'alimentation (Day, 2013).

Le pois Bambara [*Vigna subterranea* (L.) Verdc] est une légumineuse sous-utilisée d'origine africaine pour laquelle l'intérêt est grandissant depuis plus de deux siècles (Diedericks, *et al.*, 2019 ; Du Petit-Thouars, 1806). C'est une importante source de protéines (18 - 27 %), de glucides qui est utilisée dans diverses formulations traditionnelles pour compléter les céréales ou les tubercules amylicés (Kaptso *et al.*, 2015). Les protéines du pois Bambara sont riches en acides aminés acides et leurs amides (acide glutamique, acide aspartique, asparagine et glutamine) qui jouent un rôle important dans les produits nouveaux (Arise *et al.*, 2017). De plus, ces protéines possèdent des fonctionnalités structurales prometteuses telles que la formation de gels, qui ont été largement étudiées (Diedericks *et al.*, 2019 ; Diedericks *et al.*, 2020). Le pois Bambara est la troisième légumineuse la plus importante après l'arachide (*Arachis hypogea*) et le niébé (*Vigna unguiculata*) en Afrique, avec la particularité d'être tolérante à la sécheresse, résistante aux parasites et aux maladies (Arise *et al.*, 2017). Il connaît un bon rendement de production dans les zones où les conditions

agronomiques sont difficiles, ce qui lui confère un avantage par rapport à d'autres graines de légumineuses telles que l'arachide et le soja (Mazahib *et al.*, 2013).

Malgré leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles adéquates (Kaptso *et al.*, 2015 ; Yao *et al.*, 2015), le pois Bambara est consommé comme aliment de subsistance par les personnes vivant dans leurs zones de cultures. La connaissance de la composition et la structure des protéines du pois Bambara pourrait être importante pour davantage expliquer la fonctionnalité et l'utilisation de cette légumineuse dans les systèmes alimentaires (Arise *et al.*, 2017). La structure et la composition peuvent varier entre les différents génotypes des légumineuses, affectant ainsi leur fonctionnalité. Les globulines sont les principales protéines de stockage dans les graines de légumineuses (Kudre *et al.*, 2013). Adebowale *et al.* (2011) et Kudre *et al.* (2013) ont montré par SDS-PAGE, que la viciline est la principale protéine de stockage du pois Bambara.

Compte tenu de leur potentiel nutritionnel et fonctionnel, les protéines de pois Bambara pourraient être considérées comme une matière première importante pour diverses utilisations industrielles. Cependant, le pois Bambara contient également des facteurs antinutritionnels tels que l'acide phytique, des sucres provoquant des flatulences ou des inhibiteurs de protéases, qui limitent son utilisation (Mune Mune *et al.*, 2011). La préparation de l'isolat protéique par précipitation isoélectrique est une voie parmi d'autres pour la production d'un ingrédient fonctionnel débarrassé des facteurs antinutritionnels. Les industries agroalimentaires ont montré un intérêt particulier pour la préparation des isolats protéiques grâce à leurs excellentes propriétés fonctionnelles. Néanmoins, l'utilisation industrielle des protéines alimentaires requiert généralement des facteurs environnementaux (température, pH ou haute pression) qui affectent leur structure et leurs propriétés (Barba *et al.*, 2012 ; Trujillo *et al.*, 2002). Les travaux de Minka et Bruneteau (2000) ; Mune Mune et Sogi (2015, 2016) ; Kaptso *et al.* (2017) ; Diederick *et al.* (2019, 2020) et bien d'autres effectués sur les protéines de pois Bambara ont porté essentiellement sur la composition en acides aminés, la structure, les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles. Aucune étude jusque-là n'a été faite de manière à élucider comment les traitements thermiques à différents pH pourraient affecter la structure, les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines de pois Bambara. Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail permettront de donner une valeur ajoutée aux protéines de pois Bambara comme ingrédient fonctionnel. Une caractérisation plus poussée des protéines de pois Bambara, pourrait aider à comprendre leur fonctionnalité dans le système alimentaire.

Au regard de ce qui précède, nous formulons la question suivante :

✚ Les traitements thermiques à différents pH peuvent-ils affecter la structure et la fonctionnalité des protéines ?

L'**objectif général** de ce travail est donc : d'étudier la dynamique moléculaire et fonctionnelle des protéines de pois Bambara en fonction des traitements thermiques. **Cet objectif général se décline en trois objectifs spécifiques** suivis des hypothèses ci-après :

**Objectif 1** : Préparer un isolat protéique à fonctionnalité améliorée.

**Hypothèse 1** : La préparation de l'isolat protéique améliore les propriétés fonctionnelles des protéines de pois Bambara.

**Objectif 2** : Étudier l'influence des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites.

**Hypothèse 2** : Les traitements thermiques améliorent les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique de pois Bambara.

**Objectif 3** : Analyser les changements structuraux des protéines de l'isolat de pois Bambara suivant un traitement thermique à différents pH par spectroscopie de fluorescence et par analyse *in silico*.

**Hypothèse 3** : Les changements structuraux induits par les traitements thermiques sur les protéines de pois Bambara peuvent être suivis par spectroscopie de fluorescence et par analyse *in silico*.





**CHAPITRE I : REVUE DE LA  
LITTÉRATURE**

## **I.1. GENERALITES SUR LE POIS BAMBARA**

Le pois Bambara est une légumineuse sous utilisée. Il a plusieurs noms courants donc *voandzou*, *pois de terre*, *pois kafir* en français, *Madagascar groundnut* et *stone groundnut* en anglais. Plusieurs noms vernaculaires lui sont attribués donc *atob* (Ewondo), *debbi* (Foulbé), *mokran* (Tupuri) (Pasquet et Fosto 1991).

### **I.1.1. Origine et taxonomie**

Les investigations sur l'origine du pois Bambara depuis Dalziel en 1937, jusqu'aux études de variabilités morphologiques et linguistiques (Pasquet et Fosto, 1991) sont unanimes sur l'origine Africaine du pois Bambara, particulièrement dans la région du bassin du Lac Tchad avec le centre qui se situe dans la région du Nord Est du Nigeria et le Nord du Cameroun (Goli, 1995). Le pois Bambara appartient à la sous famille des Faboidées de la famille des Fabacées, et du genre *Vigna* (Mazahib *et al.*, 2013). Le nom scientifique complet du pois Bambara est *Vigna subterranea* (L.) Verdc.

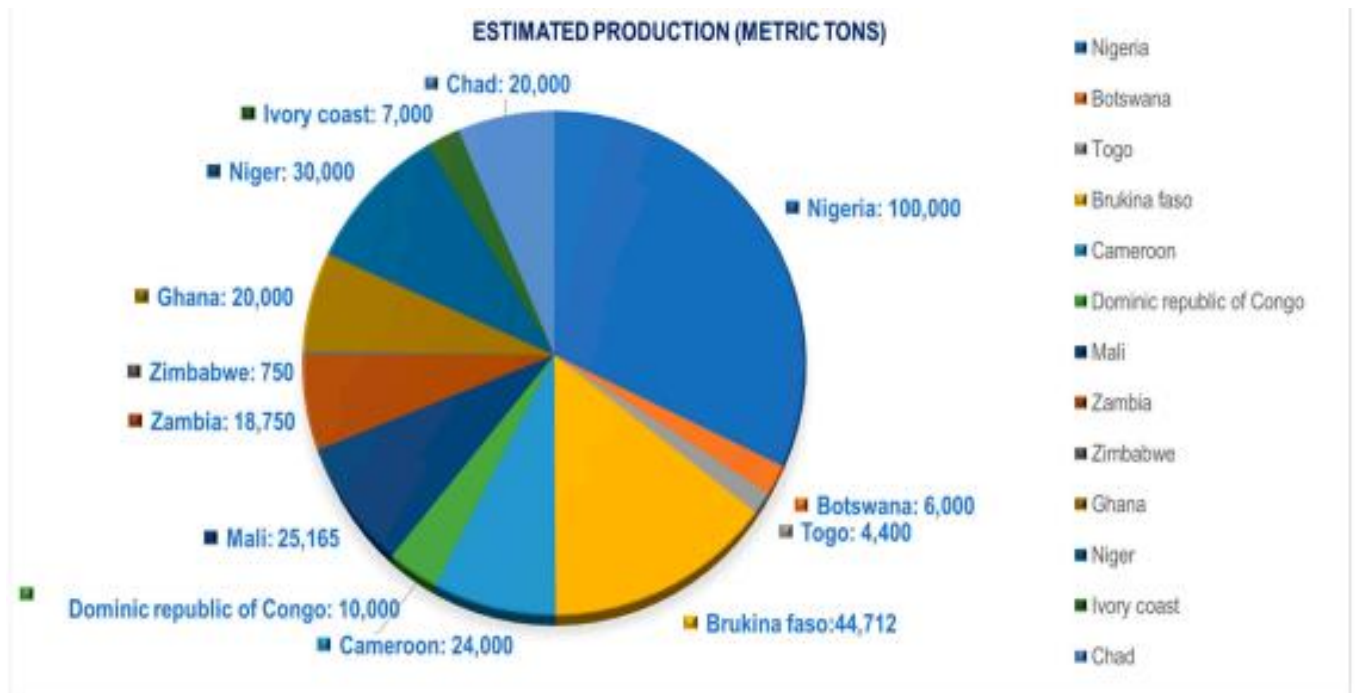
### **I.1.2. Description et écologie**

Le pois Bambara est une légumineuse annuelle herbacée intermédiaire et buissonnante qui s'auto-pollinise avec une racine pivotante bien développée et de nombreuses racines latérales courtes géotropes profuses de taille comprise entre 20 – 30 cm de long. Les tiges du pois Bambara peuvent ou pas contenir des branches, elles portent des feuilles et des fleurs fécondées s'enterrant dans le sol. Les racines sont latérales et forment des nodules pour la fixation de l'azote. Les gousses de pois Bambara se développent sous tension et contiennent généralement 1 ou 2 graines, rarement 3 graines (Borget 1989). Les graines sont réniformes, arrondies à ovales plus ou moins allongées ; à section circulaires ou plus ou moins aplaties. En fonction des critères d'identifications allant de la graine à la gousse, plus de 30 variétés de pois Bambara existent au Cameroun, avec des colorations variantes du noire, blanche, crème ou rouge (Pasquet & Fosto, 1991). En général, cette légumineuse est retrouvée dans les régions de savanes tropicales et subtropicales souvent sèches (Franche Sud du Sahara), et dans les zones discontinues de l'Afrique Orientale. L'ensoleillement est nécessaire pour une bonne production de graines (Borget 1989).

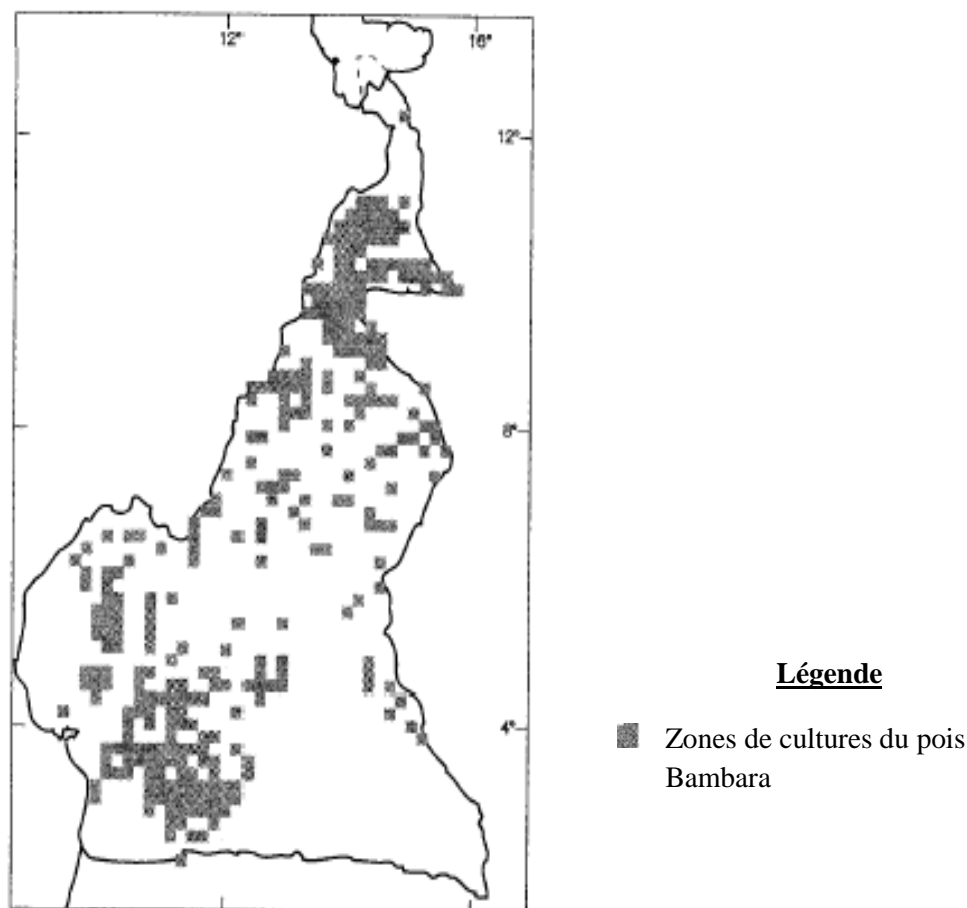
Cette légumineuse croît sur des sols pauvres, sableux légers mais avec des pH de 5,0 – 8,5, mais aussi bien sur des limons et des vertisols. Des sols riches en potassium et phosphore lui sont favorables contrairement aux sols calcaires (Borget, 1989).

### I.1.3. Production et distribution

Le pois Bambara est cultivé en Afrique, en Amérique et en Asie (Mc Watters *et al.*, 2003 ; Goli, 1995) dans de petites exploitations agricoles. Il est souvent en association avec d'autres légumineuses, tubercules et céréales. La culture est effectuée traditionnellement par les femmes. Toutefois, Pasquet et Fotso (1991) ont révélé dans le Nord du Cameroun qu'on retrouve des populations spontanées du pois Bambara vivant à l'état sauvage. D'un point de vue global, la production annuelle mondiale est estimée à environ 230 619 tonnes (FAOSTAT, 2020), les pays d'Afrique (Burkina Faso, Cameroun, Mali, Niger, Togo et République Démocratique du Congo) sont les principaux pays producteurs, avec une production annuelle d'environ 0,3 million de tonnes (**Figure 1**) (Hillocks *et al.*, 2012 ; Khan *et al.*, 2021). Le Burkina Faso fournit le rendement le plus important, soit environ 0,1 million de tonnes par an (Mayes *et al.*, 2019). Au Cameroun, le pois Bambara se rencontre presque partout à l'exception de quelques régions telles que : la plaine de Mamfe, au Sud et au Sud-Est (**Figure 2**) (Pasquet et Fosto 1991) ; avec une production de 39 809 tonnes (FAOSTAT, 2020). Malgré le fait que la production de pois Bambara ai augmentée de manière significative en 2008, la superficie des terres qui lui sont allouées a diminué entre 2002 et 2011 (FAO, 2013). Ibrahim *et al.* (2018) ont noté que l'évolution de la production de pois Bambara a augmenté de 10 % de 2007 à 2014, avec une augmentation de 4 % de la surface cultivée. Dans les pays africains, le rendement en graines (0,5-3 t/ha) dépend des zones cultivées et des variétés de terre, avec un rendement significatif de 3-4 t/ha (Bonny *et al.*, 2019).



**Figure 1** : Principaux pays producteurs africains de pois Bambara (Khan *et al.*, 2021).



**Figure 2 :** Distribution géographique du pois Bambara au Cameroun (Pasquet et Fotso, 1991).

#### **I.1.4. Utilisations du pois Bambara**

##### **I.1.4.1. Utilisation pour l'alimentation humaine**

Le pois Bambara contribue à l'alimentation de l'homme et des animaux. Les graines immatures de pois Bambara sont consommées fraîches ou grillées (Goli, 1995). Elles sont aussi bouillies avec du sel et du pigment et consommées comme casse-croute en Afrique de l'Ouest (Goli, 1995). Les farines issues du traitement des graines de pois Bambara sont utilisées pour préparer une bouillie dure qui est souvent conservée pendant de longue période en Côte d'Ivoire (Holm et Marloth, 1940). La graine fraîche peut être consommée crue, bouillie, grillée ou les graines sèches sont transformées en une forme pulvérulente pour faire une soupe avec ou sans condiments en Afrique de l'Est (Linnemann, 1990). Le pois Bambara est fermenté pour préparer des laits ayant une composition et une odeur comparable au lait de soja dont la couleur est très appréciée (Brough *et al.*, 1993). Les graines de pois Bambara sont utilisées comme ingrédients dans la préparation de farine complémentaire, d'aliment de complément pour

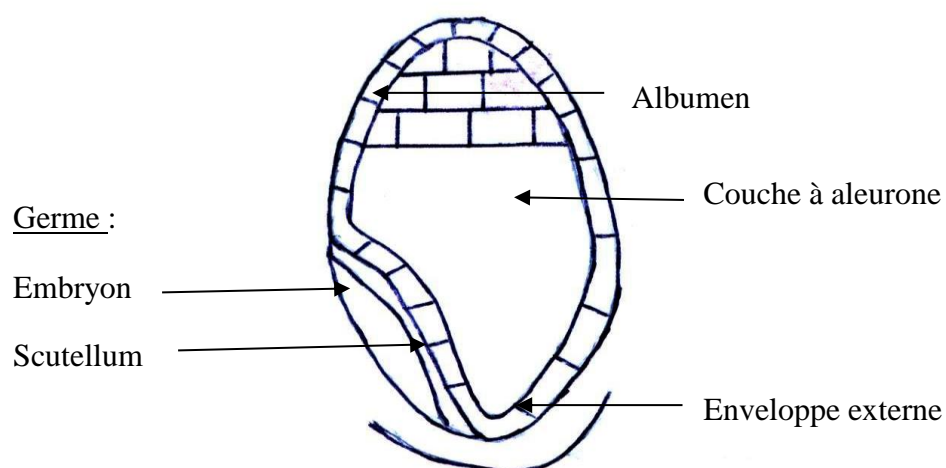
nourrissons ou mélanger aux céréales, oléagineux et tubercules entre autres ingrédients, et utiliser pour confectionner des aliments de compléments pour nourrissons en Afrique et en Asie (Nnan, 2001, Jipara *et al.*, 2001).

#### I.1.4.2. Autres utilisations

Les graines de pois Bambara ont été pendant longtemps utilisées pour l'alimentation de la volaille et des porcs. Elles se sont révélées chères, et sont maintenant moins utilisées à cet effet (Oluyemi *et al.*, 1976). Le pois Bambara joue un rôle important sur le plan physiologique. En effet, elle réduit la teneur en lipoprotéine de faible densité. Les tiges des plantes utilisées comme fourrage peuvent être employées comme engrais vert, compte tenu de la teneur élevée en protéines et de l'enrichissement des nodosités (Borget 1989). Les fanes, riches en azote et phosphore, se sont révélées agréables et adaptées pour le pâturage animal (Doku et Karikari, 1971 ; Rassel, 1960).

#### I.1.5. Structure et composition générale de la graine

Les graines de pois Bambara sont généralement sphériques et ellipsoïdales plus ou moins arrondies (Borget, 1989). Le diamètre de la sphère varie de 8 à 14 mm, pendant que la longueur de l'ellipsoïde varie de 4 à 10 mm. Leur structure est semblable à celle de nombreuses légumineuses, comprenant trois parties principales à savoir : l'enveloppe, le cotylédon (couche à aleurone et albumen) et hypocotyle ou germe (**Figure 3**).



**Figure 3** : Section longitudinale de la graine de légumineuse (Cheftel *et al.*, 1976a).

L'enveloppe de la graine de légumineuse est généralement dure et constituée de plusieurs couches superposées de cellules de types différentes. L'enveloppe est riche en glucides, particulièrement en fibres cellulosiques et héli cellulosiques. Elle contient également l'acide phytique et les polyphénols. Le cotylédon est généralement constitué de cellules allongées remplies de corps protéiques qui constituent les structures de réserve des protéines, et des sphérosomes contenant les lipides. Il contient aussi la quasi-totalité de l'amidon et des vitamines (Cheftel *et al.*, 1985). Les corps protéiques et les sphérosomes résistent aux broyages modérés. Le germe est riche en protéines, glucides et vitamines. Il contient les oligosaccharides de flatulence dont on pense être les glucides de réserve de la germination (Peterbauer et Richter, 1998). Les minéraux sont presque également répartis dans la graine, et sont constituées entre autres de fer et de zinc (Cheftel *et al.*, 1985).

### **I.1.6. Composition protéique des légumineuses**

Les légumineuses sont une source importante de protéines végétales. La plupart des protéines des légumineuses sont présentées sous forme de protéines de stockage. Les protéines de stockage des graines servent principalement de source d'azote et sont utilisées pendant la germination de la graine pour fournir les acides aminés libres et l'azote nécessaires à la plante en croissance pendant les étapes initiales de la germination. Les légumineuses indigènes telles que le haricot (Ajibola *et al.*, 2011 ; Abioye *et al.*, 2015), le pois Bambara (Murevanhema et Jideani, 2014) et le haricot de Marama (Amonsou *et al.*, 2012) se sont avérées être de bonnes sources de protéines similaires au soja (Adebowale *et al.*, 2011 ; Amonsou *et al.*, 2012). La teneur en protéines (20,6 à 25,0 %) de pois Bambara (Mazahib *et al.*, 2013 ; Murevanhema et Jideani 2014) est similaire à celles rapportées pour d'autres légumineuses telles que le niébé (Olalekan et Bosede, 2010), le haricot rouge (Qayyum *et al.*, 2012) et le haricot mungo (Dahiya *et al.*, 2013). La composition chimique de certaines légumineuses est présentée dans le **Tableau 1**. La variation de la composition chimique des protéines de légumineuses peut être attribuée aux différences entre les génotypes, les conditions environnementales et les pratiques agricoles (Abioye *et al.*, 2015).

**Tableau 1** : Composition chimique comparée de quelques légumineuses.

Type de légumes	Espèces	Protéines	Glucides	Lipides	Cendres	Fibres
Pois Bambara	<i>Voadnzeia subterranea<sup>a</sup></i>	32,40	51,79	7,35	5,78	2,68
Haricot igname	<i>Sphenogtylis stenocarpa<sup>a</sup></i>	37,21	44,40	9,49	5,35	3,55
Pois Bambara	<i>Vigna subterranea<sup>b</sup></i>	20,60	56,51	6,60	3,25	6,34
Haricot jack	<i>Canavalis ensiformes<sup>c</sup></i>	26,20	57,83	1,95	6,51	1,07
Pois Cajan	<i>Cajanus cajan<sup>c</sup></i>	24,46	56,83	4,78	4,58	1,10
Niébé	<i>Vigna unguiculata<sup>c</sup></i>	24,13	56,60	4,37	4,73	0,97
Soja	<i>Glycine max<sup>d</sup></i>	42,80	19,80	22,80	5,20	2,30
Haricot rouge	<i>Phaseolus vulgaris<sup>e</sup></i>	20,09	57,67	2,46	3,85	6,78
Lentilles	<i>Lens culinaris medicus<sup>e</sup></i>	31,12	52,63	0,81	2,62	3,68
Haricot Mungo	<i>Vigna radiata<sup>f</sup></i>	22,70	58,99	1,36	3,35	4,7
Pois chiche	<i>Cicer arietinum<sup>e</sup></i>	22,83	57,19	5,43	3,04	3,50

1. Les valeurs sont rapportées en pourcentage de matières sèches, 2 Sources ; <sup>a</sup>Chinedu et Nwinyi (2012) ; <sup>b</sup>Mazahib *et al.* (2013) ; <sup>c</sup>Olalekan et Bosede (2010) ; <sup>d</sup>Amonsou *et al.* (2014) ; <sup>e</sup>Qayyum *et al.* (2012) et <sup>f</sup>Dahiya *et al.* (2013).

### I.1.7. Composition en acides aminés des légumineuses

Les principaux acides aminés des protéines de stockage des légumineuses sont l'acide glutamique et l'acide aspartique qui peuvent inclure la glutamine et l'asparagine, respectivement (Mune Mune *et al.*, 2011). Ces acides aminés représentent 25 à 40 % des acides aminés totaux des graines de légumineuses, comme le montre le **Tableau 2** (Adebowale *et al.*, 2011 ; Kudre *et al.*, 2013 ; Latif *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2013 ; Pastor-Cavada *et al.*, 2014). Une quantité plus élevée d'arginine a été observée dans la fève Faba (Pastor-Cavada *et al.*, 2014) et l'arachide (Latif *et al.*, 2013) mais avec une comparaison similaire dans le pois Bambara par rapport au soja (Adebowale *et al.*, 2011) et au niébé (Elhardallou *et al.*, 2015). Adebowale *et al.* (2011)

ont noté une teneur en arginine plus élevée d'environ 8,1 % pour le pois Bambara. Il y a eu une reconnaissance pour les sources de protéines (y compris le pois Bambara) qui sont riches en arginine et en glutamine. La teneur en lysine du pois Bambara (6,3 g/100 g de protéines) est similaire à celle du haricot mungo (Kudre *et al.*, 2013) et du soja (Adebowale *et al.*, 2011). Sur la base de la référence FAO/OMS (1989), les légumineuses indigènes telles que le pois Bambara, le haricot mungo (Kudre *et al.*, 2013) et la féverole (Pastor-Cavada *et al.*, 2014) contiennent des sources adéquates de lysine similaires au soja (Adebowale *et al.*, 2011). Ainsi, ces légumineuses indigènes offrent quelques attributs nutritionnels potentiels significatifs qui font des légumineuses un bon complément protéique aux céréales qui sont connues pour être déficientes en lysine. La teneur en méthionine du pois Bambara (Kudre *et al.*, 2013) est plus élevée que celle du haricot Marama (Amonsou *et al.*, 2012) et de la féverole (Pastor-Cavada *et al.*, 2014) mais similaire à celle du haricot noir (Kudre *et al.*, 2013) et du soja (Adebowale *et al.*, 2011). Cependant, une teneur plus élevée en méthionine (1,8 %) a été rapportée par Ijarotimi et Esho (2009) pour le pois Bambara.

**Tableau 2 :** Compositions en acides aminés de quelques graines légumineuses<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Type de Legume	Asp	Glu	Arg	Lys	His	Ala	Ile	Leu	Met	Phe	Pro	Val	Trp	Cys	Ser	Thr	Tyr	Cys
Pois Bambara <sup>a</sup>	9,6	15,4	5,9	6,3	3	3,5	3,8	7,3	1,3	5,3	2,7	4,3	7,3	ND	3,2	2,8	3,3	3,1
Haricot Marama <sup>b</sup>	9,4	15,2	8	5,7	2,7	3,5	4,3	7,9	1	3,7	7,2	4,8	ND	6,1	5,5	3,2	11,4	5,9
Haricot rouge <sup>c</sup>	10,9	15,3	5,3	4,9	3,4	3,8	5,2	8,5	1,6	5,9	3,0	5,2	ND	0,9	4,6	3,7	3,2	3,6
Haricot Mungo <sup>a</sup>	8,5	12,5	6,4	6,2	2,8	3,7	3,9	7,4	1,3	5,8	3,0	4,6	6,4	0,5	3,9	2,8	3,2	3,2
Féverole <sup>d</sup>	11,9	16,4	11,8	7,1	2,8	4,4	3,9	7,9	0,9	5,8	4,1	4,8	0,7	1,1	4,6	4,8	2,5	4,1
Haricot noir <sup>a</sup>	9,6	14,1	6,4	6	2,9	3,6	4	7,4	1,3	5,7	2,9	4,6	7,6	ND	3,6	2,5	3,3	3,2
Soja <sup>e</sup>	11,6	19,1	7,7	6,4	2,8	4,3	4	7,8	1,4	5,2	ND	5	ND	ND	5,6	4,1	3,8	4,7
Arachide <sup>f</sup>	11,2	18,7	11,4	3,4	2,1	4	3,1	6,2	1,1	3,6	4,3	3,8	0,9	1,2	4,9	2,7	5,1	4,6
Niébé <sup>g</sup>	12,2	18,9	6,8	6,9	2,5	4,4	4,6	7,7	1,2	5,7	3,9	5,4	3,8	1	5,5	3,8	3,2	4,1
<sup>3</sup> FAO/WHO				5,8	1,9		2,8	6,6	1,7	6,3		3,5				3,4		

1 les valeurs des acides aminés sont exprimées en g/100g de protéines. Un recalcul a été effectué si nécessaire. ND : Non déterminé. 2 Sources : <sup>a</sup>Kudre *et al.* (2013) ; <sup>b</sup>Amonsou *et al.* (2012) ; <sup>c</sup>Liu *et al.* (2013) ; <sup>d</sup>Pastor-Cavada *et al.* (2014) ; <sup>e</sup>Adebowale *et al.* (2011) ; <sup>f</sup>Latif *et al.* (2013) et <sup>g</sup>Elhardallou *et al.* (2015). 3 FAO/WHO Modèle recommandé pour les enfants d'âge préscolaire : 2-5 ans.



Certaines différences dans les proportions d'acides aminés hydrophobes et les ratios relatifs d'acides aminés acides et basiques ont été observées en fonction des propriétés des chaînes latérales (**Tableau 3**). Les protéines de pois Bambara ont un contenu hydrophobe élevé (Kudre *et al.*, 2013) par rapport à la féverole (Pastor-Cavada *et al.*, 2014), le soja (Adebowale *et al.*, 2011), l'arachide (Latif *et al.*, 2013) et le niébé (Elhardallou *et al.*, 2015). Les acides aminés hydrophobes jouent clairement un rôle important dans la stabilité thermique ou la conformation des globulines (Adebowale *et al.*, 2011).

**Tableau 3** : Distribution des acides aminés en fonction des caractéristiques de la chaîne latérale dans certaines protéines de légumineuses.

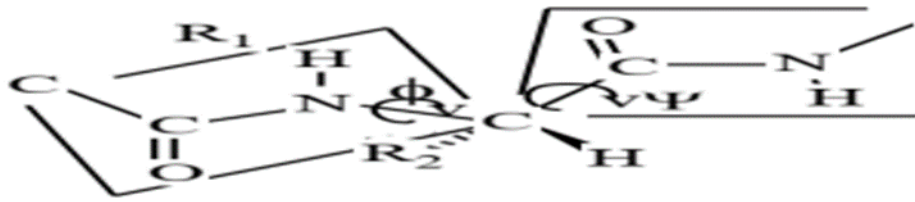
Type de légumes	Acides	Basiques	Polaire non chargée	Hydrophobes	Total
Pois Bambara	25,0	15,2	12,5	35,5	88,2
Haricot Marama	24,6	16,4	23,9	32,4	97,3
Haricot rouge	26,2	13,6	16,0	33,2	89,0
Niébé	31,1	16,2	17,6	34,0	98,9
Soja	30,7	16,9	18,2	27,7	93,5
Arachide	29,9	16,9	18,5	27,0	92,5
Féverole	28,3	21,7	17,1	32,5	99,6
Haricot noir	23,8	15,3	12,8	36,8	88,7
Haricot Mungo	21,0	15,4	13,6	36,1	86,1

Valeurs (exprimées dans g/100 g protéines) ont été calculées à partir des données du Tableau 3 sur la base de la classification effectuée par (Tang *et al.*, 2009). Acides (Ac Glutamique + Ac Aspartique), Basiques (arginine + lysine + histidine), Polaire non chargée (cystéine + serine + thréonine + tyrosine + glycine), Hydrophobes (Alanine + Isoleucine + Leucine + méthionine + phénylalanine + proline + valine + tryptophane).

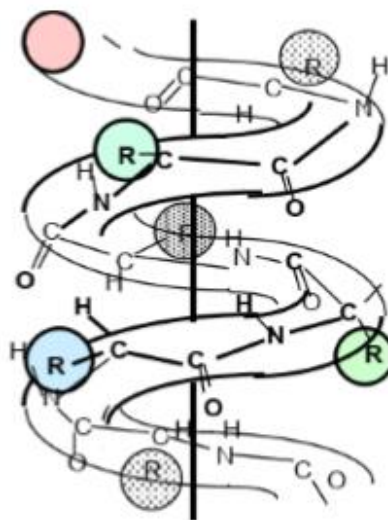
### I.1.8. Différents niveaux de structuration des protéines

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

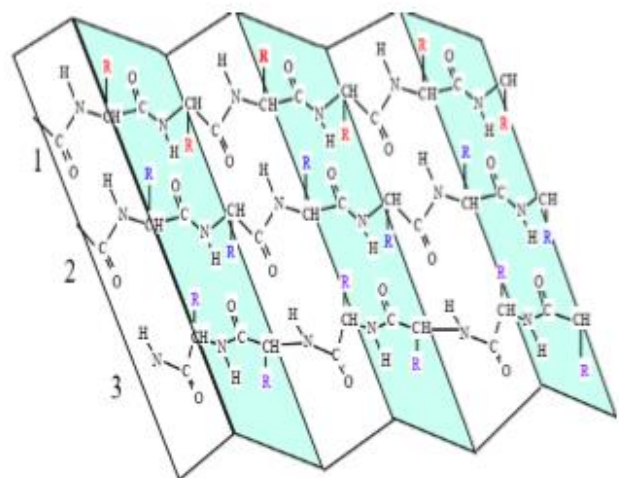
**La structure primaire** correspond à la succession linéaire des acides aminés liés l'un à l'autre par une liaison dite « peptidique ».



**La structure secondaire** décrit le repliement local de la chaîne principale. Il en existe trois grandes catégories selon l'échafaudage des liaisons hydrogènes, et ainsi, selon le repliement des liaisons peptidiques : il s'agit des hélices  $\alpha$ , feuillet  $\beta$  ainsi que des coudes.



Hélice-  $\alpha$



Feuillet  $\beta$

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

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

### **I.1.9. Classification des protéines**

Les protéines sont classées en quatre catégories en fonction de leur solubilité dans certains solvants (Osborne, 1924). Il s'agit :

- Les albumines constituent (10 – 20 %) des protéines des légumineuses solubles dans l'eau, pouvant être précipitées dans les solutions salines saturées. Elles regroupent la plupart des protéines présentant une activité biologique. Elles ont en général des teneurs plus élevées en acides aminés soufrés (cystéine, cystine et méthionine), en lysine et en histidine. Leur poids moléculaire est estimé entre 11 et 30 KDa mais la valeur moyenne est de l'ordre de 16 KDa (Gueguen et Azanza, 1983).
- Les globulines sont les protéines solubles dans des solutions alcalines diluées. Chez les végétaux, les globulines constituent les protéines de réserve de la graine. Elles ont une composition caractéristique des protéines de réserve riches en acides aspartique, glutamique et leurs amides, et en arginine (Gueguen et Azanza, 1983). Leur poids moléculaire est en moyenne de 90 KDa (Gupta *et al.*, 2010). Les globulines constituent 60 à 90 % de protéines de légumineuses où elles sont constituées en majorité de conglycinine et de glycinine.
- Les prolamines sont solubles dans les solutions aqueuses à teneur élevée en éthanol et constituées de protéines de poids moléculaires compris entre 25 et 75 KDa (Gessendorfer *et al.*, 2009).
- Les glutélines sont des protéines solubles dans des solutions acides ou basiques de poids moléculaire variant entre 100 et 1000 KDa (Gupta *et al.*, 2010).

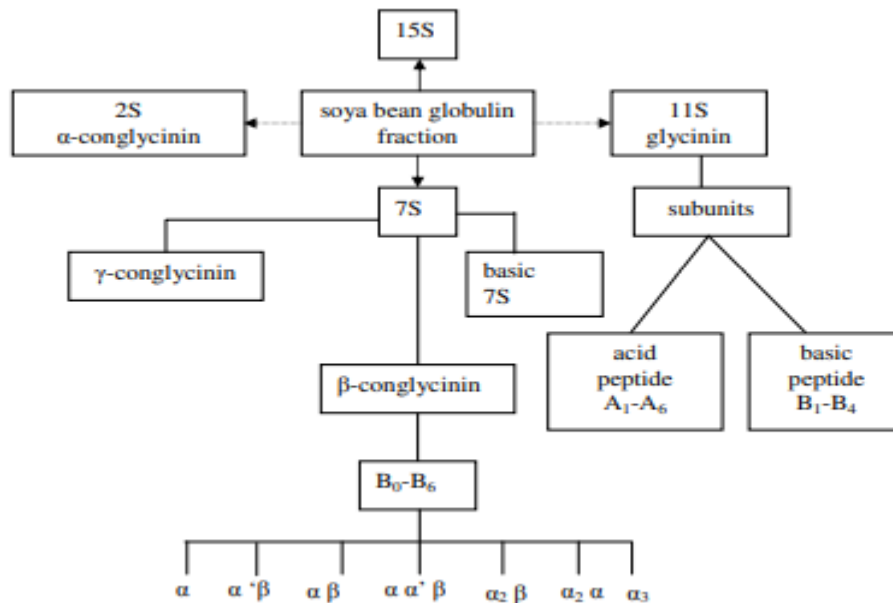
Les principales protéines de stockage des légumineuses telles que le haricot (Mundi et Aluko, 2013), le pois Bambara (Odeigah et Osanyinpeju, 1998), le niébé (Tchiagam *et al.*, 2013), le colza et le soja (Sari *et al.*, 2013) sont les globulines suivies des albumines. Sur la base de leur coefficient de sédimentation (S), les globulines sont classées en 7S et 11S, elles sont respectivement nommées viciline et légumine. Les albumines et les globulines toutes deux peuvent induire un certain nombre d'effets bénéfiques sur la santé (antihypertenseur, antioxydant, anti cancérigène et hypoglycémique) lors de la consommation alimentaire (Rubio *et al.*, 2014).

### **I.1.10. Caractéristiques protéiques des globulines de légumineuses**

Les caractéristiques protéiques des globulines de légumineuses ont été étudiées au travers de la SDS-PAGE unidimensionnelle. Des différences en termes de nombres et de poids moléculaires des sous-unités polypeptidiques constitutives ont été notées sur le pois Bambara

(Adebowale *et al.*, 2011), le haricot commun et noir (Kudre *et al.*, 2013), le niébé (Peyrano *et al.*, 2015), le haricot Pinto et le soja (Tan *et al.*, 2014). La fraction globuline de la protéine du haricot rouge est composée de deux chaînes polypeptidiques majeurs d'un poids moléculaire d'environ 43 et 45 kDa et de trois polypeptides mineurs < 30 kDa (Mundi et Aluko, 2012). Adebowale *et al.* (2011) ont noté trois bandes majeures à 35, 43 et 112 kDa sur la protéine de pois Bambara dans des conditions réductrices et non réductrices. De même, Mune Mune et Sogi, (2015) ont noté trois principales bandes à 40, 65 et 72 kDa dans les deux conditions. Cependant, Kudre *et al.* (2013) ont observé deux principales bandes à 52 et 62 kDa dans les conditions réductrices et non réductrices. La différence observée dans le nombre de bandes peut être due aux différentes méthodes d'extraction utilisées dans la préparation des isolats protéiques (Mune Mune et Sogi, 2015). A l'inverse, Benjakul *et al.* (2000) ont observé un résultat différent dans lequel l'auteur indique l'apparition d'une nouvelle bande en condition réductrice qui suggère la présence de liaisons disulfures entre les bandes. Les différentes observations de ces auteurs, peuvent être dues à la nature de l'échantillon utilisé, Benjakul *et al.* (2000) ont utilisé de la farine de graines tandis que Kudre *et al.* (2013) et Adebowale *et al.* (2011) un isolat protéique.

Les différences structurales et compositionnelles des sous-unités des deux fractions (7S et 11S) de la globuline de la légumineuse ont été notées. La protéine 11S est un oligomère, dont la structure quaternaire est composée de six paires des monomères de sous-unités acido-basiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) reliées par des ponts disulfures (**Figure 4**). Tan *et al.* (2014) ont montré que la sous-unité parentale de la fève de soja appartient aux protéines de stockage de type 11S qui sont caractérisées par la liaison disulfure de la sous-unité appariée  $\alpha$ - $\beta$ . Ceci est évident dans la SDS PAGE car le profil diffère dans des conditions réductrices et non réductrices (Tan *et al.*, 2014). Les isolats protéiques du haricot mungo, du haricot noir et du pois Bambara ont été comparés à l'aide de la SDS PAGE. La principale bande protéique du pois Bambara a un poids moléculaire de 58 et 66 KDa. Les bandes polypeptidiques de poids moléculaire 58 et 66 KDa ont été observées dans les deux conditions de réduction et de non-réduction (Adebowale *et al.*, 2011 ; Kudre *et al.*, 2013). Ces bandes ont été considérées comme des protéines de vicilline 7S qui sont largement représentés dans les protéines de graines et dépourvues de liaisons disulfures entre certaines unités. Kudre *et al.* (2013), ont rapporté que certaines sous-unités du haricot mungo sont stabilisées par des liaisons disulfures alors que de nouvelles bandes apparaissent dans des conditions de réduction.



**Figure 4 :** Nomenclature et composition des protéines de réserve du soja (Source : Barac and Stanojević (2005)).

#### I.1.11. Facteurs impliqués dans la dénaturation des protéines

Les principaux facteurs qui peuvent affecter la structure d'une protéine sont la chaleur, le pH, les radiations, les forces mécaniques (agitation), les agents dénaturants qui détruisent les liaisons hydrogènes, ou d'autres réducteurs qui détruisent les ponts disulfures (bêta mercapto-éthanol et dithiothréitol (DTT)). La chaleur a comme effet de briser les liaisons faibles (hydrogènes) reliant les radicaux de la chaîne et de rompre les interactions hydrophobes non polaires. La dénaturation thermique est souvent appliquée dans le procédé d'hydrolyse pour favoriser l'accessibilité de l'enzyme sur le substrat (Mahmoud, 1994 ; Cui *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009). La plupart des protéines sont dénaturées à des pH extrêmes, en milieu acide (Zarog et Tayab, 2012) ou alcalin (Pande *et al.*, 2009). L'hypothèse de base est que la charge nette de la protéine conduit à des répulsions électrostatiques intramoléculaires, suffisamment fortes pour vaincre les forces attractives, qui par conséquent, induisent une dénaturation de la protéine (Pande *et al.*, 2009). En règle générale, les protéines sont plus stables au voisinage de leur point isoélectrique (pI). Les agents dénaturants fragilisent les interactions hydrophobes des protéines ou ses ponts disulfures. Ils sont souvent utilisés pour l'étude du procédé de dénaturation et la maîtrise des principes physico-chimiques qui gouvernent ce phénomène (Zarog et Tayab, 2012).

## I.1.12. Valeur nutritionnelle des graines du pois Bambara

### I.1.12.1. Facteurs nutritionnels

Les graines de pois Bambara constituent un aliment nutritif et complet en raison de leur teneur en protéines (17,5 - 27,0 %), en glucides (54,5 - 69,3 %) et en lipides (1,6 - 6,7 %), avec également une quantité d'acide aminé essentiel soufrés supérieure à celle de la plupart des légumineuses (Brough *et al.*, 1993 ; Mune Mune *et al.*, 2011 ; Murevanhema et Jideani, 2013). Le pois Bambara fournit une valeur énergétique comprise entre 310 - 450 Kilocalories par 100g de graines. Les protéines de pois Bambara contiennent 40 % d'acides aminés essentiels, généralement prédominés par la lysine 7,3 % et limités par le tryptophane 1,2 %. La teneur en acides aminés essentiels par 100 g d'aliment est de : tryptophane 192 mg, lysine 1141 mg, méthionine 312 mg, phénylalanine 991 mg, thréonine 617 mg, valine 937 mg, leucine 1385 mg, et isoleucine 776 mg (FAO, 1970). Les acides gras les plus rencontrés sont l'acide palmitique, acide stéarique, l'acide oléique tandis que les acides gras insaturés les plus rencontrés sont acide linoléique et l'acide linoléique (Leung *et al.*, 1968 ; Minka et Brunneteau, 2000 ; Onwuliri et Obu, 2002). Le pois Bambara est également une bonne source de fibres, de calcium, de fer et de potassium. Il a le potentiel de fournir une alimentation équilibrée dans les régions où les protéines sont chères et où la culture d'autres légumineuses est économiquement risquée en raison des conditions environnementales défavorables (Yao *et al.*, 2015 ; Murevanhema and Jideani, 2013).

**Tableau 4 :** Composition nutritionnelle des graines de pois Bambara.

Constituants (%)	Minéraux (mg/100g de MS)	Vitamines (mg/100g de MS)
Cendres : <b>2,0 -3,6</b>	<b>Calcium :</b> 7,5-13,5	<b>Thiamine :</b> 0,47
Protéines : <b>17,0-27</b>	<b>Fer :</b> 5,9-7,1	<b>Carotène :</b> 10 µg
Lipides : <b>1,6-6,7</b>	<b>Potassium :</b> 1240-1290	<b>Acide ascorbique :</b> traces
Glucides : <b>54,5-69,3</b>	<b>Sodium :</b> 3,7-4,8	<b>Riboflavine :</b> 0,14
Fibres : <b>1,8-12,9</b>	<b>Phosphore :</b> 196-320	<b>Niacine :</b> 1,8
Eau : <b>4,2-10</b>		

(Exprimée en fonction de la masse sèche à l'exception de l'eau) (Hillocks *et al.* (2012).

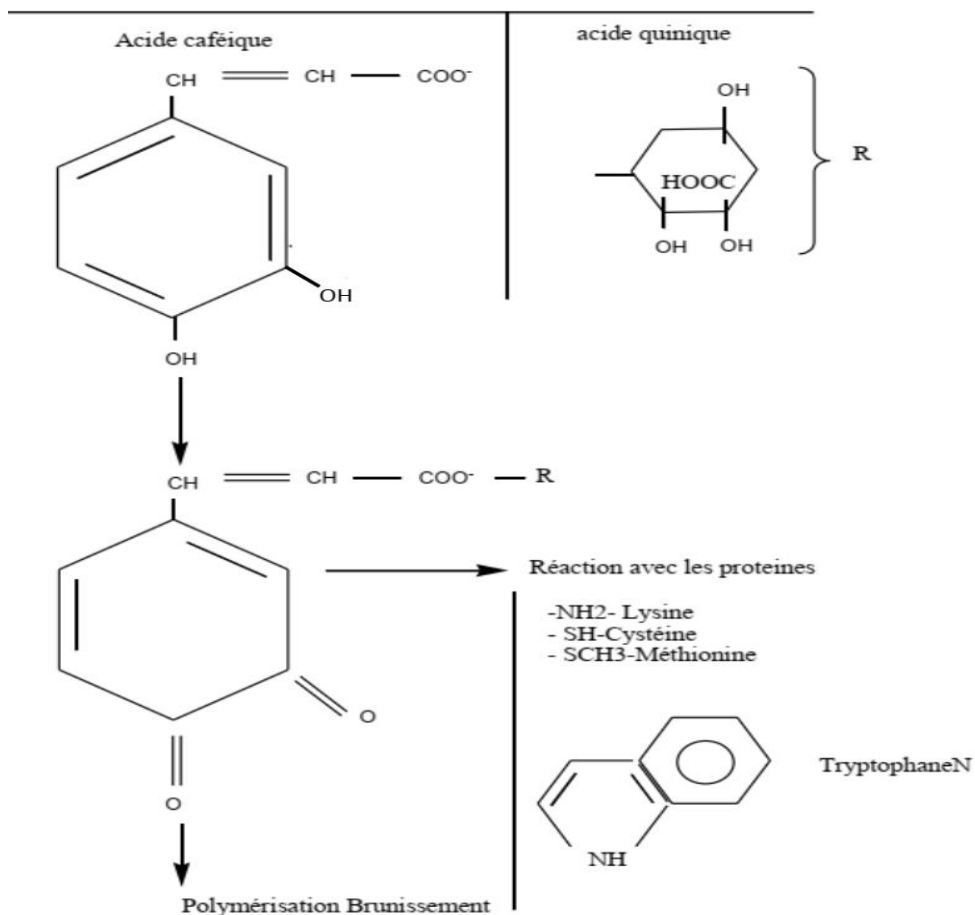
### I.1.12.2. Facteurs antinutritionnels et leurs interactions

Les facteurs antinutritionnels constituent un ensemble de composés chimiquement différents, qui limitent l'utilisation des nutriments contenus dans ces graines par l'homme. Les effets résultants (néfastes ou bénéfiques) dépendent de leur nature, de leur mode d'action et de

la dose ingérée (Godon, 1996). Parmi les composés antinutritionnels du pois Bambara, on peut citer : les inhibiteurs de protéases, les phytates, les tannins, les oxalates et les composés phénoliques. Elles sont dites antiprotéinogénétiques car elles agissent sur les protéines en formant des interactions avec elles.

#### **I.1.12.2.1. Interactions protéines - composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des polymères plus ou moins condensés de phénols. Ces composés peuvent être transformés en quinones par la polyphénol oxydase, qui se condensent en présence d'oxygène en polymères bruns ou noirs, ou se lient aux résidus de lysine et de cystéine des protéines en les rendent indisponibles et oxyde la méthionine et le tryptophane (Simic et Karrel, 1980). Ils sont toutefois aussi utilisés comme de puissants antioxydants (Mathaus, 2002). Les composés phénoliques prépondérants sont les acides phénoliques (**Figure 5**) et les tanins. Les tanins sont des composés poly phénoliques qui se subdivisent en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins condensés sont présents dans les graines de céréales et légumineuses, principalement localisés dans les téguments. Le pois Bambara variété blanche contient 232,53 mg/100 kDa de polyphénols (Mune Mune *et al.*, 2011). L'oxydation des composés phénoliques dans les aliments peut avoir lieu pendant les opérations de solubilisation des protéines à la suite d'un traitement alcalin excessif (pH supérieur à 10). Ce phénomène entraîne un brunissement de l'aliment, ce qui pose des problèmes technologiques dans les industries. Ces réactions altèrent considérablement les propriétés organoleptiques et fonctionnelles des protéines (Lin *et al.*, 1974). Lorsque l'oxydation des composés phénoliques à lieu sous l'action des enzymes présentes dans les aliments, on lui donne le nom de brunissement enzymatique. En revanche, lorsqu'elle se déroule à un pH et à température élevée, elle correspond au brunissement non enzymatique. Ces deux phénomènes aboutissent à la formation des quinones qui vont se condenser aux groupements aminés des acides aminés à savoir la lysine, la cystéine, la méthionine et le tryptophane (Hurrell *et al.*, 1982). Cette condensation entraîne l'indisponibilité biologique de certains acides aminés essentiels et la formation des composés bruns (Zaidi *et al.*, 2009). La **Figure 5** met en évidence la réaction des composés phénoliques (cas de l'acide caféique) avec les protéines.

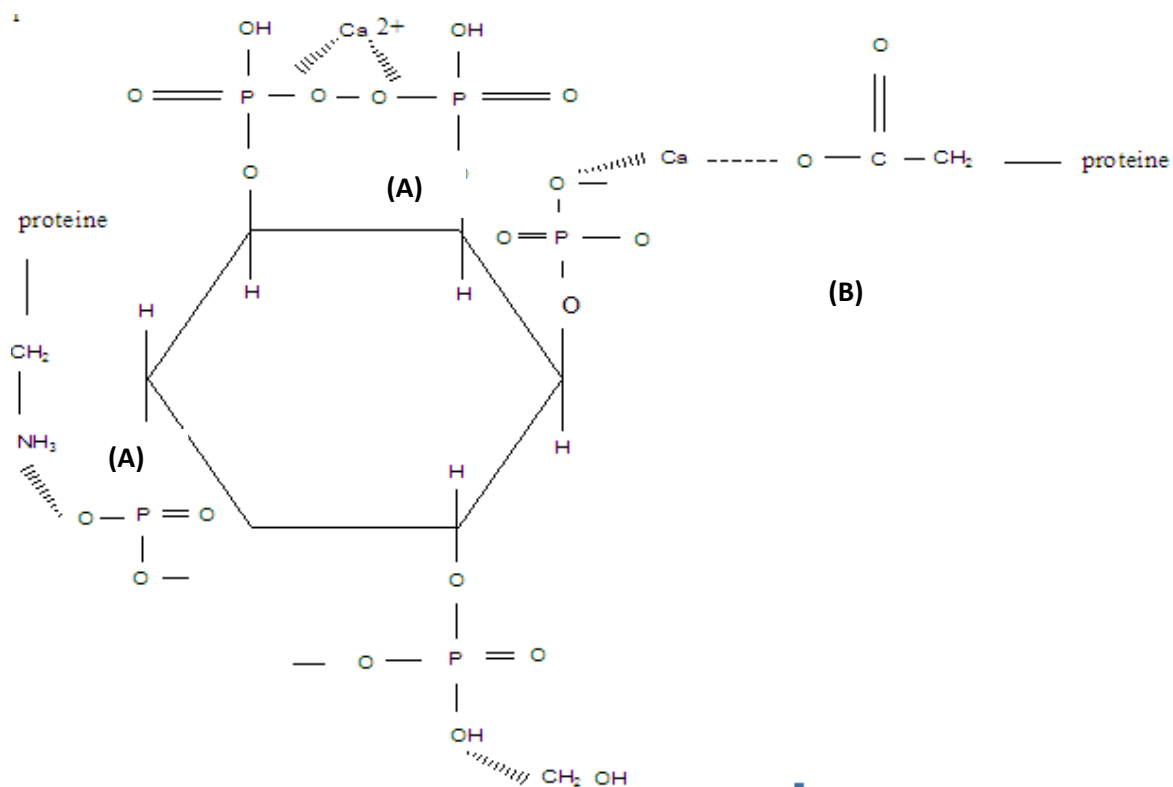


**Figure 5 :** Réactions des composés phénoliques (cas de l'acide caféique) avec des protéines (Hurrel *et al.*, 1982).

#### I.1.12.2.2. Interactions protéines - phytates

Les phytates sont des polyacides (hexamétaphosphate de myoinositol), utilisés chez les plantes comme réserve de phosphore. Cette molécule thermostable est capable de former des complexes avec des cations divalents dont l'assimilation est alors fortement perturbée (fer, zinc, calcium, magnésium, manganèse, cuivre) (Cuq, 1991). Ce composé réagit avec les protéines à pH acide en formant des complexes stables qui sont néanmoins dissociés (à pH 3) en présence de calcium (Rimbach *et al.*, 1994). De plus, les phytates peuvent se lier aux protéines à pH basique et inhiber leur digestion (Gatwug *et al.*, 2001). La teneur en phytate des graines de pois Bambara est de 0,2 - 2 % /100 mg de protéines (Mune Mune *et al.*, 2009). L'interaction entre phytates et protéines conduit à la diminution de la solubilité des protéines qui deviennent non digestibles par les protéases. La formation du complexe protéine - phytate a plus tendance à prendre place en milieu acide (**Figure 6**) (Graf, 1986).



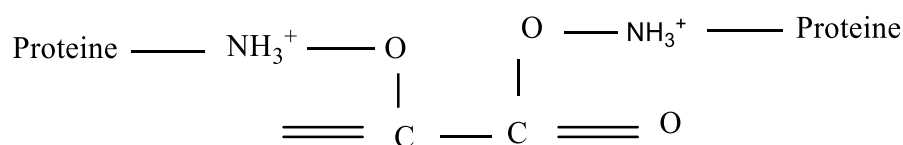


**Figure 6 :** Interactions protéines-phytate À pH acide (A) et à pH basique (B) (Graf, 1986).

### I.1.12.2.3. Interactions protéines - oxalates

Les interactions protéines - oxalates se forment par l'intermédiaire d'ions divalents à l'instar des ions calcium. La présence de deux fonctions acide carboxylique confère à l'acide oxalique

la possibilité de se lier aux ions calcium. En effet, lorsque les conditions le permettent, l'acide oxalique se charge négativement, attirant électrostatiquement les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) qui portent des charges positives. On aboutit ainsi à la formation du complexe oxalate - calcium. L'acide oxalique en solution peut réagir directement avec les protéines et empêcher ainsi leur hydrolyse par les enzymes peptidiques (Sefa-Dedeh et Agyir-Sacker, 2004). La **Figure 7** l'illustre à suffisance.



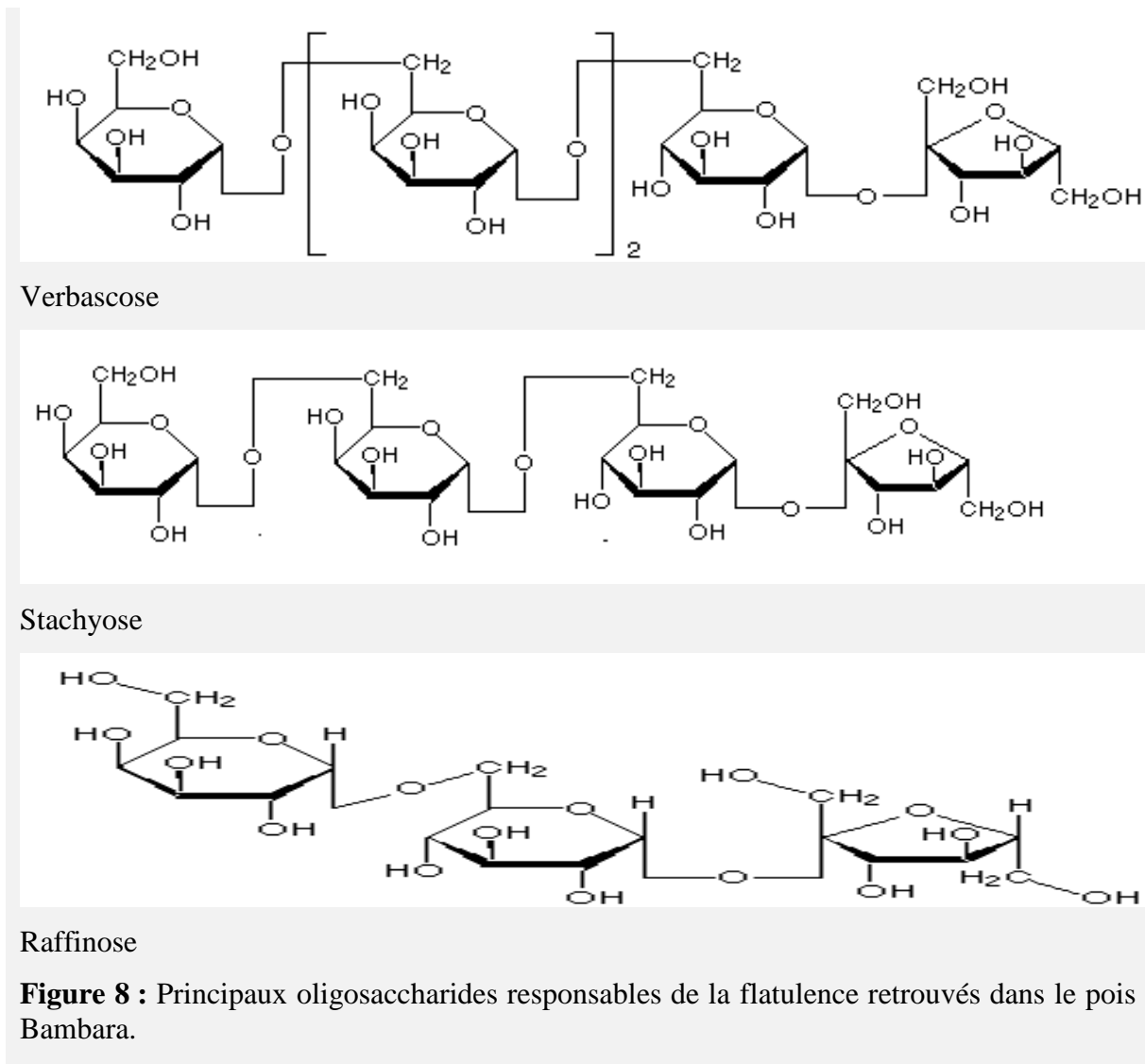
**Figure 7 :** Interactions oxalate-  $\text{M}^x$  - avec protéines.

#### **I.1.12.2.4. Interactions protéines - inhibiteurs de protéases**

Les inhibiteurs des protéases sont des protéines anti nutritionnelles inhibant l'activité des enzymes protéolytiques. Ce sont surtout les inhibiteurs de la trypsine et de la chymotrypsine, qui sont des protéines de faibles poids moléculaires (8 - 12 KDa), constituant la fraction 2S des protéines de pois Bambara, qui se lient fermement aux protéines pancréatiques durant la digestion et inhibent leur activité. Ils sont activés par la chaleur. L'activité antitrypsique varie de 8 à 92  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines (Okafor *et al.*, 2002 ; Mwasuru *et al.*, 1999a). Les interactions protéines - inhibiteurs des protéases s'accompagnent d'une diminution de groupes aminés libres. La présence de ces complexes dans le tractus gastro-intestinal entraîne une augmentation de la sécrétion pancréatique d'enzymes protéolytiques. Cette hypersécrétion se caractérise dans le pancréas par une conversion rapide de la méthionine en cystéine entraînant ainsi une augmentation du besoin de l'organisme en méthionine (Elsheik *et al.*, 2000).

#### **I.1.12.2.5. Facteurs de flatulence**

Certaines légumineuses contiennent des oligosaccharides qui induisent la flatulence et la diarrhée (Suskovic *et al.*, 2001). Parmi ces composés, les plus souvent rencontrés chez les légumineuses sont le raffinose ( $\alpha$ -galactose-1,6- $\beta$ -glucose-1,2- $\beta$ -fructose), le stachyose ( $\alpha$ -galactose-1,6-raffinose) et le verbascose ( $\alpha$ -galactose-1,6-stachyose) (**Figure 8**). Non hydrolysés par les glucosidases intestinales, ces molécules parviennent alors au contact des bactéries intestinales et sont fermentées. Onyenekwe *et al.* (2000) et Phillips et Abbey (1989) ont montré que les graines de pois Bambara renferment du stachyose (2 - 4 %), du raffinose (0,1 à 0,5 %) et du verbascose (0,4 à 0,6 %).



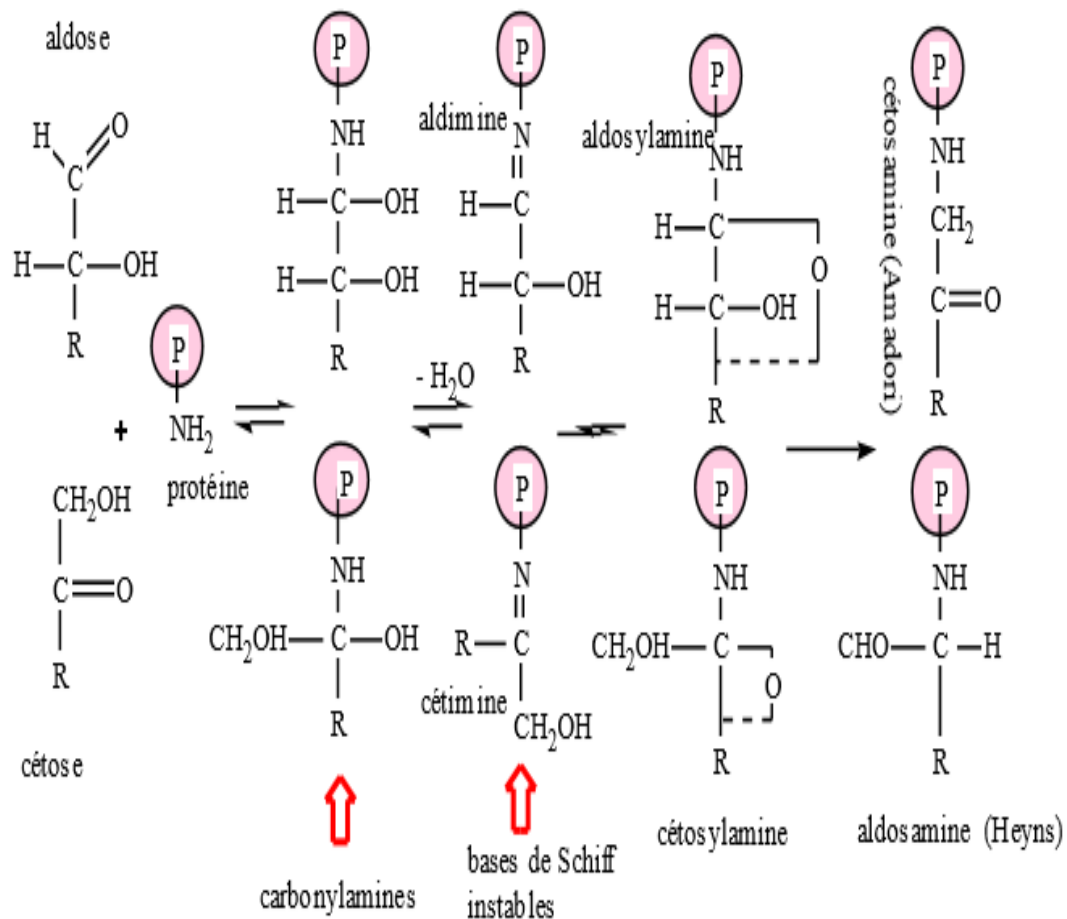
### I.1.13. Effet des traitements traditionnels sur la valeur nutritionnelle

Les différents traitements traditionnels effectués sur les graines de légumineuses en vue d'améliorer leur valeur nutritionnelle sont : les traitements thermiques, alcalins etc. Ces traitements peuvent influencer la qualité nutritionnelle et l'apport en protéines par dénaturation de celles-ci.

#### I.1.13.1. Traitements thermiques

Les traitements thermiques à l'instar de la cuisson sur les graines de légumineuses réduisent leur teneur en substances nutritionnelles et la disponibilité de certains acides aminés en particulier la lysine. En présence de sucres réducteurs, les traitements thermiques entraînent des interactions protéines- glucides appelées réactions de Maillard. Elles commencent par la condensation entre un groupement aminé ( $\text{NH}_2$ ) de la lysine et un glucide réducteur, il se forme une base de Schiff instable qui s'isomérisé en aldosylamine ou en cétosylamine. Ces derniers

donnent après hydrolyse les produits d'Amadori ou de Heyns qui se complexeront et donneront des pigments bruns appelés mélanoides ; la lysine est le principal acide aminé dont la biodisponibilité est réduite (Mougha *et al.*, 2008). La **Figure 9** illustre le mécanisme de formation des produits d'Amadori et de Heyns.

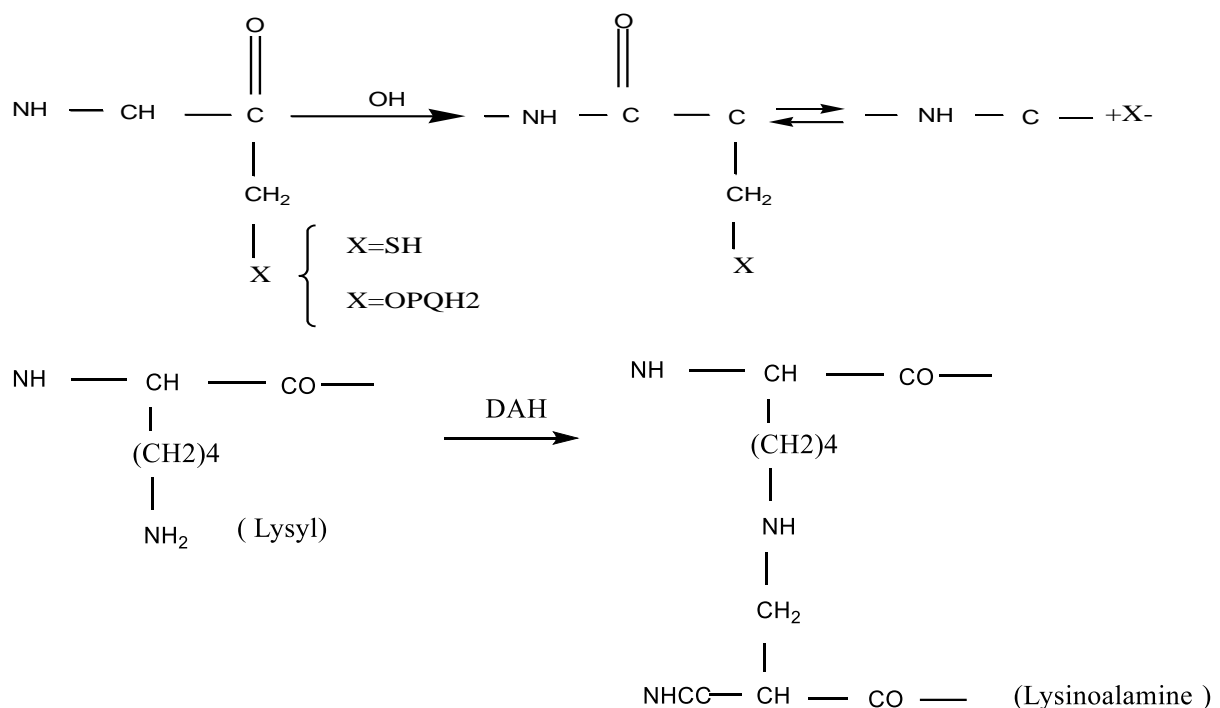


**Figure 9** : Réactions de formation des produits d'Amadori et de Heyns.

### I.1.13.2. Traitements alcalins

Les traitements alcalins appliqués aux aliments pour augmenter leur solubilité peuvent entraîner des conséquences néfastes sur leur valeur nutritionnelle. Les traitements alcalins entre pH 10 et pH 11 causent moins de dégâts sur les protéines. Au-dessus de pH 11, on note l'oxydation de la méthionine, de la cystéine et du tryptophane, les interactions entre acides aminés, la destruction de la lysine, la sérine, l'arginine et de l'histidine (Friedman, 1996).

Au cours des traitements alcalins et thermiques il y'a formation de la déhydroalanine (DHA) à la suite de la dégradation de la lysine. La DHA va favoriser la mise en place des ponts inter et intra moléculaires et il va en résulter la lysinoalanine (**Figure 10**).



**Figure 10 :** Equations de formation de la déhydroalanine (DHA) et de la lysinoalanine.

## I.2. LES MATIERES PROTEIQUES VEGETALES (MPV)

Les matières protéiques végétales sont des produits alimentaires obtenus à partir des oléagineuses, des légumineuses, par réduction ou par élimination de certains principaux constituants non protéiques (eau, huile, amidon.) de manière à obtenir une teneur protéique ( $N \times 6,25$ ) de 40 % ou plus (FAO/OMS, 2007).

### I.2.1. Les types de matières protéiques végétales

#### I.2.1.1. Farines

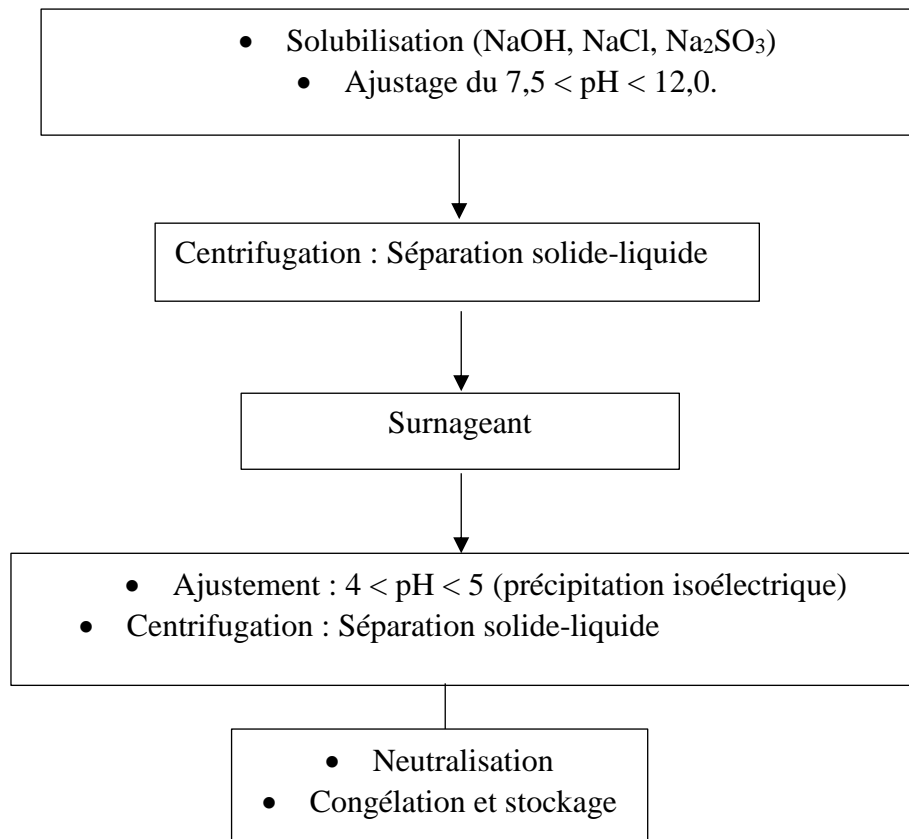
Les graines de pois Bambara sont sélectionnées puis trempées dans l'eau pendant quelques heures pour faciliter le dépelliculage. Par la suite, les amandes sont moulues et la pâte obtenue est séchée à l'étuve pour obtenir la farine. Dans certains cas comme le soja par exemple, une étape de délipidation est recommandée pour réduire ou éliminer les huiles. Les graines de pois Bambara ont une teneur en lipides comprise entre 1,4 - 9,7 % (Tan *et al.*, 2020). La préparation de la farine constitue l'étape initiale pour la préparation des concentrats et isolats protéiques.

### **I.2.1.2. Les concentrats protéiques**

Selon les normes Codex alimentarius (Codex Stan 174-1989), les concentrats protéiques constituent des produits préparés à partir des graines de légumineuses de bonne qualité, décossées et lavées, déshuilées ou non, par extraction des protéines ou des composés non protéiques notamment les glucides, minéraux et autres composés azotés non protéiques, et devant contenir entre 65 et 90 % de protéines en masse sèche. Il s'agit d'ingrédients protéiques disponibles depuis presque 40 ans, et maintenant devenus très importants dans les industries alimentaires occidentales et orientales. Ils sont préparés surtout à partir des graines de légumineuses plus précisément de soja, de niébé (Mune Mune *et al.*, 2008), de pois Bambara (Adebowale *et al.*, 2011). Il existe trois méthodes de préparation des concentrats protéiques : méthode par lavage acide, dénaturation à la chaleur et lavage avec une solution aqueuse alcoolique. Chaque méthode produit un type de concentrat bien spécifique avec des caractéristiques bien précises (**Figure 11**).

### **I.2.1.3. Les isolats protéiques**

Selon les normes du Codex alimentarius (Codex Stan 174-1989), les isolats protéiques sont des produits alimentaires ayant une teneur en protéines supérieure ou égale à 90 %. Leur production se fait à partir des graines riches en protéines (soja, lentilles ...). Les graines sont délipidées ou non selon la teneur en lipides. Selon Cuq (2006), les étapes de la préparation des isolats protéiques sont schématisées comme suite (**Figure 11**).



**Figure 11** : Principales étapes de la préparation des concentrats et isolats protéiques (Mune Mune *et al.*, 2011 ; Lqari *et al.*, 2002 ; Arise *et al.*, 2017).

### I.2.2. Extraction des protéines de légumineuses

Les méthodes d'extractions utilisées pour la plupart des concentrats et isolats des protéines végétales sont supposées contribuer à l'amélioration des propriétés chimiques, fonctionnelles, nutritionnelles et de la digestibilité. La sélection de la technologie et des conditions appropriées pour l'extraction des protéines est essentielle dans la transformation des aliments car elles peuvent influencer les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles du produit fini (Boye *et al.*, 2010). Les différentes méthodes d'extraction :

- ✓ Extraction des protéines solubles dans l'eau et le sel
- ✓ Précipitation isoélectrique des protéines
- ✓ Extraction acide

Utilisées pour extraire les protéines végétales ont été discutées ci-dessous.

### **I.2.2.1. Extraction des protéines solubles dans l'eau et le sel**

Le principe de l'extraction saline pour l'isolement des protéines est basé sur la force ionique pour dissoudre et fractionner les deux principales protéines de stockage (globuline et albumine) présentes dans les légumineuses (Boye *et al.*, 2010). La glycoprotéine élevée (jusqu'à 45 %) présente dans l'albumine augmente sa solubilité dans l'eau en renforçant l'interaction protéine-eau. D'autre part, la faible glycoprotéine (3,9 %) présente dans la globuline peut contribuer à son insolubilité dans l'eau (Mundi et Aluko, 2012). La méthode d'extraction au sel a été utilisée pour isoler les protéines végétales telles que le colza et les graines de lin (Karaca *et al.*, 2011), le haricot rouge (Mundi, 2012), le soja et le pois Bambara (Adebowale *et al.*, 2011). La dialyse de l'extrait salé contre de l'eau suivie d'une centrifugation donne un précipité riche en globuline et un surnageant riche en albumine (Mundi et Aluko, 2012).

### **I.2.2.2. Précipitation isoélectrique des protéines**

La méthode la plus courante d'extraction des protéines des légumineuses implique l'utilisation d'une extraction aqueuse alcaline suivie d'une précipitation isoélectrique (IEP) (Boye *et al.*, 2010). Cette technique tire parti de la solubilité différentielle des protéines de légumineuses, qui est élevée à un pH alcalin, ce qui nécessite la solubilisation des protéines, et faible à leur point isoélectrique, généralement à un pH de 4 - 5 (Boye *et al.*, 2010). Cette méthode conduit à l'obtention des produits avec une teneur élevée en protéines. Par exemple, Adebowale *et al.* (2011), ont rapporté une teneur en protéines de 90 % et 92 % pour les isolats précipités isoélectriques de pois Bambara et de soja respectivement. Cependant, la récupération des protéines est incomplète, ce qui peut être le résultat d'une solubilisation inadéquate ou d'une perte dans le surnageant pendant la centrifugation de la protéine précipitée (Malomo, 2015).

### **I.2.2.3. Extraction acide**

Le principe de l'extraction acide est similaire à celui de l'extraction alcaline, mais l'extraction initiale des protéines est réalisée dans des conditions acides. Puisque la solubilité des protéines des légumineuses est également élevée dans les conditions d'acidités très élevées (pH < 4,0). Ainsi, un pH faible est utilisé pour solubiliser la protéine, puis suivi soit d'une précipitation isoélectrique, d'une Cryo précipitation ou d'une séparation par membrane (Boye *et al.*, 2010). Des études antérieures ont rapporté une extraction d'environ 95,7 % de protéines pour les isolats protéiques de haricot rouge (Alli *et al.*, 1993), 91,2 % et 91,9 % pour les isolats protéiques de féverole et de pois respectivement (Vose, 1980), lorsque la solution d'acide



citrique ou la méthode d'acidification directe est utilisée. L'ultrafiltration ou une séparation par membrane barrière sous pression est fréquemment utilisée comme alternative à la précipitation isoélectrique. Le surnageant obtenu par extraction alcaline ou acide est soumis à une ultrafiltration (Boye *et al.*, 2010). L'efficacité de la séparation de la protéine peut être affectée par les coupures de poids moléculaire, le type de membrane utilisé et le rapport volume-concentration (Mundi, 2012). Des études antérieures ont également rapporté une teneur en protéines plus élevée de 94,1 et 93,5 % pour les isolats protéiques de féverole et de pois respectivement, en utilisant une membrane d'ultrafiltration (Vose, 1980).

### **II.2.3. Facteurs influençant l'extraction des protéines de légumineuses**

Deux étapes sont déterminantes dans la préparation des matières protéiques végétales en milieux aqueux : il s'agit de la solubilisation et de la précipitation des protéines. Les conditions opérationnelles de l'extraction des protéines des graines de légumineuses affectent le rendement et le recouvrement des protéines, de même que leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles (Chew *et al.*, 2003 ; Mwasaru *et al.*, 1999). Lors de ces procédures, plusieurs facteurs physico-chimiques dont le pH, la température, la force ionique, les types de sels et de solvants influencent leur solubilité (Jyothirmayi *et al.*, 2006) ; Quanhong et Cailli, 2005 ; Moure *et al.*, 2001. Le choix de la combinaison est fonction de la rentabilité économique, de l'obtention du rendement et de la teneur en protéine maximum du concentrat ou de l'isolat protéique. De nombreuses études ont contribué à définir les intervalles à chacun de ces paramètres où l'extraction des protéines est optimale.

#### **I.2.3.1. Effet de la température et du pH**

L'effet de la température sur l'extraction des protéines est certainement l'un des effets les plus étudiés durant la préparation des concentrats et isolats protéiques. Moure *et al.* (2001) et Rustom *et al.* (1991) ont montré durant la préparation de concentrats protéiques de *Rosa rubiginosa* et d'*Arachis hypogea*, que le rendement d'extraction et la teneur en protéines augmentent avec la température de 25 °C à 30 - 50 °C. Dans l'intervalle 30 - 50 °C, le rendement et la teneur en protéines n'augmentent pas significativement. De plus, les températures élevées facilitent l'extraction des polyphénols et des sucres pouvant se condenser aux protéines, avec des conséquences sur leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques (Cheftel *et al.*, 1985 ; Lin *et al.*, 1974). En tenant compte des inconvénients de l'élévation de la température en milieu alcalin sur la qualité des protéines et de l'amélioration souhaitée de l'extraction des protéines,

la température de 35 °C est utilisée pour les graines de *Rosa rubiginosa*, de pois Bambara etc. (Moure *et al.*, 2002 ; 2001 ; Mune Mune *et al.*, 2011). Cependant, on a observé des rendements élevés (65 à 85 %) d'extraction des protéines de *Cajanus cajan*, de *Lupinus angustifolius* et de *Cicer arietinum* à température ambiante ( $\approx 25$  °C) (Chew *et al.*, 2003 ; Mizubuti *et al.*, 2000 ; Sanchez-Vioque *et al.*, 1999).

Le pH peut impacter sur la charge nette des protéines et modifier les forces d'attraction et de répulsion des protéines affectant ainsi les interactions protéines - protéines et protéines - solvant (Philips *et al.*, 1994). Les pH neutres ou basiques sont utilisés pour l'extraction des protéines de graines de légumineuses. Le pH 9,9 est optimal pour *Vigna subterranea* (L.) Verdc (Mune Mune *et al.*, 2011), pendant que le pH 12 est optimal pour *Psophocarpus tetragonolobus* (Bello et Okezie, 1989).

### **I.2.3.2. Effet du solvant et de la taille des particules**

Le solvant utilisé lors de l'extraction des protéines est généralement l'eau car elle est moins chère et non toxique, en plus de ses propriétés d'extraction. La présence de sel (force ionique) joue un rôle prépondérant. Elle permet une meilleure solubilisation et une récupération efficace des protéines. Les concentrations de NaCl 0,5 M, et de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,25 % ont été utilisées avec succès dans l'extraction des protéines de plusieurs légumineuses. En effet, le pois Bambara est constitué en majorité des fractions d'albumine et de globuline qui sont solubles dans les solutions de faible concentration en sel (Mune Mune *et al.*, 2011). Ainsi, pour limiter l'oxydation des protéines, lesquelles peuvent interagir avec les lipides et affecter les propriétés fonctionnelles, l'extraction des protéines peut s'effectuer avec le Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Lqari *et al.*, 2002). La force ionique a un effet sur l'intensité des interactions électrostatiques entre les chaînes protéiques dénaturées, sur l'absorption de l'eau, le gonflement et la solubilité des protéines.

Les particules de tailles inférieures à 500  $\mu\text{m}$  sont plus appropriées pour l'extraction des protéines de *Rosa rubiginosa*, que celle des particules de taille comprises entre 500  $\mu\text{m}$  et 1000  $\mu\text{m}$ . Les rapports solide /liquide (p/v) compris entre 1/10 et 1/20 sont utilisés pour l'extraction de diverses légumineuses Mune Mune *et al.* (2011) ; Moure *et al.* (2001). En outre, plusieurs solvants sont utilisés dans le recouvrement des protéines. Chavan *et al.* (2001) ont éliminé près de 70 % de composés non protéiques du concentrat de *Lathyrus maritimus* L avec des lavages à l'éthanol et à l'acétone.

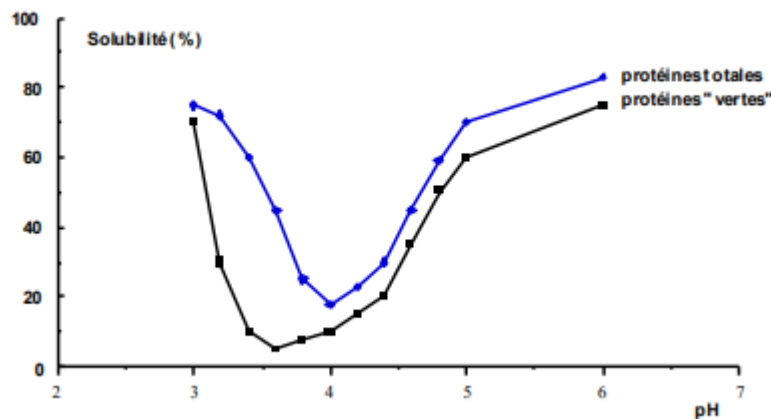
#### **I.2.4. Propriétés fonctionnelles des protéines**

Les propriétés fonctionnelles des protéines ou fonctionnalités sont les propriétés physiques ou physico-chimiques intrinsèques qui affectent le comportement des protéines dans les systèmes alimentaires pendant la transformation, la préparation, la fabrication et le stockage (Amonsou, 2010 ; Mundi, 2012). Ces propriétés comprennent la solubilité, l'absorption d'eau et d'huile, les propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes (Amonsou, 2010). Les légumineuses, à l'instar du pois Bambara, sont exploitées comme ingrédients fonctionnels pour la préparation de divers repas, soit seules, soit comme ingrédients d'autres matières alimentaires, en raison de leur valeur nutritionnelle élevée et de leur disponibilité. Diverses études ont exploité les fonctionnalités protéiniques des cultures de légumineuses telles que la protéine de soja (De la Caba *et al.*, 2012 ; Rebholz *et al.*, 2012), du pois Bambara (Adebowale *et al.*, 2011), du haricot (Wani *et al.*, 2013), du pois (Barac *et al.*, 2015) et du fenugrec (Feyzi *et al.*, 2015). La fonctionnalité des protéines est le résultat d'interactions moléculaires de ces dernières avec leur environnement (autres molécules, pH, température...) (Cheftel *et al.*, 1985). Cependant, les propriétés fonctionnelles peuvent être altérées par les différentes méthodes d'obtention des isolats protéiques. Arise *et al.* (2015), ont rapporté une plus faible capacité de moussage, d'émulsification et de rétention d'eau pour l'isolat protéique de pois Bambara précipité par rapport à l'isolat micellisé. Une limitation supplémentaire est que les isolats précipités contiennent des quantités élevées de cendres générées pendant la procédure de neutralisation acide-base (Malomo, 2015).

##### **I.2.4.1. Solubilité des protéines**

La quantité d'eau contenue dans la matière alimentaire qui peut être extraite par l'eau ou un solvant approprié dans des conditions spécifiques est sa solubilité dans les protéines. Le facteur déterminant pour la fonctionnalité des protéines dans la transformation et l'application des aliments a toujours été la solubilité dans une solution aqueuse (Karaca *et al.*, 2011). La solubilité des protéines dépend d'un certain nombre de facteurs tels que : la force ionique, le pH, le milieu de la matrice alimentaire et la température. Un autre facteur critique est le point isoélectrique de la protéine. C'est le point auquel la protéine ne porte aucune charge électrique nette (Mundi et Aluko 2012). La solubilité est généralement faible au point isoélectrique. En effet, la nature amphotère (contenant à la fois des groupes fonctionnels acides et basiques) de la protéine provoque des précipitations au pH correspondant au point isoélectrique, ce qui conduit à une solubilité minimale de la protéine (Malomo, 2015).

En outre, le type ou la variété de la source de protéines végétales peut avoir un impact sur la détermination de la solubilité et donc affecter les propriétés fonctionnelles des isolats finaux (Cuq, 1991 ; Barac *et al.*, 2015). Outre le point isoélectrique, le pH de l'environnement est également un facteur déterminant important de la solubilité des protéines (**Figure 12**). Par exemple, la solubilité minimale signalée pour deux variétés d'isolats protéiques de pois Bambara s'est produite à un pH de 5,0 (Adebowale *et al.*, 2011), un pH de 4,8 a été noté pour la globuline d'haricot rouge (Mundi et Aluko, 2013), tandis qu'un pH de 4 - 5 a été obtenu pour les isolats protéiques de haricot mungo et de haricot noir (Kudre *et al.*, 2013).



**Figure 12 :** Solubilité des protéines totales de feuilles et des chlorophylles associées aux protéines en fonction du pH (Cuq, 1991).

#### I.2.4.2. Capacité d'absorption d'eau

La capacité d'absorption d'eau (CAE) est la capacité à retenir physiquement l'eau contre la gravité (Zayas, 1997). La CAE est également un indice de l'interaction des protéines avec l'eau dans le système alimentaire (Arise, 2016). La CAE dépend de plusieurs paramètres tels que la taille, la forme et les caractéristiques conformationnelles (Malomo *et al.*, 2014). La CAE est également affectée par l'équilibre des acides aminés polaires et non polaires des molécules de protéines, la présence de lipides, l'environnement physico-chimique (pH, force ionique) et la solubilité en référence aux groupes aminés hydrophiles qui sont les sites primaires d'interaction entre les protéines et l'eau (Malomo *et al.*, 2014). La faible capacité de rétention d'eau de certaines protéines pourrait éventuellement résulter de leurs faibles propriétés hydrophiles telles que déterminées par la proportion d'acides aminés hydrophiles par rapport aux acides aminés hydrophobes (Nosenko *et al.*, 2014). Par exemple, les protéines de colza ayant des acides aminés plus hydrophobes que les protéines de soja possèdent une capacité de rétention d'eau inférieure à celle des protéines de soja (Nosenko *et al.*, 2014). Il a également été

observé que la méthode d'extraction a un effet sur la CAE, une étude réalisée par Adebowale *et al.* (2011) a mis en évidence une CAE plus élevée pour l'isolat protéique de pois Bambara extrait par micellisation par rapport à la précipitation isoélectrique. Cela peut être dû à l'exposition des groupements hydrophiles et ioniques ayant une plus grande affinité pour l'eau environnante par le biais de la liaison hydrogène. De plus, la technique d'extraction par micellisation favorise les changements conformationnels des molécules de protéines qui exposent les chaînes latérales précédemment enterrées, les rendant ainsi disponibles pour interagir avec l'eau (Adebowale *et al.*, 2011).

#### **I.2.4.3. Capacité d'absorption d'huile**

La capacité d'absorption d'huile (CAH) est la capacité de la graisse à se lier au côté hydrophobe (non polaire) des protéines. Elle est liée à la capacité d'émulsification, une propriété fonctionnelle qui traite de l'hydrophobie (Malomo, 2015). La méthode d'extraction, les espèces et les sources de protéines déterminent la capacité de rétention d'huile des protéines. Par exemple, Nosenko *et al.* (2014) ont rapporté une CAH d'environ 30 % plus élevée pour le colza de printemps par rapport à l'isolat protéique de colza d'hiver. De même, la méthode de micellisation des isolats protéiques de pois d'Angole (Paredes-López *et al.*, 1991), de niébé (Mwasaru *et al.*, 1999) et du pois Bambara produit des CAH plus élevées que ceux des isolats obtenus par précipitation isoélectrique (Adebowale *et al.*, 2011). Autant, la protéine ayant des quantités plus importantes de groupement hydrophiles près de la surface retient plus d'eau. De même, la protéine ayant des quantités plus importantes de groupes hydrophobes près de la surface retient plus d'huile. La capacité de rétention d'huile est un facteur déterminant pour l'utilisation des protéines en tant qu'ingrédients fonctionnels potentiels dans les aliments tels que les produits de boulangerie à forte teneur en matières grasses, les beignets et les aliments de type émulsion (Liu *et al.*, 2013 ; Malomo, 2015 ; Arise, 2016).

#### **I.2.4.4. Propriétés moussantes**

Une mousse est définie comme étant une dispersion de bulles de gaz (gaz carbonique, azote, air) dans une phase continue (liquide, semi-solide ou solide) produit par agitation mécanique. Les mousses sont des systèmes biphasés constitués de bulles d'air entourées d'une phase liquide lamellaire continue (Tan *et al.*, 2011). Une bonne mousse se caractérise par la flexibilité moléculaire des protéines, un désordre structurel et une métastabilité. Ainsi, une fois formée, elle est thermodynamiquement stable sur une certaine période (Ptaszek, 2013). En général, les propriétés moussantes sont mesurées par la capacité et la stabilité de la mousse. La capacité moussante est la capacité d'une protéine, dans certaines conditions (telles que la

concentration, le pH, la température, la concentration en sel) à former une mousse, tandis que la stabilité moussante indique la capacité d'une protéine à conserver le volume de la mousse pendant un certain temps (Stone *et al.*, 2015). Certains facteurs tels que la concentration en protéines, le pH, la haute pression, le traitement thermique, la procédure de formation de la mousse, la nature et le comportement de l'interface (interactions protéine-protéine, dénaturation) ainsi que leur interaction avec d'autres ingrédients alimentaires ont été signalés comme influençant les propriétés moussantes des isolats protéiques (Stone *et al.*, 2015). Aux pH alcalins élevés, on obtient une très faible stabilité moussante, en raison de l'augmentation de la charge nette induite par de faibles interactions protéines - protéines, réduisant ainsi la capacité de la protéine à former de fortes membranes interfaciales à l'interface air - eau (Tan *et al.*, 2011). On a également noté que la méthode d'extraction, ainsi que la méthode de séchage affectent les propriétés moussantes. Stone *et al.* (2015) ont noté une meilleure capacité moussante pour l'isolat protéique de pois séché par pulvérisation et extrait au sel que pour les isolats protéiques obtenus par précipitation isoélectrique. Une meilleure capacité moussante a également été notée pour les isolats de pois Bambara micellisés par rapport à l'isolat précipité (Adebowale *et al.*, 2011). Cependant, la stabilité moussante est influencée par divers facteurs comme la capacité d'adsorption des protéines à l'interface eau - air, les propriétés rhéologiques de surface, la diffusion de l'air à l'extérieur et à l'intérieur des cellules de mousse, la distribution de la taille des cellules, la tension superficielle du liquide, la pression externe et la température (Hojilla-Evangelista *et al.*, 2014). Plusieurs isolats de protéines végétales ont été étudiés dans le passé pour leurs propriétés moussantes, qui est l'une des propriétés fonctionnelles souhaitables des protéines dans les industries de transformation des aliments telles que le lait et les laiteries, les brasseries et les confiseries (Mundi et Aluko, 2012 ; Hojilla-Evangelista *et al.*, 2014 ; Barac *et al.*, 2015).

#### **I.2.4.5. Propriétés émulsifiantes**

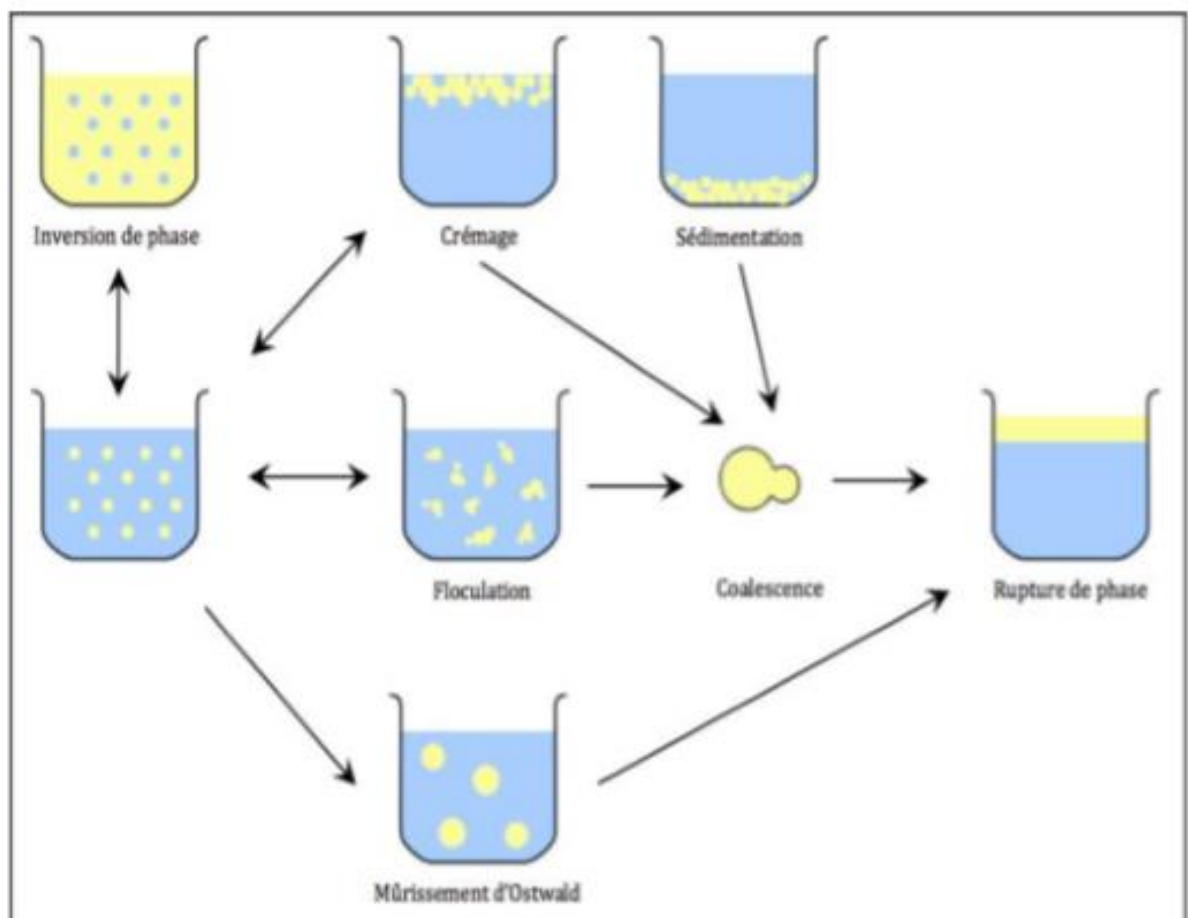
Une émulsion est un mélange macroscopiquement homogène mais microscopiquement hétérogène de deux substances liquides non miscibles (qui ne se mélangent normalement pas) comme l'eau et l'huile, l'une sous forme de petites gouttelettes dispersées, l'autre sous forme de phase continue dispersante. Une émulsion possède un aspect macroscopique homogène alors que sa structure microscopique est hétérogène (Leal-Calderon *et al.*, 2007). On différencie deux types d'émulsions selon la répartition des différentes phases employées. Une émulsion est dite directe (notée Huile dans Eau) lorsque la phase dispersante est hydrophile et que la phase dispersée est lipophile, alors qu'une émulsion inverse (notée Eau dans Huile) se caractérise par

une phase dispersante lipophile et une phase dispersée hydrophile (LealCalderon *et al.*, 2007). Lorsque l'émulsion est composée uniquement de deux phases, on la qualifie de "simple". À l'inverse, si le mélange se présente sous plus de deux phases imbriquées les unes dans les autres, le système est désigné comme "multiple" ou est appelée "émulsion d'émulsion". Celle-ci se caractérise par une première émulsion dans laquelle est présente des gouttelettes composées elles même d'une émulsion (Leal-Calderon *et al.*, 2007).

### ✓ Caractéristiques et stabilité des émulsions

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

Pour ce qui est de la stabilisation des émulsions, on peut alors dénombrer plusieurs types de phénomènes : Des phénomènes conduisant à une augmentation de taille des gouttelettes (coalescence et mûrissement d'Ostwald) ; des phénomènes liés à la migration des gouttelettes (crémage et floculation) et l'inversion de phase (Leal-Calderon *et al.*, 2007).



Les propriétés émulsifiantes des protéines sont souvent exprimées par la capacité émulsifiante (CE) et la stabilité émulsifiante (SE) (Boye *et al.*, 2010). La CE mesure la surface maximale créée par unité de protéine, c'est-à-dire la quantité d'huile qui peut être émulsifiée par unité de protéine, tandis que la SE évalue la capacité de l'émulsion à résister aux changements de sa structure pendant une période définie, ce qui définit la capacité d'une protéine à stabiliser une émulsion (Boye *et al.*, 2010). Un certain nombre d'études ont rapporté que la capacité émulsifiante des concentrats ou isolats protéiques des légumineuses est affectée par la méthode appliquée pour leur préparation. Par exemple, Adebowale *et al.* (2011) ont noté une stabilité émulsifiante plus élevée pour les isolats micellisés de pois Bambara que pour les isolats obtenus par précipitation isoélectrique. De plus, il a été noté que le pH du milieu d'extraction avait un effet sur les activités émulsifiantes. Pedroche *et al.* (2004) ont étudié l'effet du pH d'extraction sur les propriétés émulsifiantes des isolats protéiques précipités à l'acide. Ils ont montré que les isolats protéiques extraits à un pH alcalin (soit 10, 11 ou 12) ont des propriétés émulsifiantes inférieures à celles de leurs farines. Les deux propriétés émulsifiantes (capacité et stabilité émulsifiante) diminuent au fur et à mesure que le pH d'extraction augmente. Cela contraste avec les résultats d'Aluko et McIntosh (2001), qui ont noté que la stabilité émulsifiante du précipité acide est plus élevée que celle de sa farine. Cette différence pourrait être due à des différences entre les cultivars et la méthode d'extraction utilisée (Tan *et al.*, 2011 ; Arise, 2016).

#### **I.2.4.6. Propriétés gélifiantes**

Les propriétés de structuration regroupent les propriétés d'interaction protéines-protéines. Ce sont les propriétés intervenant lors des phénomènes tels que la gélification ou la texturation. La gélification est un phénomène qui implique une dénaturation des protéines suivie de leur agrégation pour former un réseau protéique ordonné. Un traitement thermique est indispensable à la gélification, même si l'alcalinisation suivie d'un retour à la neutralité est suffisante pour la gélification des protéines de soja (Hermansson, 1986). Les globulines 11S et 7S des graines de légumineuses, capables de se dissocier et de s'associer par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et d'échanges SH - SS sont des protéines, les plus déterminantes dans les phénomènes de gélification, les globulines 7S étant meilleure que les globulines 11S (Catsimpoolas et Meyer, 1970). Les protéines constituent la base de la structure et de la texture de plusieurs aliments, le plus souvent fabriqués comme la mie du pain ou les gels de soja. Il existe aussi des procédés de texturation qui à partir des protéines solubles conduisent à des structures fibreuses ou ne forme de film, possédant une bonne capacité de rétention d'eau et pouvant garder ces propriétés aux cours du chauffage. Des films protéiques ont pu être obtenus



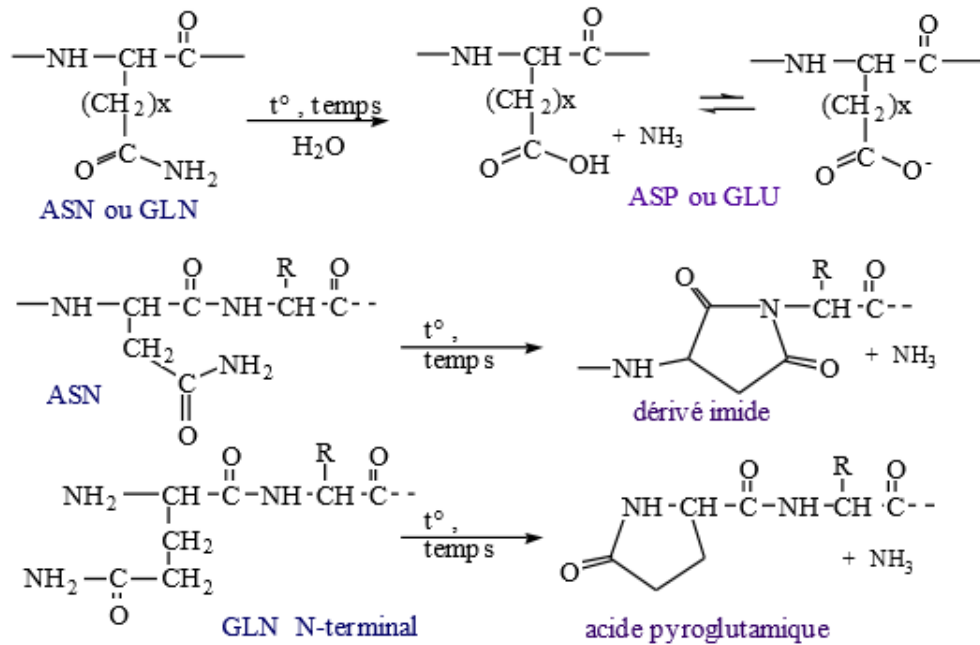
par coagulation thermique du lait de soja au Japon. La texturation des protéines sous forme de granules ou de morceaux secs, fibreux et poreux est réalisée par extrusion thermoplastique utilisant des températures et pressions élevées, de même que d'intenses forces de cisaillement (Guégen et Lemarié, 1960). Généralement la texturation conduit à des produits masticables, qui sont utilisés pour remplacer ou diluer les viandes. Les interactions hydrophobes et les échanges SH-SS sont très impliqués dans les phénomènes de texturation, le déplissement de la protéine étant indispensable. Les protéines globulaires de masse moléculaire élevée présentent de bonnes propriétés texturation (Guégen et Lemarié, 1960 ; Arise, 2016).

### **I.2.5. Modification des propriétés fonctionnelles**

De nombreux travaux ont été consacrés à l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires. Ces propriétés sont fonction des structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, et dépendent donc de certaines caractéristiques des protéines (charge, taille, hydrophobicité de surface...). Ces modifications peuvent être obtenues par voie physique (température, pression etc.), chimique ou biochimique (enzymatique) et affectent une structure donnée.

#### **I.2.5.1. Modification par les agents physiques**

Les traitements thermiques des protéines peuvent provoquer des modifications structurales, l'hydrolyse des liaisons peptidiques et des modifications des chaînes latérales d'acides aminés selon l'intensité et la durée du traitement, l'activité de l'eau, le pH, la force ionique entre autres (Cuq, 1991). Généralement un traitement thermique modéré (température 50 – 80 °C, temps entre 10 et 30 minutes) aux pH acides (2 – 4) ou faiblement alcalins (7 – 8,5) conduit à une destruction des interactions maintenant les conformations secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines, conduisant à leur déplissement (Kinsella, 1976). Ce déplissement thermique améliore la solubilité des protéines, les propriétés gélifiantes, émulsifiantes et moussantes (Kinsella, 1976). La glutamine et l'asparagine sont les résidus protéiques affectés directement au cours de traitements technologiques. Ils subissent sous l'effet de la chaleur et en milieu acide ou alcalin une désamidation dont l'effet significatif sur la valeur nutritionnelle est lié à la formation ultérieure de ponts covalents. La désamidation peut également intervenir au cours d'une protéolyse (Cuq, 1991). Elle peut se former à partir des résidus Gln N-terminaux de l'acide pyroglutamique et à partir de l'Asn des dérivés cycliques « imides » (**Figure 13**).



**Figure 13 :** Effet de la chaleur sur les résidus de glutamine et d’asparagine (Cuq, 1991).

### I.2.5.2. Modification par les agents chimiques

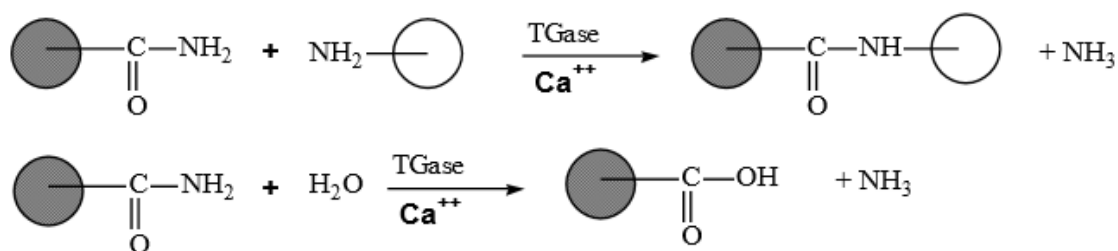
Ces modifications ont généralement pour objectif principal de fabriquer des produits biodégradables destinés à une utilisation non alimentaire. Parmi l’ensemble des bio polymères, les protéines sont les seules à posséder la plupart des fonctions réactives de la « chimie organique » (Cuq, 1991). Les agents chimiques les plus impliqués dans les modifications des propriétés fonctionnelles des protéines sont les acides et bases, les métaux, les sels, et les solvants organiques. Les pH faiblement acides (4 – 5) ou les concentrations élevées en sel (> 1 M) entraînent une précipitation des protéines (Cheftel *et al.*, 1985). La solubilité peut être restaurée quand le sel est utilisé pour la précipitation ou quand la précipitation est conduite à basse température. La solubilité des protéines est accrue aux pH acides (1 - 4) et alcalins (7 - 12). Elle est plus importante aux pH alcalins par rapport aux pH acides, due à un plus grand nombre de résidus chargés négativement aux pH alcalins, qu’au nombre de résidus chargés positivement aux pH acides (Cheftel *et al.*, 1985). Une alcalinisation (pH 10 – 12) préalable à une neutralisation améliore les propriétés de surface de protéines. Les pH acides ou alcalins favorisent la fixation par les protéines d’anions et de cations respectivement, qui abaissent la solubilité des protéines (Cheftel *et al.*, 1985). Les pH alcalins favorisent la fixation de polyphénols aux protéines par l’intermédiaire des résidus de Lys, Cys, Met et Trp affectant ainsi leurs propriétés gélifiantes et texturantes (Cheftel *et al.*, 1985 ; Lin *et al.*, 1974).

Les traitements des farines ou des concentrats protéiques par les solvants organiques sont souvent utilisés pour éliminer les lipides, les sels minéraux et les sucres. Ces traitements exposent les régions hydrophobes des protéines, et s'accompagnent d'une insolubilisation et d'une réduction de la capacité d'absorption d'eau des protéines. L'élimination de l'eau aux températures élevées affecte la solubilité des protéines, l'absorption d'eau et leurs propriétés de surface, par rapport aux techniques comme l'ultrafiltration (Cheftel *et al.*, 1985).

### **I.2.5.3. Modifications dues à l'action d'enzymes**

La modification enzymatique des protéines constitue un outil très performant pour améliorer une ou plusieurs propriétés physico-chimiques ou nutritionnelles de ces macromolécules. De toutes les modifications effectuées, la protéolyse partielle au moyen de protéases est le traitement le plus utilisé actuellement (Panyam et Kilara, 1996). Les enzymes utilisées sont les protéases digestives (trypsine, pepsine...), les protéases de végétaux (papaine, macrodontine...) ou de microorganismes (alcalase, esperase...) (Surowka *et al.*, 2004). À l'instar de la transglutaminase (EC 2.3.2.13.) enzyme extraite du foie de porc (80000 daltons, calcium dépendante) ou excrétée par des microorganismes (à partir de *Streptoverticillium sp* à 38000 daltons, un  $pH_i = 9$ , un  $pH_{op} = 6,5$ , une  $t_{op} = 55$  °C, et est insensible au calcium) catalyse la formation de liaisons covalentes entre des groupes amines libres (résidus de lysine) et le gamma carboxyl amide des résidus de glutamine (**Figure 14**). Appliqué à des solutions protéiques concentrées, ce traitement conduit à la formation de gels et de films aux propriétés rhéologiques particulièrement intéressantes (Cuq, 1991).

La protéolyse partielle est surtout utilisée pour améliorer la solubilité des protéines rendues insolubles par la chaleur ou les solvants utilisés au cours des procédures d'extraction de protéines, ou lors de la préparation d'aliments. L'accroissement de la solubilité est attribuable à la formation d'unités polypeptidiques plus petites, donc incapables de former des agrégats volumineux au pH isoélectrique, qui sont plus hydrophiles et solvatées. Généralement la protéolyse limitée s'accompagne d'une amélioration de propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines, la stabilité de l'émulsion et de la mousse est toutefois altérée. La protéolyse limitée est défavorable aux propriétés gélifiantes des protéines (Alder-Nissen, 1986).

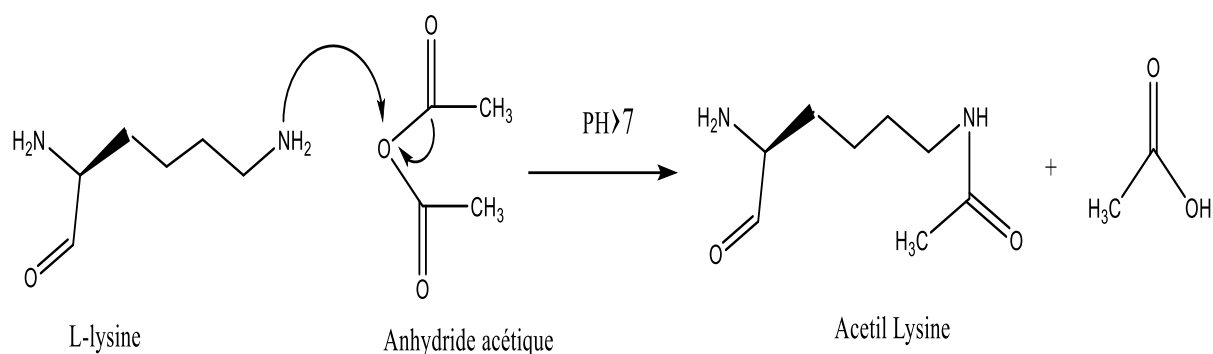


**Figure 14 :** Réactions catalysées par la transglutaminase.

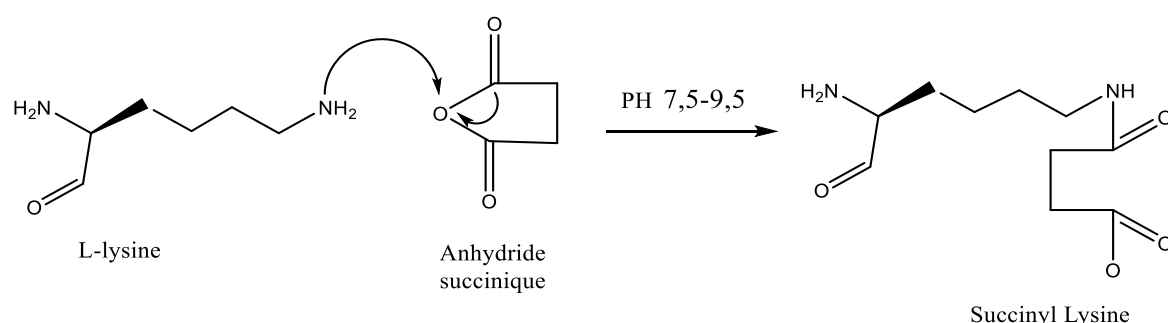
#### I.2.5.4. Modifications chimiques spécifiques

De nombreuses modifications de la structure primaire des protéines sont effectuées dans le but d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles pour des utilisations alimentaires ou autres. Les propriétés fonctionnelles des protéines modifiées dépendent du type de modification chimique effectuée et de l'étendue de la modification. Les modifications les plus courantes dans le domaine alimentaire sont la désamidation et l'acylation. La désamidation consiste à hydrolyser, en milieu acide et à chaud (75 °C), les fonctions amides de résidus de glutamine ou d'asparagine pour libérer les groupements carboxyliques ionisables. Les modifications de la conformation qui s'ensuivent favorisent l'amélioration de la solubilité, des propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines (Cuq, 1991).

L'acylation est généralement effectuée sur les groupements  $\alpha$ - ou  $\xi$ -aminés, même si les groupements hydroxyl, imidazole, et thiol sont aussi capables de réagir avec les anhydrides acétique et succinique qui sont les plus communément utilisés. L'acétylation décroît le nombre de charges positives de la protéine, qu'elle substitue par les groupements acétyles qui sont hydrophobes (**Figure 15**). La succinylation introduit les résidus anioniques succinates qui sont liés de manière covalente aux groupements  $\alpha$  ou  $\xi$ -aminés de la protéine (**Figure 16**) (Cuq, 1991). Les protéines acétylées et succinylées présentent une amélioration de leur solubilité, leur viscosité en solution, leurs propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes. Ces effets restent néanmoins largement dépendants du pH (Lawal *et al.*, 2007).



**Figure 15 :** Réaction d’acétylation de la lysine par l’anhydride acétique.



**Figure 16 :** Réaction de succinylation de la lysine par l’anhydride succinique.

Cette substitution de charges positives par les charges négatives engendre une modification d’interactions électrostatiques dans la protéine et une dissociation de sous unités agrégées, associées à des changements conformationnels majeurs.

### I.3. QUELQUES TECHNIQUES D’ETUDES DES STRUCTURES DES PROTEINES

Les techniques d’extraction et de purification peuvent avoir un impact sur la qualité des protéines au niveau moléculaire et par conséquent, réduire leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles. Les prochains paragraphes sont dédiés à la description des techniques employées pour l’étude de la structure des protéines. Les protéines globulaires ont des structures compactes et étroitement repliées dans leur état natif. Cette structure peut être altérée par un changement d’environnement ou en les soumettant à des pH extrêmes, des températures élevées, des détergents et des solvants organiques. Une telle exposition entraîne le dépliage de la protéine (Mundi, 2012). Les propriétés physico-chimiques des protéines dépliées sont généralement différentes de celles des molécules repliées. Il est donc pertinent d’étudier la

structure des isolats protéiques afin de comprendre comment les protéines se replient dans des états biologiquement actifs et comment ces états sont stabilisés. Ces études doivent être réalisées dans les conditions dans lesquelles les protéines de légumineuses fonctionnent réellement (généralement en solution) ainsi que dans d'autres conditions et fournir des mesures des taux de changements structuraux des protéines, qui sont souvent essentiels à leur fonction biologique (Mundi, 2012).

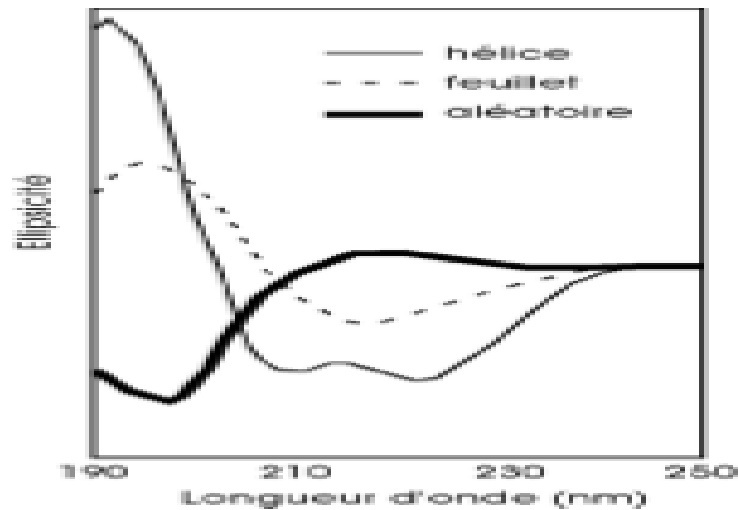
Les méthodes spectroscopiques telles que le dichroïsme circulaire (DC), la spectroscopie de fluorescence (FS) et la calorimétrie différentielle à balayage ou Differential Scanning Calorimetry (DSC) sont des outils analytiques qui peuvent mesurer les changements de conformation qui peuvent survenir (au niveau moléculaire) dus à des changements dans l'environnement de la protéine (Kelly *et al.*, 2005).

### **I.3.1. Le dichroïsme circulaire (DC)**

Depuis quelques années, le dichroïsme circulaire (DC) est devenu une technique très reconnue pour la mesure des modifications structurales des protéines. Le DC est de plus en plus reconnu comme une technique précieuse pour examiner la structure des protéines en solution, la stabilité du fragment de protéine conçu et l'étendue de la vitesse des changements structuraux qui se sont produits dans la structure de la protéine (Kelly *et al.*, 2005). Au cours de l'extraction, l'isolation, la digestion et la caractérisation, l'intégrité structurale de la protéine peut être altérée, la technique de DC est donc nécessaire pour évaluer les changements de conformation de ces protéines (Malomo, 2015). La spectroscopie par DC a une bonne précision pour évaluer les changements dans les deux types de structures suivantes : secondaires (hélice  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , tours  $\beta$  et non ordonnés) et tertiaires des protéines (**Figure 17**). Le DC est aussi utilisé pour l'étude de la stabilité structurale d'une protéine suite au traitement thermique ou avec un agent dénaturant (urée ou chlorure de guanidinium) (Kelly et Price, 2000).

Le DC est basé sur l'absorption différentielle des radiations polarisées circulairement à gauche et à droite par les chromophores des échantillons de protéines lorsqu'ils sont placés dans des environnements de chiralité intrinsèque ou dans des environnements chiraux. Cela donne une mesure empirique de l'arrangement structurel et de la conformation de la protéine (Kelly *et al.*, 2005). L'unité standard de rapport de la mesure de la spectroscopie par DC est l'ellipticité moyenne des résidus, qui correspond à l'ellipticité molaire de la protéine divisée par le nombre de résidus. L'absorption des liaisons peptidiques dans les chromophores de la protéine donne lieu à des signaux DC dans la région de l'ultraviolet lointain (UV) de 240 - 180 nm, qui représentent les caractéristiques structurales secondaires régulières (Kelly *et al.*, 2005). L'autre

spectre dans la région de l'UV proche à 320 - 250 nm reflète les environnements de la chaîne latérale des acides aminés aromatiques pour donner des informations sur les structures tertiaires de la protéine (Kelly *et al.*, 2005). Les avantages de cette technique sont la simplicité, la rapidité et les faibles quantités d'échantillon nécessaires pour chaque analyse. La méthode est aussi non intrusive, ce qui permet l'utilisation du même échantillon pour d'autres études.



**Figure 17 :** Spectres DC (UV lointain) spécifiques correspondant aux trois types de structure secondaire des protéines d'après Horton *et al.* (2000).

### I.3.2. Spectroscopie de fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse générée suite à l'excitation d'une molécule (fluorophore) par absorption d'un photon. Elle est suivie par l'émission spontanée de la même lumière. En effet, pendant un très court moment, la molécule qui adsorbe le photon, se trouve dans un état excité (singulet). Le retour à un état énergétique plus bas (état fondamental), va caractériser la fluorescence (Parker, 1968).

La fluorescence des protéines est liée à l'absorbance des acides aminés aromatiques : tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Cependant, chez les protéines contenant les trois acides aminés, la fluorescence émise est souvent dominée par la seule contribution du tryptophane qui a une absorbance et un rendement d'émission plus importants que les deux autres résidus aromatiques. En effet, la sensibilité du tryptophane est beaucoup plus élevée que celle de la tyrosine et de la phénylalanine (Parker, 1968). Le changement structural d'une protéine, comme la dénaturation, induit souvent des modifications d'émission de fluorescence du tryptophane ou de la tyrosine pour les protéines sans tryptophane. L'émission du tryptophane d'une protéine peut varier selon l'environnement où il est exposé. C'est pourquoi son intensité de fluorescence

augmente et diminue au cours de la dénaturation de la protéine. Le déplacement de l'émission maximale ( $\lambda_{\max}$ ) du tryptophane est appelé « shift » (Parker, 1968). Si le tryptophane se trouve dans un environnement hydrophobe (le cœur de la protéine), on assiste à un déplacement de sa  $\lambda_{\max}$  vers le bleu, appelé « bleu shift ». Inversement, dans le cas d'une dénaturation de la protéine le tryptophane est exposé au solvant et son émission de fluorescence se déplace vers le rouge : « red shift » (Parker, 1968).

La fluorescence est une technique largement utilisée pour l'étude de la structure tertiaire des protéines et en particulier pour l'analyse de leur processus de dénaturation. Parmi les agents dénaturants utilisés, les plus communs sont la température, le chlorure de guanidinium et l'urée. En règle générale, l'augmentation de la température provoque une diminution de l'intensité de fluorescence. Une augmentation de la concentration en agent dénaturant affecte aussi significativement la fluorescence du tryptophane et de la tyrosine. Cela est souvent utilisé pour évaluer le taux de déstructuration des protéines et leur stabilité (Parker, 1968). Le principal avantage de la fluorescence est l'utilisation des quantités très limitées de matériaux (d'ordre de nano mole) de l'échantillon (Kelly *et al.*, 2005).

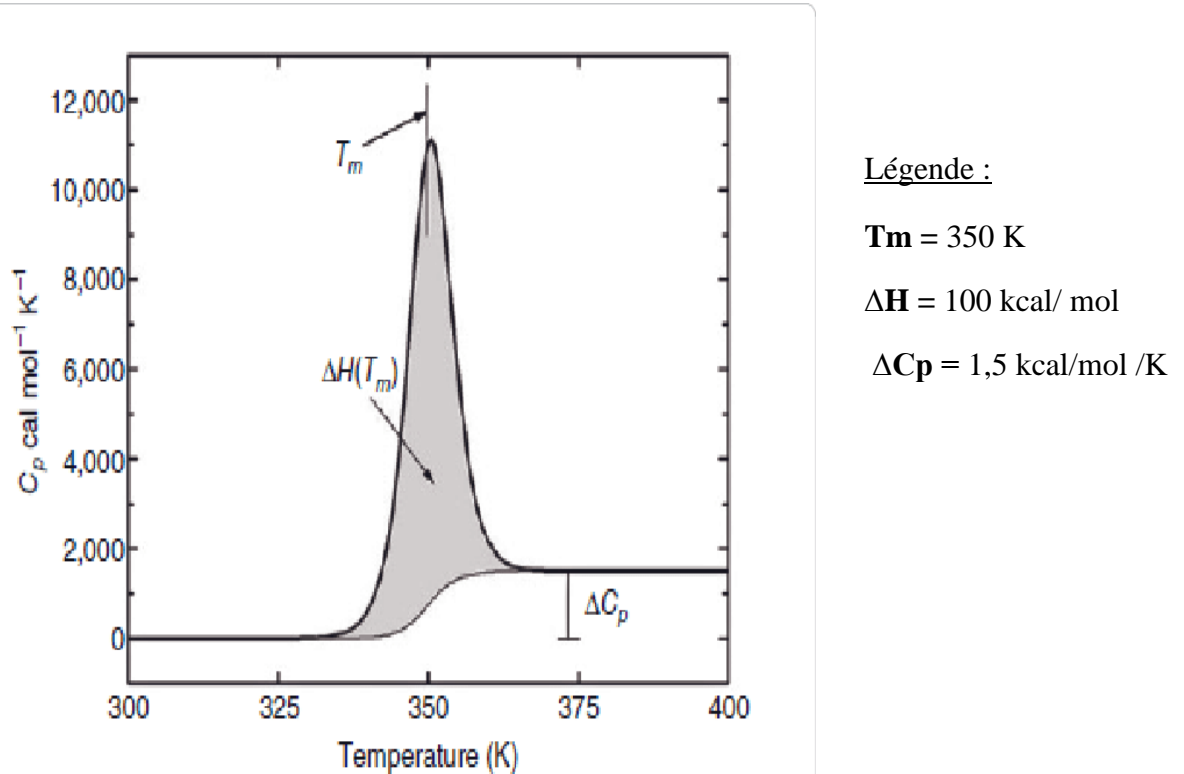
### **I.3.3. La calorimétrie différentielle à balayage ou Differential Scanning Calorimetry (DSC)**

La calorimétrie différentielle à balayage ou Differential Scanning Calorimetry (DSC) est une technique qui a été très développée au cours des dernières années, pour l'étude de la stabilité thermique des protéines (Privalov, 1979). La stabilité d'une protéine peut être définie comme étant sa capacité à conserver la structure tridimensionnelle d'une chaîne polypeptidique dans des conditions extrêmes (température, pH, agents chimiques, etc.).

La DSC fait partie des techniques permettant de déterminer la résistance de la structure des protéines à la température, tout en mettant en évidence leur processus de déstructuration. L'analyse de la variation de la chaleur spécifique ( $C_p$ ) fournit des informations sur l'état natif de la protéine et sur les états intermédiaires qui apparaissent au cours du processus de dénaturation par la température (**Figure 18**). Dans le cas le plus simple, la dénaturation d'une protéine est réversible. Elle n'existe que sous deux formes (native et dénaturée) qui sont à l'équilibre. Ce modèle présente de nombreuses restrictions, car les protéines n'ont pas toujours un comportement simple représenté par deux états (Cooper, 2000). La validité de la méthode van't Hoff peut être évaluée par la DSC qui donne la valeur réelle de l'enthalpie du processus de dénaturation. En effet, une des particularités de la DSC est la possibilité de déterminer la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) calorimétrique du processus et de celle de van't Hoff à partir d'un



seul thermogramme. L'enthalpie calorimétrique ( $\Delta H_{cal}$ ) représente la surface sous la courbe du pic d'absorption de chaleur (QT) divisée par le nombre de moles de protéine impliquées ( $\eta$ ) (Cooper, 2000).



**Figure 18 :** Thermogrammes typiques obtenus suite à la dénaturation thermique d'une petite protéine globulaire en solution avec (Giri et Pal, 2016).

#### I.4. METHODES DE SEPARATIONS ET D'IDENTIFICATION DES PROTEINES

L'évaluation de la masse molaire d'une protéine inconnue est une des premières étapes de son identification. Cependant, cette dernière se trouve fréquemment en présence de mélanges protéiques d'où l'usage de différentes techniques biochimiques en vue de leurs séparations.

##### I.4.1. Techniques chromatographiques

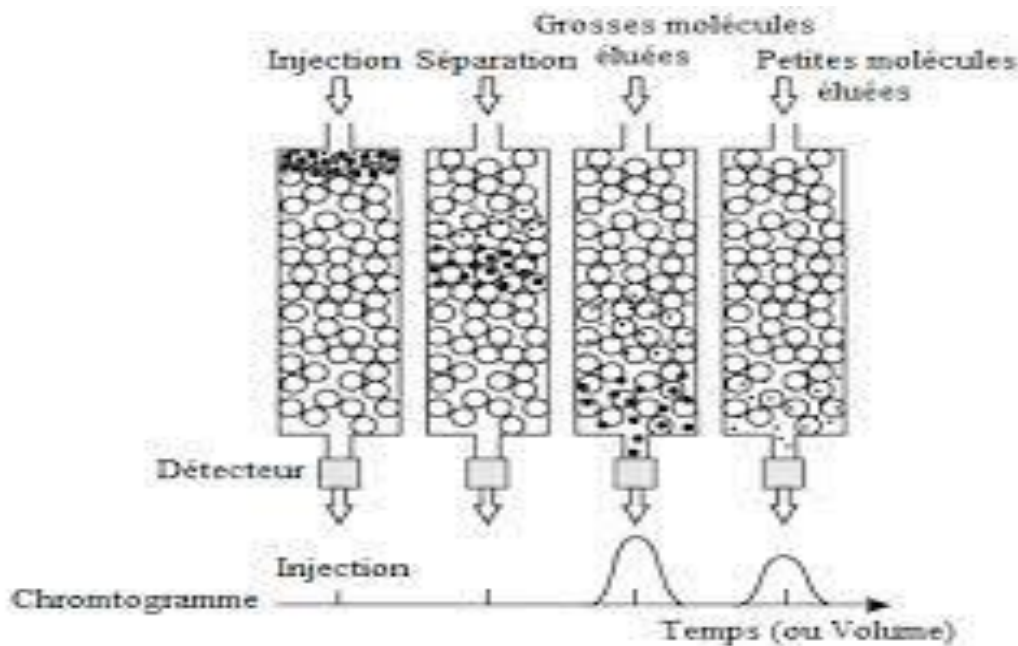
La chromatographie est une technique qui permet de séparer les différentes molécules d'un mélange. Elle est caractérisée par deux phases distinctes : une phase stationnaire, généralement placée dans une colonne, sur laquelle les constituants du mélange sont retenus avec plus ou moins d'affinité, et une phase mobile (liquide ou gazeuse) dans laquelle les constituants du mélange sont miscibles et transportés à travers la phase stationnaire. Ainsi, les molécules du mélange sont plus ou moins retardées suivant leur affinité par rapport à la phase stationnaire (Bouhallab *et al.*, 1996). Le principe général de la chromatographie est basé sur le coefficient d'affinité **K<sub>a</sub>**.

$$K_a = \frac{\text{Concentration en soluté dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration en soluté dans la phase mobile}}$$

La chromatographie est considérée comme étant la méthode de choix aussi bien pour l'analyse de la composition en peptides des hydrolysats protéiques que pour la purification des peptides d'intérêt (Silvestre, 1997). De plus, suivant la résolution des techniques employées et la pureté du produit désiré, il est souvent envisagé la combinaison de plusieurs techniques chromatographiques.

#### I.4.1.1. Chromatographie par filtration sur gel

La séparation en chromatographie d'exclusion stérique est faite grâce à l'utilisation de billes poreuses, avec une gamme bien définie de taille de pores, comme phase stationnaire. Les molécules dont le volume est supérieur à celui des billes ne peuvent y pénétrer et sont éluées rapidement. Tandis que les molécules dont le volume est inférieur à celui des billes y pénètrent et y subissent des frottements qui les retardent (**Figure 19**).



**Figure 19** : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique.

#### I.4.1.2. Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

La CEI permet de séparer les peptides selon leur charge. En fonction de la charge du support, le fractionnement peut être réalisé sous deux formes. Si le support est chargé négativement, les peptides retenus sont basiques (chargés positivement) ; il s'agit alors de la chromatographie échangeuse de cations. Inversement, si le support est chargé positivement, les peptides retenus sont acides ; il s'agit de la chromatographie échangeuse d'anions.

Dans ce type de chromatographie, le pH et la force ionique de la phase mobile jouent un rôle primordial puisque ces deux paramètres influencent directement l'intensité des charges des peptides et du support. La séparation présente généralement une meilleure résolution en échange de cations qu'en échange d'anions (Bouhallab *et al.*, 1996).

## **I.4.2. Techniques électrophorétiques.**

### **I.4.2.1. Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE)**

Dans cette technique, les molécules protéiques sont mises en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), qui, par ses charges négatives, masque les charges propres des peptides. Selon la charge globale de l'ensemble peptide/SDS, la vitesse de migration des peptides dans un réseau de polyacrylamide sous l'action d'un champ électrique, dépend uniquement de la longueur de la chaîne peptidique (Laemmli, 1970). La technique du SDS-PAGE est quelque fois utilisée pour caractériser les mélanges peptidiques comme cela a été réalisé par Masson *et al.* (1986) avec un hydrolysate de protéines de blé par la pepsine. Elle présente toutefois le désavantage de ne pas être adaptée pour la séparation des peptides inférieurs à 2500 Da.

## **I.5. DETERMINATION DE LA STRUCTURE D'UNE PROTEINE**

Différentes approches peuvent être utilisées pour prédire la structure 3D d'une protéine à partir de sa structure et de sa composition en acides aminés. Il s'agit en outre des méthodes expérimentales et de prédictions expérimentales (basée sur l'usage des outils informatiques).

### **I.5.1. Méthodes expérimentales**

Les méthodes expérimentales fournissent en réalité la meilleure approximation du réel car elles sont basées sur des observations et des mesures physiques issues d'expériences faisant intervenir de vraies protéines. Les structures définies expérimentalement sont usuellement classées en deux grandes catégories : les structures à haut niveau de résolution (précision inférieure à 3 Å) et celles à bas niveau de résolution. Si les premières peuvent souvent être considérées comme étant les structures réelles, le niveau de résolution des secondes nous pousse souvent à les considérer comme des prédictions du même taux de confiance que celles obtenues avec les meilleurs algorithmes de prédiction de structure (Chen *et al.*, 2002). La cristallographie et la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont des méthodes expérimentales les plus utilisées (Capener *et al.*, 2000). À l'heure actuelle, la cristallographie est la méthode la plus efficace pour déterminer la structure d'une protéine. Les deux premières protéines cristallisées furent la myoglobine et l'hémoglobine vers la fin des années 50. En 1988, un peu plus de 200 autres structures ont été ainsi déterminées, pour finalement dépasser les 25000 aujourd'hui. Les

niveaux de définition atteints par cette technique sont de l'ordre de l'Angstrom (Å). La RMN ne nécessite pas pour sa part de cristalliser la protéine. En conséquence, cette dernière pourra être étudiée dans un milieu plus similaire à celui rencontré *in-vivo*. Cette technique permet également d'observer la dynamique de repliement du polypeptide et non plus uniquement dans sa configuration finale. Ces arguments plaident nettement en faveur des adeptes de la RMN. En revanche, la taille des protéines pouvant être traitées au moyen de cette technique est limitée à une centaine d'acides aminés, restreignant ainsi son domaine d'application (Capener *et al.*, 2000).

### **I.5.2. Méthodes de prédictions *in silico***

Il existe une multitude de méthodes de prédiction de structure *in silico*. La fiabilité des prédictions est bien entendu fortement liée au niveau de définition de la prédiction et du raffinement du modèle utilisé. Nous pouvons ainsi distinguer les algorithmes destinés à la prédiction de structures secondaires de ceux retournant un modèle tridimensionnel de la protéine. Pour les structures tertiaires, deux types de techniques permettent de prédire leurs structures. Tout d'abord des méthodes de dynamique moléculaire basées sur des modèles thermodynamiques exacts permettant de simuler le repliement puis de déterminer la structure tertiaire d'une protéine (MacKerell, 2001 ; Fiser *et al.*, 1998). Ces techniques sont implémentées dans des logiciels tels que CHARMM (MacKerell *et al.*, 1998). Mais, en raison de l'extrême complexité des calculs devant être effectués, la taille des polypeptides pouvant être traitée par ces méthodes ne dépasse pas la vingtaine d'acides aminés, rendant de fait ces techniques inutilisables en pratique. Alternativement, d'autres méthodes dites comparatives ou par homologie proposent de déterminer la structure tertiaire par alignement de séquences et/ou de sous-éléments structuraux (Greer, 1990 ; Sali, 1995 ; S'anchez et Sali, 1997). Plusieurs logiciels tels que COMPOSER (Sutcliffe *et al.*, 1987), MODELLER (Sali et Blundell, 1993 ; Marti-Renom *et al.*, 2000) ou SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003) basés sur cette approche sont aujourd'hui disponibles.

Par définition, la fiabilité de la prédiction est directement liée à la présence dans la base de données d'homologues à la séquence analysée. La modélisation « comparative » ou « homologie » est l'approche la plus précise qui utilise le principe que les protéines partagent une structure similaire. La modélisation moléculaire est un terme qui englobe un ensemble de techniques de chimie computationnelle et de graphisme moléculaire (Cavasotto et Phatak, 2009). Ces techniques permettent d'analyser, d'afficher, de dessiner, de calculer, de simuler et

de stocker les propriétés des composés pour imiter le comportement ou modéliser de molécules (Vitkup *et al.*, 2001).

### **I.5.2.1. Modélisation moléculaire basée sur la structure**

La modélisation moléculaire est fondée sur l'utilisation de la structure tridimensionnelle (3D) de la protéine cible. Plusieurs structures de protéines sont disponibles dans la Protein Data Bank. Cependant plusieurs familles ne sont pas représentées et en l'absence d'une structure 3D pour certaines protéines (Vitkup *et al.*, 2001). Il est donc légitime de tenter d'en construire un modèle par les techniques de construction par homologie, et de déterminer l'énergie de leurs entités moléculaires. Les méthodes de prédiction de la structure tridimensionnelle des protéines sont classées en trois catégories :

- Les méthodes de reconnaissance de repliement ou d'enfilage « threading » ;
- Les méthodes de novo et ab initio ;
- La modélisation par homologie (ou modélisation comparative).

#### **I.5.2.1.1. Méthodes de reconnaissance de repliement « Threading »**

Elle est utilisée comme méthode alternative à la modélisation par homologie lorsque le taux d'identité de la protéine à structure inconnue avec les séquences disponibles dans la PDB est entre 15 - 30 %. Elle a comme principe d'identifier parmi les repliements connus celui qui pourrait contenir la séquence cible, en calculant un score de compatibilité afin de déterminer la meilleure hypothèse (Moult, 2005). Les difficultés de ces méthodes résident aussi bien dans l'alignement séquence-structure que dans l'évaluation des différents modèles potentiels. À cet effet, elles sont devenues de moins en moins compétitives avec les méthodes ab initio et de novo (Moult, 2005).

#### **I.5.2.1.2. Méthodes ab initio et de novo**

Cette méthode vise à prédire la structure à partir de sa séquence en acides aminés. On distingue deux types de méthodes :

- ❖ Les méthodes ab initio « pures » : Elles reposent surtout sur les propriétés physico-chimiques et sur la recherche de la structure d'une protéine avec une faible énergie dans l'ensemble des structures possibles. Plusieurs méthodes utilisent ASTRO-FOLD comme principale approche pour prédire premièrement les hélices, puis les brins et la topologie globale des feuilletts. Alors que les boucles sont modélisées séparément. Toutes ces parties sont ensuite utilisées pour la prédiction d'une structure 3D (Klepeis et Floudas, 2003). Ces

méthodes ne sont applicables que pour les petites protéines de moins d'une centaine de résidus. Ceci du fait qu'elles nécessitent une importante exploration de l'espace conformationnel.

- ❖ Les méthodes de novo : Elles exploitent toutes les informations obtenues par l'analyse des structures tridimensionnelles connues, en utilisant actuellement les approches d'assemblage de fragments (Moult, 2005). Elles reposent sur l'hypothèse qu'il y a probablement presque toutes les sous-structures. Elles procèdent ainsi en deux étapes ; d'abord réduire le nombre de conformation possible pour un fragment de séquence. Ensuite générer de nombreux modèles 3D en assemblant les fragments prédits. La sélection du modèle se fait grâce à une fonction d'énergie appropriée (Moult, 2005).

### **I.5.2.1.3. Modélisation par homologie**

La modélisation par homologie est utilisée pour déterminer l'espace de conformation d'une structure inconnue à partir d'autres structures résolues expérimentalement. Elle est basée essentiellement sur le fait que la conformation structurale d'une protéine est plus fortement conservée que sa séquence primaire d'acides aminés (Lesk et Chothia, 1980), et qu'un faible changement de la séquence n'entraîne qu'une faible variation de sa structure 3D (Chothia et Lesk, 1986). La modélisation par homologie est une méthode qui est fondée sur des données réelles (bonne résolution, quantité des protéines résolues dans PDB). Elle est la succession de différentes étapes (Martí-Renom *et al.*, 2000) qui peuvent être répétées jusqu'à l'obtention du modèle approprié. Elle intervient dans plusieurs domaines en particulier en biologie moléculaire. En générale, la modélisation par homologie ne donne qu'une idée structurale sur la protéine, tandis que sa qualité dépende aussi bien de la similarité et de sa séquence d'acide aminé avec celle du modèle, ainsi que du pourcentage d'identité de leurs séquences (modèle, cible) (Hilbert *et al.*, 1993). La modélisation par ordinateur d'une molécule implique une présentation graphique de la configuration et de la géométrie de ses atomes, suivie de l'application d'une méthode théorique (Clark1, 1985).

**Tableau 5 :** Tableau récapitulatif sur les méthodes de prédiction *in silico*.

<b>Modélisation moléculaire basée sur la structure</b>			
	Méthode de reconnaissance de repliement ou d'enfilage « threading »	Méthode de novo et ab initio	Modélisation par homologie (ou modélisation comparative).
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Taux d'identité de la protéine à structure inconnue entre 15 - 30 % avec les séquences disponibles dans la PDB.</li> <li>➤ Identifie parmi les repliements, la séquence cible en calculant un score de compatibilité afin de déterminer la meilleure hypothèse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Recherche la structure d'une protéine avec une faible énergie dans l'ensemble des structures possibles.</li> <li>➤ Elles exploitent toutes les informations obtenues par l'analyse des structures tridimensionnelles connues.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elle est fondée sur des données réelles (bonne résolution, quantité des protéines résolues dans PDB).</li> </ul>
<b>Inconvénients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Difficulté dans l'alignement séquence-structure et dans l'évaluation des différents modèles potentiels.</li> <li>➤ Elles sont de moins en moins compétitives avec les méthodes ab initio et de novo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elles ne sont applicables qu'aux petites protéines de moins d'une centaine de résidus.</li> <li>➤ Elles nécessitent une importante exploration de l'espace conformationnel et la sélection du modèle se fait grâce à une fonction d'énergie appropriée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elle ne donne qu'une idée structurelle sur la protéine.</li> <li>➤ La qualité dépend de la similarité, la séquence d'acide aminé avec celle du modèle, de même que du pourcentage d'identité de leurs séquences.</li> </ul>

### **I.5.2.2. Applications de la modélisation par homologie.**

Le succès de la modélisation par homologie réside dans la prédiction de la structure tridimensionnelle d'une protéine inconnue en utilisant comme modèle, une structure 3D connue d'une autre protéine homologue. Cette prédiction est responsable de l'apparition de nouvelles découvertes, la production des drogues fiables et l'établissement des mécanismes fonctionnels etc.

### **I.5.2.3. Limites de la modélisation**

L'absence de structures 3D homologues représente la limite primordiale de la modélisation par homologie. En effet, devant le manque de structures expérimentales (RMN ou

RX), la modélisation ne peut avoir lieu. Récemment, la difficulté, voir même l'impossibilité de prédire les changements conformationnels qui se produisent durant une activité biologique présente une autre limite essentielle devant la modélisation.

#### **I.5.2.4. Etapes de la modélisation par homologie**

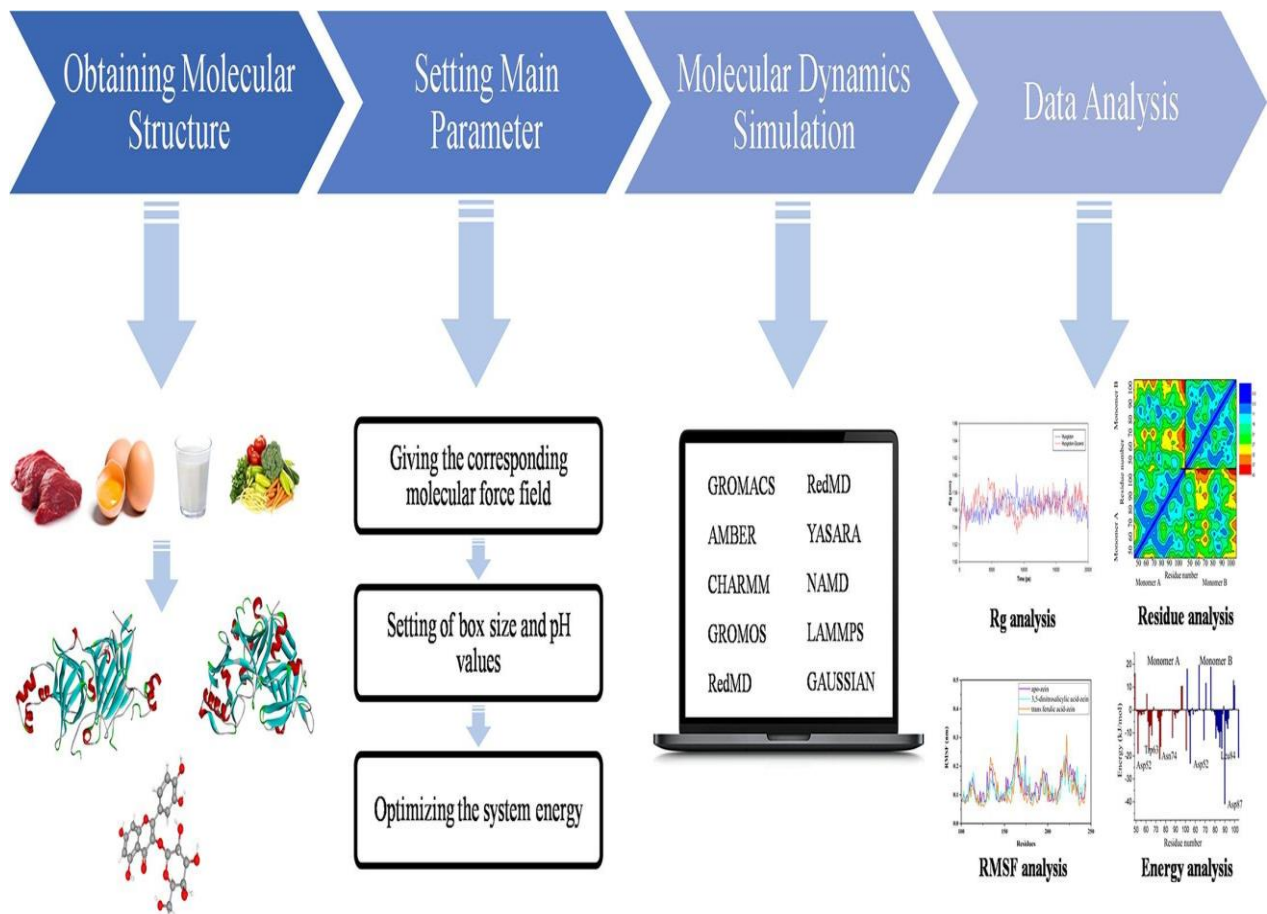
##### **I.5.2.4.1. Outils de modélisation par homologie**

L'existence d'une protéine dont la structure 3D est connue et qui représente une identité de 30 % avec la protéine à modéliser (Baker et Sali, 2001), est l'étape la plus importante dans la réalisation de la modélisation par homologie. Cette dernière nécessite l'utilisation des logiciels spécifiques, MODELLER, créé par Sali et Blundell en 1993 (Sali et Blundell, 1993), et SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014), créé il y a 20 ans comme le premier serveur entièrement automatisé et a été continuellement amélioré et développé depuis (Guex *et al.*, 2009). Ce serveur dispose d'une interface facile qui permet aux non spécialistes à partir d'un navigateur simple de générer des structures 3D. Et ceci sans avoir besoin d'installer et d'apprendre des logiciels complexes de modélisation qui peuvent télécharger de grandes bases de données (Arnold *et al.*, 2006). Actuellement, SWISS-MODEL est l'un des serveurs automatisés de modélisation les plus utilisés dans le monde, avec plus de 0,9 million de demandes de modèles de protéines par an (soit ~ 1 modèle par minute).

##### **I.5.2.4.2. Etape de la modélisation par homologie**

La réalisation de la modélisation par homologie nécessite plusieurs étapes : (1) la sélection de la meilleure structure de référence et la plus pertinente biologiquement. (2) L'alignement des séquences de la protéine cible et celle de référence. (3). A l'issue de toutes ces étapes, le modèle construit doit être validé et raffiné selon les connaissances et les données expérimentales non exploitées pour sa construction. Le serveur SWISS-MODEL est conçu pour fonctionner avec un minimum d'entrée de l'utilisateur, qui est la séquence d'acides aminés d'une protéine cible (Schwede *et al.*, 2003). Il donne à l'utilisateur le choix entre trois principaux modes d'interaction. Premier mode d'approche : Ce mode fournit une interface simple qui ne nécessite qu'une séquence d'acides aminés comme données d'entrée (Guex *et al.*, 2009 ; Kiefer *et al.*, 2008). Le serveur SWISS-MODEL sélectionne automatiquement les modèles appropriés avec une identité de séquence de plus de 25 % avec la séquence cible soumise. La procédure de modélisation débutera automatiquement si au moins un modèle est disponible.





**Figure 20 :** Logigramme pour étudier la structure des protéines.

La procédure de modélisation est initiée en soumettant un alignement de séquence, l'utilisateur spécifie la séquence cible et la séquence qui correspond à la chaîne protéique structurellement connue de la bibliothèque (Arnold *et al.*, 2006) (de modèles ExpDB. Le serveur va construire le modèle en fonction de l'alignement donné. Mode projet, le mode projet est une méthode de soumission d'une requête de modélisation optimisée manuellement au serveur SWISS-MODEL. Le fichier du projet DeepView est un point de départ de ce mode. Il contient l'alignement de la cible et les modèles ainsi que leurs structures. Le mode projet donne aux utilisateurs du contrôle sur une large gamme de paramètres (sélection des modèles, placement d'écart dans l'alignement). Il peut aussi être utilisé pour améliorer la sortie du « premier mode d'approche ».

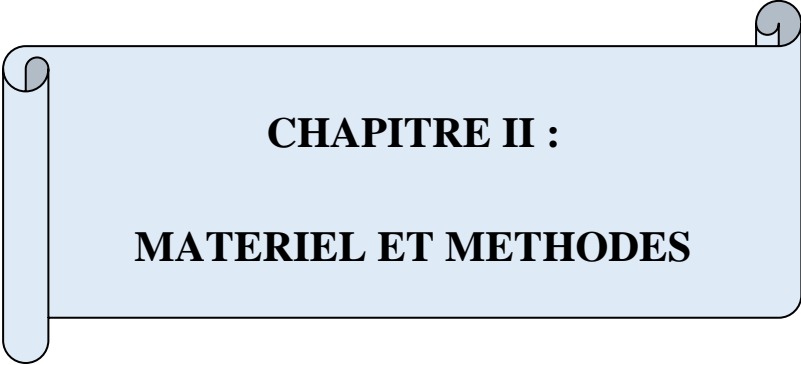
### I.5.3. Evaluation des méthodes et des modèles

L'évaluation de différentes méthodes de prédiction est une étape très critique. La raison pour laquelle la communauté scientifique se réunie tous les deux ans pour une compétition CASP (Critical Assessment of Structure Prédiction). La comparaison de ces méthodes se fait

sur le même groupe de protéines avec des critères identiques, dont la structure 3D a été déterminée expérimentalement mais non encore publiée ou déposée dans la PDB (Chothia et Lesk, 1986). L'évaluation des performances de ces méthodes est procédée en comparant les modèles prédits aux structures 3D obtenues expérimentalement. Pour mesurer la similitude et la distance entre ces deux structures on utilise comme critère, l'écart quadratique moyen ou la "déviation de la racine de la moyenne des carrés" (Root Mean Square Deviation ou RMSD) (Chothia et Lesk, 1986). Il est défini par la distance euclidienne entre les coordonnées des atomes des deux structures superposés.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)^2}{n}}$$

Le RMSD consiste en général à comparer des valeurs théoriques avec des valeurs observées dans le but de déterminer à quel point le modèle théorique représente bien la réalité. Pour cela, chaque valeur  $X_i$  théorique ou prédite est comparée à la valeur  $Y_i$  observée pour la  $i$ ème observation. Le carré de la soustraction de l'une par l'autre  $(X_i - Y_i)^2$  donne une idée de la distance qui les sépare. Les résidus représentent la différence entre les valeurs réelles et les valeurs prédites. Ils peuvent être positifs ou négatifs, car la valeur prévue est inférieure ou supérieure à la valeur réelle. La quadrature des résidus, la moyenne des carrés et la racine carrée nous donnent l'erreur quadratique moyenne.



**CHAPITRE II :**  
**MATERIEL ET METHODES**

## II.1. MATERIEL VEGETAL

Les graines séchées de pois Bambara [*Vigna subteranea* (L.) Verdc] cultivar rouge (**Figure 21**) ont été achetées au marché du Mfoundi (Yaoundé, Cameroun). Elles ont été ensuite triées puis nettoyées. Seules les graines de bonnes qualités sont conservées à 4°C dans un sac en polyéthylène jusqu'à leur utilisation.



**Figure 21** : Graines sèches de pois Bambara cultivar rouge (photographiées par NGUI Simon Pierre, 2016).

## II.2. METHODES

La démarche générale utilisée dans le cadre de ce travail est présentée à la **Figure 22**.

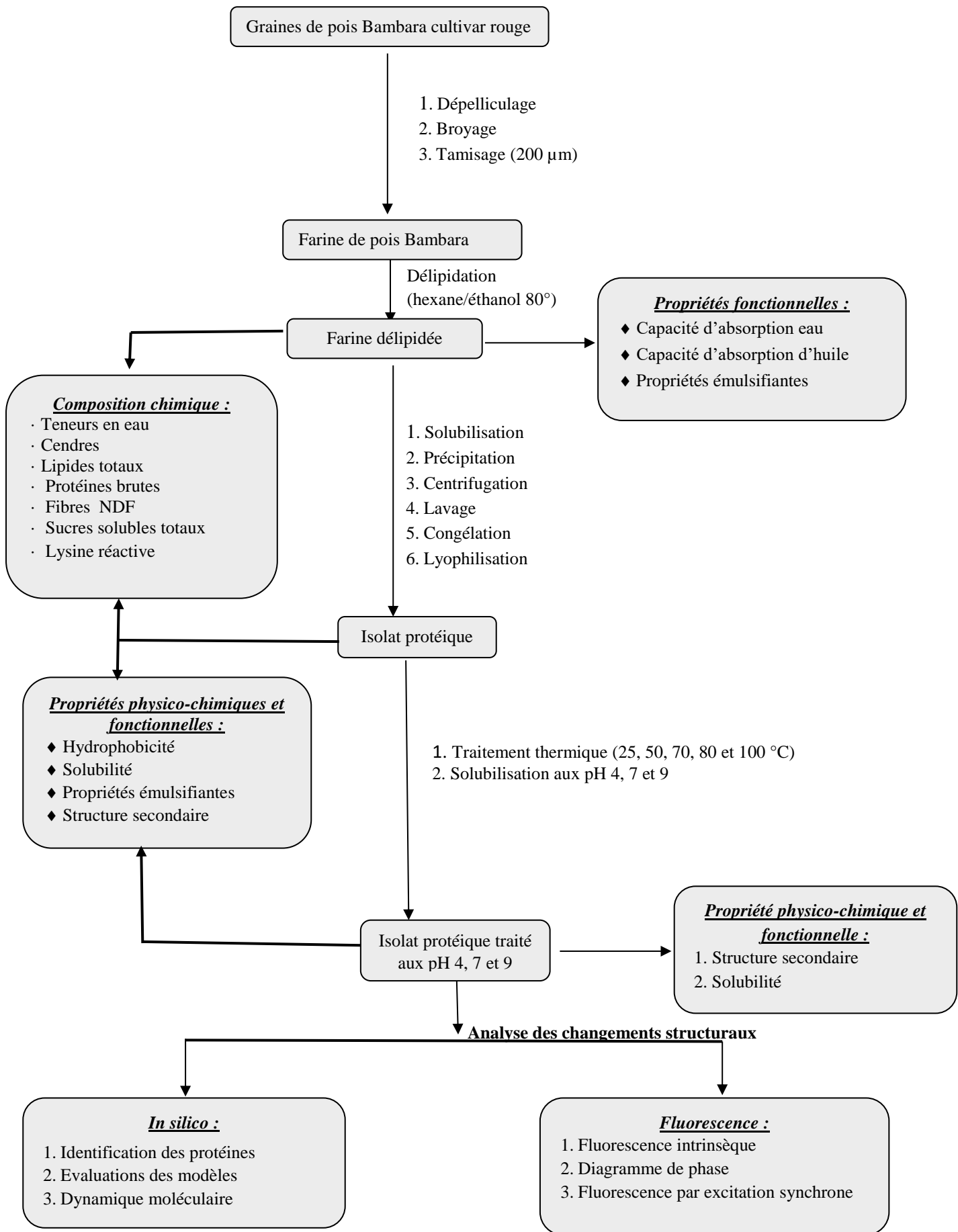
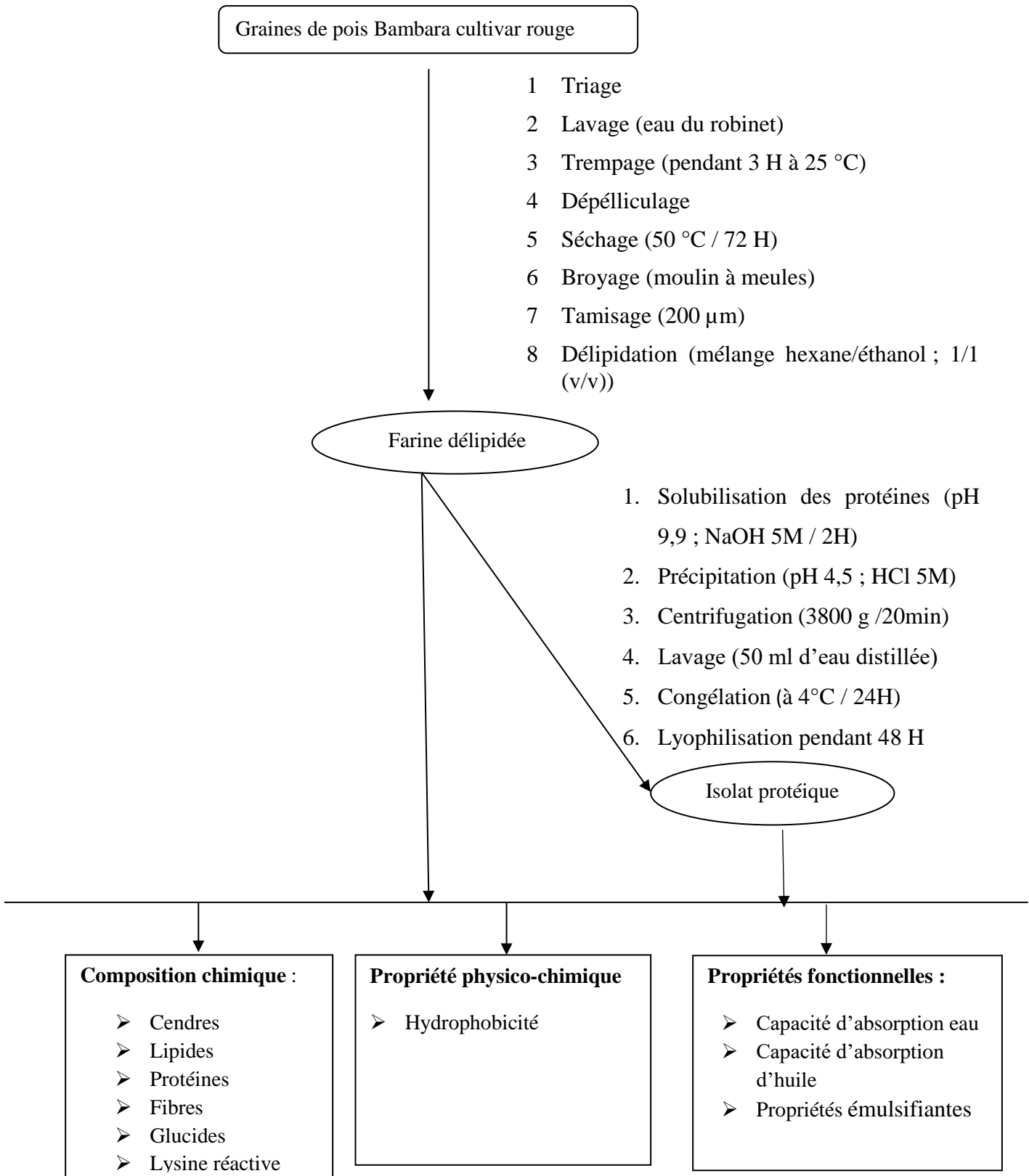


Figure 22 : Schéma général des travaux effectués sur les graines de pois Bambara.

### **II.2.1. Extraction des protéines de pois Bambara et analyse des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.**

Les graines de pois Bambara cultivar rouge ont servi à l'extraction des protéines dont les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la farine et de l'isolat protéique ont été ensuite évaluées. Le procédé d'extraction des protéines de pois Bambara et l'évaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles est schématisé à la **Figure 23**.



**Figure 23 :** Extraction des protéines de pois Bambara et évaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.

### II.2.1.1. Préparation de la farine

#### ✚ Principe

La méthode est basée sur l'élimination des téguments des graines (trempage puis dépelliculage) et l'obtention des particules de tailles bien déterminées.

#### ✚ Mode opératoire

Les graines triées de pois Bambara ont été lavées à l'eau de robinet puis rincées à l'eau distillée. Les graines lavées de pois Bambara ont été trempées pendant trois heures dans l'eau distillée à température ambiante ( $25 \pm 2$  °C), puis ont été dépelliculées manuellement. Les graines dépelliculées et lavées à l'eau distillée de pois Bambara ont été séchées à 50 °C pendant 72 heures dans une étuve à ventilation de marque Memmert (Allemagne) avant d'être broyées dans un moulin à meules de marque Victoria (Italie), puis ont été tamisées à l'aide d'un système de tamis de marque Fischer Scientific (Elancourt, France), de diamètres de mailles respectifs de 500, 400 et 200  $\mu\text{m}$  pour l'obtention de tailles de particules inférieures à 200  $\mu\text{m}$ . Les farines obtenues ont été conservées à 4 °C dans un sac en polyéthylène pour les manipulations ultérieures.

#### ✚ Expression des résultats

Le rendement de préparation de la farine a été donné par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M_f \times MS_f}{M_g \times MS_g} \times 100$$

M<sub>f</sub> : masse de la farine tamisée

M<sub>g</sub> : masse des graines

MS<sub>f</sub> : matière sèche de la farine

MS<sub>g</sub> : matière sèche des graines

### II.2.1.2. Délipidation de la farine

La farine de pois Bambara a été délipidée selon la méthode de Maguire *et al.* (2004).

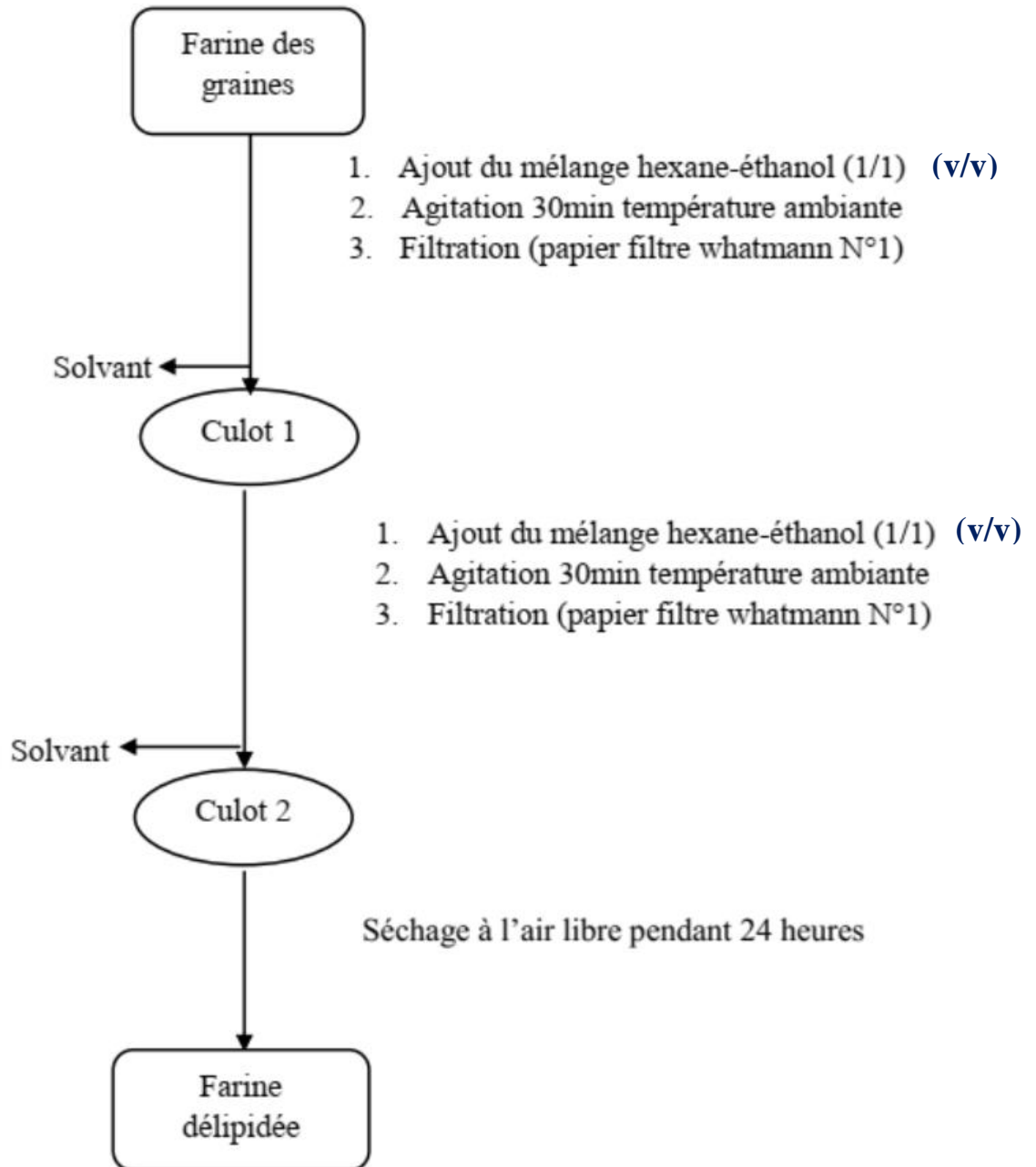
#### ✚ Principe

La méthode est basée sur élimination des composées et/non polaires ou faiblement polaire en particulier des lipides.



### Mode opératoire

Le protocole de la délipidation est présenté à la **Figure 24**. La farine (environ 150 g) de pois Bambara a été suspendue dans 450 ml d'un mélange hexane-éthanol 80 ° (rapport 1/1 ; v/v) respectivement. Le mélange a été agité pendant 60 minutes à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique de marque SELECTA (Barcelone, Espagne). Le mélange a été laissé au repos pendant une heure jusqu'à l'apparition de deux phases bien distinctes, l'ensemble a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman N°1. Le culot obtenu a été suspendu à nouveau dans 450 ml d'un mélange hexane-éthanol (rapport 1/1 ; v/v). L'ensemble a été agité pendant 30 minutes à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique. Le mélange a été laissé au repos pendant quelques minutes jusqu'à l'apparition de deux phases bien distinctes, l'ensemble a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman N°1. Le culot obtenu a été séché à 50 °C à l'aide d'une étuve à ventilation de marque Memmert (Allemagne) pendant 24 heures puis la farine délipidée a été pesée et enfin conservée dans des sacs en polyéthylène à une température de 4 °C.



**Figure 24.** Protocole de délipidation de la farine de pois Bambara (Maguire *et al.*, 2004).

### II.2.1.3. Préparation de l'isolat protéique

La préparation de l'isolat protéique a été décrite par Mune Mune & Sogi (2016). Les différents paramètres d'extraction (température, pH, rapport solide/liquide...) ont été choisis par la méthode d'optimisation des moindres carrées sur la préparation des concentrats protéiques de pois Bambara (Mune Mune *et al.*, 2011).

## ✚ Principe

La préparation de l'isolat protéique est basée sur la solubilisation des protéines en milieu alcalin (pH 9,9) suivie d'une précipitation par acidification au pH isoélectrique (pH 4,5).

## ✚ Mode opératoire

Le protocole d'extraction des protéines est présenté à la **Figure 25**. La farine délipidée (environ 100 g) de pois Bambara cultivar rouge de taille inférieure à 200  $\mu\text{m}$  a été dissoute dans une solution de NaCl 0,17 M avec un rapport solide- liquide 1/10 (m/v). Le pH a été ajusté à 9,9 avec une solution de NaOH 5M. La solution obtenue a été ensuite centrifugée à 3800 g pendant 20 minutes. Le culot a été repris dans une solution de NaCl 0,17 M et à un rapport solide - liquide de 1/5 (m/v). Le pH a été ajusté à la valeur fixée antérieurement. La solution a été agitée pendant 1 heure à 35 °C et centrifugée à 3800 g pendant 20 minutes. Les surnageants résultants des deux extractions alcalines ont été combinés. Le pH a été ajusté à 4,5 avec une solution de HCl 5 M ; ensuite a été centrifugé à 3800 g pendant 20 minutes. Le culot a été repris dans une solution d'eau désionisée au rapport solide - liquide de 1/2,5 (m/v), le pH a été ajusté à 4,5 avec une solution de HCl 5 M. L'ensemble a été centrifugé à 3800 g pendant 20 minutes. Le culot obtenu a été suspendu dans 60 ml d'eau désionisée et conservé dans des boîtes de Pétri à l'abri de l'air et de la lumière, à la température de - 25 °C pendant 48 heures. Les boîtes de Pétri ont été séchées dans un lyophilisateur pendant 48 heures et la masse de l'isolat protéique de pois Bambara a été notée.

## ✚ Expression des résultats

Rendement de préparation de l'isolat protéique (Rdt) a été donné par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M_i \times MS_i}{M_f \times MS_f} \times 100$$

$M_i$  et  $M_f$  : masse de l'isolat et de la farine.

$MS_i$  et  $MS_f$  : matière sèche de l'isolat et de la farine.

Rendement protéique (Rdt), donné par la formule suivante :

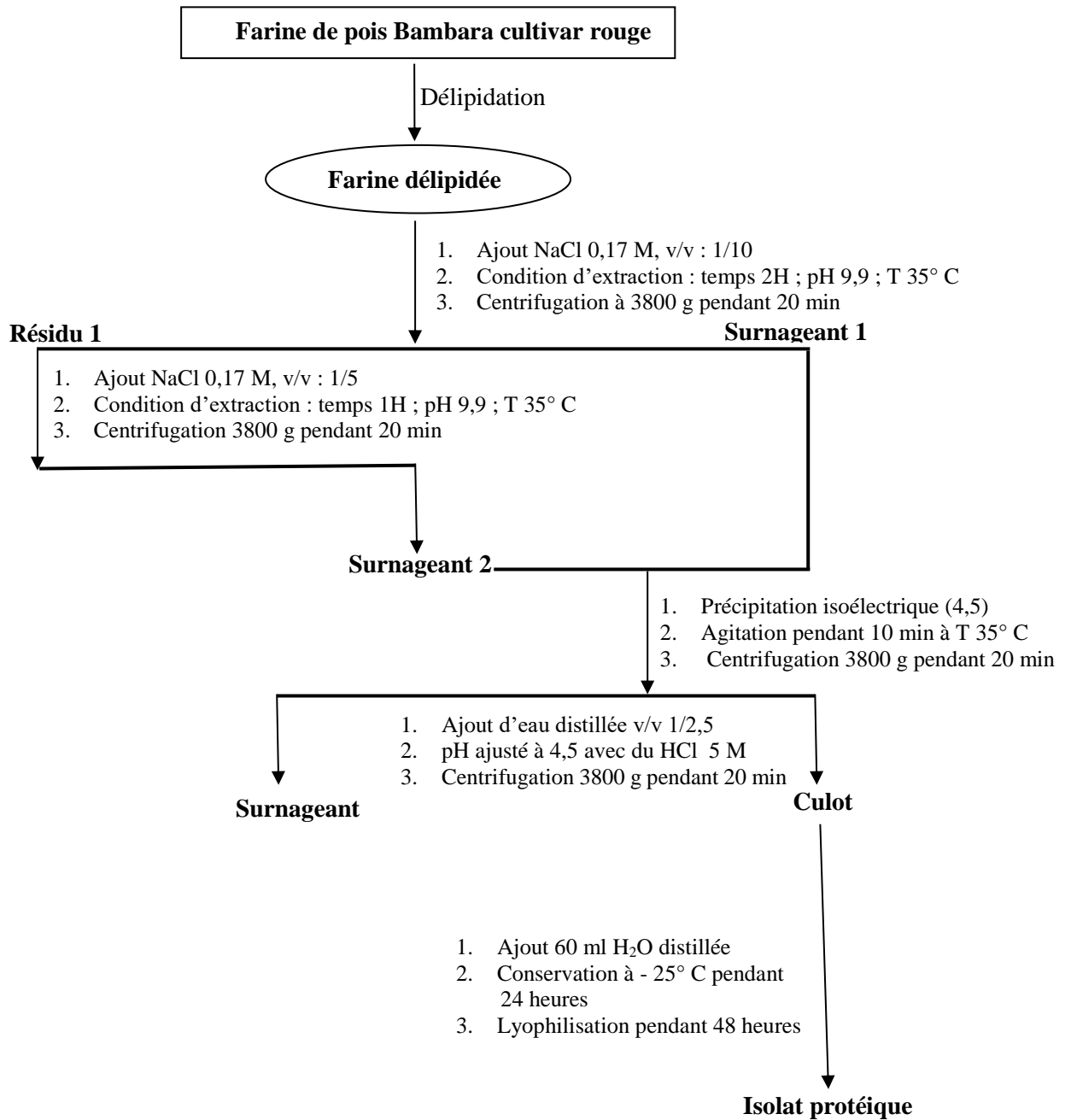
$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M_i \times MS_i \times T_{pi}}{M_f \times MS_f \times T_{pf}} \times 100$$

$M_i$  et  $M_f$ : masse de l'isolat protéique et de la farine.

$MS_i$  et  $MS_f$  : matière sèche de l'isolat protéique et de la farine.

$T_{pi}$  et  $T_{pf}$  : teneur en protéines dans l'isolat et dans la farine.

La technique utilisée est schématisée ci-dessous.



**Figure 25** : Préparation de l'isolat protéique du pois Bambara.

## II.2.2. Analyse compositionnelle

### II.2.2.1. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau a été effectuée suivant la méthode décrite par (AOAC, 1990).

#### Principe

La méthode est basée sur la perte en masse des échantillons après étuvage à  $105 \pm 2$  °C, jusqu'à élimination complète d'eau libre, de la matière volatile et l'obtention d'une masse constante.

#### Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (0,5 g ; Me) a été introduit dans un creuset en papier aluminium de masse Mo préalablement conditionné à 105 °C et taré. L'ensemble a été placé dans une étuve de marque Memmert (Allemagne) à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, pendant 48 heures. L'échantillon séché a été refroidi dans un dessiccateur et la masse Ms de l'ensemble a été notée.

#### Expression des résultats

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

$$\text{Teneur en eau (\%)} = 100 - \frac{Ms - Mo}{Me} \times 100 = 100 - MS$$

Avec MS qui désigne la matière sèche, les analyses ont été faites en triplets.

### II.2.2.2. Détermination de la teneur en cendres

La détermination de la teneur en cendres a été effectuée suivant la méthode décrite par (AOAC, 1990).

#### Principe

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

### ✚ Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (0,5 g ; Me) a été introduit dans un creuset en porcelaine taré de masse Mo, préalablement conditionné au four de marque Heraeus (Allemagne) à 550 °C pendant 2 heures, refroidi et pesé. L'ensemble a été placé dans le four à 550 °C pendant une nuit. L'on a retiré le creuset en porcelaine du four à l'aide de pinces, laissé refroidir dans un dessiccateur, puis l'on a pesé. La masse Mc du creuset a été notée.

### ✚ Expression des résultats

La teneur en cendres a été donnée par la relation suivante :

$$\text{Teneur en cendres (\%)} = \frac{Mc - Mo}{Me \times MS} \times 100$$

#### II.2.2.3. Détermination de la teneur en protéines brutes

La détermination de la teneur en protéines brutes a été effectuée suivant la méthode décrite par Kjeldahl (AOAC, 1990).

### ✚ Principe

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

### ✚ Mode opératoire

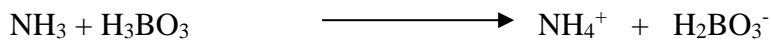
#### ✓ Minéralisation

Une masse donnée d'échantillon de 0,2 – 0,5 g (Me) ou un volume de 1 – 5 ml, un demi-comprimé de catalyseur de minéralisation (3,5 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 0,4 g de CuSO<sub>4</sub> pour un comprimé) et 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré ont été introduits dans un matras. Une pré-minéralisation a été effectuée à température ambiante pendant au moins une heure. Les matras ont été ensuite mis à chauffer sur une rampe de minéralisation sous une hôte et sous aspiration de l'oxyde nitreux généré, jusqu'à l'apparition de la coloration vert-claire persistante. Le minéralisât obtenu a été refroidi sous la hôte.

### ✓ Distillation

L'on a ajouté environ 20 ml d'eau désionisée dans le matras et le place sur le distillateur (Kjeltec System 1002, Hogavas, Suède). L'on y a versé environ 50 ml de NaOH 20 % (m/v) et démarré la distillation. L'ammoniac libéré a été récupéré dans un erlenmeyer contenant 25 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (4 %), 10 ml d'eau et 4 gouttes d'indicateur, ici l'indicateur de Tashiro (200 g de rouge de méthyle et 100 g de bleu de méthyle dans 150 ml d'alcool absolu), jusqu'à environ 200 ml de solution.

Les équations des réactions sont les suivantes :



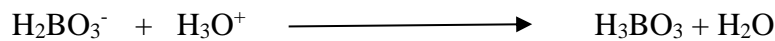
(Acide borique)

(ion borate)

### ✓ Neutralisation

L'ion borate a été titré par une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N, et régénère l'acide borique. La solution a virée au violet.

L'équation de la titration est la suivante :



Un témoin dépourvu de matière organique a été constitué.

### ✚ Expression des résultats

La teneur en protéines brutes a été donnée par la relation suivante :

$$\text{Protéines (\%)} = 6,25 \times \frac{1,4 \times N_{H_2SO_4} \times (V_a - V_0)}{Me \times MS}$$

Avec V<sub>a</sub> qui désigne le volume d'acide à l'équivalence, V<sub>0</sub> désignant le volume d'acide obtenu pour le témoin. 6,25 : Facteur de conversion de l'azote en protéines brutes végétales. Les analyses ont été faites en triplets. N<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> : Normalité de l'acide sulfurique

#### II.2.2.4. Détermination de la teneur en lipides totaux

La détermination de la teneur en lipides totaux a été effectuée suivant la méthode décrite par (AOAC, 1990).

### Principe

La méthode est basée sur la solubilité différentielle qu'ont les lipides dans certains solvants comme l'hexane ou l'éther de pétrole. Après évaporation du solvant, les lipides extraits sont récupérés et pesés.

### Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (2 g ; Me) a été introduit dans une cartouche cellulosique tapissée de papier filtre Whatman N°1, et l'extrémité a été bouchée avec du coton délipidé. La cartouche a été placée dans le Soxhlet. L'extraction de lipides a été effectuée pendant 12 heures à environ 80 °C, dans un ballon contenant des billes de verre préalablement conditionné à 105 °C et taré (Mo), dans lequel a été additionné 200 ml d'éther de pétrole.

Le ballon a été démonté et le dispositif a été laissé refroidir pendant environ 1 heure, puis le solvant a été éliminé sur évaporateur rotatif de marque Laborota 4003 (Digital Heildolph, Allemagne). Le ballon contenant l'extrait huileux a été séché à 105 °C pendant 24 heures, puis refroidi dans un dessiccateur. Le ballon contenant l'extrait huileux a été pesé (M<sub>1</sub>). Les analyses ont été faites en triplets.

### Expression des résultats

La teneur en lipides totaux a été donnée par la relation :

$$\text{Lipides (\%)} = \frac{M_1 - M_0}{M_e \times MS} \times 100$$

#### II.2.2.5. Extraction des sucres

L'extraction des sucres solubles a été effectuée par la méthode décrite par (Cerning et Guilbot, 1973).

### Principe

Les glucides de faibles masses moléculaires sont extraits des farines par une solution d'éthanol à 80° (v/v) et à ébullition. Mono- et oligosaccharides ( $\leq 10$  monomères) sont solubles, pendant que les polysaccharides, fibres et protéines sont insolubles et seront éliminés par filtration.



### ✚ Mode opératoire

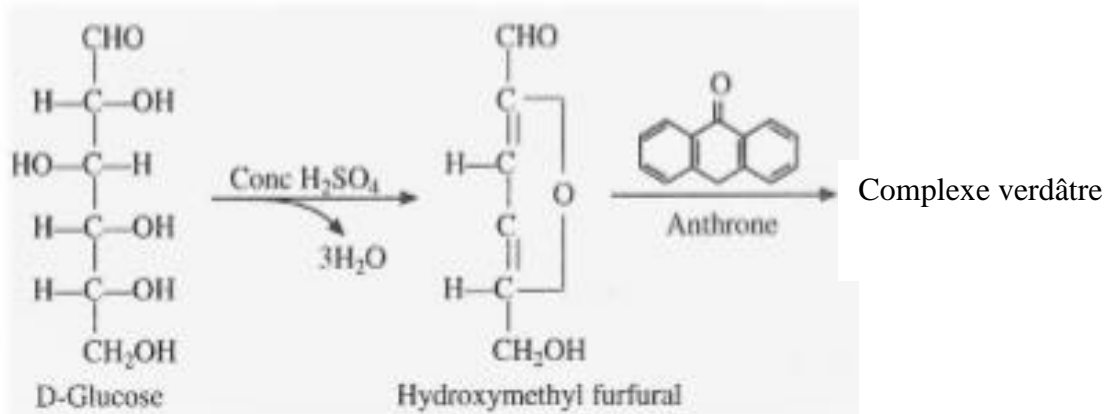
La farine délipidée ou l'isolat protéique (0,5 g ; Me) a été introduit dans un ballon, on y a ajouté 80 ml d'éthanol à 80° (v/v) et un barreau aimanté. L'ensemble a été chauffé à reflux en agitant pendant 30 minutes après que l'alcool ai commencé à bouillir. La solution refroidie a été transvasée dans une fiole de 100 ml, et complétée avec de l'alcool à 80 % jusqu'au trait de jauge. Après Filtration avec le papier Whatman N°1, le filtrat a été conservé au réfrigérateur.

#### II.2.2.6. Détermination de la teneur en sucres totaux

La détermination de la teneur en sucres totaux a été effectuée par la méthode décrite par (Montreuil *et al.*, 1981).

### ✚ Principe

En milieu acide et à chaud, les glucides se déshydratent lorsqu'ils réagissent avec l'acide sulfurique concentré en furfural. Le furfural réagit avec l'anthrone pour produire un complexe verdâtre qui absorbe à 623 nm.



### ✚ Mode opératoire

L'extrait alcoolique (2 ml) à la dilution appropriée a été mélangé avec 5 ml de réactif à l'anthrone [0,2 g d'anthrone mélangé à de l'acide sulfurique concentré (95 – 97 %) pour un volume de 100 ml de solution]. La solution d'anthrone a été être préparée au moins 4 heures d'avance, et a été conservée à l'abri de la lumière. L'ensemble a été agité puis placé pendant 16 minutes dans un bain marie bouillant. La solution a été refroidie dans un bain glacé puis ramenée à la température ambiante, et la densité optique est lue à 623 nm contre le blanc constitué d'éthanol 80° (v/v).

Les solutions de glucose de 10, 20, 30, 40 et 50 µg/ml préparées à partir d'une solution mère de glucose à 1000 µg/ml et d'éthanol 80 ° (v/v), ont été utilisées comme étalons.

### ✚ Expression de résultats

La teneur en sucres totaux a été donnée par la relation suivante :

$$\text{Sucres (\%)} = \frac{50 \times Fd \times q}{Me \times 10 \times TMS}$$

Avec q qui représente la concentration de glucose équivalente à la densité optique obtenue, et Fd le facteur de dilution de l'extrait alcoolique. Les analyses ont été faites en triplets.

#### II.2.2.7. Détermination de la teneur en fibres brutes

La Détermination de la teneur en fibres brutes a été effectuée par la méthode au détergent neutre (NDF) (Goering et Van Soest, 1970).

#### ✚ Principe

L'analyse est effectuée de telle sorte que l'action de la termamyl ( $\alpha$ -amylase bactérienne thermostable), et du réactif NDF puisse permettre d'une part l'hydrolyse de l'amidon, et d'autre part la solubilisation des protéines et d'autres constituants de l'échantillon analysé, à l'exception de la cellulose, l'hémicellulose et de la lignine qui restent toutefois associés aux minéraux.

#### ✚ Mode opératoire

##### ✓ Traitement à la termamyl

L'échantillon (2 g) a été introduit dans un ballon, on y a ajouté 40 ml d'eau distillée, 0,2 ml de termamyl et un barreau aimanté. L'ensemble a été chauffé à reflux pendant 30 minutes à 100 °C sous agitation.

##### ✓ Traitement au détergent neutre

Après le traitement à la termamyl, on y a ajouté dans chaque ballon 50 ml de détergent neutre deux fois concentré [55,83 g de sel disodique hydraté d'éthylène diaminotétra acétate (EDTA 2Na, 2H<sub>2</sub>O), 20,7 g de borate de sodium 10 fois hydraté ou de tétraborate de sodium, 13,68 g de phosphate disodique anhydre, 90 g de lauryl sulfate de sodium ont été mélangés avec de l'eau désionisée pour 1,5 L de solution] et 10 ml d'eau désionisée. Après une heure d'ébullition avec agitation, le ballon a été retiré et le réfrigérant minutieusement rincé avec 60 ml d'eau chaude (80 - 90 °C) qu'on récupérera dans un erlenmeyer. Les creusets filtrants contenant environ 3 g de sable fin préalablement calciné ont été conditionnés à 450 °C pendant une heure, refroidis dans un dessiccateur et pesés (Mo). Le contenu du ballon et de l'erlenmeyer a été filtré et le filtre est rincé trois fois avec de l'eau chaude, puis avec 20 ml d'acétone pour éliminer les traces d'eau. Les creusets contenant les fibres ont été séchés à l'étuve à 105 °C

pendant 48 heures, refroidis dans un dessiccateur et pesés ( $M_1$ ). Leur masse a été notée. Les filtres ont été ensuite placés dans le four à 450 °C pendant 3 heures pour incinérer la matière organique, puis refroidis et pesés ( $M_2$ ). Les analyses ont été faites en triplets.

#### ✚ Expression des résultats

La teneur en fibres brutes a été donnée par la formule suivante :

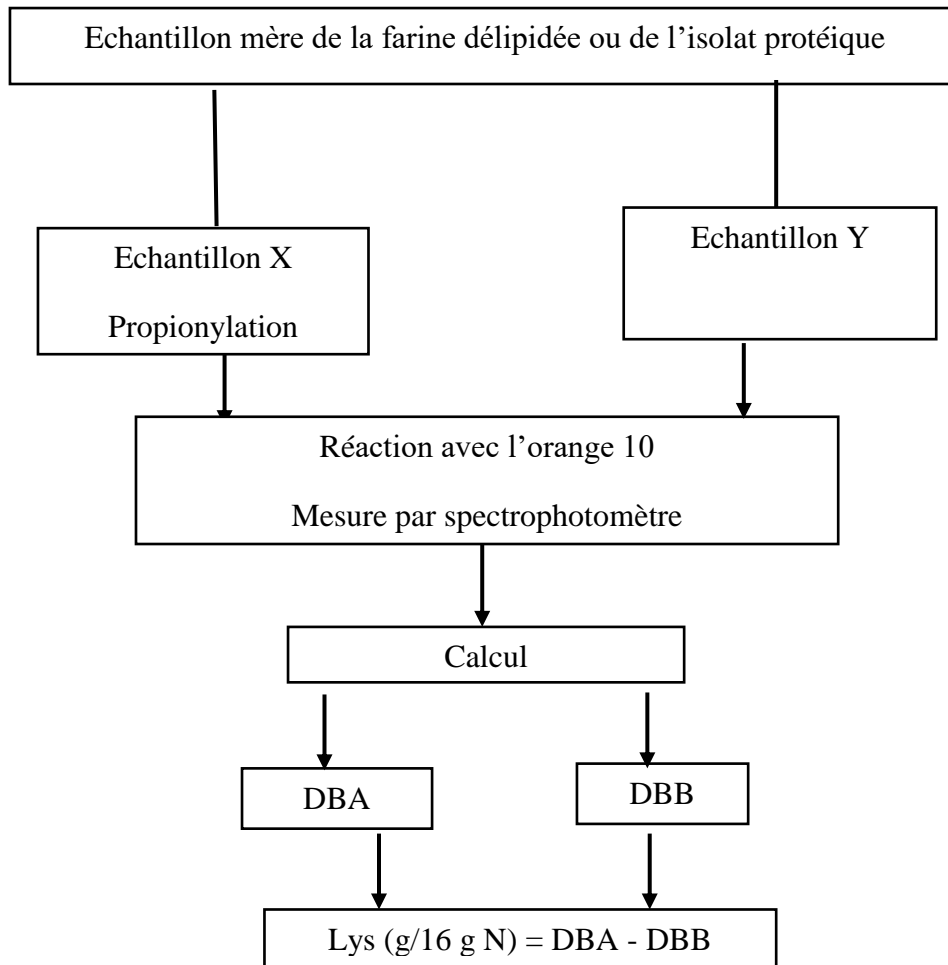
$$\text{Fibres brutes (\%)} = \frac{(M_1 - M_0) - (M_2 - M_0)}{Me \times MS} \times 100$$

#### II.2.2.8. Détermination de la teneur en lysine réactive (Hurrell *et al.*, 1979)

La lysine réactive est la lysine non bloquée dans les réactions et biologiquement active. La détermination de la teneur en lysine réactive est importante lorsque la concentration dans l'aliment en protéines et en glucides réducteurs est élevée. Contrôlée, cette réaction génère des couleurs et des composants d'arômes souvent jugés très favorablement par le consommateur. Cette réaction se produit dans les aliments entre des composés possédant des fonctions amine primaire ( $\alpha\text{NH}_2$  terminal,  $\alpha\text{NH}_2$ , des acides aminés libres,  $\epsilon\text{NH}_2$  de la chaîne latérale des résidus de lysine) et des composés carbonylés (glucides réducteurs, aldéhydes et cétones apparaissant au cours de l'oxydation des lipides, acide ascorbique, composés d'arôme par exemple) (**Figure 26**).

#### ✚ Principe

L'Orange 10 (acide phenylazo-2-naphtol-6-sulfonique) réagit avec les chaînes latérales basiques libres de résidus d'acides aminés de protéines (Lys, His, Arg). Les chaînes latérales basiques impliquées dans des interactions avec d'autres composés de la farine, sont incapables de réagir avec le colorant. Sachant que l'anhydride propionique réagit préférentiellement avec les résidus de lysine des protéines, la différence entre la quantité de colorant fixée en présence ou non d'anhydride propionique permet d'obtenir la teneur en lysine réactive qui est souvent assimilée à la lysine disponible.



**Figure 26** : Principales étapes du dosage de la lysine réactive.

#### II.2.2.8.1. Colorant fixant Arg + Lys + His (DBA)

##### ✚ Mode opératoire

La farine délipidée (0,15 g) ou l'isolat protéique (0,05 g ; Ma), contenant environ 0,1 mmole de Lys + Arg + His, finement broyé a été mélangé avec 0,5 ml d'acétate de sodium 16,4 % (m/v). L'ensemble a été agité puis mélangé avec 5 ml de solution d'Orange 10 à 3,9 mM [20 g d'acide oxalique 2H<sub>2</sub>O, 3,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 60 ml d'acide acétique glacial et 2,52 g d'Orange 10 (70 %, m/m) pour 1l de solution]. Le mélange a été conservé à 4°C pendant une nuit puis a été agité pendant 3 heures à température ambiante et centrifugé à 5000 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été dilué 100 fois avec de l'acétate de sodium 16,4 % (m/v) et la densité optique a été lue à 475 nm contre le blanc (solution d'acétate de sodium) à l'aide d'un spectrophotomètre de marque Spectronic, modèle 601 (Milton Roy Compagy, Rochester, NY, 14625, USA).

### II.2.2.8.2. Colorant fixant Arg + His (DBB)

La farine délipidée (0,15 g) ou l'isolat protéique (0,05 g ;  $M_B$ ) finement broyé a été mélangé avec 0,5 ml d'acétate de sodium 16,4 % (m/v) et 25  $\mu$ l d'anhydride propionique. L'ensemble a été agité pendant 1 heure, puis 5 ml de solution d'Orange 10 à 3,9 mM est ajouté. Le mélange a été conservé à 4 °C pendant une nuit puis a été agité pendant 3 heures à température ambiante et centrifugé à 5000 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été dilué 100 fois avec de l'acétate de sodium 16,4 % (m/v) et la densité optique est lue à 475 nm contre le blanc (acétate de sodium 16,4 %). Un étalonnage a été effectué à diverses concentrations (**Annexe 1**).

#### Expression des résultats

La lysine réactive a été calculée par la relation suivante :

$$\begin{aligned} \text{Lys (g/16 g N)} &= \text{DBA} - \text{DBB} \\ &= M_{\text{Lys}} \times 10^{-3} \left( \frac{\text{CoVo} - \text{CaVa}}{M_a \times \text{MS} \times \%P} - \frac{\text{CoVo} - \text{C}_B \text{V}_B}{M_B \times \text{MS} \times \%P} \right) \times 100 \end{aligned}$$

Avec  $M_{\text{Lys}} = 146,2$  g / mol, Ca et  $C_B$  étant valables entre 1,1 et 1,9 mmol/l, Co désigne la concentration initiale du colorant. Les analyses ont été faites en triplets.

### II.2.3. Traitement thermique de l'isolat protéique

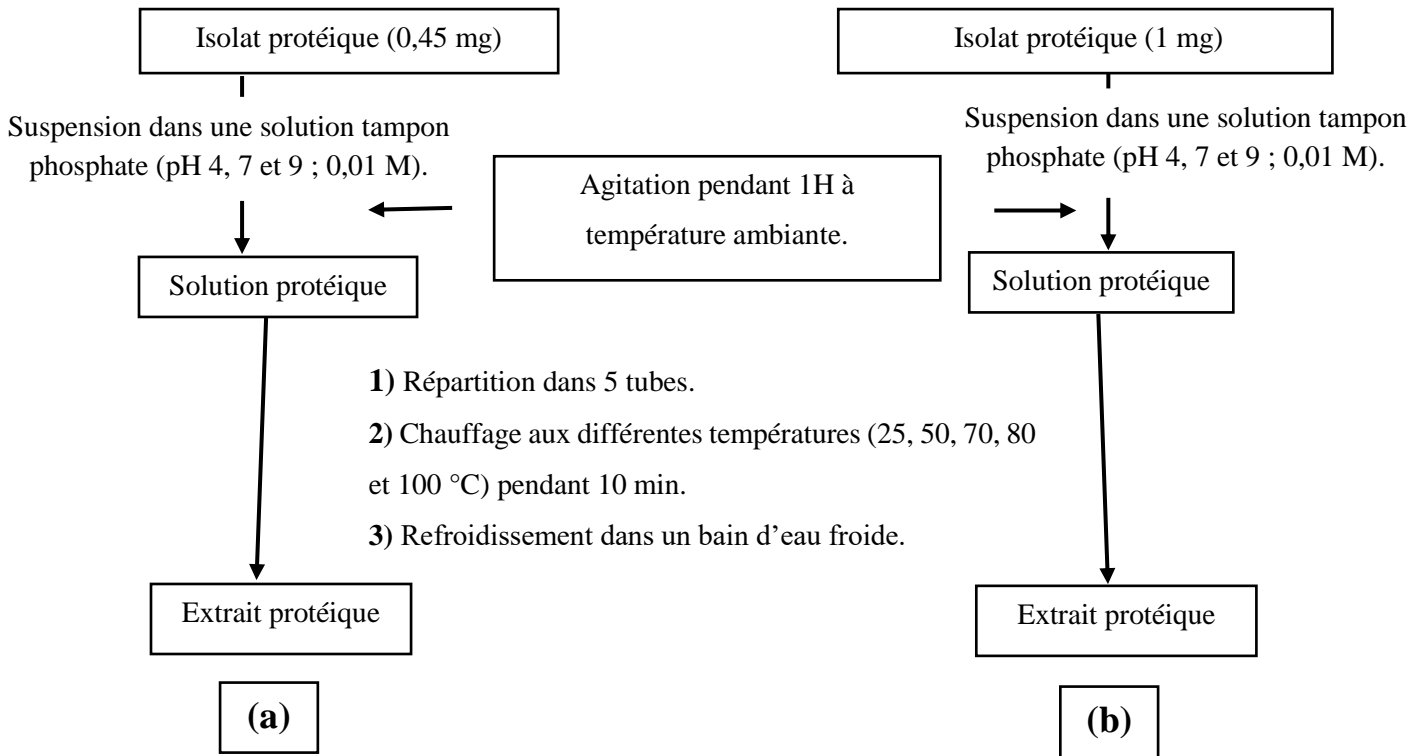
- **Pour les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles :**

Une masse de 0,45 mg d'isolat protéique (Me) de pois Bambara a été suspendue dans 45 ml d'un tampon phosphate (pH 4, 7 et 9 ; 0,01 M). Le mélange a été agité pendant 1H à température ambiante. Par la suite, la solution a été répartie dans 4 tubes. Les tubes ont été chauffés aux températures de 25 °C, 50 °C, 70 °C, 80 °C et 100 °C pendant 10 min, puis ont été refroidis dans un bain d'eau froide (**Figure 27a**). La structure secondaire, l'hydrophobicité, la solubilité et les propriétés émulsifiantes des différentes fractions traitées aux températures sus-indiquées ont été ensuite évaluées.

- **Pour la fluorescence :**

Une masse de 1 mg d'isolat protéique (Me) de pois Bambara a été suspendue dans 1 ml d'un tampon phosphate (0,01 M) aux différents pH (4, 7 et 9). Les différents mélanges ont été agités pendant 1H à température ambiante. Par la suite, les différentes solutions ont été réparties

dans 4 tubes Eppendorf. Les tubes d'Eppendorf ont été chauffés aux températures de 25 °C, 50 °C, 70 °C, 80 °C et 100 °C pendant 10 min, puis ont été refroidis dans un bain d'eau froide (**Figure 27b**).



**Figure 27 :** Traitement thermique de l'isolat protéique de pois Bambara (a) des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, (b) pour la fluorescence.

#### II.2.4. Analyse SDS-PAGE de l'isolat protéique de pois Bambara

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate a été réalisée selon les procédures de Laemmli (1970).

##### **Principe**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sodium dodécylsulfate est une technique d'identification et de séparation consistant à faire migrer les protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique.

##### **Mode opératoire**

Le système de gel a été composé de 12 % de polyacrylamide pour le gel de résolution (pH 8,8) et de 4,5 % pour le gel d'empilage (pH 6,8). Cinq milligrammes de farine et de l'isolat

protéique de pois Bambara ont été mis en suspension dans 1 ml d'eau distillée, puis dilués 25 fois avant le chargement. Les différents échantillons ont été préparés dans des conditions de réduction à l'aide du  $\beta$ -mercaptoethanol, chauffés à 95 °C dans un bain-marie pendant 5 minutes, puis centrifugés pendant 5 minutes à 5 000 g. Quinze microlitres de chaque échantillon ont été chargés dans les puits. La séparation électrophorétique a été effectuée à 70 V pour le gel d'empilage et à 100 V pour le gel de résolution. Les bandes protéiques ont été fixées par immersion du gel dans une solution d'acide acétique à 10 % pendant 30 min, colorées dans une solution de Coomassie bleu brillant R-250 (Bio-Rad) à 0,1 % p/v pendant 30 min, puis décolorées dans une solution contenant 10 % v/v d'acide acétique et 10 % de méthanol pendant 40 min.

### Expression des résultats

Tracer la courbe d'étalonnage :

$$\log PM = f(D)$$

Puis à l'aide de la courbe d'étalonnage, déterminer la masse moléculaire de chaque bande.

PM : Masse Moléculaire des marqueurs standards en KDa

D : Distance de migration des marqueurs

## **II.2.5. Evaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la farine délipidée et de l'isolat protéique**

### **II.2.5.1. Hydrophobicité de la farine délipidée et de l'isolat protéique**

Si un composé hydrophobe (sans charge, sans polarité partielle) est mis dans l'eau, les molécules d'eau en s'attirant (liaisons hydrogènes) vont " chasser " ce composé. Toutes les molécules chassées constituent alors une phase séparée de l'eau. Le phénomène est qualifié d'hydrophobicité (Cuq, 1991). L'hydrophobicité des protéines est déterminée par la méthode de Chelh *et al.* (2006).

### Principe

Elle est basée sur l'interaction du chromophore hydrophobe, le bleu de bromophénol qui réagit avec les groupements hydrophobes des protéines, l'ensemble donne une coloration bleue dont l'absorbance est lue à 495 nm.

### Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (50 mg, Me) a été suspendu dans 10 ml du tampon phosphate 40 mM à pH 7. L'ensemble a été agité pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite, 1 ml de solution protéique a été prélevé, que l'on a mélangé avec 200 µl de solution de bleu de bromophénol (1mg/ml), de même 500 µl de chacune des solutions traitées aux différentes températures pré-indiquées ont été mélangées avec 200 µl de solution de bleu de bromophénol (1mg/ml). Les différents mélanges ont été agités pendant 10 minutes à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique, puis centrifugés à 3000 g pendant 15 minutes. Les surnageants recueilli ont été dilués 100 fois avec de l'eau distillée puis l'absorbance a été lue à 595 nm contre un blanc (tampon phosphate).

### Expression des résultats

Hydrophobicité des protéines a été donnée par la relation suivante

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

$A_c$  : absorbance du blanc

$A_s$  : absorbance de l'échantillon

$M_p$  : masse de protéine de l'échantillon, calculée à partir de la teneur en protéines et la masse de l'échantillon. Les analyses ont été faites en triplets.

#### II.2.5.2. Capacité d'absorption d'eau

La capacité d'absorption d'eau (CAE) est la capacité à retenir physiquement l'eau contre la gravité (Zayas, 1997). La CAE est déterminée par la méthode décrite par Mundi et Aluko (2012).

### Principe

L'échantillon est mis au contact d'eau en excès par rapport à celle qu'il peut fixer. L'application d'une force centrifuge modérée permet de séparer l'eau retenue, et la détermination de la masse du culot permet de déduire la fraction absorbée.

### Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (0,10 g ; Me) a été mélangé avec 1 ml d'eau désionisée. L'ensemble a été agité pendant 2 minutes à température ambiante. Le mélange a été



centrifugé à 4000 g pendant 20 minutes. Le surnageant a été éliminé, ensuite le tube a été placé à un angle de 45° pendant 10 minutes pour éliminer l'eau restante, et le culot a été pesé ( $M_2$ ).

#### Expression des résultats

La capacité d'absorption d'eau (CAE) a été déterminée par l'équation suivante :

$$CAE (\%) = \frac{M_2 - M_1}{M_1 \times MS} \times 100$$

$M_2$  : masse du sédiment après inclinaison

$M_1$  : masse de l'échantillon

MS : matière sèche en fraction décimale ; les analyses ont été faites en triplets.

#### II.2.5.3. Capacité d'absorption d'huile

La capacité d'absorption d'huile (CAH) est la capacité de l'huile à se lier au côté hydrophobe (non polaire) des protéines (Malomo, 2015). Elle a été déterminée par la méthode décrite par (Sze-tao et Sathe, 2000).

#### Principe

L'échantillon est mis au contact d'un excès d'huile. L'application d'une force centrifuge modérée permet de séparer et mesurer l'huile en excès, puis d'en déduire la masse retenue.

#### Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (0,10 g ; Me) a été mélangé avec 1 ml d'une huile végétale de marque Mayor (SCR Maya et Cie, Douala), la masse volumique de l'huile ( $f_m$ ) étant  $0,877 \pm 0,002$  g/ml. L'ensemble a été homogénéisé pendant 2 minutes puis tenu pendant 30 minutes à température ambiante. Le mélange a été centrifugé à 4000 g pendant 20 minutes, le surnageant a été éliminé directement après inclinaison à un angle de 45° pendant 10 minutes, et pesé ( $M_s$ ).

#### Expression des résultats

La capacité d'absorption d'huile (CAH) de l'échantillon a été donnée par la relation suivante :

$$CAH (\text{ml/g} \cdot MS) = \frac{M_2 - M_1}{M_1 \times MS \times f_m}$$

$M_2$  : masse du sédiment après inclinaison

$M_1$  : masse de l'échantillon ;  $f_m$  : qui représente la masse volumique équivalente à 5 ml d'huile ; MS : matière sèche en fraction décimale ; les analyses ont été faites en triplets.

#### II.2.5.4. Propriétés émulsifiantes (Lawal, 2004)

##### Principe

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

##### Mode opératoire

La farine délipidée ou l'isolat protéique (0,15 g) a été mélangé avec 15 ml de tampon à la concentration (0,10 M ; pH 7). L'ensemble a été agité pendant 2 heures à température ambiante. La stabilité émulsifiante et la capacité émulsifiante ont été calculées par la méthode de Lawal, 2004. 1 ml de solution protéique prétraitée aux différentes températures et non traitée a été mélangée avec 1 ml d'huile de soya de manière à obtenir un rapport huile/eau (1/1), le mélange a été homogénéisé à la vitesse maximale pendant une minute à l'aide d'un mixeur et a été chauffé pendant 30 minutes à 80 °C, puis refroidi. La solution protéique chauffée ou non a été centrifugée à 1100 g pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse, puis la hauteur de l'émulsion a été mesurée

##### Expression des résultats

La stabilité émulsifiante (SE) a été donnée par la relation suivante :

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

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

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

Les analyses ont été faites en triplets.

## II.2.6. Effet des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites.

L'influence des traitements thermiques aux pH 4, 7 et 9 sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles telles que la solubilité, l'hydrophobicité, la structure secondaire et les propriétés émulsifiantes ont été étudié au cours du présent travail.

### II.2.6.1. Structure secondaire

#### ✚ Principe

La structure secondaire des protéines a été analysée par Spectroscopie à Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) selon la méthode décrite par (Surewicz *et al.*, 1993). Cette technique est basée sur les bandes d'absorption particulières que présentent les protéines en spectroscopie infrarouge. De ces bandes, celle caractérisant la liaison amide I et amide II, entre et 1530 et 1700  $\text{cm}^{-1}$ , sont particulièrement sensibles aux variations de la structure secondaire des protéines. En effet, la nature de la liaison hydrogène entre les groupements carbonyle (C=O) et amine (N-H) de la chaîne polypeptidique, détermine la géométrie du squelette polypeptidique, qui est elle aussi déterminée par la fréquence des bandes infrarouges. Puisque la protéine est habituellement constituée de différentes structures secondaires telles que l'hélice  $\alpha$ , les feuillets  $\beta$ , le coude  $\beta$  et de la structure irrégulière, les bandes amide I et amide II sont alors composites et constituées de plusieurs signaux superposés.

#### ✚ Mode opératoire

Les données de l'Infrarouge à Transformé de Fourier (IRTF) pour environ 0,1 ml d'échantillon traité aux différentes températures (**Figure 27a**) précédemment indiquées ont été enregistrées à une longueur d'onde 1450-1700/1750/1800  $\text{cm}^{-1}$  grâce à un Spectrophotomètre l'Infrarouge à Transformé de Fourier de marque IRAffinity-1 Shimadzu (Japan) avec un nombre de Scan égal à 32 et une résolution variant de 2 à 4  $\text{cm}^{-1}$  en mode absorbance.

#### ✓ Analyse du spectre

Les données ont été analysées par le logiciel Peakfit 4.12 (Systat Software, San José, USA). Les caractéristiques de la structure secondaire des protéines ont été calculées à partir de la bande amide I, par déconvolution et ajustement non linéaire sous forme de pics Gaussiens du spectre original. La correspondance entre les pics obtenus et la structure secondaire des protéines a été effectuée sur la base des données du **Tableau 6**. Le calcul du pourcentage des

aires des différents pics a permis de déterminer la composition des diverses structures secondaires des fractions protéiques traitées à différentes températures.

**Tableau 6 :** Correspondance entre les positions et les bandes des pics des liaisons amide I-III avec les différentes structures secondaires des protéines (Goormaghtigh *et al.*, 2006).

Conformation	Position des bandes et des pics sans région amide I-III
	Liaison amide I
Hélice $\alpha$	1649 ; 1653-1657 ; 1655
Feuillet $\beta$	1621-1623 ; 1630 ; 1634-1639 ; 1647-1648 ; 1680-1691 (feuillet $\beta$ ou coudes $\beta$ )
Coude $\beta$	1661 ; 1667 ; 1673 ; 1677
Bobine aléatoire	1648 ; 1654 ; 1642-1657
Agrégat protéique	1615-1620
	Liaison amide II
Hélice $\alpha$	1545
Feuillet $\beta$	1530
Coude $\beta$	1528 ; 1577
	Liaison amide III
Hélice $\alpha$	1293 ; 1300-1311 ; 1316-1320 ; 1331
Feuillet $\beta$	1223-1225 ; 1231-1238 ; 1242 ; 1248-1251
Coude + désordre	1244 ; 1259-1269 ; 1280-1290

### II.2.6.2. Solubilité

Il s'agit d'une propriété de composants (solutés) à former avec les molécules d'une phase dispersante (solvant) une phase dispersée homogène (solution) (Cuq, 1991).

#### Principe

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

#### Mode opératoire

Un volume d'1 ml de solution protéique préalablement traitée aux températures indiquées (**Figure 27a**) a été agité pendant 30 min, puis centrifugé à 4000 g pendant 20 min. Les surnageants ont été recueillis pour le dosage de l'azote total par la méthode **Lowry *et al.*, (1951)**.

#### • Réactifs utilisés :

- Solution A : réactif de Folin-Ciocalteus dilué de moitié dans la soude 0,1 N ;
- Solution B : carbonate de sodium (2 %, m/v) préparé dans de le NaOH 0,1 N ;
- Solution C1 : sulfate de cuivre (0,5 %, m/v) préparé dans l'eau distillée ;

- Solution C2 : tartrate double de sodium et de potassium (1 %, m/v) préparé dans de l'eau distillée ;
- Solution D : préparée à partir de 98,04 ml de solution B, 980 µl de solution C1, 980 µl de solution C2 pour 100 ml de solution finale ;
- Solution stock de BSA à 1 mg/ml utilisée comme référence.

➤ **Technique de dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.*, (1951)**

Deux cents (200) µl d'échantillon protéique ont été dilués dans 2 ml de solution D puis agités et laissés reposer à température ambiante pendant 10 min. Ensuite, 200 µl de solution A ont été ajoutés à ce mélange. Le milieu réactionnel a été agité et laissé reposer pendant 30 min à l'obscurité pour permettre le développement de la coloration. Les densités optiques des essais ont été mesurées à 600 nm contre un blanc. Les densités optiques obtenues ont été ensuite converties en mg de protéine grâce à une droite d'étalonnage.

✚ **Expressions des résultats :**

Les densités optiques obtenues ont été ensuite converties en mg de protéine en utilisant le BSA comme standard. La solubilité des protéines est donnée par la relation suivante :

$$\text{Solubilité} = \frac{\text{Mps}}{\text{Me} \times \text{MS} \times \% \text{P}}$$

Avec : Mps : masse de la protéine dans le surnageant (N×6,25) ;

%P : teneur en protéines de l'échantillon ;

Me : Masse de l'échantillon ;

MS : Matière Sèche, Les analyses ont été faites en triplets.

## **II.2.7. Analyse des changements structuraux de la protéine de l'isolat de pois Bambara suivant un traitement thermique à différents pH par spectroscopie de fluorescence**

### **II.2.7.1. Préparation des échantillons pour l'analyse de la fluorescence**

✚ **Mode opératoire**

Afin d'étudier l'influence des traitements thermiques à différents pH sur la viciline de pois Bambara, des solutions de 1 mg/ml ont été préparées dans un tampon Tris/HCl 0,01 M (pH 4, 7 et 9) (**Figure 27b**). Avant de procéder aux mesures par spectroscopie de fluorescence, pour chaque valeur de pH, un volume de 0,1 ml de solution protéique a été mis en suspension dans 3 ml de tampon Tris/HCl approprié et laissé à température ambiante pendant 1 h.

### II.2.7.2. Fluorescence intrinsèque

#### ✚ Principe

Elle est donnée par les résidus Tyr, Trp, Phe pour surveiller les propriétés de fluorescence associées aux altérations structurales des protéines telles que le repliement, le dépliement ou les agrégations dues aux changements de l'environnement (Eftink, 1991 ; Lasagna *et al.*, 1999). La fluorescence intrinsèque est déterminée par la méthode décrite par (Aprodu *et al.*, 2017).

#### ✚ Mode opératoire

Tous les spectres de fluorescence des échantillons (**Figure 27b**) ont été effectués sur un spectromètre de luminescence LS-55 (Perkin Elmer Life Sciences, Shelton, CT, USA), équipé du logiciel Perkin Elmer FL Winlab. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 274 nm, 280 nm et 292 nm, tandis que les spectres d'émission ont été recueillis de 310 nm à 420 nm, avec des incréments de 0,5 nm. Les largeurs de fente d'excitation et d'émission ont été fixées à 10 nm.

### II.2.7.3. Diagramme de phase

Le diagramme de phase obtenu en traçant  $I\lambda_1$  par rapport à  $I\lambda_2$  (où  $I_1$  et  $I_2$  sont les valeurs d'intensité spectrale mesurées aux longueurs d'onde 320 nm et 365 nm) est utilisé pour détecter l'existence d'états de repliement intermédiaires des protéines. Le diagramme de phase est déterminé par la méthode de Aprodu *et al.* (2017).

#### ✚ Principe

Quand deux bio polymères A et B en solution aqueuse sont mélangés, ils peuvent, en fonction de leurs concentrations respectives, donner un système monophasique ou diphasique. Il permet de déterminer les concentrations respectives des deux bio polymères qui conduisent soit à un système monophasique, soit à un système diphasique dans lequel il y'a incompatibilité thermodynamique.

#### ✚ Mode opératoire

Les mesures de l'intensité de la fluorescence des échantillons (**Figure 27b**) ont été effectuées à la longueur d'onde d'excitation de 292 nm, alors que l'intensité a été recueillie à 320 nm et 365 nm. Les fentes de l'excitation et de l'émission ont été fixées à une valeur de 10 nm, et la vitesse de balayage a été de 500 nm/min.

#### II.2.7.4. Spectres synchrones

##### Principe

La spectroscopie de fluorescence synchrone est une méthode très utile pour étudier le microenvironnement des résidus d'acides aminés, par le décalage possible de  $k_{max}$ , qui correspond aux changements de polarité autour de la molécule de chromophore (Vekshin, Biofizika, 1996). Les spectres synchrones ont été construits autour des résidus de Tyr et Trp en fixant la longueur d'onde d'excitation et d'émission  $\Delta\lambda$  à 15 nm et 60 nm, respectivement. Elle a été déterminée par la méthode d'Aprodu *et al.* (2017).

##### Mode opératoire

Les spectres de fluorescence synchrone des échantillons (**Figure 27b**) ont été enregistrés de 240 nm à 340 nm en balayant simultanément les monochromateurs d'excitation et d'émission. L'intervalle de longueur d'onde ( $\Delta\lambda$ ) a été fixé individuellement à 15 et 60 nm, où le spectre ne montre que le comportement spectroscopique des résidus Tyr et Trp, respectivement. Des blancs appropriés correspondant au tampon ont été soustraits pour corriger le fond de fluorescence.

#### II.2.8. Analyse *in silico* à pH 7 et aux températures 25 °C, 70 °C et 100 °C

##### II.2.8.1. Principe général

L'analyse *in silico* ou analyse Bio-informatique a pour objectif de comprendre les changements structuraux de la protéine sous l'effet de la température au niveau moléculaire, sur la base de simulation d'ordinateurs. Les modèles 3D des protéines sont ainsi conçus sur la base de structures connues et déjà déterminées, et la structure des protéines sous différentes conditions est modélisée par la dynamique moléculaire qui s'appuie sur des lois physiques connues (Hess *et al.*, 2008).

##### II.2.8.2. Identification des protéines

L'identification des protéines contenues dans l'isolat protéique de pois Bambara s'est opérée sur la base des résultats de la SDS-PAGE, et conformément aux travaux de Mune Mune *et al.* (2018, 2021). Ainsi, les protéines de masse moléculaires semblable à la viciline (environ 50 kDa, **Annexe 5**) ont été recherchées dans la base de données Uniprot à l'adresse suivante <http://www.uniprot.org/> (The UniProt Consortium, 2012). La recherche a été focalisée uniquement sur les protéines du genre *Vigna*. Les résultats ont ensuite été confrontés

aux travaux sur la protéomique des graines de pois Bambara effectués par Okpuzor *et al.* (2010). La séquence primaire des différentes protéines identifiées est conservée sous forme de fichier FASTA (**Annexe 6**) qui est utilisée pour les études de dynamique moléculaire.

### **II.2.8.3. Construction de la structure tridimensionnelle**

La structure tridimensionnelle des protéines a été construite à partir d'un serveur web utilisant l'algorithme I-TASSER (Zhang, 2008 ; Yang *et al.*, 2015), sur la base de la structure primaire des protéines en format FASTA. La construction de la structure 3D a été effectuée sur la base de l'homologie moléculaire, qui consiste à rechercher une protéine homologue de structure tridimensionnelle connue, à partir de laquelle la conformation inconnue de la protéine identifiée sera déterminée. La structure 3D des protéines identifiées a été conservée sous forme de fichier pdb ayant l'ensemble de coordonnées moléculaires de la protéine (**Annexe 7**),

### **II.2.8.4. Préparation de la protéine**

En vue de simuler la structure de la protéine dans les conditions expérimentales, il est nécessaire au préalable de tenir en compte l'ionisation des résidus d'acides aminés constitutifs de la protéine. Le logiciel Gromacs 4.6.1 (Groningen University, Netherlands) dans le système d'exploitation Linux (Hess *et al.*, 2008) a été utilisé, et particulièrement le module pdb2gmx. L'ajustement de l'ionisation des acides aminés est effectué de manière interactive.

### **II.2.8.5. Dynamique moléculaire**

Les études de dynamiques moléculaires pour simuler la structure des protéines de l'isolat de pois Bambara sous différentes températures ont été effectuées à partir du logiciel Gromacs 4.6.1. Ce logiciel est recommandé pour des structures macromoléculaires comme celles des protéines, car il est l'un des plus rapide connu jusqu'ici (Hess *et al.*, 2008). La dynamique moléculaire a été effectuée en plusieurs étapes à partir de la structure équilibrée sous format pdb, à savoir : (1) la minimisation de l'énergie, (2) l'équilibration et (3) la simulation proprement dite.

La minimisation de l'énergie a été effectuée à travers divers modules à savoir : editconf, solvate pour immerger la protéine dans l'eau, grompp et genion pour ajouter des ions, et les paramètres utilisés pour la minimisation sont présentés en **Annexe 8**. L'équilibration a été



effectuée en soumettant la protéine aux différentes températures utilisées dans cette étude à savoir 25 °C, 70 °C et 100 °C. La température 25 °C représente la protéine native, et celles 70 °C et 100 °C ont été sélectionnées car des changements structuraux majeurs y ont été observés à la suite de l'analyse par fluorescence. Les conditions affectées ici sont présentées en **Annexe 9**. La simulation proprement dite s'opère en soumettant ensuite la protéine aux conditions de températures fixées et à la pression atmosphérique, dans les conditions données dans l'**Annexe 10**.

D'autre part, la topologie des modèles a été définie par le champ de force OPLS. Le thermostat de Berendsen a été utilisé pour la température. Les interactions électrostatiques ont été considérées à une distance de 1,7 nm, et le potentiel de Lennard-Jones est utilisé pour les interactions de van der Waals. Les simulations ont été effectuées à partir d'un ordinateur HP Elite Book Workstation (Intel 8760w, 7 crores, 16GB RAM, 2,7 GHz).

#### **II.2.8.6. Évaluation des modèles**

L'évaluation des modèles a été opérée par le calcul du RMSD (*Root-Mean Square Deviation*) qui est la distance moyenne entre les groupes d'atomes de la protéine au cours de la simulation. Cette distance devra être minimale. Le module rms de Gromacs permet d'effectuer ce calcul. La variation de la température au cours de la simulation a été aussi calculée de la même manière. Le nombre de liaisons hydrogènes, le volume de la molécule sont calculés à partir des modules hbond et energy de Gromacs. La structure secondaire des protéines a été calculée à partir du serveur web pdbsum (Laskowski, 2009).

#### **II.2.8.7. Visualisation**

La visualisation des molécules a été effectuée à partir du logiciel Visual Molecular Dynamics, VMD (Humphrey, Dalke & Schulten, 1996).

### II.3. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS

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



**CHAPITRE III : RESULTATS ET  
DISCUSSION**

### **III.1. Extraction des protéines de pois Bambara et évaluation des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles**

#### **III.1.1. Préparation de la farine**

La farine de particules inférieures à 200 µm a été préparée à partir de pois Bambara cultivar rouge. Le rendement de préparation de la farine de pois Bambara cultivar rouge est de 71,19 % du poids sec des graines. Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Mune Mune *et al.* (2011) avec le pois Bambara cultivar blanc de tailles 150 µm et 450 µm, rendement étant de 61,72 % et 64,95 % respectivement. L'obtention de la farine ayant des particules plus petites (200 µm) nécessite des opérations répétées de broyage et de tamisage qui causent des pertes. Cette différence significative ( $p < 0.05$ ) serait allouée aux opérations répétées de broyage et de tamisage ; lesquels augmentent le colmatage des mailles du tamis.

Des études similaires ont montré que la taille des graines et l'épaisseur de leur tégument affectent le rendement de préparation de la farine (Sathe et Salunkhe, 1981).

#### **III.1.2. Rendement de la préparation de l'isolat protéique**

La farine dépelliculée et délipidée de pois Bambara cultivar rouge a été utilisée pour l'extraction alcaline des protéines au pH 9,9, suivie d'une précipitation au pH 4,5 ; selon la méthode décrite par Mune Mune et Sogi, 2016. Les différents paramètres d'extraction (température, pH, rapport solide/liquide...) ont été choisis, par la méthode d'optimisation des moindres carrées sur la préparation des concentrats protéiques de pois Bambara (Mune Mune *et al.* 2011) avec quelques modifications. Le rendement de la préparation de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge est de 14,35 %. Ce rendement révèle une perte significative durant le procédé d'extraction des protéines, laissant penser à un non-recouvrement d'une quantité appréciable de protéines solubilisées. D'ailleurs, Chew *et al.* (2003) ont observé que près de 40 % de protéines solubilisées sont perdues durant leur recouvrement au pH isoélectrique. Sgarbieri et Sumner *et al.* (1981) ont noté d'autre part, qu'une petite fraction de protéines de *Pisum sativum* reste dans le culot durant leur extraction, liée à d'autres constituants de la farine sous forme de complexes insolubles dans l'eau.

### III.2. Analyse compositionnelle de la farine et de l'isolat protéique

La composition chimique de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge, notamment : les teneurs en eaux, cendres, protéines brutes, lipides totaux, sucres totaux et fibres NDF sont présentées dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7** : Analyse compositionnelle de la farine délipidée et de l'isolat protéique.

Pois Bambara		
Composants	Farine délipidée	Isolat protéique
Eau (%)	8,16± 0,35 <sup>b1</sup>	3,45± 0,39 <sup>c2</sup>
Cendres(%)	3,29± 0,26 <sup>c1</sup>	3,71± 0,56 <sup>c2</sup>
Protéines (%)	27,93± 0,34 <sup>a1</sup>	81,28± 1,57 <sup>a2</sup>
Lipides totaux (%)	7,71± 0,38 <sup>b1</sup>	6,17± 0,27 <sup>b2</sup>
Sucres solubles totaux (%)	8,22 ± 0,42 <sup>b1</sup>	1,02 ± 0,03 <sup>d2</sup>
Fibres brutes (%)	7,86± 0,10 <sup>b1</sup>	4,07± 0,5 <sup>c2</sup>
Lysine réactive g/ 16 g d'azote de protéine	3,54 ± 0,84 <sup>c1</sup>	1,27 ± 0,42 <sup>d2</sup>

<sup>‡</sup> Les valeurs sur la même colonne suivie de lettres (a, b, c, d) différentes sont significativement différentes (p< 0,05)

<sup>‡</sup> Les valeurs sur la même ligne suivie de chiffres (1, 2) différentes sont significativement différentes (p< 0,05)

#### III.2.1. Teneurs en eau

La teneur en d'eau d'un aliment est d'une importance capitale en technologie alimentaire du fait qu'elle permet d'estimer sa durée et son mode de conservation. La teneur en eau de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge est de 8,16 et de 3,45 % respectivement. Il existe une différence significative (p< 0,05) entre ces deux valeurs. Cette différence entre les teneurs en eau observée pourrait être due à l'étape de séchage (lyophilisation) durant la préparation de l'isolat protéique de pois Bambara.

La teneur en eau de la farine délipidée de pois Bambara cultivar rouge est de 8,16 %. Cette valeur est significativement supérieure (p< 0,05) à celle obtenue par Adebowale *et al.*, 2011 sur les farines de pois Bambara cultivars blanc et rouge. Ces auteurs ont noté des teneurs en eau de 5,64 et 6,82 % sur les farines de pois Bambara cultivars blanc et rouge respectivement. Ijarotimi *et al.* (2013) ont également noté une teneur en eau significativement supérieure (4,6 %) sur la farine de pois Bambara. Contrairement aux travaux de Mwasaru *et al.* (1999), qui ont rapporté une teneur en eau élevée (13,23 %) sur la farine du niébé. Diallo *et al.* (2015) ont noté

que les graines de voandzou sont connues pour leur faible humidité. Cela permet une bonne et longue durée de conservation. Une forte teneur en eau diminue le temps de stockage et impacte la qualité des graines (Anhwange et Atoo, 2015). La teneur en eau de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge est de 3,45 %. Cette valeur est significativement inférieure ( $p < 0,05$ ) à celle trouvée par Wani *et al.* (2014) sur l'isolat protéique d'haricot cultivar rouge (7,38 %). De même, Stone *et al.* (2014) ont rapporté des teneurs en eau supérieures sur différents isolats protéiques de pois (7,67 - 9,49 %). La teneur en eau de l'isolat protéique de pois Bambara obtenue est défavorable aux dégradations microbiennes. Cependant, les altérations chimiques telles que l'oxydation des lipides ou des polyphénols restent possibles. Il est donc nécessaire de conserver ces isolats et farines de pois Bambara à basse température (5 °C) pour limiter ces réactions (Cheftel *et al.*, 1976a).

### III.2.2. Teneurs en cendres

La teneur en cendres de la farine délipidée de pois Bambara cultivar rouge est de 3,29 % (**Tableau 7**). Cette teneur en cendres observée dans la farine délipidée de pois Bambara est semblable à celles notées par Kaptso *et al.*, 2007 (3,6- 3,8 %), mais reste inférieure à celle obtenue par Yusuf *et al.*, 2008 (4,40 %) sur la farine de pois Bambara. Il existe une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les valeurs obtenues par Yusuf *et al.*, 2008 et celle du présent travail. La teneur en cendres de l'isolat protéique de pois Bambara est de 3,71 %. Wani *et al.* (2014) ont rapporté une teneur en cendres de (4,40 - 4,32 %) sur les isolats protéiques du haricot cultivars jaune et rouge, lesquelles sont significativement supérieures ( $p > 0,05$ ) à celle du présent travail. De même, Mwasaru *et al.*, 1999 ont trouvé des teneurs en cendres plus élevées (4,10 %) sur l'isolat protéique de *Cajanus cajan* extrait au pH compris entre 8,5 - 12,5 en présence d'eau. Selon Amarteifio *et al.* (2006), cette différence entre les teneurs en cendres pourrait s'expliquer par la texture et la composition des sols qui auraient un effet sur l'absorption minérale des plantes et des différences variétales. De plus, la présence d'une grande quantité de cendres dans les isolats protéiques est parfois due à la formation de NaCl lors de la précipitation des protéines (Chavan *et al.*, 2001).

### III.2.3. Teneurs en protéines brutes

La teneur en protéines brutes de la farine délipidée de pois Bambara cultivar rouge présentée dans le **Tableau 7** est de 27,93 %. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par Adebowale *et al.*, 2011 sur le pois Bambara cultivars blanc (29,53 %) et rouge (30,37 %). La différence entre la valeur obtenue et celle de la littérature peut s'expliquer par la différence de

variété et de milieu de culture du pois Bambara. Par ailleurs, la teneur en protéines brutes de l'isolat protéique de pois Bambara obtenue est de 81,28 %. En effet, la teneur en protéine de l'isolat protéique de pois Bambara est similaire à la valeur obtenue par Lqari *et al.*, 2002 sur l'isolat protéique de *Lupinus angustifolius* (83,9 %). Cependant, elle est inférieure à celle obtenue par Arise *et al.*, 2017 (91,70 %) sur l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge ; de même que celle rapportée par Shalini *et al.*, 2015 (88,57 - 90,21 %) sur les isolats protéiques du niébé. Cette différence s'expliquerait par l'influence des conditions opérationnelles d'une part sur l'extraction des protéines à savoir : le pH, la température, la force ionique, les types de sels et de solvants sur les propriétés physico-chimiques des protéines (liaisons électrostatiques et hydrogènes et interactions hydrophobes) (Chew *et al.* (2003) ; Mwasaru *et al.* (1999), Phillips *et al.* (1991) et d'autre part sur le recouvrement des protéines (Jyothirmayi *et al.* (2006) ; Quanhong et Cailli. (2005) ; Moure *et al.* (2001).

#### III.2.4. Teneurs en lipides totaux

Les teneurs en lipides totaux de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge sont présentées dans le **Tableau 7**. La teneur en lipides totaux de la farine délipidée de pois Bambara cultivar rouge est de 7,71 %. Cette valeur est similaire à celle rapportée par Diallo *et al.* (2015) sur les différents cultivars de Voandzou (7,72 – 8,55 %). Arise *et al.* (2015) ont trouvé une teneur en lipides totaux de 6,60 % sur le pois Bambara cultivar blanc, valeur semblable à celle trouvée par Kaptso *et al.* (2007) sur les farines de pois Bambara cultivars rouge et noire qui sont de 6,1 et 5,9 % respectivement. Ces auteurs ont par ailleurs noté que les farines de pois Bambara sont une source appréciable de lipides au regard de leurs compositions en acides gras essentiels (acide linoléique et linoléique) (Minka et Bruneteau, 2000). Boateng *et al.* (2013) ont montré que les graines de légumineuses, à l'exception du soja et de l'arachide, contiennent de façon générale peu de lipides. Vu les faibles teneurs en lipides des farines de pois Bambara de cultivar rouge, elles peuvent être recommandées pour une alimentation hypolipidémie. La teneur en lipides totaux de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge est de 6,17 %. Malgré la délipidation de la farine avec un mélange d'hexane-éthanol, des teneurs importantes en lipides sont observées. En effet Sanchez-vioque *et al.*, 1999 ont montré que les lipides polaires fermement associés aux protéines de *Cicer arietinum L* étaient retrouvés dans l'isolat protéique, ces dernières jouent un rôle important dans la saveur (Rackis *et al.*, 1979). La valeur obtenue dans ce travail est significativement supérieure à celle de Kudre *et al.* (2013), qui ont trouvé une teneur en lipides totaux de 1,41 ; 1,80 et 3,24 % sur les isolats protéiques du haricot Mungo, du haricot noir et du pois Bambara. Ces lipides totaux

sont constitués d'acides gras saturés 51,9 % contre 48,1 % d'acides insaturés : indispensable pour l'organisme du fait de leur implication dans de nombreux processus biologiques (Adebowale *et al.*, 2011). Compte tenu de la composition d'acides gras saturés et insaturés, nous pouvons suggérer l'utilisation de l'isolat protéique de pois Bambara comme une source potentielle de lipides, lors de la formulation d'aliments.

### III.2.5. Fibres alimentaires (NDF)

Les teneurs en fibres alimentaires (NDF) de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara sont de 7,86 et 4,07 % respectivement (**Tableau 7**). L'isolat de pois Bambara contient significativement ( $p < 0,05$ ) moins de fibres alimentaires que la farine délipidée correspondante. La teneur en fibres alimentaires de la farine délipidée de pois Bambara est supérieure à celle observée par Olaposi *et al.* (2017) sur le pois Bambara cultivars blanc et marron (2,11 - 3,64 %), de même que celle rapporté par Mazahid *et al.*, 2013 (6,60 %) sur la farine de pois Bambara. Tandis que, Sanchez –Vioque *et al.* (1999) ont noté une teneur en fibres significativement supérieure sur la farine du soja (18,8 %). La teneur en fibres alimentaires de l'isolat protéique est supérieure à celle rapportée par Qayyum *et al.* (2012) sur les isolats protéiques de lentille et soja. Ces auteurs ont trouvé des teneurs en fibres de 3,50 et 3,68 % respectivement. Tandis qu'avec l'isolat protéique du haricot, Qayyum *et al.* (2012) ont trouvé une teneur en fibres significativement supérieure (6,78 %) à celle obtenu dans ce travail. Adebowale *et al.* (2011) ont rapporté des teneurs en fibres de 5,04 et 5,24 % sur les isolats protéiques de *Vigna subterranea* cultivars blanc et marron respectivement. Ces résultats nous font penser, qu'une petite fraction d'hémicellulose et de lignine serait solubilisée puis recouverte avec les protéines de pois Bambara. Selon Armateifo *et al.* (2010) ; Himeda, 2012, les différences de teneurs en nutriments dans les plantes alimentaires sont dues en grande partie, au type de sol, au traitement post récolte, aux conditions environnementales et degré de maturation.

### III.2.6. Sucres solubles totaux

Les composés très solubles dans l'eau et dans les solutions hydro alcooliques tels que les sucres, sont souvent largement éliminés lors de la préparation de l'isolat protéique. Les teneurs en glucides totaux sont respectivement de 8,22 et 1,02 % pour la farine délipidée et l'isolat protéique de pois Bambara respectivement. L'isolat protéique de pois Bambara contient significativement ( $p < 0,05$ ) moins de sucres totaux que la farine délipidée correspondante. Une grande partie des sucres solubles de pois Bambara serait éliminés dans les différents culots jetés



au cours de la préparation de l'isolat protéique. Cette observation est en droite ligne avec celle de Mwasaru *et al.* (1999a), qui ont également observé une élimination complète de ces sucres durant la préparation des concentrats protéiques de *Vigna unguiculata* et de *Cajanus cajan*.

La teneur en sucres solubles de la farine délipidée de pois Bambara est de 8,22 %. Cette valeur obtenue est significativement inférieure à celle rapportée par Adebowale *et al.*, 2011 sur les farines de pois Bambara (2,56 et 3,78 %) cultivars blanc et marron respectivement. Ces différences observées entre les résultats peuvent être attribuées d'une part aux processus de préparation des farines et d'autre part, aux différences variétales et aux conditions environnementales de leurs cultures. La teneur en sucres solubles de l'isolat protéique de pois Bambara est de 1,02 %. Cette valeur obtenue est significativement inférieure ( $p < 0,05$ ) à celle rapportée par Sanchez-Vioque *et al.*, 1999 sur l'isolat protéique du soja (11,8 et 3,3 %) en présence ou non du sulfite de sodium respectivement.

### III.2.7. Lysine réactive

La lysine réactive est la lysine non bloquée dans les réactions de Maillard et biologiquement active. En effet, la lysine possède un groupement  $\epsilon$ -aminé ( $R=CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ ) très réactif qui intervient dans plusieurs processus biologiques. La teneur en lysine réactive de la farine délipidée et de l'isolat protéique du pois Bambara cultivar rouge est de 3,54 et 1,27 par g/ 16 g d'azote de protéine respectivement. L'on constate une diminution de la lysine réactive dans l'isolat protéique par rapport à celle de la farine délipidée. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Moure *et al.* (2001) sur la préparation du concentrat protéique de *Rosa rubiginosa*. Ces auteurs ont attribué la baisse de la teneur en lysine réactive à l'élimination des albumines, riches en lysine solubles dans les solutions hydroalcooliques et l'eau. Cette diminution peut aussi s'expliquer par la présence de certains facteurs antinutritionnels dans les graines de pois Bambara, notamment les tanins, les inhibiteurs de trypsine et l'acide oxalique (Ijarotimi *et al.*, 2018), susceptibles de réagir avec les résidus de lysine *via* leur groupement  $\epsilon-NH_2$ . En outre, Mune Mune *et al.* (2011) ont expliqué que les réactions de Maillard entre les sucres réducteurs et les résidus de lysine des protéines à travers leur groupement  $\epsilon-NH_2$  sont très impliquées dans le manque de disponibilité biologique de cet acide aminé.

### **III.3. Propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara**

Les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles affectent le comportement des protéines dans les systèmes alimentaires pendant la transformation, la préparation, la fabrication et le stockage (Amonsou, 2010 ; Mundi, 2012). Ces propriétés comprennent l'hydrophobicité, la solubilité, l'absorption d'eau et d'huile, les propriétés émulsifiantes (Amonsou, 2010).

#### **III.3.1. Propriété physico-chimique de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara**

##### **III.3.1.2. L'hydrophobicité**

L'hydrophobicité par  $\mu\text{g}$  de Bleu de Bromophénol lié/ g protéines ( $\mu\text{g}$  de BBP lié/g protéines) de la farine délipidée et de l'isolat protéique du pois Bambara cultivar rouge est de 1,10 et 2,15  $\mu\text{g/g}$  protéine respectivement. L'hydrophobicité de l'isolat protéique est significativement ( $p > 0,05$ ) plus élevée que celle de la farine délipidée. Les résultats d'hydrophobicités de la farine délipidée et de l'isolat protéique du pois Bambara obtenus dans ce travail sont supérieurs à ceux rapportés par Mwasaru *et al.* (1999) sur l'isolat protéique du pois *Cajan* et du niébé obtenu par préparation au pH 8,5 en présence du NaOH 0,1 M. Mwasaru *et al.* (1999) ont noté que le pH d'extraction affecte la conformation et la dénaturation des protéines, l'hydrophobicité des protéines augmente avec le pH d'extraction. L'hydrophobicité des protéines est corrélée à sa composition en acides aminés. Kudre *et al.* (2013) ont rapporté que certaines différences dans les proportions d'acides aminés hydrophobes et dans les rapports relatifs entre les acides aminés acides et basiques observées, sont à la base des propriétés de la chaîne latérale.

#### **III.3.2. Propriétés fonctionnelles de la farine délipidée et de l'isolat protéique**

##### **III.3.2.1. Capacité d'absorption d'eau**

La capacité d'absorption d'eau (CAE) joue un rôle majeur dans la qualité et la texture de divers aliments, notamment les produits de boulangeries tels que le pain ou les cakes, les produits carnés et les analogues de viandes (Kinsella, 1976). La capacité d'absorption d'eau de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara présentée dans le **Tableau 8** est de 3,35 et de 5,12 g/g respectivement. La CAE de la farine délipidée de pois Bambara obtenue est significativement inférieure à celle rapportée par Adebawale *et al.* (2011) sur les farines de pois Bambara cultivars blanc et marron (5,8 – 6,7 g /g de protéines) obtenues aussi bien par

précipitation que miccélation. Ces auteurs ont noté que la précipitation isoélectrique perturbe la structure et les alentours du système aqueux des protéines, réduisant ainsi la capacité d'absorption d'eau (Adebowale *et al.*, 2011). Les résultats de la CAE de l'isolat protéique obtenus sont supérieurs à ceux observés par Lqari *et al.* (2002) sur l'isolat protéique de *Lupinus angiotifolius* préparé au pH 10,5 en présence du Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,25 % (3,83 %). De même, que ceux rapporté par Sanchez-Vioque *et al.* (1999) (4,09 %) sur l'isolat protéique des lentilles. Les différences observées entre ces résultats s'expliquent d'une part, par la dénaturation et le dépliement des protéines qui ont affecté l'interaction avec l'eau ; d'autre part, par la présence de composants non protéiques (Kinsella, 1979). Mune Mune *et al.* (2011) ont suggéré que les variations de la CAE des concentrats protéiques reflètent la composition en acides aminés des protéines de même que l'état de leur dénaturation.

L'isolat protéique de pois Bambara est un potentiel ingrédient pour les industries de la viande, du pain et des gâteaux, au regard de sa capacité d'absorption d'eau comparable à celle du concentrat protéique de soja commercial (SUPROPLUS, 4,04 g/g) (Mwasaru *et al.*, 1999). L'incorporation de la farine délipidée et d'isolat protéique de pois Bambara dans les formulations alimentaires aqueuses, en particulière celles impliquant la manipulation de la soupe et de la pâte, pourrait être envisagée au regard de sa bonne capacité d'absorption d'eau, qui est la capacité de la farine à absorber l'eau et à gonfler pour une consistance prouvée dans les aliments.

**Tableau 8 :** Quelques paramètres fonctionnels de la farine délipidée et de l'isolat protéique du pois Bambara.

<b>Pois Bambara</b>		
	<b>Farine délipidée</b>	<b>Isolat protéique</b>
Capacité d'absorption d'eau (g/g)	3,35 ± 0,27 <sup>c2</sup>	5,12 ± 0,71 <sup>c1</sup>
Capacité d'absorption d'huile (ml/g)	4,82 ± 0,19 <sup>c1</sup>	2,93 ± 0,79 <sup>d2</sup>
Capacité Emulsifiante (%)	24,51 ± 0,43 <sup>b1</sup>	37,59 ± 1,29 <sup>a2</sup>
Stabilité Emulsifiante (%)	21,47 ± 1,38 <sup>a1</sup>	29,08 ± 2,45 <sup>b2</sup>

‡ Les valeurs sur la même colonne suivie de lettres (a, b, c, d) différentes sont significativement différentes (p < 0,05)

‡ Les valeurs sur la même ligne suivie de chiffres (1, 2) différentes sont significativement différentes (p < 0,05)

### III.3.2.2. Capacité d'absorption d'huile

La capacité d'absorption d'huile des ingrédients protéiques conditionne leur incorporation dans les produits carnés tels que les saucisses, ou les analogues de viandes (Acton, 1983). La capacité d'absorption d'huile (CAH) de la farine délipidée et de l'isolat protéique de pois Bambara présentée dans le **Tableau 8** est de 4,82 et de 2,93 ml/g respectivement. La CAH obtenue sur la farine de pois Bambara cultivar rouge est significativement supérieure à celle rapportée par Diallo *et al.* (2015) (2,04 – 2,12 ml/g) sur différents cultivars de Voandzou. Par contre, cette valeur obtenue est inférieure aux résultats rapporté par Adebowale *et al.*, 2011 (6,6 – 7,2 ml/g) sur les farines de pois Bambara. Ces différences pourraient s'expliquer par la taille des particules des farines. En effet, indépendamment de la variété, il a été observé que l'augmentation de la taille des particules de farines entraînait une variation de la CAH des farines (Diallo *et al.*, 2015). La CAH de l'isolat de pois Bambara cultivar rouge obtenue est similaire à celle observée par Mwasaru *et al.* (1999b) pour les isolats protéiques de *Cajanus cajan* de 1,77 à 2,45 ml/g et inférieure à celle obtenue par Stone *et al.* (2015) sur les isolats protéiques de pois (3,5 – 5,4 g/g). Wu *et al.* (2009) ont attribué la faible absorption d'huile à une dénaturation irréversible causée par la précipitation des protéines au pH 4,5. Les différences observées dans la capacité d'absorption d'huile des isolats protéiques peuvent être dues aux différentes propriétés de surface des protéines ou simplement aux différentes méthodes d'analyse (Stone *et al.*, 2015). La capacité de rétention d'huile est un facteur déterminant pour l'utilisation des protéines en tant qu'ingrédients fonctionnels potentiels dans les aliments tels que les produits de boulangerie à forte teneur en matières grasses et les aliments de type émulsion (Liu *et al.*, 2013 ; Malomo, 2015 ; Arise, 2016).

### III.3.2.3. Propriétés émulsifiantes

Les émulsifiants sont composés de parties hydrophobes et hydrophiles qui s'intègrent à l'interface huile-eau pour réduire la tension interfaciale (Bos et van Vliet 2001). L'efficacité des émulsifiants à base de protéines dépend des propriétés de la protéine (source, taille, solubilité, conformation et hydrophobicité de surface) (Schwenke 2001 ; McClements 2007) et des effets du solvant (température, pH et présence de sels) (McClements 2004 ; Can Karaca *et al.* 2011). La Capacité Emulsifiante (CE) et la Stabilité Emulsifiante (SE) de la farine et de l'isolat protéique du pois Bambara cultivar rouge est présentée dans le **Tableau 8**.

### ➤ **Capacité Emulsifiante**

La capacité émulsifiante (CE) de la farine délipidée de pois Bambara obtenue est de 24,51 %. Cette valeur obtenue est significativement supérieure ( $P > 0,05$ ) à celle obtenue par Aleleke *et al.* (2017) (19,29 - 19,27 %) sur les farines délipidées du pois Bambara cultivars blanc et brun. La capacité émulsifiante (CE) de l'isolat protéique de pois Bambara présentée dans le **Tableau 8** est de 37,59 %. Les résultats obtenus sont similaires à ceux rapporté par Shalini *et al.* (2015) sur l'isolat protéique du niébé, de même que ceux obtenu par Karaca *et al.*, 2011 sur l'isolat protéique des graines de lin. Par contre, les résultats obtenus sont inférieurs à ceux rapportés par Lqari *et al.* (2002) sur l'isolat protéique de *Lupinus angiotifolius* préparé au pH 10,5 en présence du  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0,25 % (69,1%). La faible capacité émulsifiante observée dans le cadre du présent travail peut être due à la capacité d'absorption d'huile de l'isolat protéique de pois Bambara. Abu *et al.* (2006) ont noté une corrélation positive entre la capacité d'absorption d'huile et l'activité émulsifiante du concentrat protéique du niébé.

### ➤ **Stabilité Emulsifiante**

La stabilité émulsifiante (SE) de la farine délipidée de pois Bambara obtenue est de 21,47 %. Cette valeur obtenue est significativement inférieure à celle obtenue par Aleleke *et al.* (2017) (30,12 - 26,83 %) sur les farines délipidées du pois Bambara cultivars blanc et brun. La stabilité émulsifiante (SE) de l'isolat protéique de pois Bambara présentée sur le **Tableau 8** est de 29,08 %. Cette valeur obtenue est similaire à celle rapportée par stone *et al.* (2015) (24,7 %) sur l'isolat protéique du blé. Par ailleurs, Mwasaru *et al.* (2000) ont rapporté des valeurs élevées sur l'isolat protéique du niébé préparé au pH 10,5 en présence du NaCl (0,1 – 0,5 M). De plus Mwasaru *et al.* (2000) ont suggéré que la différence de propriétés émulsifiantes (Capacité émulsifiante, Stabilité émulsifiante) est fonction de leur composition en acides aminés.

### III.3.3. Conclusion partielle

Au terme de cette partie qui consistait à préparer un isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge à fonctionnalité améliorer. Il ressort que :

L'extraction des protéines par solubilisation alcaline (pH 9,9) suivi de la précipitation par acidification au (pH 4,5) isoélectrique a été bien effectuée d'une part, au regard des diminutions des teneurs observées (teneurs en eaux, glucides totaux, fibres alimentaires...) dans l'isolat protéique par rapport à la farine délipidée. Et d'autre part, à la teneur en protéines obtenue (81,28 %) de l'isolat protéique de pois Bambara. Malgré la délipidation de la farine, une teneur en lipides totaux de 7,71 % a été notée, L'isolat protéique de pois Bambara contient une quantité importante de lipides (6,18 %), laquelle peut être recommandée pour une alimentation hypolipidémie. La préparation de l'isolat protéique de pois Bambara est favorable à l'élimination des glucides totaux et fibres. L'hydrophobicité de l'isolat protéique est meilleure que celle de la farine délipidée tandis que l'extraction des protéines a réduit la teneur en lysine réactive. L'évaluation des propriétés fonctionnelles a mis en évidence d'excellentes propriétés (capacité d'absorption d'eau et d'huile et les propriétés émulsifiantes), lesquelles permettent de prédire l'utilisation de l'isolat protéique de pois Bambara comme additifs dans la formulation de produits traditionnels et nouveaux.

### III.4. Effet des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites

L'utilisation des isolats protéiques de pois Bambara comme potentiels ingrédients fonctionnels dans les industries agroalimentaires nécessite l'évaluation de certains facteurs environnementaux (pH, température, etc.) sur certaines propriétés physico-chimiques et fonctionnelles.

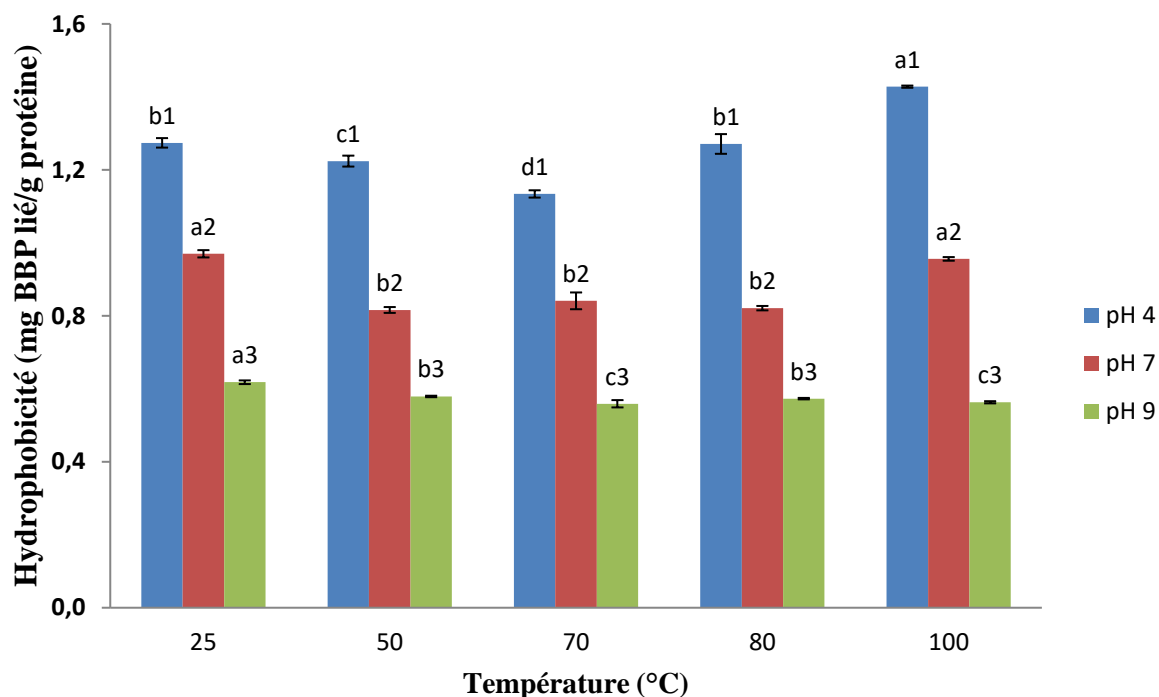
#### III.4.1. Effet sur les propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques mettent en évidence les différentes interactions de la protéine avec son environnement. Il s'agit ici de l'hydrophobicité.

##### III.4.1.1. L'hydrophobicité

L'hydrophobicité des protéines est un paramètre physicochimique important lié à la conformation des protéines et facilite la compréhension de certaines propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, les propriétés émulsifiantes et moussantes lors des formulations alimentaires. L'hydrophobicité des protéines est fonction de la charge des protéines qui résultent soit des facteurs intrinsèques (contenu en acides aminés, taille, charge et conformation des protéines) soit des facteurs extrinsèques entre autre : le solvant (force ionique et la température), temps d'agitation et la concentration des protéines. L'hydrophobicité ( $\mu\text{g}$  de Bleu de Bromophénol lié/g protéines) de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique aux différents pH est illustrée à la **Figure 28**. Il existe des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre les valeurs d'hydrophobicités de l'isolat protéique aux pH 4, 7 et 9 quelles que soient les températures appliquées. L'hydrophobicité de la protéine est significativement plus élevée à pH 4 et plus faible à pH 9. Les valeurs obtenues dans cette étude sont inférieures à celle trouvées par Stone *et al* (2015) sur les isolats protéiques de pois à pH 7 (25,44 – 53,58) à la température ambiante. À pH 4, la charge nette de la protéine est d'environ 0. De ce fait, les interactions hydrophobes protéines - protéines seront alors prédominantes, tandis qu'à pH 9, la protéine est chargée négativement et les interactions protéine-eau sont prédominantes. À pH 4, l'hydrophobicité diminue avec la température jusqu'à 70 °C, puis augmente ensuite. La diminution de l'hydrophobicité résulterait probablement de l'agrégation des protéines par le biais des interactions hydrophobes, et l'augmentation serait due au dépliage partiel et à l'exposition de régions précédemment enfouies dans la structure des protéines. En plus, l'étude de la structure secondaire de l'isolat a montré une faible teneur en structure irrégulières (1,53 %) à 25°C pH 4, ce qui suggère un faible repliement de la protéine. La forte hydrophobicité de l'isolat protéique peut être liée au réarrangement observé dans sa structure secondaire. Ces

observations sont en droite ligne avec celle de Sorgentini, *et al.*, 1995, qui ont noté que les sous-unités dépliées et dissociées par la chaleur qui composent la molécule de protéine provoquent l'exposition de domaines hydrophobes précédemment enfouis à l'intérieur des sous-unités. Cette exposition des sites hydrophobes à la surface de la protéine augmente l'hydrophobicité de surface. À pH 9, le traitement thermique a entraîné une diminution de l'hydrophobicité des protéines. Cette diminution de l'hydrophobicité des protéines a été observée à une température comprise entre 50 et 80 °C, tandis qu'une différence non significative de l'hydrophobicité de l'isolat protéique traitée à 100 °C par rapport à celle de la protéine non traitée a été constatée lors du traitement thermique. Lianzhou Jiang *et al.* (2015) ont observé une augmentation de l'hydrophobicité avec une augmentation de la température sur l'isolat protéique de soja de 2 % (p/v). Sun *et al.* (2013) ont noté que la modification de l'hydrophobicité de surface induit un changement de structure de la protéine en réponse au traitement thermique.



\* les données sont déterminées en triplets. Les moyennes suivies de lettres différentes (a, b, c) à un même pH sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ). Les moyennes suivies de chiffres différents (1, 2, 3) à la même température sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

**Figure 28 :** Effet des traitements thermiques à différents pH sur l'Hydrophobicité ( $\mu\text{g}$  de BBP lié/g protéines) de l'isolat protéique de pois Bambara.



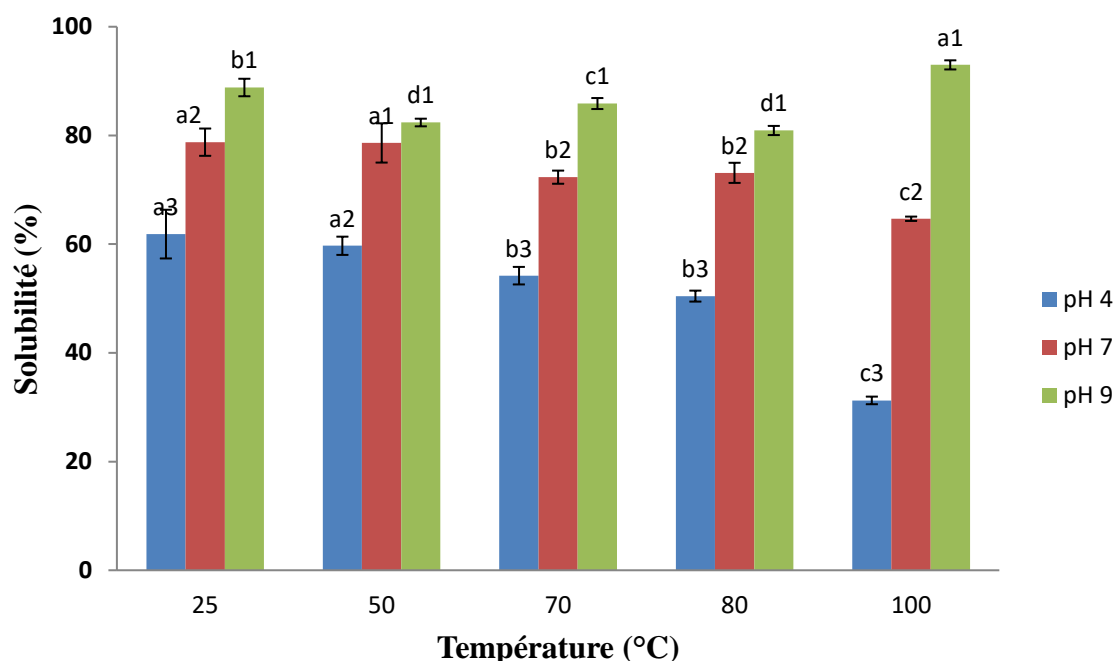
### III.4.2. Effet sur les propriétés fonctionnelles

La maîtrise des propriétés fonctionnelles est d'une importance capitale pour l'incorporation des protéines dans les aliments nouveaux. Il s'en est agi de la solubilité et des propriétés émulsifiantes.

#### III.4.2.1. Solubilité

La solubilité d'un ingrédient protéique à divers pH conditionne son incorporation dans les boissons, les produits de boulangeries ou de desserts (Chel-Guero *et al.*, 2002 ; Cheftel *et al.*, 1985). Les résultats de l'effet des traitements thermiques à différents pH sur la solubilité de l'isolat protéique de pois Bambara sont présentés dans la **Figure 29**. Les diagrammes de la solubilité des protéines de l'isolat varient en fonction de la température. La solubilité des protéines globulaires est généralement en corrélation négative avec l'hydrophobicité (Can Karaca *et al.*, 2011). À cet égard, la solubilité de l'isolat protéique de pois Bambara est significativement plus faible à pH 4, et plus élevée à pH 9. Cette faible solubilité protéique à pH 4 est cohérente avec celle de plusieurs légumineuses dont le pH isoélectrique est compris entre 4 et 5 (Chavan *et al.*, 2001 ; Mwasaru *et al.*, 2000 ; Hermansson, 1979). La forte solubilité des protéines des légumineuses aux pH basiques s'explique par leurs charges négatives, qui maintiennent les interactions électrostatiques répulsives entre les chaînes latérales voisines, et favorisent la dissociation des oligomères et le déploiement des polypeptides (Moure *et al.*, 2006). La forte solubilité de l'isolat protéique peut être due au fait que les acides aminés aromatiques et hydrophobes ne sont pas exposés à la surface, augmentant ainsi l'interaction avec le solvant. Elle peut aussi être liée à la teneur relativement élevée de la conformation coude  $\beta$  qui donne plus de flexibilité à la protéine (Mune Mune *et al.*, 2016b). De plus, la solubilité des protéines augmente avec la proportion de structure non ordonnée, une solubilité élevée peut contribuer à de bonnes propriétés émulsifiantes, car les protéines sont capables de diffuser à l'interface huile-eau et de diminuer la tension interfaciale (Cheung *et al.*, 2015). Aux pH 4 et 7, une différence non significative de la solubilité a été constatée à 50 °C lors du traitement thermique par rapport à la protéine non traitée, puis nous observons une diminution de la solubilité aux températures de 70 et 100 °C. La faible solubilité de la protéine (31 %) a été observée à pH 4, et la plus élevée (93 %) a été trouvée à pH 9, après un traitement thermique à 100 °C. La source de protéine est importante pour mieux cerner le comportement de la solubilité après traitement thermique. Cependant, Timelisena *et al.*, 2016 ont noté que la solubilité est influencée par l'interaction protéine - eau et la molécule de protéine dépliée à une température

inférieure à celle de la dénaturation de la protéine, affecte de ce fait la liaison des structures secondaires et tertiaires.



\* les données sont déterminées en triplets. Les moyennes suivies de lettres différentes (a, b, c) à un même pH sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ). Les moyennes suivies de chiffres différents (1, 2, 3) à la même température sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

**Figure 29 :** Effet des traitements thermiques à différents pH sur la solubilité de l'isolat protéique de pois Bambara.

### III.4.2.2. Propriétés émulsifiantes

Les propriétés émulsifiantes sont une fonctionnalité importante des protéines dans les aliments tels que les boissons, les crèmes glacées, les vinaigrettes, les mousses, les nappages fouettés et la margarine (Boye *et al.*, 2010 ; Lam et Nickerson, 2013). En raison de leur nature amphiphile (existence de résidus d'acides aminés polaires et non polaires), les protéines agissent comme des émulsifiants en s'adsorbant à l'interface, en enrobant les gouttelettes d'huile ou d'air, en développant des films stables et en stabilisant les dispersions. Les émulsions (interface huile-eau) se forment lorsque des gouttelettes d'huile se dispersent dans un milieu aqueux. Dans ce cas, la valeur du film repose sur la prévention de la coalescence, de la floculation et de la sédimentation dans les émulsions et de l'effondrement des bulles d'air dans la mousse (McClements, 2004 ; 2007). L'effet des traitements thermiques sur les propriétés émulsifiantes de l'isolat protéique de pois Bambara aux différents pH sont présentées dans les **Figures 30 a**

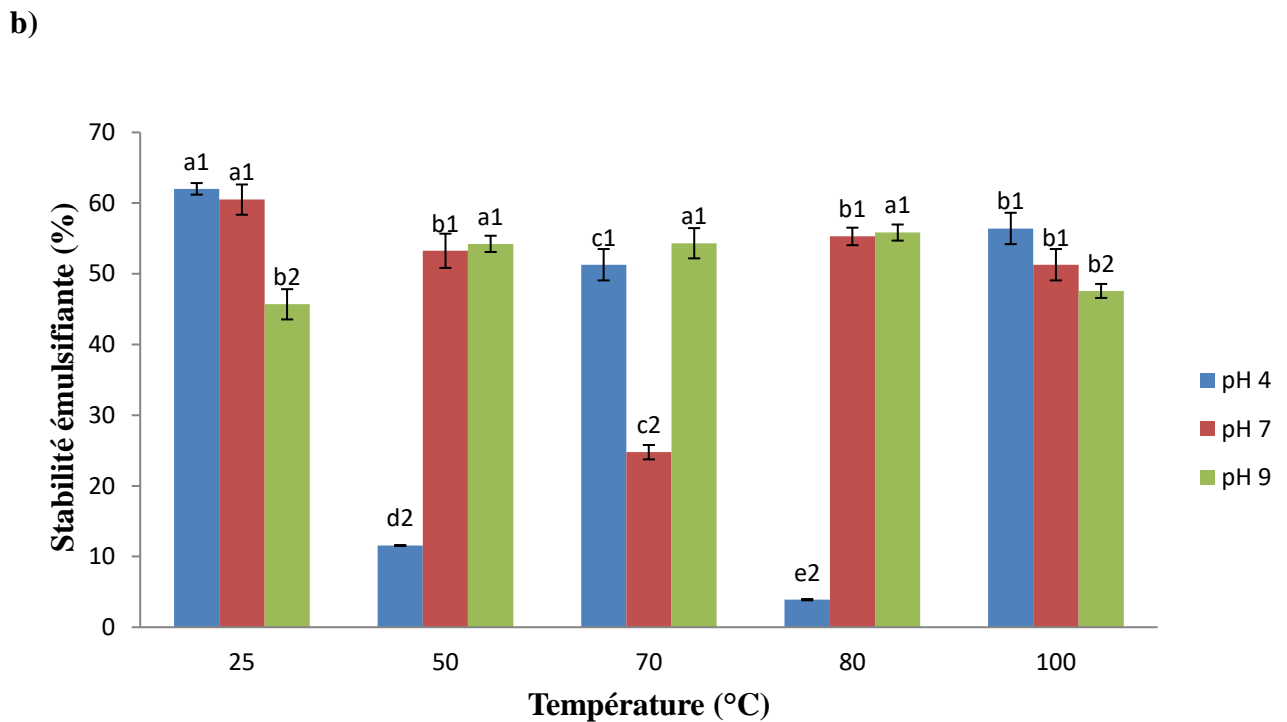
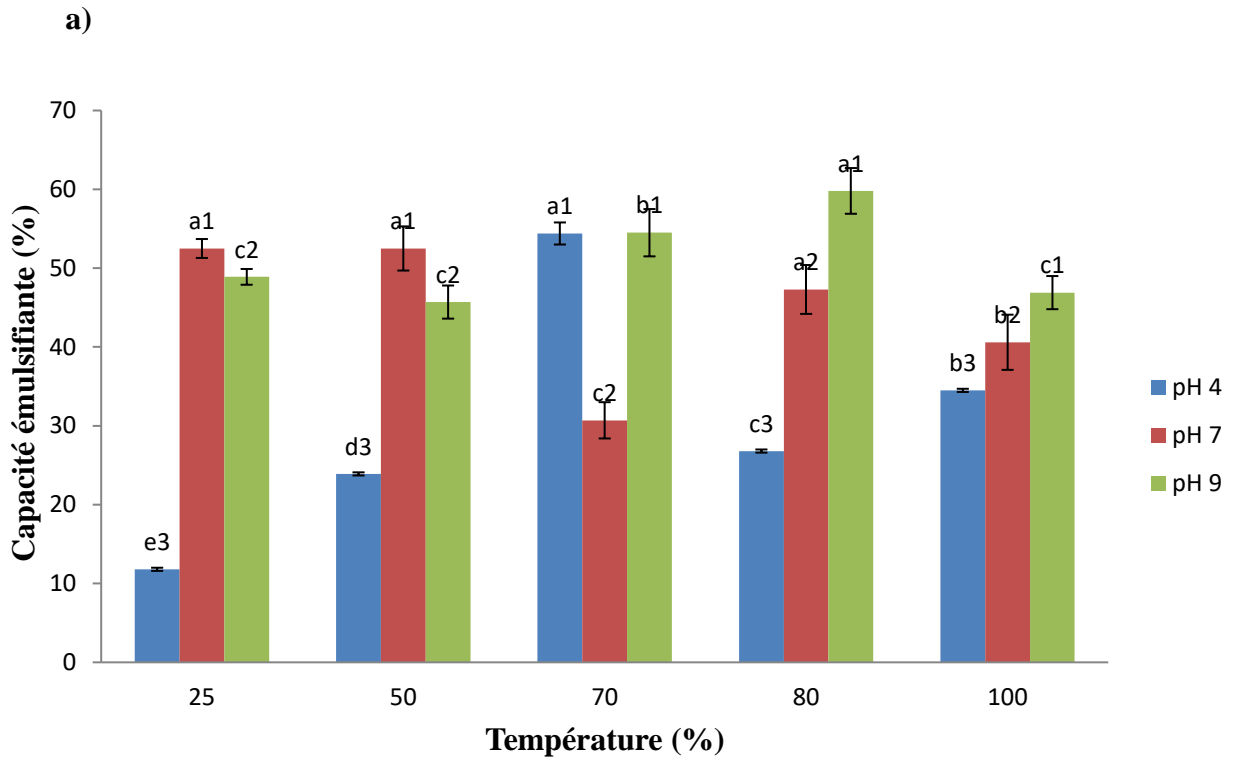
**et b.** Les propriétés émulsifiantes ont été déterminées en utilisant deux indices : la capacité émulsifiante (CE) (**Figure 30 a**) et la stabilité émulsifiante (SE) (**figure 30 b**).

Il est recommandé d'utiliser l'isolat protéique de pois Bambara sans traitement thermique dans les applications où une CE est élevée, sous un pH neutre ou basique. Une CE plus élevée de l'isolat protéique à 25 °C à un pH neutre ou basique est attendue, car une solubilité élevée confère généralement aux protéines une meilleure capacité de diffusion à l'interface huile/eau, ce qui réduit la tension inter faciale, et donc améliorer la CE (**Figure 30a**). Des résultats similaires ont été trouvés par Carvalho *et al.* (2006). En outre, Panyam et Kilara, 1996 ont noté que l'hydrophobicité des protéines globulaires est importante pour la CE, en particulier lorsque la solubilité est élevée, car elle facilite l'adsorption des protéines à l'interface huile-eau, puis réduit la tension superficielle. En plus, Aluko et Yada (1995) ont noté qu'une solubilité élevée confère aux protéines une meilleure aptitude à diffuser vers l'interface huile/eau et s'y adsorber en abaissant la tension interfaciale, donc à améliorer la capacité émulsifiante. La CE de l'isolat protéique est significativement plus élevée aux pH 7 et 9 par rapport à pH 4 à toutes les températures, sauf pour l'isolat traité à 70 °C. En général, une combinaison adéquate de la solubilité, d'hydrophobicité et de la flexibilité moléculaire explique une augmentation de la CE des protéines globulaires. De plus à pH 9, l'isolat protéique de pois Bambara est chargé négativement ce qui implique la présence des forces répulsives. Lam et Nickerson, 2013, ont noté que les forces électrostatiques répulsives et les interactions stériques entre les gouttelettes voisines jouent toutes un rôle dans la stabilisation des émulsions huile-dans-eau. Le traitement thermique a augmenté la CE de l'isolat protéique traité à pH 4. La CE maximale (54,4 %) a été observée pour l'isolat traité à 70 °C. À pH 7, une différence non significative a été constatée entre la CE de l'isolat protéique non traité et celle de l'isolat traité à 50 et 80 °C (52 %), et la CE a diminué pour l'isolat traité à 70 et 100 °C. À pH 9, une augmentation de la CE a été observée pour l'isolat protéique de pois Bambara traité à 70 °C (55 %) et 80 °C (60 %) par rapport à l'isolat de protéine non traité, tandis qu'une différence non significative a été constatée pour l'isolat traité à 50 et 100 °C. En outre, la proportion élevée de coudes  $\beta$  confère aux protéines globulaires une meilleure flexibilité.

L'influence des traitements thermiques sur la stabilité émulsifiante (SE) (**Figure 30 b**) de l'isolat de protéine de pois Bambara varie en fonction du pH appliqué. L'isolat protéique non traité (à 25 °C) présente une meilleure SE (62 %) aux pH 4 et 7. La forte stabilité de l'émulsion à 25°C peut être liée à sa structure secondaire dans laquelle la teneur en conformation coude  $\beta$  était élevée. Mune Mune *et al.* (2016b) ont rapporté qu'une teneur élevée de la conformation

coude  $\beta$  est importante pour la flexibilité de la protéine, ce qui contribue à la stabilisation de l'émulsion. À pH 9, le traitement thermique entre 50 - 80 °C a augmenté la SE de l'isolat protéique de pois Bambara (55 %), qui a ensuite diminué à 48 % lorsque l'isolat a été chauffé à 100 °C. Des résultats similaires ont été observés par Mwasaru *et al.* (2000) qui ont remarqué que la stabilité émulsifiante de l'isolat protéique de *Cajanus cajan* est maximale à pH 4. En outre, Zayas (1997) a souligné que la SE élevée nécessite un réarrangement moléculaire des protéines adsorbées à l'interface huile-eau pour former une couche épaisse qui empêche la coalescence avec de faibles forces répulsives entre les protéines. D'autre part, à pH 4, l'isolat de pois Bambara chauffé entre 50 - 80 °C présente une faible SE (12 et 4 %, respectivement). À pH 7, une différence non significative ( $p > 0,05$ ) de la SE (55 %) a été observée pour l'isolat chauffé à 50, 80 et 100 °C, et le traitement thermique à 70 °C a produit un isolat protéique avec une SE plus faible (25 %). La flexibilité moléculaire des protéines globulaires induite par le dépliage partiel a probablement joué un rôle important dans la SE de l'isolat protéique de pois Bambara, car elle a renforcé le réarrangement des protéines à l'interface huile-eau.

Les propriétés émulsifiantes peuvent être également influencées par les traitements thermiques et le pH. Les **Figures 30a et b** illustrent également l'influence des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés émulsifiantes. De bonnes propriétés d'émulsifiantes sont importantes dans de nombreux produits alimentaires contenant des graisses, tels que les saucisses, le lait végétal et les produits à base de lait, ainsi que les pâtes à gâteau (Kinsella, 1979). Wu *et al.*, 2009 ont noté que les protéines à forte teneur en huile et les protéines à forte capacité émulsifiante étaient bonnes pour les vinaigrettes, les saucisses, la mortadelle, les soupes, les confiseries, les desserts glacés et les gâteaux.



\* les données sont déterminées en triplets. Les moyennes suivies de lettres différentes (a, b, c) à un même pH sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ). Les moyennes suivies de chiffres différents (1, 2, 3) à la même température sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

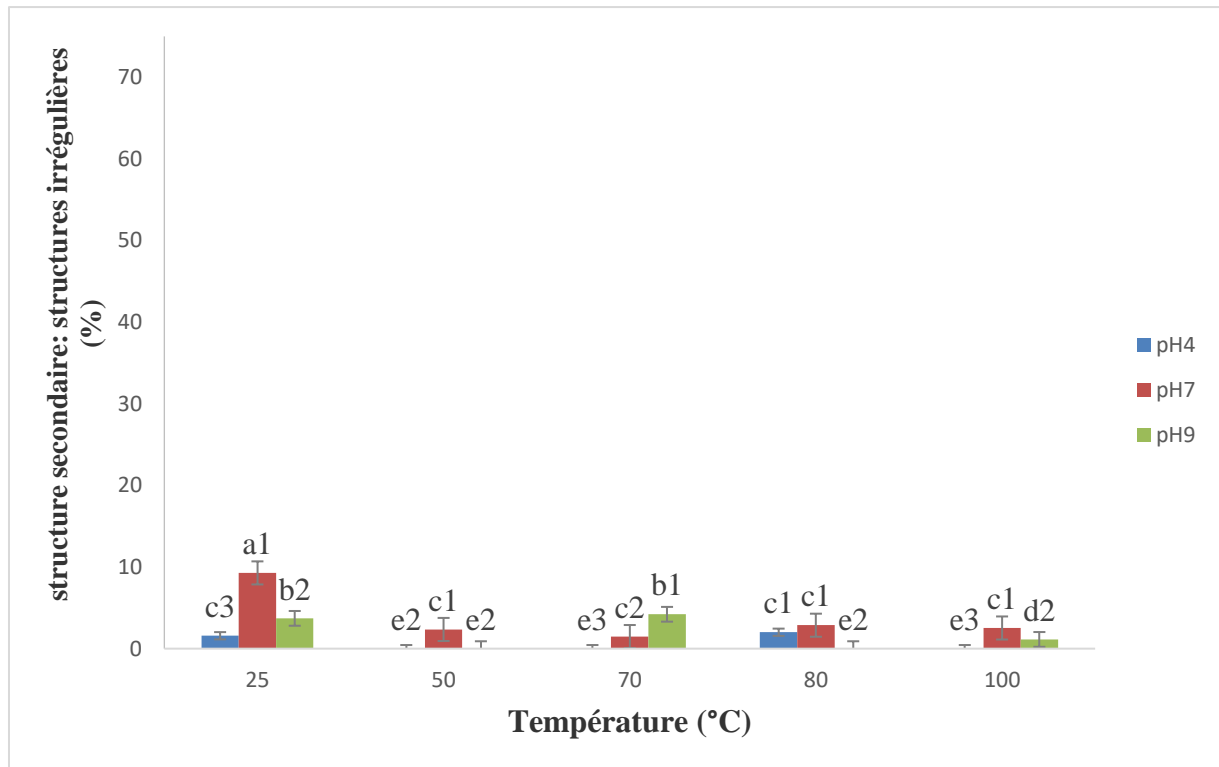
**Figure 30 :** Effet des traitements thermiques à différents pH sur la capacité émulsifiante (a) et la stabilité émulsifiante (b) de l'isolat protéique de pois Bambara.

### III.4.3. Effet des traitements thermiques à différents pH sur les structures secondaires des protéines.

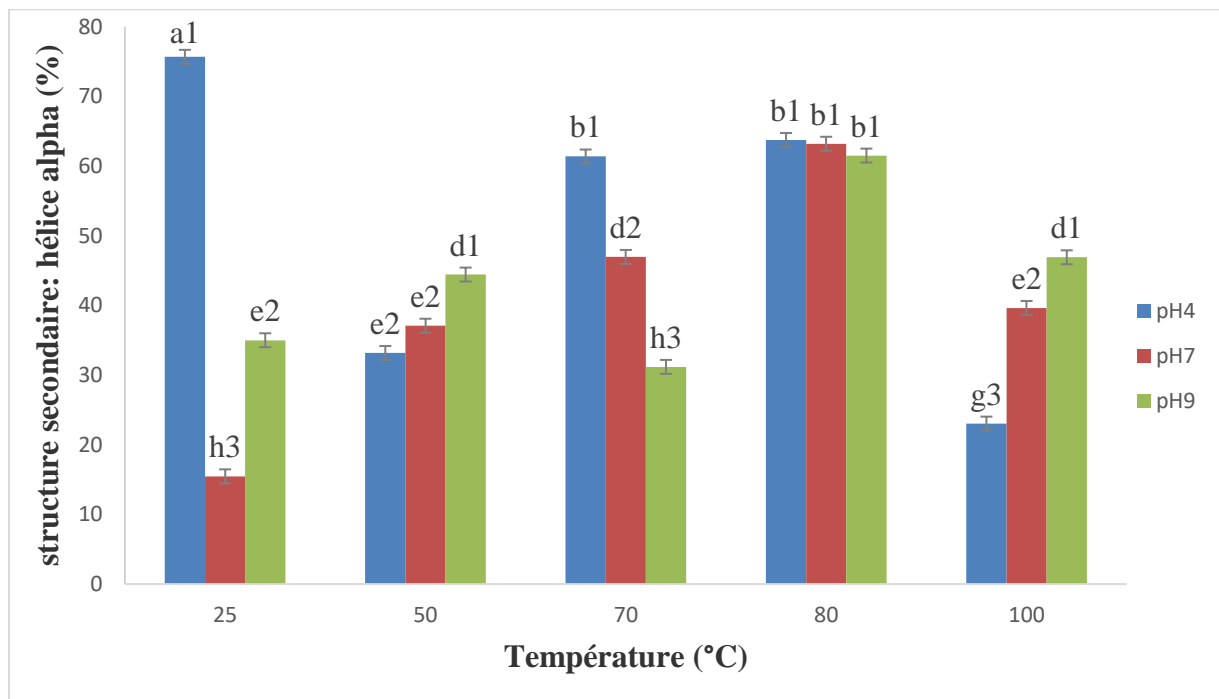
La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une méthode précieuse pour étudier les changements de conformation des protéines à l'état solide, cristallin et en solution. Cette méthode a été appliquée avec succès pour élucider la structure secondaire des protéines de la caséine bovine par Farrell *et al.*, 2001. L'influence des traitements thermiques à différents pH sur la structure secondaire par FTIR est illustrée aux **Figures 31 a-e**. Les données qui ont permis le tracé de ces figures sont en **Annexe 3**. Il en ressort que : les feuillets  $\beta$  et l'hélice  $\alpha$  sont les principales structures secondaires observées dans l'isolat protéique de pois Bambara, avec des proportions allant de 15,02 à 67,34 % et de 15,47 à 75,69 %, respectivement, en fonction du pH. La variation de la structure secondaire des protéines de légumineuses est particulièrement importante pour la capacité de rétention d'huile qui influence l'utilisation des protéines dans l'industrie de la viande froide et pour les saucisses, où la protéine peut faire le pont entre la graisse et l'eau dans ces produits. Achouri *et al.* (1998) ; Achouri and Zhang (2001) ont constaté que la capacité de rétention d'huile augmente avec la proportion de feuillets  $\beta$ , tandis qu'elle diminue avec la proportion de structures irrégulières et une très faible proportionnalité de la structure irrégulière. En outre, la proportion de [feuillelet  $\beta$  + l'hélice  $\alpha$ ] se situe entre 73 % (à pH 9 et 70 °C) et 100 % (à pH 9, 50 °C). La proportion élevée de [feuillelet  $\beta$  + l'hélice  $\alpha$ ] est une caractéristique principale des protéines de stockage des globulines compactées, et il a également été remarqué que les feuillets antiparallèles  $\beta$  peuvent se former dans les molécules de protéines agrégées (Ellepola *et al.*, 2005). À cet égard, la protéine agrégée favoriserait le piégeage physique de l'huile. Cependant, la proportion de feuillelet  $\beta$  et d'hélice  $\alpha$  se comporte différemment après un traitement thermique à différents pH. À pH 4, le traitement thermique a provoqué une augmentation de la proportion de feuillelet  $\beta$  et une diminution de celle d'hélice  $\alpha$ , tandis qu'à pH 7, le feuillelet  $\beta$  a diminué et la proportion de l'hélice  $\alpha$  a augmenté. Cette observation serait due à la coexistence de plusieurs conformations dans l'isolat protéique de pois Bambara pendant le chauffage. En outre, il y a probablement eu une inter conversion entre feuillelet  $\beta$  et hélice  $\alpha$ , puisque la corrélation entre les deux proportions est significative ( $R^2=0,98$  ;  $p<0,01$ ) pendant le chauffage à des pH de 4 et 7. Tandis qu'à pH 9, une augmentation significative ( $p<0,05$ ) de la proportion des feuillets  $\beta$  a été constatée à 50 °C lors du traitement thermique par rapport à l'échantillon non traité, et une diminution à 80 °C. Au même pH, sauf à 70 °C, le traitement thermique a provoqué une augmentation de la proportion d'hélice  $\alpha$ . Par ailleurs, on note également une proportion significative des structures irrégulière et coudes  $\beta$ . Cette structure irrégulière résulterait du dépliage des protéines et de la dénaturation, et la

proportion élevée de coudes  $\beta$  peut être considérée comme le produit du dépliage des protéines d'une structure d'ordre supérieur. Cependant, la proportion élevée de coudes  $\beta$  est importante pour la flexibilité des protéines. De plus, elle contribue à la stabilisation de l'émulsion eau-huile et à l'augmentation des propriétés d'émulsifiantes des protéines globulaires (Mune Mune *et al.*, 2016).

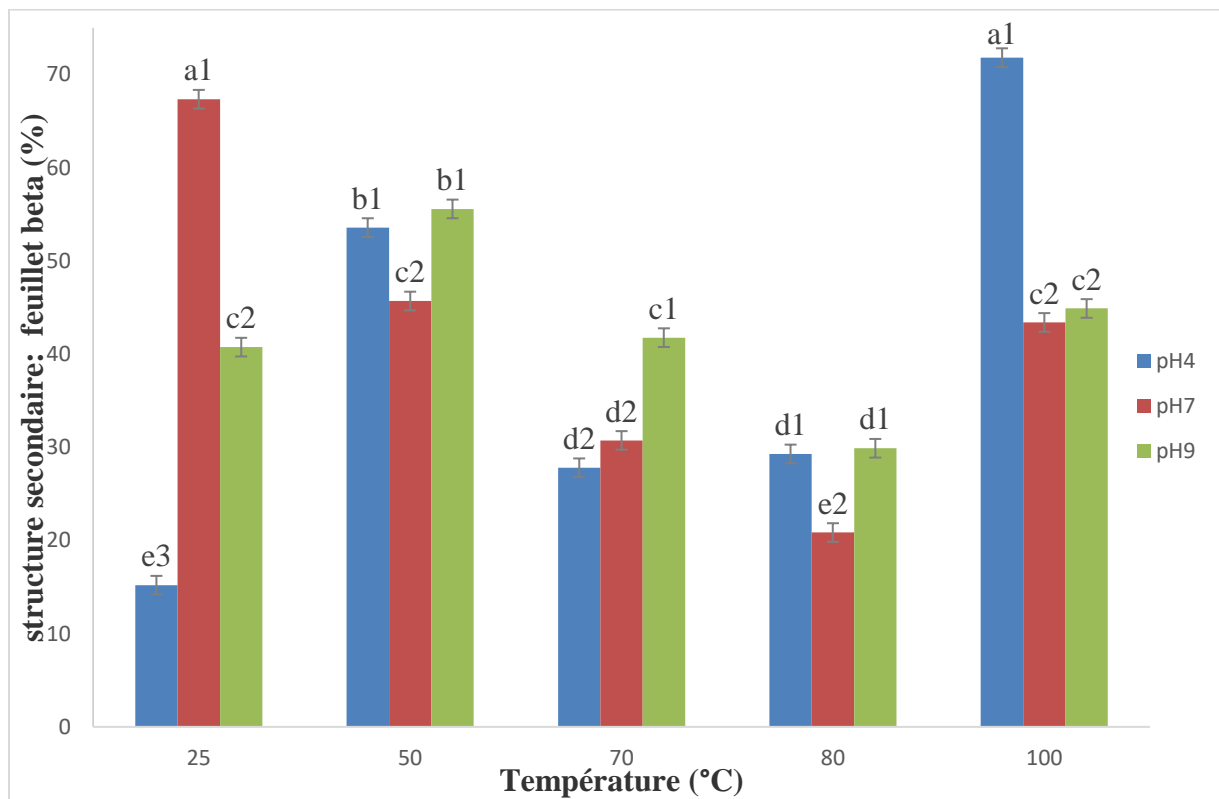
a)



b)

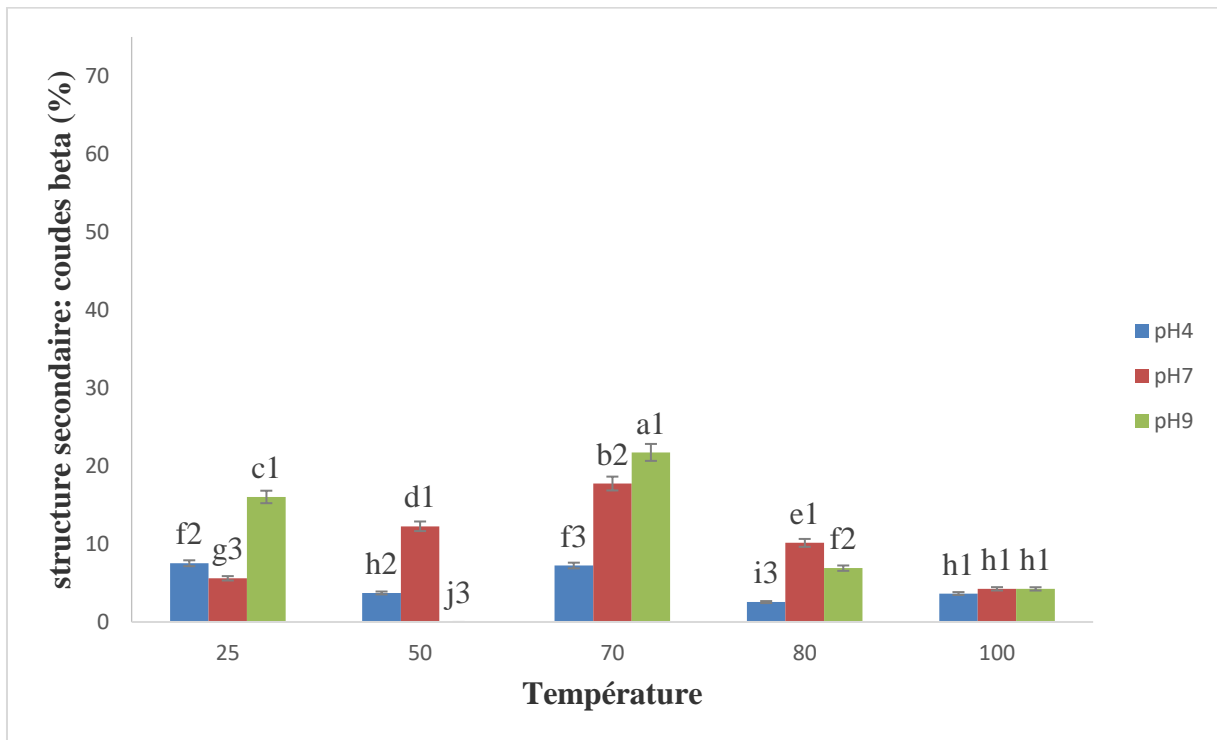


c)

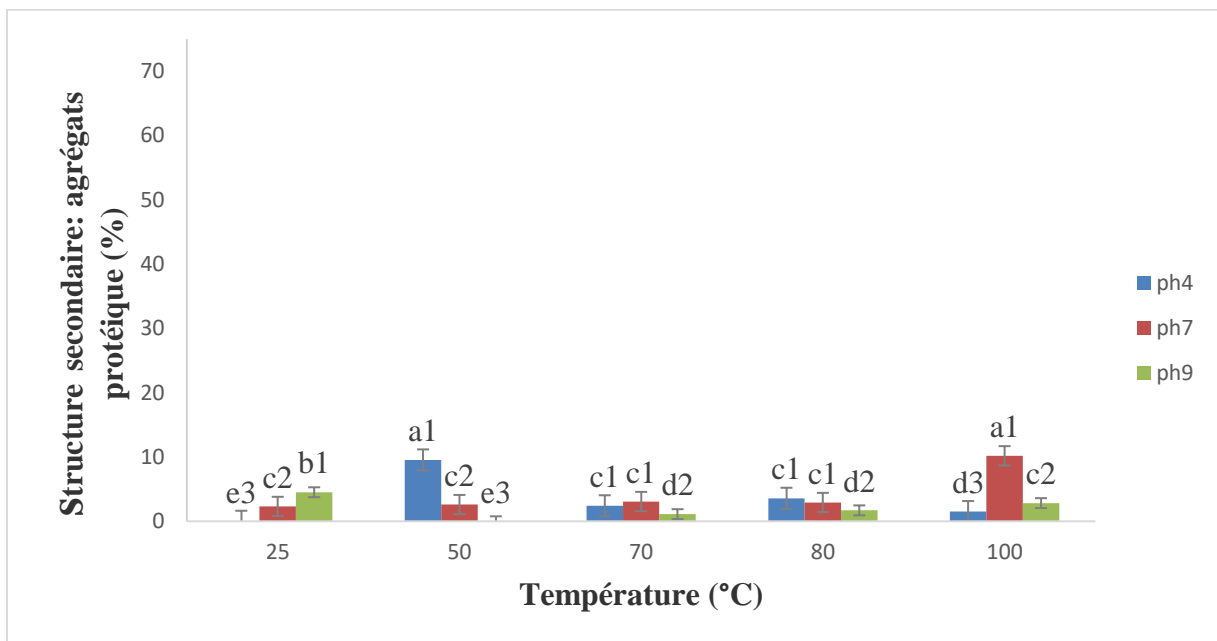




d)



e)



**Figure 31 :** Effet des traitements thermiques à différents pH sur la structure secondaire de l'isolat protéique de pois Bambara (structures irrégulières (a), hélice  $\alpha$  (b), feuillet  $\beta$  (c), coudes  $\beta$  (d) et agrégats protéiques (e)).

### III.4.3. Conclusion partielle

Au terme de cette partie qui consistait à étudier l'influence des traitements thermiques à différents pH sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines extraites de pois Bambara. Il ressort que :

L'hydrophobicité de l'isolat protéique est plus élevée à pH 4 et plus faible à pH 9, indépendamment de la température. La température a diminué la solubilité de la protéine aux pH 4 et 7 et l'a augmentée à pH 9 et visiblement à 100 °C. La faible solubilité de l'isolat protéique a été observée à pH 4, et la plus élevée à pH 9, après un traitement thermique à 100 °C. La capacité émulsifiante de l'isolat protéique est significativement plus élevée aux pH 7 et 9 par rapport à pH 4 à toutes les températures, sauf pour l'isolat traité à 70 °C. Tandis que, l'isolat protéique non traité présente une meilleure stabilité émulsifiante aux pH 4 et 7. D'autre part, à pH 9, le traitement thermique entre 50 - 80 °C a augmenté la stabilité émulsifiante de l'isolat protéique de pois Bambara, qui a ensuite diminué lorsque l'isolat a été chauffé à 100 °C. La structure secondaire a révélé les feuillets  $\beta$  et l'hélice  $\alpha$  comme les principales structures secondaires de l'isolat protéique de pois Bambara. À pH 4, le traitement thermique a provoqué une augmentation du feuillet  $\beta$  et une diminution de l'hélice  $\alpha$ . Tandis qu'à pH 7, le feuillet  $\beta$  a diminué et la proportion de l'hélice  $\alpha$  a augmenté. De manière générale, un contrôle adéquat du pH et du traitement thermique pourrait être important pour l'application de la protéine de pois Bambara dans les produits industriels où des propriétés émulsifiantes élevées sont requises. Les isolats protéiques de pois Bambara chauffés peuvent servir comme ingrédients fonctionnels dans les produits à base de lait, les industries carnés et les produits de boulangeries.

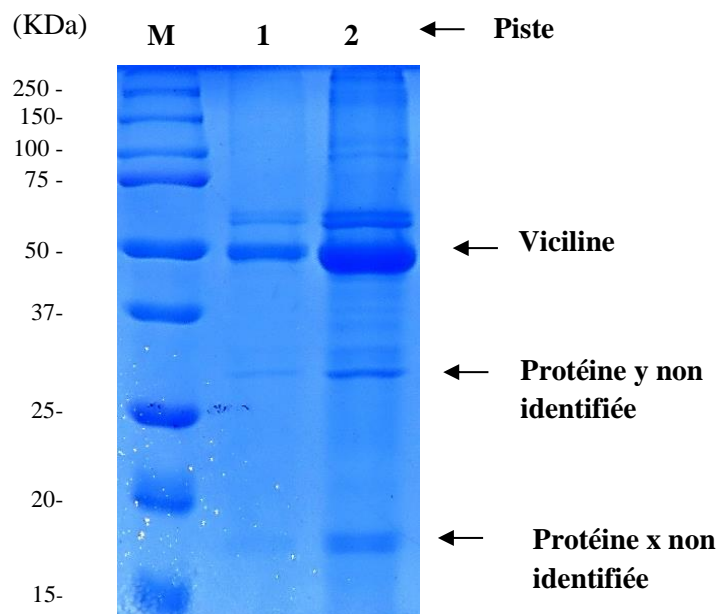
### **III.5. Analyse des changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à différents pH par spectroscopie de fluorescence et par analyse *in silico*.**

Les traitements thermiques se traduisent par des changements de conformation des protéines dont l'importance est fonction de l'intensité et du temps d'application. Plusieurs techniques sont utilisées pour étudier les différentes modifications structurales induits (fluorescence, dichroïsme circulaire...).

#### **III.5.1. Analyse SDS-PAGE de l'isolat protéique de pois Bambara**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sodium dodecyl sulfate a été utilisée pour l'analyse structurale de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge. La SDS-PAGE des protéines extraites de pois Bambara cultivar rouge a montré des bandes spécifiques pour cette espèce, avec des masses moléculaires allant de ~ 17 à ~ 118 kDa (**Figure 32**). Trois principales bandes des sous-unités ont été observées dans des conditions réductrices, à la fois pour la farine délipidée que pour l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge. Les résultats du présent travail sont en droite ligne avec ceux rapportés par Adebowale *et al.* (2011), qui ont noté trois bandes majeures pour la protéine de pois Bambara dans des conditions réductrices et non réductrices. Cependant, Kudre *et al.* (2013) ont observé deux principales bandes dans les conditions réductrices et non réductrices avec les protéines de pois Bambara. La différence observée dans le nombre de bandes pourrait être due aux différentes méthodes d'extraction utilisées dans la préparation des protéines extraites. La principale bande mise en évidence dans le gel correspond à la viciline, qui est la globuline de stockage des graines, dont la masse moléculaire est d'environ 50 kDa. Les deux autres bandes moyennes avec ~60 kDa et ~66 kDa ont été mieux observées dans l'isolat protéique par rapport à la farine, en raison du processus de concentration des protéines. La viciline est une protéine trimère ou hexamérique dépourvue de liaisons disulfures, ayant des fonctions de stockage de substrats nutritifs et avec une masse moléculaire de  $200,0 \pm 50,0$  kDa (Adebowale *et al.*, 2011 ; Pernolet *et al.*, 1983).

Des protéines de masses moléculaires élevées entre 100 - 118 kDa et, également de faibles masses moléculaires entre 17 kDa-27 kDa sont également visibles dans le gel, en particulier dans l'isolat protéique (**Figure 32, piste 2**). En général, les protéines de pois contiennent une faible quantité d'albumines, qui jouent des fonctions métaboliques telles que les enzymes, les inhibiteurs de protéases, les inhibiteurs d'amylase et les lectines (Lam *et al.*, 2018).



**Figure 32 : Modèles SDS-PAGE des extraits protéiques du pois Bambara**

**M** – Étalons de poids moléculaire - Étalons bicolores Précision Plus Protein™ (Bio-Rad) ;  
**1** – Farine délipidée de pois Bambara ; **2** – Isolat protéique de pois Bambara.

### III.5.2. Analyse des changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique aux pH 4, 7 et 9 par spectroscopie de fluorescence.

L'analyse des changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction des traitements thermiques aux différents pH a été faite par spectroscopie de fluorescence. L'étude par spectroscopie de fluorescence de l'isolat protéique du pois Bambara a visé dans un premier temps à la mesure de la fluorescence intrinsèque ensuite le diagramme de phase et enfin à la fluorescence par excitation synchrone.

La fluorescence par excitation synchrone est une méthode très utile pour étudier le microenvironnement des résidus d'acides aminés, par le décalage possible de  $k_{max}$ , qui correspond aux changements de polarité autour de la molécule de chromophore (Stanciuc *et al.*, 2015).

La fluorescence intrinsèque est donnée par les résidus de Tyr et Trp. Ces résidus ont été considérés pour surveiller les propriétés de fluorescence associées aux altérations structurales des protéines telles que le repliement, le dépliement ou les agrégations dues aux changements de l'environnement (Eftink et Shastry, 1997). La valeur la plus élevée de l'intensité intrinsèque de la fluorescence a été enregistrée à pH 4 et la plus faible à pH 9, indiquant les conditions de pH qui permettent une exposition maximale et minimale des résidus de Trp et de Tyr respectivement. Les décalages vers le bleu et le rouge sont étroitement liés à la mobilité des

acides aminés (Stanciuc *et al.*, 2015). Ainsi, les acides aminés à forte mobilité sont plus exposés à l'environnement polaire, induisant un pic d'émission décalé vers le rouge, tandis que ceux qui sont enterrés et entourés par un environnement apolaire génèrent des pics qui sont décalés vers le bleu (Gasymov *et al.*, 2000).

Le diagramme de phase met en évidence les modifications structurales durant les traitements thermiques effectués afin de faciliter la compréhension des phénomènes étudiés (Kuznetsova *et al.*, 2004). Le diagramme de phase a été utilisé avec succès pour décrire le dépliage / repliage des protéines de la bêta-lactalbumine et pour détecter les espèces partiellement repliées et les intermédiaires cachés (Stanciuc *et al.*, 2012). Le diagramme implique une allure linéaire ou non. Le tracé linéaire implique une transition totale ou partielle entre deux conformations, tandis qu'un tracé non linéaire reflète le caractère séquentiel des transformations structurales, suggérant la présence de plusieurs conformations structurales distinctes induites par le chauffage (Kataeva *et al.*, 2004).

### **III.5.2.1. Changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 4**

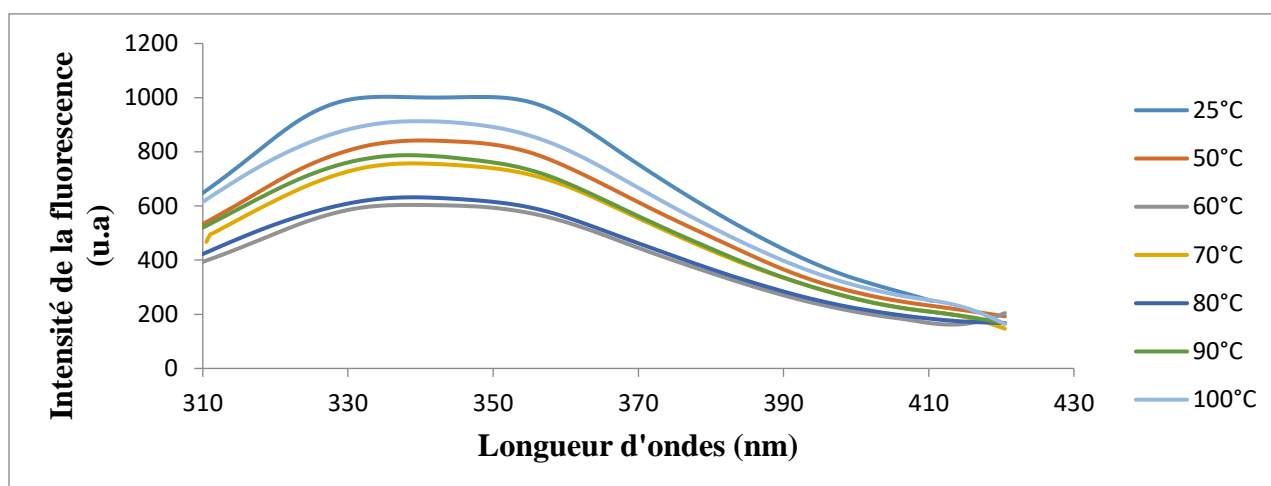
Les traitements thermiques (25, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 °C) sur l'isolat protéique (suspendu dans un tampon phosphate 0,01 M) à pH 4 pendant 10 minutes ont induits des modifications dans la structure des protéines. Ces différentes modifications structurales sur l'isolat protéique de pois Bambara à pH 4 ont été évaluées par fluorescence intrinsèque, par diagramme de phase et par fluorescence avec excitation synchrone.

#### ➤ **Fluorescence intrinsèque :**

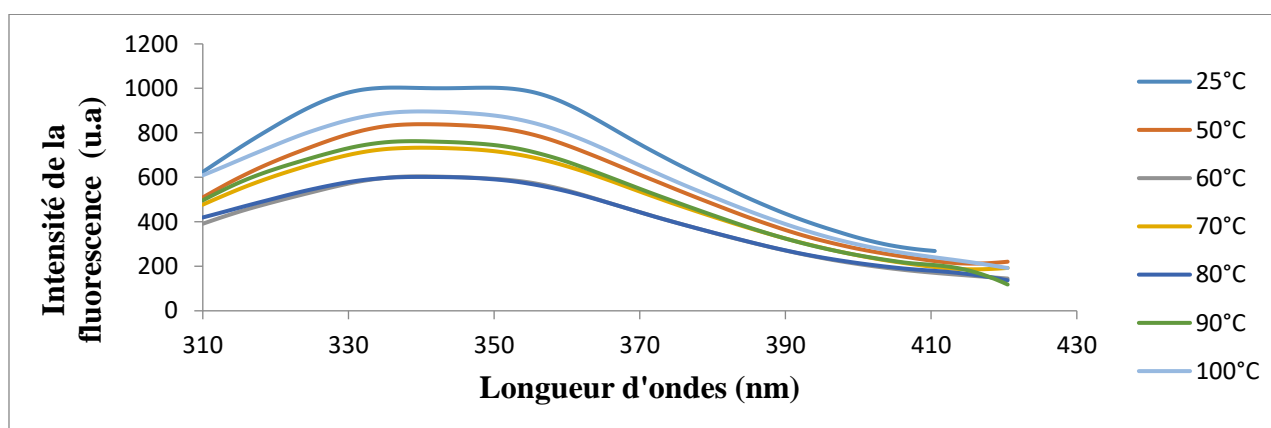
La fluorescence intrinsèque peut servir d'outil universel pour l'étude des interactions entre les protéines et leurs environnements. Cette méthode fournit des informations importantes sur la compréhension des caractéristiques structurales qui influencent le mécanisme de liaison entre n'importe quel composé cible et la protéine, et est appliquée avec succès pour étudier l'interaction entre eux (Aprodu *et al.*, 2017). Les changements structuraux opérés au travers de la fluorescence intrinsèque après traitement thermique à pH 4 sont présentées sur les **Figures 33a, b et c**. Les données brutes qui ont permis le tracé de ces Figures sont en **Annexe 2**. Des changements structuraux sur l'isolat protéique de pois Bambara, tels qu'observés par la variation de  $\lambda_{max}$  et l'intensité de la fluorescence. L'excitation à 280 et 274 nm à la température ambiante a entraîné un décalage vers le bleu de 340 nm à 336,5 nm lorsque le pH diminue de 7 à 4. Par conséquent, une transition de conformation s'est produite (les résidus de Trp et Tyr ont été

enfouis dans un environnement plus hydrophobe). Le spectre d'émission a un maximum à 295 nm lorsqu'il est chauffé entre 25 - 60 °C, entraînant un décalage de 3,5 nm vers le rouge. Cependant, l'augmentation de la température de 60 - 70 °C, a entraîné un décalage de 3 nm vers le bleu, qui est resté constant jusqu'à 100°C, ce qui suggère une diminution de la polarité du microenvironnement de Trp (**Figure 33a**). Gasyimov *et al.*, (2000) ont noté que les acides aminés à forte mobilité sont plus exposés à l'environnement polaire, induisant un pic d'émission décalé vers le rouge, tandis que ceux qui sont enterrés et entourés par un environnement apolaire génèrent des pics qui sont décalés vers le bleu. Lorsque la longueur d'onde d'excitation est passée à 280 nm, le traitement thermique de 50 - 60 °C a entraîné un décalage de 4 nm vers le rouge, suivi d'un décalage de 3,5 nm vers le bleu à la température comprise entre 80 - 90 °C (**Figure 33b**). La diminution de l'intensité de la fluorescence ainsi que le décalage vers le bleu du  $\lambda_{\text{max}}$  pourraient être expliqués par l'effet du traitement thermique sur l'agrégation des protéines en induisant la formation des liaisons intermoléculaires (Rodrigues *et al.*, 2015). À 274 nm, le traitement thermique de 25 à 50 °C a entraîné un décalage de 5 nm vers le rouge. L'augmentation de la température de 50 à 70 °C a entraîné un décalage de 5,5 nm vers le bleu, suivi d'un décalage de 3 et 2,5 nm vers le rouge entre 70 - 80 °C et 90 - 100 °C respectivement (**Figure 33c**). Par conséquent, la variation de la température et les longueurs d'onde d'excitation ont affecté la structure conformationnelle de l'isolat de protéine de Bambara de manière non dénaturante.

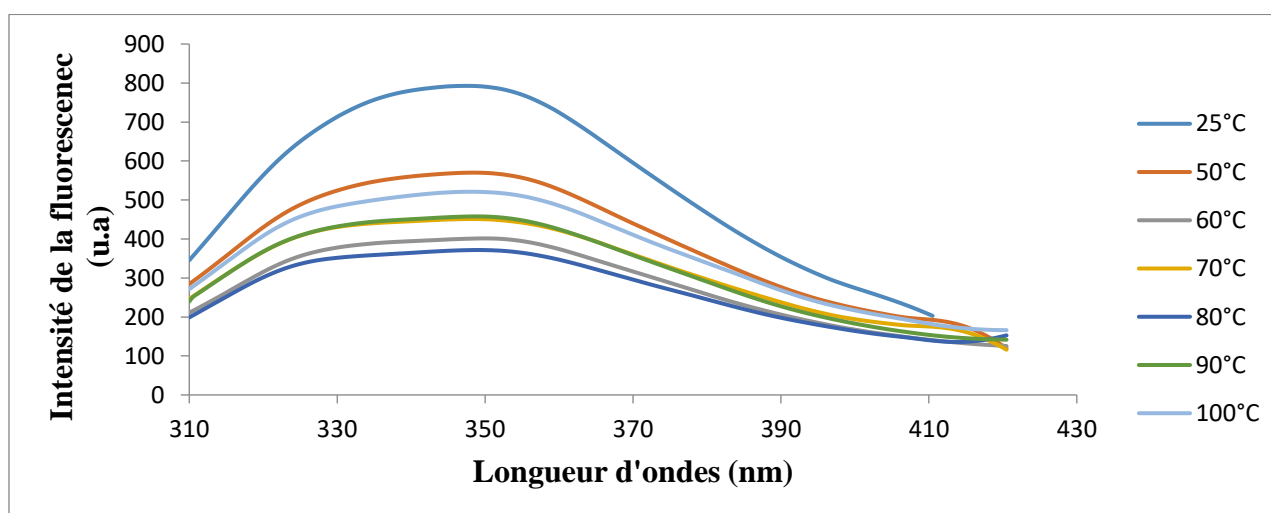
a)



b)



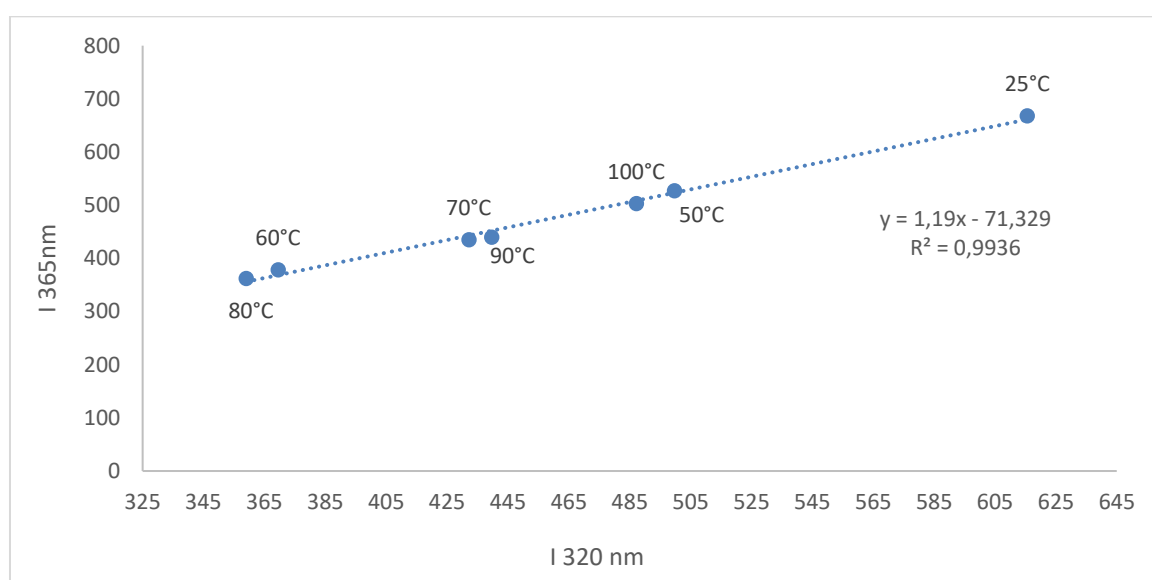
c)



**Figure 33 :** Changements structuraux induits après le traitement thermique à pH 4 sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm. Lors de l'excitation à 274 nm (a) ; 280 nm (b) et 295 nm (c).

### ➤ Diagramme de phase

Cette méthode utilise la construction d'un diagramme en traçant  $I_{\lambda_1}$  par rapport à  $I_{\lambda_2}$  (où  $I_1$  et  $I_2$  sont les valeurs d'intensités spectrales mesurées aux longueurs d'onde 320 nm et 365 nm), afin de décrire la voie de déploiement des protéines en détectant les espèces partiellement repliées et les intermédiaires cachés (Kuznetzova *et al.*, 2004). Le diagramme de phase sur l'influence des traitements thermiques de l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge à pH 4 a révélé une allure linéaire ( $R^2 = 0,99$  ;  $p < 0,00$ ) indiquant la présence de 2 conformations dans la protéine à 25 °C et entre 60 - 100 °C (**Figure 34**). Aprodu *et al.* (2017) ont rapporté également une allure linéaire après traitement thermique sur le complexe formé entre la beta caroténoïde de l'argousier et la  $\beta$ -lactoglobuline bovine. Cette relation linéaire obtenue, suggère une transition entre deux conformations dans la viciline du pois Bambara induite par un traitement thermique à 25 °C et entre 60 -100 °C. À ce pH, la charge nette de la protéine est d'environ 0 (Adebowale *et al.*, 2011) de plus, la force attractive ou répulsive intermoléculaire n'est probablement pas significative. Par conséquent, le traitement thermique a probablement entraîné la dissociation des trimères de la viciline en monomères ensuite, la dénaturation de protéines de pois Bambara avec l'augmentation de la température entre 60 - 100 °C. La **Figure 34** met en évidence le diagramme de phase changements structuraux induits par traitement thermique à pH 4 de l'isolat protéique de pois Bambara.



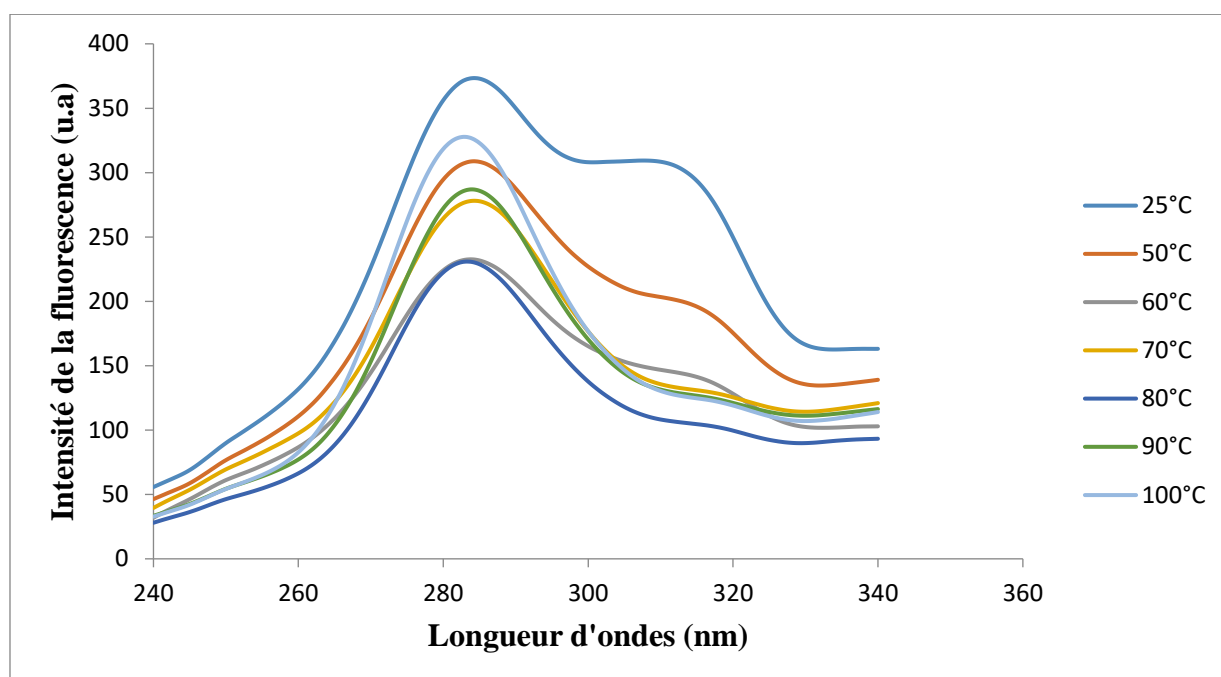
**Figure 34** : Analyse du diagramme de phase des changements structuraux induits par le traitement thermique à pH 4.



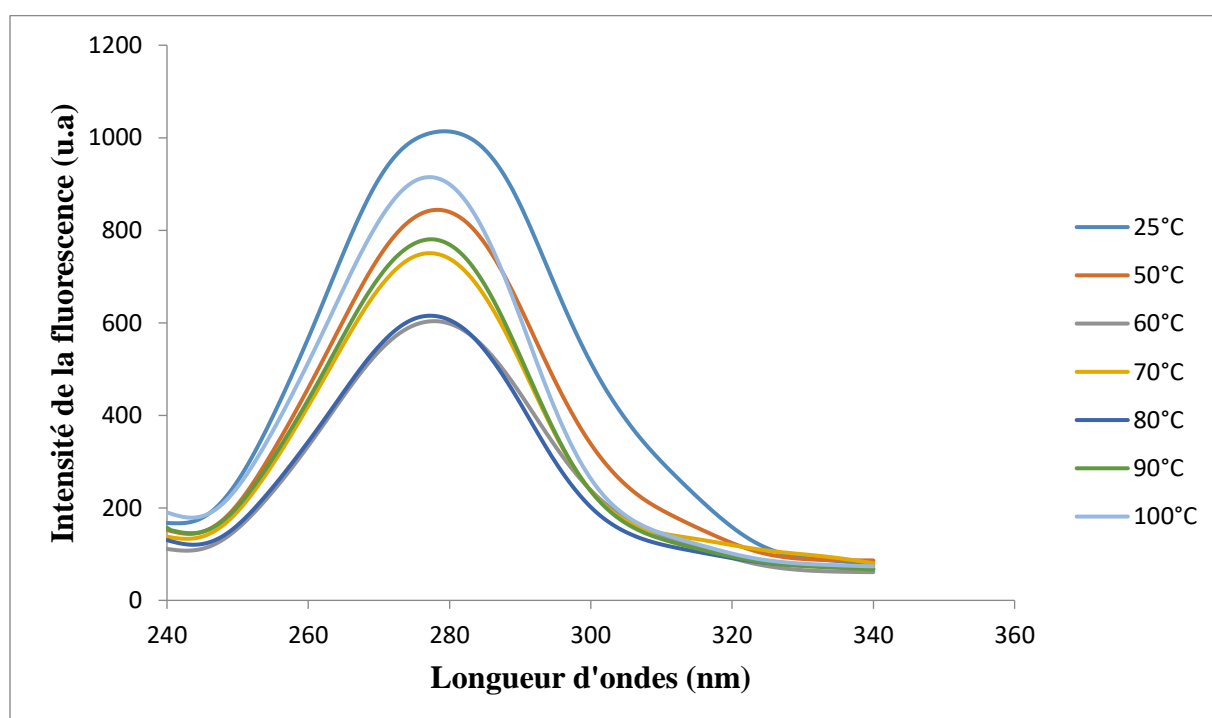
### ➤ Fluorescence par excitation synchrone

Afin d'étudier l'influence des traitements thermiques sur la nature du microenvironnement au voisinage des groupes fluorophores. Des spectres synchrones de l'isolat protéique ont été réalisés. Les résultats des changements structuraux observés via la fluorescence par excitation synchrone de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 4 sont présentés sur les **Figures 35a et b**. Les données brutes qui ont permis le tracé de ces figures sont en **Annexe 4**. L'observation des spectres synchrones montre un maximum à la température de 70 °C. Le traitement thermique entre 25 - 60 °C et 70 - 80 °C a provoqué un décalage de 0,5 et 1 nm vers le bleu respectivement. L'augmentation du traitement thermique entre 80 - 90 °C et 90 - 100 °C a entraîné un décalage de 0.5 nm vers le rouge et le bleu, respectivement en ce qui concerne les résidus de Tyr. De même pour les résidus du Trp, le traitement thermique entre 25 - 50 °C puis de 70 - 80 °C a provoqué des décalages de 0.5 et 1 nm vers le bleu respectivement. Ensuite, l'augmentation de la température de 80 - 90 °C et de 90 - 100 °C a entraîné un décalage de 0.5 nm vers le rouge et le bleu respectivement. Ces observations sont en droit ligne avec celle obtenu par Aprodu et *al.* (2017) avec le complexe formé entre la beta caroténoïde et  $\beta$ -lactoglobuline bovine. Cela montre que, les traitements thermiques appliqués ont induit un enfouissement des résidus de Trp et de Tyr en raison de l'interface entre la protéine et le milieu hydrophobe. Par conséquent, on peut conclure que les traitements thermiques ont induit des changements conformationnels qui ont conduit à l'enfouissement des résidus Tyr et Trp à des températures plus basses, et à leur exposition partielle à des températures plus élevées.

a)

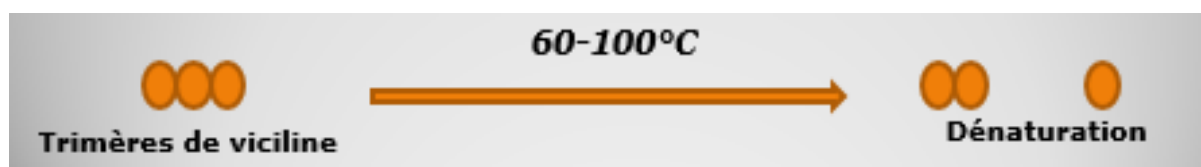


b)



**Figure 35 :** Spectres synchrones de l'isolat protéique de pois Bambara à  $\Delta\lambda$  15 nm (a) et à  $\Delta\lambda$  60 nm (b) après traitement thermique à pH 4.

Le modèle moléculaire de dénaturation est la résultante des différentes informations observées par l'analyse de la fluorescence des changements structuraux induits par les traitements thermiques aux différents pH, en particulier des informations obtenues sur le diagramme de phase. Au regard de l'ensemble des changements structuraux induits par les traitements thermiques à pH 4 observés par le biais de la fluorescence en particulier du diagramme de phase, indiquant la présence de deux conformations. De plus, à pH 4, la charge nette de la protéine est d'environ 0 (Adelowale *et al.*, 2011 ; Mune Mune *et al.*, 2018), avec une force attractive ou répulsive intermoléculaire n'étant probablement pas significative. Par conséquent, le traitement thermique a probablement entraîné la dénaturation des trimères de la viciline.



**Figure 36 :** Modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline à pH 4.

### III.5.2.2. Changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 7.

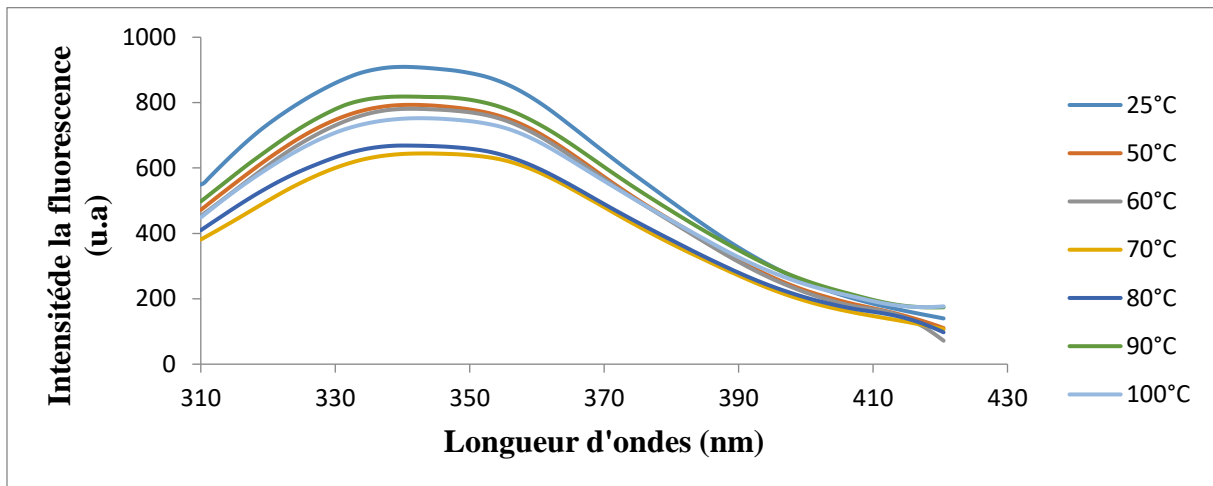
Les traitements thermiques (25, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 °C) sur l'isolat protéique (suspendu dans un tampon phosphate 0,01 M) à pH 7 pendant 10 minutes ont induit des modifications dans la structure des protéines. Ces différentes modifications structurales sur la structure de l'isolat protéique de pois Bambara à pH 7 ont été évaluées par fluorescence intrinsèque, diagramme de phase et fluorescence par excitation synchrone.

#### ➤ Fluorescence intrinsèque :

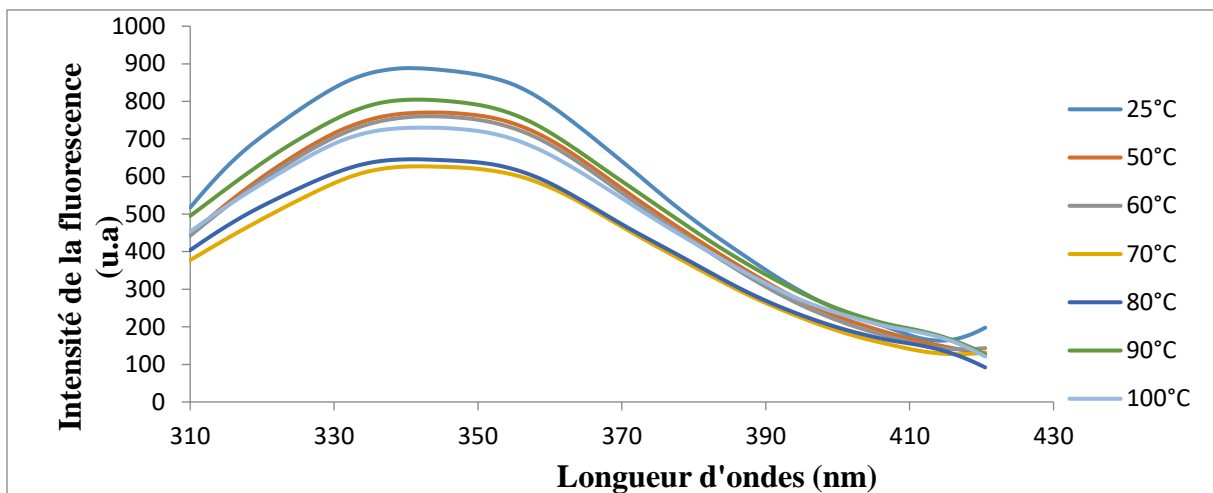
La mesure de la fluorescence est une approche utile pour mieux cerner certaines interactions entre la protéine et son environnement, car le fluorophore est sensible à la polarité du milieu qui l'entoure (Aprodu *et al.*, 2017). En général, la fluorescence intrinsèque des protéines contenant les résidus de Trp et de Tyr. Elle dépend fortement de l'environnement et de la phyto physique de ces résidus, en particulier du Trp. **Les Figures 37a, b et c** dont les données brutes ayant permis le tracé de ces figures sont en **Annexe 2**, montrent les changements structuraux induits après les traitements thermiques à pH 7 suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm à différents longueurs d'onde d'excitations. Les traitements thermiques à pH 7

ont provoqué des changements structuraux sur l'isolat protéique de pois Bambara, tels que le démontre la variation de  $\lambda_{\text{max}}$  et l'intensité de la fluorescence. Lorsque le pH a été porté à 7 à 295 nm, un décalage de 2,5 nm vers le rouge a été noté pour un traitement thermique entre 25 - 60 °C, lequel s'est poursuivi avec l'augmentation de la température entre 50 - 60 °C par un décalage de 0,5 nm vers le rouge puis est resté constant jusqu'à 100 °C (**Figure 37a**). À 280 nm, le traitement thermique entre 25 - 50 °C et 60 - 70 °C a provoqué un décalage de 1,5 et 3,5 nm vers le rouge respectivement, puis l'augmentation de la température entre 80 °C - 90 °C a induit un décalage de 3,5 nm vers le bleu et enfin un décalage de 1,5 nm vers le rouge a été noté entre 90 - 100 °C (**Figure 37b**). Les décalages vers le bleu ou le rouge de  $\lambda_{\text{max}}$  pourraient être expliqués par l'effet du traitement thermique sur l'agrégation des protéines en induisant la formation des liaisons intermoléculaires ou la rupture des différentes liaisons exposant de ce fait la protéine à son environnement hydrophile (Rodrigues *et al.*, 2015). Un changement de la longueur d'onde d'excitation à 274 nm a provoqué un changement comparable à celui observé à 280 nm (**Figure 37c**). Gasyimov *et al.* (2000) ont noté que les acides aminés à forte mobilité sont plus exposés à l'environnement polaire, induisant un pic d'émission décalé vers le rouge, tandis que ceux qui sont enterrés et entourés par un environnement apolaire génèrent des pics qui sont décalés vers le bleu.

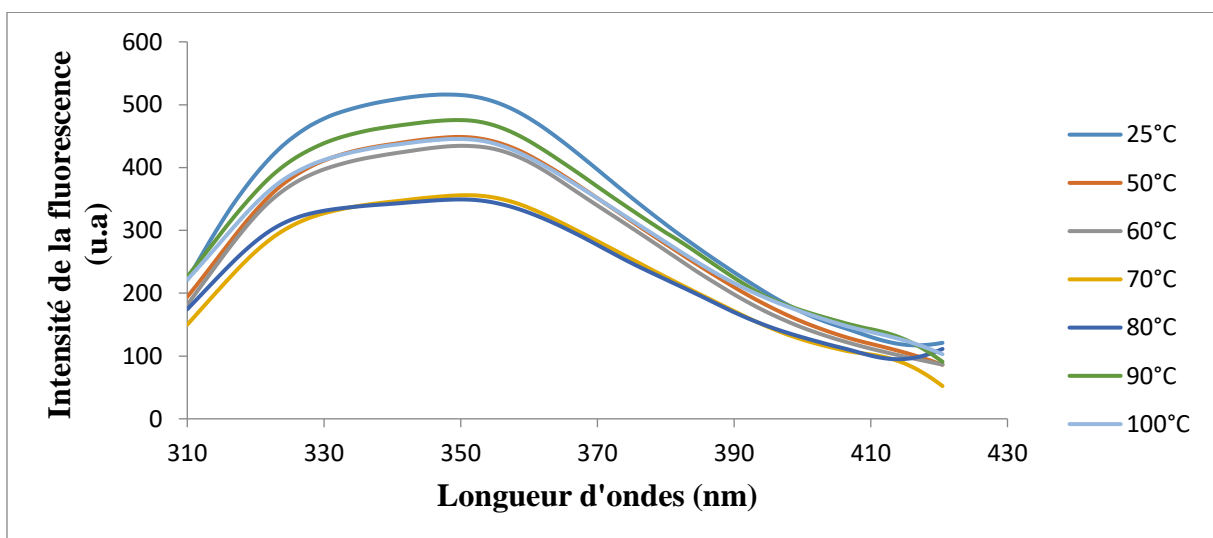
a)



b)



c)

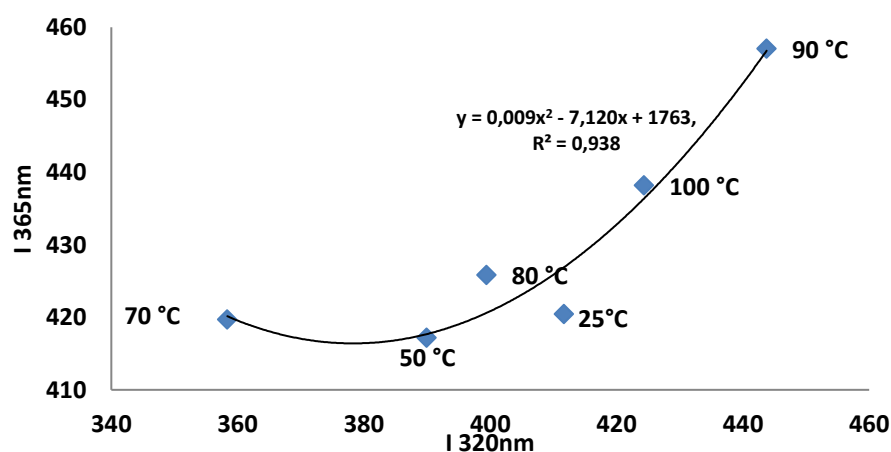


**Figure 37 :** Changements structuraux induits après traitement thermique à pH 7 sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm. Lors de l'excitation à 274 nm (a) ; 280 nm (b) et 295 nm (c).

### ➤ Diagramme de phase

Le diagramme de phase a été utilisé avec succès pour décrire le dépliement / repliement des protéines de la bêta-lactalbumine et pour détecter les espèces partiellement repliées et les intermédiaires cachés (Stantiuc *et al.*, 2012). Le diagramme implique une allure linéaire ou non. Le tracé linéaire implique une transition totale ou partielle entre deux conformations, tandis qu'un tracé non linéaire reflète le caractère séquentiel des transformations structurales, suggérant la présence de plusieurs conformations structurellement distinctes induites par le chauffage (Kataeva *et al.*, 2004).

Le diagramme de phase de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction des traitements thermiques à pH 7 met en évidence une allure parabolique signe de la présence de 3 conformations de la protéine entre 25 - 100 °C, deux transitions de conformation surviennent avec la formation d'un intermédiaire (**Figure 38**). Les trimères de la viciline ont probablement prédominé dans la solution et le traitement thermique entre 50 - 70 °C a probablement favorisé la dislocation des trimères en dimères intermédiaires, suivie de la dissociation des dimères en monomères entre 80 -100 °C. Ce résultat est en droite ligne avec celui d'Oancea *et al.*, 2017 sur le mécanisme de fixation des anthocyanes des peaux de cerises acides (*Prunus cerasus* L) aux  $\beta$  lactoglobulines de bovins.

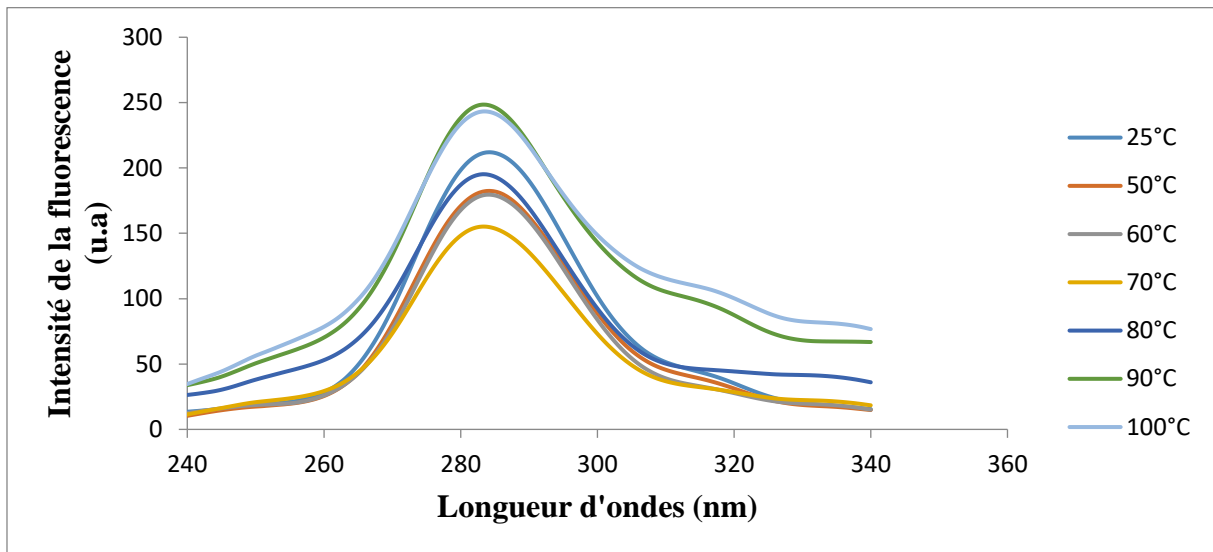


**Figure 38** : Analyse du diagramme de phase des changements structuraux induits après traitement thermique sur l'isolat protéique à pH 7.

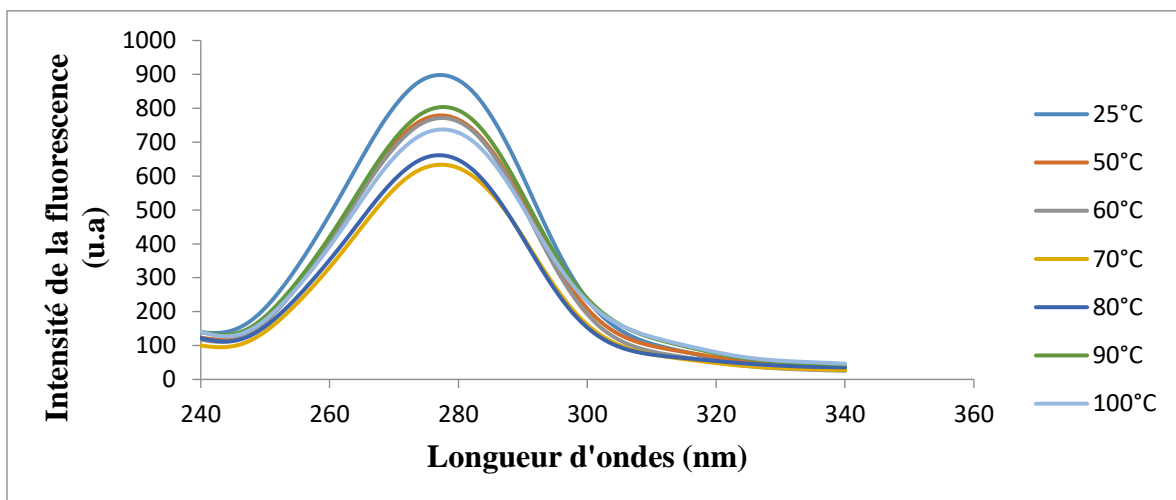
### ➤ Fluorescence par excitation synchrone

Cette technique consiste à balayer simultanément les monochromateurs d'excitation et d'émission tout en maintenant une différence de longueur d'onde fixe ( $\Delta\lambda$ ) entre eux. Les traits caractéristiques des résidus Tyr et Trp ont été obtenus après avoir fixé le  $\Delta\lambda$  à 15 nm et 60 nm, respectivement (Aprodu *et al.*, 2017). Les spectres synchrones des changements structuraux du pois Bambara induits après traitement thermique à pH 7 pour des  $\Delta\lambda$  de 15 et 60 nm sont présentés sur les **Figures 39a et b**, les données brutes qui ont permis le tracé de ces figures sont à l'**Annexe 4**. La fluorescence par excitation des spectres synchrones des résidus de Tyr a montré : un décalage de 0,5 nm vers le bleu de la  $\lambda_{\max}$  pour un traitement thermique compris entre 60 - 70 °C, lequel est resté constant malgré l'augmentation de la température jusqu'à 100 °C (**Figure 39a**). Tandis que pour le cas des résidus de Trp, un décalage de 0,5 nm vers le rouge a été noté pour un traitement thermique entre 25 – 50 °C. L'augmentation de la température a provoqué un décalage de 0.5 nm vers le bleu et le rouge entre 60 – 70 °C et 70 – 80 °C respectivement qui est resté constant par la suite (**Figure 39b**). Les différentes observations faites montrent que les traitements thermiques n'ont pas un impact considérable sur la structure de l'isolat protéique de pois Bambara.

a)



b)



**Figure 39** : Spectres synchrones de l'isolat protéique de pois Bambara à  $\Delta\lambda$  15 nm (a) et à  $\Delta\lambda$  60 nm (b) après traitement thermique à pH 7.

Au regard de ce qui précède sur les changements structuraux observés à pH 7. Particulièrement, l'allure parabolique observée dans le diagramme de phase, signe de la présence de 3 conformations de la protéine entre 25 - 100 °C. Le traitement thermique entre 50 - 70 °C a favorisé la dissociation des trimères de la viciline en dimères et monomères. L'augmentation de la température entre 80 - 100 °C a provoqué la dissociation du dimère précédemment formé en monomères par la suite. Le modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline proposé est celui-ci-dessous.





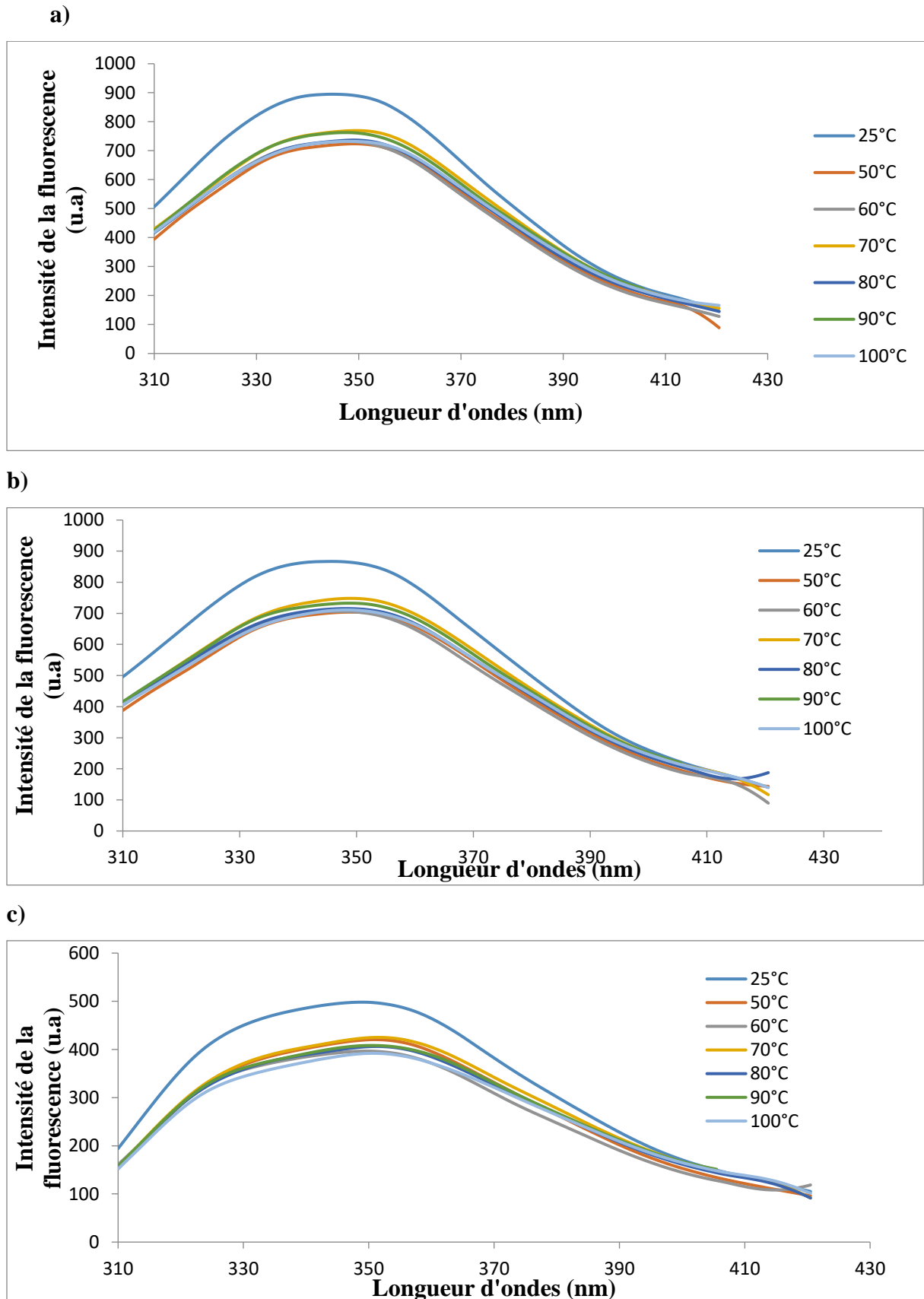
**Figure 40** : Modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline à pH 7.

### III.5.2.3. Changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction du traitement thermique à pH 9

Les traitements thermiques (25, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 °C) sur l'isolat protéique (suspendu dans un tampon phosphate 0,01 M) à pH 9 pendant 10 minutes ont induits des modifications dans la structure des protéines. Ces différentes modifications structurales sur la structure de l'isolat protéique de pois Bambara à pH 9 ont été évaluées par fluorescence intrinsèque, diagramme de phase et fluorescence par excitation synchrone.

#### ➤ Fluorescence intrinsèque

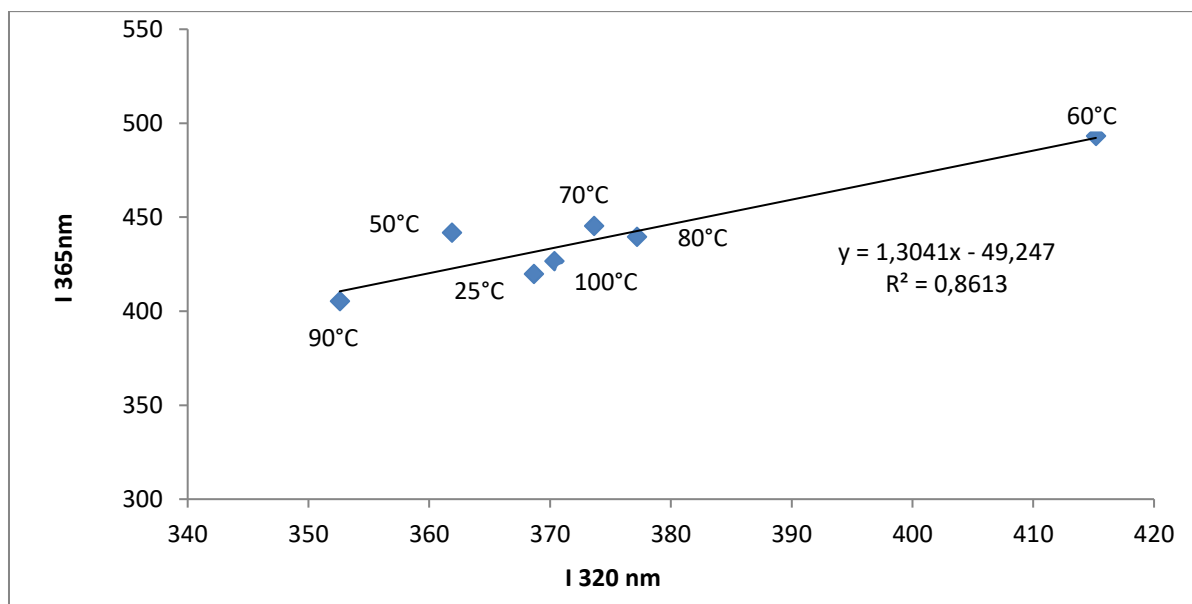
Les changements structuraux provoqués par le traitement thermique à pH 9 sur l'isolat protéique de pois Bambara, tels que le démontre la variation de  $\lambda_{max}$  et l'intensité de la fluorescence sont présentés aux **Figure 41a, b et c**. Les données brutes qui ont permis le tracé de ces figures sont en **Annexe 2**. Les traitements thermiques à la longueur d'onde de 295 nm, ont provoqué un décalage de 4 et 1 nm vers le rouge entre 25 - 50 °C et 60 - 80 °C respectivement. Tandis que, l'augmentation de la température entre 90 - 100 °C a provoqué un décalage de 1 nm vers le bleu (**Figure 41c**). À la longueur d'onde de 280 nm, le traitement thermique entre 25 - 50 °C a entraîné un décalage de 2 nm vers le rouge qui est resté stable jusqu'à 100 °C (**Figure 41b**). À 274 nm, le traitement thermique entre 25 - 50 °C a entraîné un décalage de 5,5 nm vers le rouge. L'augmentation de la température entre 60 - 70°C et 80 - 90 °C a provoqué un décalage de 5 nm et 2 nm vers le bleu respectivement. Tandis qu'un décalage de 2 nm a été noté durant le traitement thermique entre 70 - 80 °C et 90 - 100 °C. (**Figure 41a**). Ces différentes observations laisseraient penser à des modifications important sur la structure de l'isolat protéique de pois Bambara durant le traitement thermique au travers de l'alternance entre les décalages rouges et bleus. Les décalages vers le bleu et le rouge sont étroitement liés à la mobilité des acides aminés (Stanciuc *et al.*, 2015). Ainsi, les acides aminés à forte mobilité sont plus exposés à l'environnement polaire, induisant un pic d'émission décalé vers le rouge, tandis que ceux qui sont enterrés et entourés par un environnement apolaire génèrent des pics qui sont décalés vers le bleu (Gasymov *et al.*, 2000).



**Figure 41** : Changements structuraux induits après traitement thermique à pH 9 sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission de 310 à 420 nm. Lors de l'excitation à 274 nm (a) ; 280 nm (b) et 295 nm (c).

### Diagramme de phase

L'influence des traitements thermiques sur le diagramme de phase de l'isolat protéique à pH 9 montre une allure linéaire, indiquant la présence de 2 conformations de la protéine à 25 °C et entre 50 – 100 °C. L'augmentation de la température a probablement conduit à la dissociation de la viciline en monomères entre 50 – 100 °C puis au déploiement de monomères facilité par la répulsion intermoléculaire des résidus d'acides aminés des protéines. En effet l'isolat protéique de pois Bambara contient une proportion élevée d'acide glutamique et d'acide aspartique (Adebowale *et al.*, 2011) et est donc chargé négativement au pH 9, ce qui augmente la répulsion électrostatique intermoléculaire. Des observations similaires ont été faites pour des modifications structurales de l'alpha-lactalbumine induites par le traitement thermique (Stantiuc *et al.*, 2012).



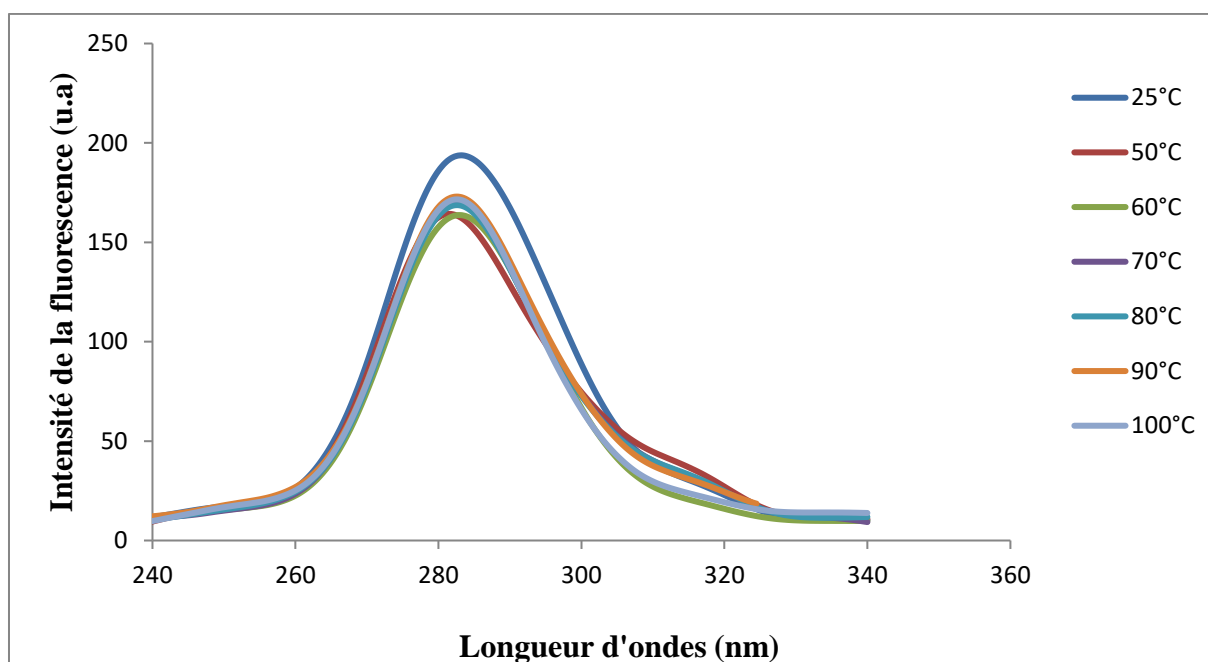
**Figure 42 :** Analyse du diagramme de phase des changements structuraux des protéines de pois Bambara après traitement thermique à pH 9.

#### ➤ Fluorescence par excitation synchrone

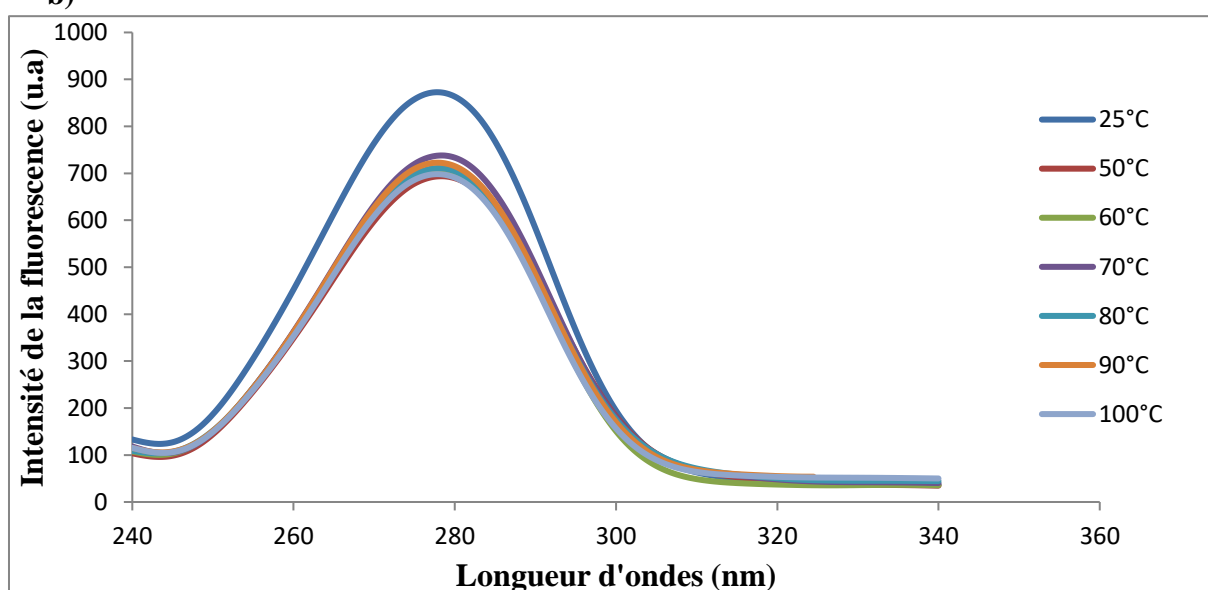
Afin d'étudier la nature du microenvironnement au voisinage des groupes fluorophores. Des spectres synchrones de l'effet des traitements thermiques sur l'isolat protéique du pois Bambara ont été réalisées. Les spectres synchrones des changements structuraux de l'isolat protéique de pois Bambara en fonction des traitements thermiques à pH 9 sont présentés aux **Figures 43a et b**, les données qui ont permis le tracé de ces figures sont en **Annexe 4**. La fluorescence des spectres synchrones de Tyr met en évidence un décalage de 2.5 nm vers le bleu entre 25 – 50 °C, ensuite un décalage de 1.5 nm vers le rouge entre 50 – 60 °C et enfin un

décalage vers le bleu de 0.5 nm a été noté entre 60 – 70 °C, qui s'est maintenu par la suite jusqu'à 100 °C (**Figure 43a**). Les décalages de la position de  $\lambda_{\text{max}}$  correspondent à des changements de polarités autour des molécules chromophores. L'augmentation de la température a causé des réarrangements dans les chaînes polypeptidiques de la protéine, les résidus de Tyr enfouis dans le noyau protéique ont induit des changements conformationnels provoquant de petits décalages bleu de l'ordre de 0.5 à 1.5 nm. Tandis que, le spectre synchrone des résidus Trp a gardé pratiquement la même position à 278 nm (**Figure 43b**). Par conséquent, aucun changement conformationnel n'a été associé aux résidus de Trp, tandis que les réarrangements locaux induits par les traitements thermiques dans les régions hydrophobes contenant de la Tyr ont été trouvés.

a)



b)



**Figure 43 :** Spectres synchrones de l'isolat protéique de pois Bambara à  $\Delta\lambda$  15 nm (a) et à  $\Delta\lambda$  60 nm (b) après traitement thermique à pH 9.

Le modèle moléculaire de dénaturation est la résultante des différentes informations observées par l'analyse de la fluorescence des changements structuraux induits par les traitements thermiques aux différents pH, en particulier des informations obtenues sur le diagramme de phase. Au regard de l'ensemble des observations faites particulièrement celle sur le diagramme de phase qui met en évidence la présence de deux conformations. L'isolat

protéique de pois Bambara contient une proportion élevée d'acide glutamique et d'acide aspartique et est donc chargé négativement à pH 9, ce qui augmente la répulsion électrostatique intermoléculaire (Adebowale *et al.*, 2011). À cet égard, le traitement thermique a probablement conduit à la dissociation de la viciline en monomères entre 50 – 100 °C puis au déploiement de monomères facilité par la répulsion intermoléculaire.



**Figure 44** : Modèle moléculaire de la dénaturation de la viciline à pH 9.

### III.5.3. Analyse *in silico* des changements structuraux de l'isolat protéique à différentes températures

#### III.5.3.1. Identification des protéines

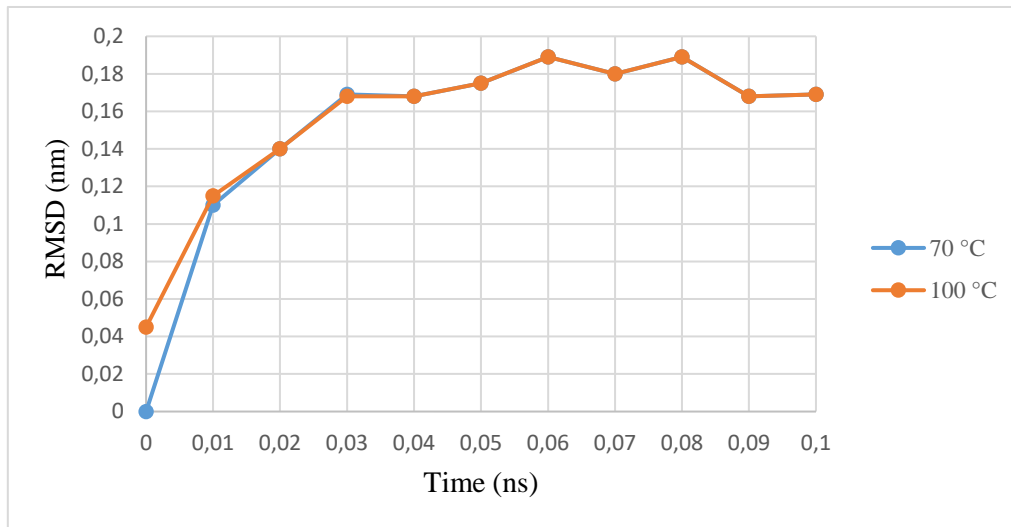
Les résultats de la SDS-PAGE ont démontré que la protéine majeure de l'isolat de pois Bambara est la viciline avec un poids moléculaire d'environ 50 kDa. La protéine de stockage des graines B (A5WYF9) et la 7S globuline-3 du haricot (A4PIA0) sont également les principales protéines que l'on trouve dans différentes espèces du genre *Vigna* avec des masses moléculaires d'environ 50 kDa, ayant des fonctions très importantes dans les cellules, dans le processus de croissance des graines et la liaison avec des ions métalliques respectivement. Quatre protéines ont été identifiées dans la base de données Uniprot qui présente des propriétés similaires avec cette viciline. Il s'agit de la viciline de *Vigna unguiculata* (VP), de la 7S globuline-3 de *Vigna angularis* (7SG3), de la 7S globuline-2 de *Vigna angularis* (7SG2), et de la protéine B de réserve des graines (STPB). Toutes ces protéines ont un poids moléculaire d'environ 50 kDa (**Annexe 5**). La 7SG3 ayant présenté des résultats *in silico* proches de ceux obtenus *in vitro* lors de l'étude sur l'effet de la haute pression sur la structure des protéines de pois Bambara (Mune Mune *et al.*, 2020), a été sélectionnée pour la suite de notre analyse. En outre, deux autres protéines, telles que l'albumine des graines de haricot mungo (Q43680), qui a des fonctions de liaison aux ions métalliques, et ARG10 (O64438, similaire à la protéine spécifique de la tige TSJT1-like), ont été identifiées dans l'UniprotKB comme ayant respectivement ~30 kDa et ~25,5 kDa. De plus, un large spectre de masses moléculaires entre 16 kDa et ~27 kDa a été associé à la déshydrine. Cette protéine est impliquée dans tout

processus qui entraîne un changement d'état ou d'activité de la cellule, lié à la sécrétion, à la production d'enzymes ou à l'expression de gènes (Lam *et al.*, 2018).

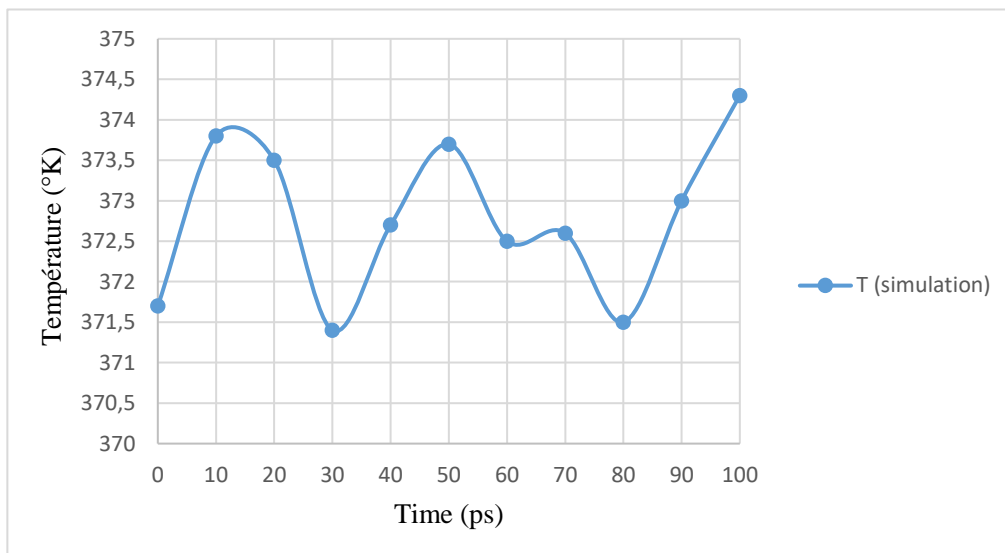
### III.5.3.2. Évaluation des modèles

L'évaluation des performances des différentes méthodes de prédiction est une étape très importante. Elle est procédée en comparant les modèles prédits aux structures 3D obtenues expérimentalement à température constante. Pour mesurer la similitude et la distance entre ces deux structures, on utilise comme critère, l'écart quadratique moyen ou la "déviation de la racine de la moyenne des carrés" (Root Mean Square Deviation ou RMSD) (Chothia et Lesk, 1986). Le RMSD consiste en générale à comparer les valeurs théoriques avec les valeurs observées dans le but de déterminer à quel point le modèle théorique représente bien la réalité (Chothia et Lesk, 1986). Il est important que durant une simulation, le RMSD doit être le même et compris entre +/- (3 – 5) Å, pour que le modèle soit valide. L'évaluation de la structure des protéines de pois Bambara cultivar rouge au terme de la simulation s'est opérée par le calcul du RMSD et de la variation de température. Les résultats de l'évaluation du RMSD (**Figure 45a**) et de la variation de la température (**Figures 45b**) ont conduit à l'évaluation du modèle de prédiction utilisée. Au regard de ce qui précède, la **Figure 45a** montre qu'il n'y a pas de changement notable du RMSD à 70 °C et 100 °C. La **Figure 45b** illustre la variation de la température au cours de la simulation. Il en ressort que la température ne varie pas de plus de 1,5 °K par rapport à celle fixée lors de la simulation. Sur la base de ce qui précède, nous pouvons dire que la simulation de l'effet de la température sur 7SG3 à 70 et 100 °C a été effectuée de manière convenable.

(a)



(b)



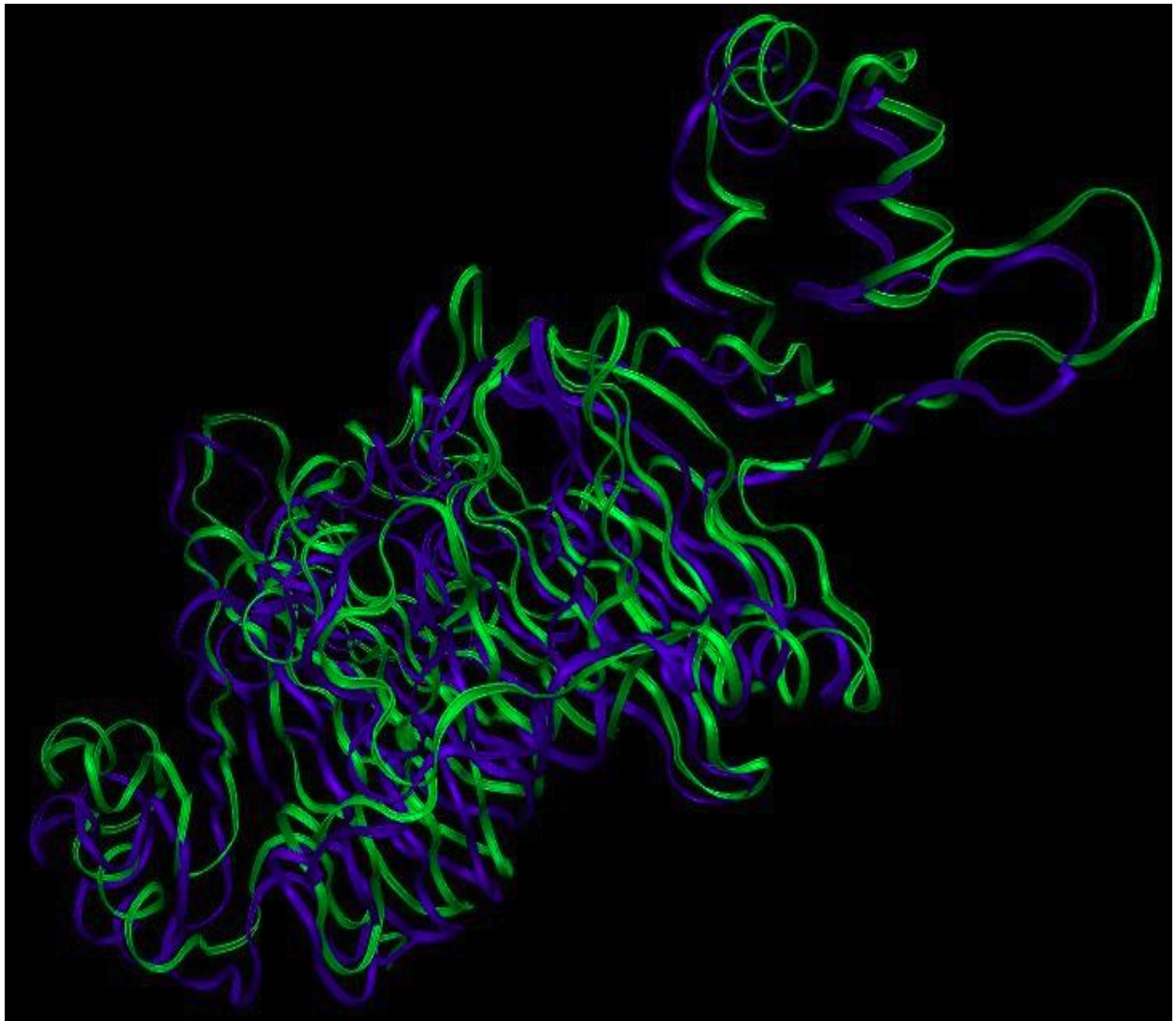
**Figure 45 :** Évaluation du RMSD (a) et de la température (b) au cours de la simulation de la structure de la protéine aux températures 70 °C et 100 °C à pH 7.

### III.5.3.3. Caractéristiques de la structure à 70 °C

Afin d'estimer la mesure dans laquelle la température a affecté la stabilité de chaque protéine étudiée au niveau de la molécule unique, le modèle traité à 70°C a été superposé au modèle de contrôle correspondant. La prédiction du comportement de la viciline de l'isolat du pois Bambara au niveau moléculaire a été évaluée à travers le comportement d'une protéine homologue, la 7SG3. La structure de la protéine traitée a été superposée avec celle traitée à 25



°C, et les résultats sont présentés sur la **Figure 46**. Ensuite, les caractéristiques moléculaires des structures à 25 et 70 °C sont présentées dans le **Tableau 9**.



**Figure 46** : Superposition des modèles moléculaires de 7SG3 à 25 °C (bleu) et 70 °C (vert).

La stabilité des deux modèles de protéines étudiées a varié en fonction du traitement appliqué. L'augmentation de la température de 25°C à 70°C a entraîné des changements moléculaires importants. Du point de vue global, le traitement thermique à 70 °C a provoqué un changement de la structure de la 7SG3 avec une tendance au dépliement, tel qu'observé sur la **Figure 46**. À partir des détails sur les changements de la protéine à 70 °C et des descripteurs de la structure secondaire présentés sur le **Tableau 9**. On note une diminution du nombre d'hélice dans la viciline par rapport à la molécule de contrôle, tandis que le nombre de coudes bêta a augmenté de manière significative. Cependant, le traitement thermique n'a provoqué aucun changement sur le nombre de feuillet bêta et d'épingles à cheveux. L'analyse des

descripteurs de la structure globale laisse penser à un dépliage de la molécule, probablement dû à l'exposition des résidus d'acides aminés polaires comme l'a montré l'augmentation de la surface accessible ainsi que le nombre de liaisons hydrogènes protéines - protéines par rapport à la molécule non traitée. (**Tableau 9**).

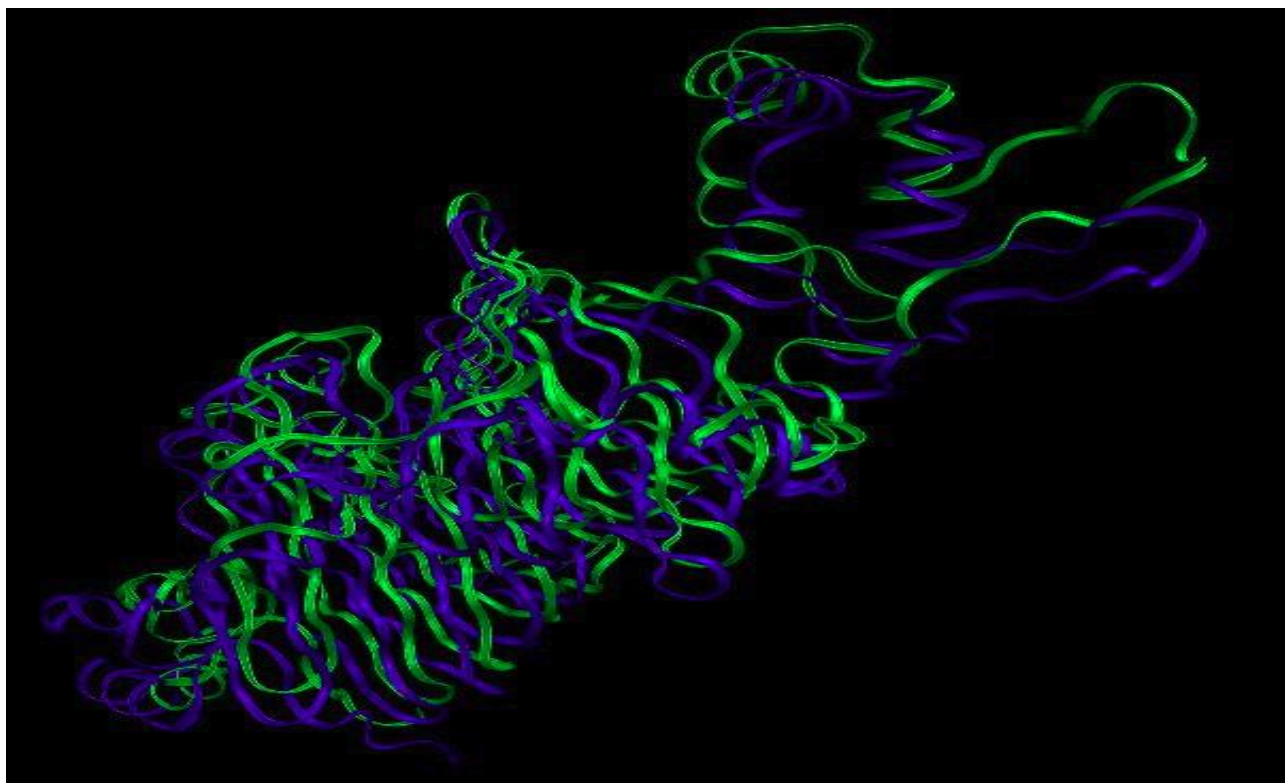
**Tableau 9 : Caractéristiques structurales de la viciline de pois Bambara à 25 °C, 70 °C et 100 °C**

Descripteurs de la structure secondaire/ globale	25 °C	70 °C	100 °C
Nombre d'hélices	12	8	9
Nombre de feuillets	4	4	4
Nombre de coudes bêta	35	46	35
Épingle à cheveux bêta	6	6	6
Interactions hélices – hélices	8	4	1
Surface accessible A <sup>3</sup>	20608	21034	21197
Liaisons H protéine-protéine	284	297	272
Volume nm <sup>3</sup>	87011	131408	97118

#### III.5.3.4. Caractéristiques de la structure à 100 °C

La structure de la protéine traitée à 100 °C a été superposée avec celle traitée à 25 °C, afin d'estimer la mesure dans laquelle la température de 100 °C a affecté la stabilité de la protéine étudiée et les résultats sont présentés sur la **Figure 47**. Les caractéristiques moléculaires des structures à 25 et 100 °C sont présentées dans le **Tableau 9**. Le traitement thermique à 100 °C a entraîné des modifications importantes sur la structure des protéines. Les descripteurs de la structure secondaire ont montré en particulier une diminution du nombre d'hélice alpha par rapport à la protéine non traitée. Le nombre des interactions hélices - hélices a diminué de manière significative alors qu'aucune variation du nombre d'épingles à cheveux, feuillet et de coudes bêta n'a été observée. Ces résultats indiquent d'importants réarrangements

de la protéine avec un pliage au niveau des feuillets bêta et un dépliage au niveau de l'hélice alpha dans la protéine. S'agissant des descripteurs de la molécule, on note une augmentation significative de la surface accessible de la protéine traitée à 100 °C par rapport à celle non traitée, ce qui laisserait penser à des réarrangements qui ont été suivis par l'exposition des résidus d'acides aminés hydrophobes précédemment enfouis dans le noyau de la molécule de protéine. Tandis que le volume global a légèrement augmenté par rapport à la protéine traitée à 25 °C.



**Figure 47 :** Superposition des modèles moléculaires de 7SG3 à 25 °C (bleu) et 100 °C (vert).

Au regard de ces différents résultats (**Tableau 9**), nous pensons à une possible dissociation des trimères de la viciline dans l'isolat protéique de pois Bambara cultivar rouge à 70 °C et à un repliement des monomères dissociés à 100 °C, comme observé par la diminution du volume de la protéine à 100 °C par rapport à 70 °C. Cette observation est contraire à celle notée par Mune Mune *et al.*, 2020 durant l'effet du traitement à haute pression sur l'isolat protéique de pois Bambara. Lequel, aurait plutôt induit une diminution du volume de la protéine (219.84 à 211.84 nm<sup>2</sup>). En outre, le volume cumulé de tous les atomes de la molécule, les cavités internes et la solvation des chaînes latérales des acides aminés et des liaisons peptidiques contribuent au volume de la protéine (Mozhaev *et al.*, 1996). Cette observation pourrait être importante car les modifications de la structure des protéines affectent leurs propriétés physico-chimiques, en vue de leur transformation dans des applications industrielles.

### III.5.4. Conclusion partielle

La troisième partie de ce travail avait pour objectif d'étudier les changements structuraux induits des protéines de pois Bambara par les traitements thermiques aux différents pH par la spectroscopie de fluorescence et par analyse *in silico*.

La SDS-PAGE a révélé la viciline, comme principale protéine de l'isolat protéique du pois Bambara, avec un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Outre cette dernière, des bandes mineures ont également été trouvées (Albumines). D'une part, les changements structuraux induits au travers de l'étude par fluorescence intrinsèque ont mis en évidence un décalage significatif vers le rouge lorsque le pH a augmenté de 7 à 9 tandis qu'un décalage vers le bleu a été constaté lorsque le pH a diminué de 7 à 4. Pour le diagramme de phase, le traitement thermique aux pH 4 et 9 a mis en évidence la présence de 2 conformations de la protéine. À pH 7, deux transitions de conformation se sont produites, avec formation d'un intermédiaire suivie d'une dissociation des sous-unités. L'influence des traitements thermiques à pH 4 via spectroscopie de fluorescence par excitation synchrone a mis en évidence des réarrangements structurels avec l'exposition des résidus de Trp et de Tyr. D'autre part, l'analyse *in silico* des changements structuraux de l'isolat protéique à 70 et 100 °C (pH 7) a entraîné une modification structurale importante de la viciline, comme l'a montrée la simulation de la structure protéique. Ces résultats pourraient permettre une meilleure exploitation de l'isolat protéique de pois Bambara grâce à la modélisation basée sur la connaissance de leurs propriétés fonctionnelles. En particulier, l'isolat protéique chauffé à pH neutre et alcalin pourrait trouver une application dans l'industrie alimentaire en tant qu'émulsifiant ou ingrédient moussant.



**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le présent travail de recherche consistait à étudier la dynamique moléculaire et fonctionnelle des protéines de pois Bambara en fonction des traitements thermiques.

Il ressort les conclusions ci-après :

- ✚ L'isolat protéique de pois Bambara possède une teneur en lipides importante, laquelle peut être utile pour des régimes hypolipidémies d'une part, et d'excellentes propriétés fonctionnelles lesquelles permettent de prédire son utilisation comme additifs dans la formulation de produits traditionnels et nouveaux.
- ✚ Les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique de pois Bambara sont affectées de différentes manières par les traitements thermiques et selon le pH. Ainsi, les isolats protéiques de pois Bambara chauffés peuvent servir comme ingrédients fonctionnels dans les produits laitiers, les industries des produits carnés et quelques produits de boulangeries (confiseries, desserts glacés, boissons...).
- ✚ L'analyse des changements structuraux de l'isolat protéique par spectroscopie de fluorescence et *in silico* a révélé d'importante modification dans la structure de la viciline.

Ainsi, les résultats de notre étude sont intéressants car, ils permettent d'une part mieux appréhender le comportement de la viciline de pois Bambara. Et d'optimiser sa formulation en vue de son application industrielle comme ingrédient fonctionnel.

## PERSPECTIVES

Pour affiner ce travail, nous espérons dans un futur proche,

- D'évaluer quelques propriétés biologiques des différents isolats protéiques chauffés aux pH 4, 7 et 9.
- D'effectuer une modification chimique puis évaluer les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de l'isolat protéique de pois Bambara chauffés aux pH 4, 7 et 9.
- D'effectuer une formulation de quelques produits nouveaux à base des isolats protéiques obtenus aux pH 4, 7 et 9.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abioye, V. Olanipekun, B. and Omotosho, O. (2015).** Effect of Varieties on the Proximate, Nutritional and Anti-nutritional Composition of Nine Variants of African Yam Bean Seeds (*Sphenostylis stenocarpa*). *Donnish Journal of Food Science and Technology*, **1** (2): 17 -21.

**Abu, O., J. Muller, K., Duodu, G., K. Minnaar, A. (2006).** Gamma irradiation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp) flours pastes: Effects on functional, thermal and molecular properties of isolated proteins. *Food Chemistry* **95** 138 -147.

**Achouri, A. & Zhang, W. (2001).** Effect of succinylation on the physico-chemical properties of soy protein hydrolysates. *Food Research International*, **31**, 617–623.

**Acton, J., C. (1983).** Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **18**, 99.

**Adebowale, Y. A, Schwarzenbolz, U. and Henle, T. (2011).** Protein Isolates from Bambara Groundnut (*Voandzeia subterranea* L.): Chemical Characterization and Functional Properties, *International Journal of Food Properties*, **14**: 4, 758-775, DOI: 10.1080/10942910903420743.

**Adegbola, O., B. J. and Bamishaiye, E. (2011).** Bambara groundnut: an Under-Utilized Nut in Africa. *Advances in Agricultural Biotechnology*, **1**: 60-72.

**Adeleke, O., R. Adiamo, O., Q. et Fawale, O., S. (2018).** Nutritional, physicochemical, and functional properties of protein concentrate and isolate of newly-developed Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L). Verdc) cultivars. *Food Science Nutrition*. **6**: 229–242. <https://doi.org/10.1002/fsn3.552>.-

**Adler-Nissen, J. (1986).** Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Applied Science Pub.*, New York.

**Ajibola, C., F. Fashakin, J., B. Fagbemi, T., N. and Aluko, R., E. (2011).** Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, **12** (10): 6685-6702.

**Alli, I. Gibbs, B., F., Okoniewska, M., K. Konishi, Y. and Dumas, F. (1993).** Identification and characterization of phaseolin polypeptides in a crystalline protein isolated from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41** (11): 1830-1834.

**Aluko, R., E. and McIntosh, T. (2001).** Polypeptide profile and functional properties of defatted meals and protein isolates of canola seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81** (4) 391-396.

**Aluko, R., E. et Yada, R., Y. (1995).** Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, **53**, 259-265.

**Amarteifio J., O., Tibe, O. Njogu, R., M. (2006).** The mineral composition of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L) Verdc) grown in Southern Africa. *African Journal of Biotechnology* **5** : 2408-2411.

**Amonsou, E. O. 2010.** Characterization of Marama bean protein. PhD Thesis (Unpublished). University of Pretoria pp111.

**Amonsou, E., O. Taylor, J. Beukes, M. and Minnaar, A. (2012).** Composition of Marama bean protein. *Food Chemistry*, **130** (3): 638-643.

**Anhwange, B., A. and Atoo, G., H. (2015).** Proximate Composition of Indigenous Bambara nuts (*Vigna subterranea* (L.) Verdc). *SCSR Journal of Pure and Applied Science*. **2** (1), 11 – 16.

**Anshul, T. Monika, S. Sandeep, S. Pant, A., B. Prachi, S. (2014).** In *silico* Characterization of Retinal S-antigen and Retinol Binding Protein-3: Target against Eales' Disease. *International Journal of Bio automation*; **18**: 287-296.

**AOAC. (1990).** Official methods of analysis (15th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, USA.

**Aprodu, I. Ursache, F., M. Turturică, M. Râpeanu, G. & Stănciuc, N. (2017).** Thermal stability of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) and bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **173**, 562-571.

**Arise, A., K. Amonsou, E., O. and Ijabadeniyi, O., A. (2015).** Influence of extraction methods on functional properties of protein concentrates prepared from South African Bambara groundnut landraces. *International Journal of Food Science and Technology*, **50**: 1095-1101.

**Arise, A., K. (2016).** *Composition and functional bioactive properties of Bambara groundnut protein and hydrolysates*. degree of Doctor of Philosophy (Food Science and Technology) in the Department of Biotechnology and Food Technology, Faculty of Applied Sciences at the Durban University of Technology, Durban, South Africa.

**Arise, A., K. Alashi, A., M. Nwachukwu, I., D. Ijabadeniyi, O., A. Aluko, R., E. & Amonsou, E., O. (2016).** Antioxidant activities of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions. *Food & Function*, **7**(5), 2431-2437.

**Arise, A., K. Nwachukwu, I., D. Aluko, R., E. & Amonsou, E., O. (2017).** Structure, composition and functional properties of storage proteins extracted from Bambara groundnut (*Vigna*



*subterranea*) landraces. *International Journal of Food Science and Technology*, **52**(5), 1211–1220. <http://doi.org/10.1111/ijfs.13386>.

**Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. (2006).** The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. **22**(2): 195201.

**Baker, D. et Sali, A. (2001).** Protein structure prediction and structural genomics. *Science*. **294**(5540): 93-6.

**Barać, M. and Stanojević, S. (2005).** The effect of microwave roasting on soybean protein composition and components with trypsin inhibitor activity. *Acta Alimentaria*, 34 (1): 23-31.

**Barac, M., B. Pesic, M. B., Stanojevic, S., P. Kostic, A., Z. and Bivolarevic, V. (2015).** Comparative study of the functional properties of three legume seed isolates: adzuki, pea and soybean. *Journal of Food Science and Technology*, **52** (5): 2779-2787.

**Barba, F., J. Esteve, M., J. & Frígola, A. (2012).** High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11**(3), 307-322.

**Bello, A. B., et Okezie, B. O. (1989).** Effect of extraction conditions on the extractability of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) proteins. *Journal of Food Science*, **54**, 1656–1657.

**Benjakul, S., Visessanguan, W. and Thummaratwasik, P. (2000).** Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. *Journal of Food Biochemistry*, **24** (2): 107-127.

**Biasini, M. Bienert, S. Waterhouse, A. Arnold, K. Studer, G. Schmidt, T. et al. (2014).** SWISSMODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*. 42(W1): W252-W8.

**Bonny, B., S. Dagou, S., E. K. A. Ajoumani, K., Koffi, K., G. Kouonon, L., C. Sie, R., S. (2019).** Evaluation of the diversity in qualitative traits of Bambara groundnut germplasm (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) of Côte d’Ivoire. *African Journal Biotechnology*, 8, 23–36.

**Borget, M. (1989).** Les Légumineuses Vivrières Tropicales. Maison Neuve et Larose et ACCT, Paris.

**Boateng, M., A. Addo, J., K. Okyere, H., Adu-Dapaah, H., Berchie, J., N. Tetteh, A. (2013).** Physicochemical and functional properties of proteinates of two Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces. *African Journal of Food Science and Technology*. **4** (4): 64-70.

- Bouhallab, S. Henry, G. et Boschetti, E. (1996).** Separation of small cationic bioactive peptides by strong ion exchange chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 724, 137-145.
- Boye, J. Aksay, S. Roufik, S. Ribéreau, S. Mondor, M. Farnworth, E. and Rajamohamed, S. (2010).** Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43 (2): 537-546.
- Boye, J. Zare, F. and Pletch. A. (2010).** Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International* 43 (2) :414–31. Doi: 10.1016/j.foodres. 2009.09.003.
- Brough, S. H., Azam-Ali, S. N., et Taylor, A. J. (1993).** The potential of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) in vegetable milk production and basic protein functionality systems. *Food Chemistry*, 47, 277-283.
- Broughton, W., J. (2003).** Roses by Other Names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology*. 185: 2975-79.
- Can Karaca, A. Low, N. Nickerson, M. (2011).** Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International* 44(9) :2742–2750.
- Capener, C. E., Shrivastava, I. H., Ranatunga, K. M., Forrest, L. R., Smith, G. R., Sansom, M. S. (2000).** Homology modeling and molecular dynamics simulation studies of an inward rectifier potassium channel. *Biophysical Journal*. 78(6):2929-42.
- Carvalho, A. V., Garcia, N. H., P., & Amaya-Farfan. J. (2006).** Physico-Chemical Properties of the Flour, Protein Concentrate, and Protein Isolate of the Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum) Seed. Sensory and Nutritive Qualities of Food. Vol. 71, Nr. 8, 2006— *Journal of Food Science*.
- Catsimpoolas, N., et Meyer, W. (1970).** Gelation phenomena of soy globulins. I. Protein-protein interaction. *Cereal Chemistry*, 47, 559-570.
- Cavasotto, C. N., Phatak, S. S. (2009).** Homology modeling in drug discovery: *current trends and applications*. Drug Discv Today. 14(13-14):676-83.
- Cerning, J., et Guilbot, J. (1973).** Change in carbohydrate composition during maturation of wheat and barley kernel. *Cereal Chemistry*, 50, 220-225.
- Chavan, U. D., McKensie, D. B., et Shahidi, F. (2001).** Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L). *Food Chemistry*, 74, 177-187.

**Cheftel, J.-C., Cheftel, H., et Besançon, P. (1976a).** *Introduction à la Biochimie et technologie des aliments*. Vol. 1. Paris : Technique et Documentation, pp. 1 - 381.

**Cheftel, J.-C., Cheftel, H., et Besançon, P. (1976b).** *Introduction à la Biochimie et technologie des aliments*. Vol. 2. Paris : Technique et Documentation, pp. 1 - 420.

**Cheftel, J., -C., Cuq, J. L. And Lorient, D. (1985).** *Protéines alimentaires. Biochimie-propriétés fonctionnelles- valeur nutritionnelle- modifications chimiques. Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, France.

**Chel-Guero, L., Perez-Fores, V., Bentacur-Ancona, D., et Davila-Ortiz, G. (2002).** Functional properties of flours and protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 584–591.

**Chelh I, G., P. and Sante-L, H., V. (2006).** Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*. **74**: 681-683.

**Chen, C. P., Kernytsky, A., and Rost. B. (2002).** Transmembrane helix predictions revisited. *Protein Science*, **11**: 2774–2791.

**Chew, P. G., Casey, A. J., et Johnson, S. K. (2003).** Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. *Food Chemistry*, **83**, 575-583.

**Chinedu, S. N. and Nwinyi, C. O. (2012).** Proximate analysis of *Sphenostylis stenocarpa* and *Voandzeia subterranean* consumed in South Eastern Nigeria. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4 (3): 57-62.

**Chothia, C. and Lesk, A., M. (1986).** The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *The EMBO Journal*. **5**(4): 823-6.

**Clark, T. (1985).** A handbook of computational chemistry: A practical guide to chemical structure and energy calculations: *Wiley-Interscience*.

**Clemente, A. (2000).** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, **11**, 254-262.

**Cooper, A. (2000).** Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophysical Chemistry* **85**: 25–39.

**Cui, C. Zhou, X. Zhao, M. & Yang, B. (2009).** Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10 (1) : 37–41.

**Cuq, J., L. (1991).** *Technologie de protéines végétales*. Université de Montpellier II- Institut des sciences de l'ingénieur, pp. 1-50. Dégâts, pertes et moyens de stockage. Ed. *Maisonneuve et Larose Paris*, pp :

- Dahiya, P. Linnemann, A. Nout, M. van Boekel, M. and Grewal, R. (2013).** Nutrient composition of selected newly bred and established mung bean varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 54 (1): 249-256.
- Dalziel, J., M. (1937).** The Useful Plants of West Africa, Crown Agents, London, UK.
- Day, L. (2013).** Proteins from land plants - potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>.
- De la Caba, K. Pena, C. Ciannamea, E. Stefani, P. Mondragon, I. and Ruseckaite, R. (2012).** Characterization of soybean protein concentrat, stearic acid/palmitic acid blend edible films. *Journal of Applied Polymer Science*, 124 (3): 1796-1807.
- Diallo K., S. Koné, K. Youssouf, S., Doudjo. Assidjo, N., E. Yao, K., B. Gnakri, D. (2015).** Caractérisation biochimique et fonctionnelle des graines de sept cultivars de voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. Fabaceae] cultivées en côte d'ivoire, *European Scientific Journal September 2015 édition vol.11, No.27 ISSN : 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431*.
- Diedericks, C., F. de Koning, L. Jideani, V., A. Venema, P. & van der Linden, E. (2019).** Extraction, gelation and microstructure of Bambara groundnut vicilins. *Food Hydrocolloids*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105226>.
- Diedericks, C. F., Shek, C., Jideani, V. A., Venema, P., & Van der Linden, E. (2020).** Physicochemical properties and gelling behavior of Bambara groundnut protein isolates and protein-enriched fractions. *Food Research International*, 138 (PB), 109773. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109773>.
- Doku, E., V. et Karikari, S., K. (1971).** Bambara groundnut. *Economic Botany*, 25(3), 225-262.
- Du Petit-Thouars, L., M. A. (1806).** *Genera nova Madagascariensis, Secundum Methodum Jussieuam Disposita* (p. 23). Paris: Farr, E. R., Leussink, J. A. et Stafleu, F. A.
- Eftink, M., R. & Shastry, M., C. (1997).** Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions. *Methods in enzymology* 278: 258–286.
- Elhardallou, S., B. Khalid, I., I. Gobouri, A., A. and Abdel-Hafez, S., H. (2015).** Amino Acid Composition of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Flour and Its Protein Isolates. *Food and Nutrition Sciences*, 6 (9): 790.
- Ellepolá, S., W. Choi, S., M. & Ma, C., Y. (2005).** Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier- transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(1–2), 12–20.

**Elsheik, E., A. E. Fadal, I. A. et El Tinay, A., H. (2000).** Effect of cooking on anti-nutritional factors and in vitro protein digestibility (IVPD) of Faba bean grown with different nutritional regimes. *Food Chemistry* **68**, 211-212.

**FAO / WHO (Food and Agriculture Organization and the World Health Organization) (1989).** Protein quality evaluation. Report of the Joint FAO / WHO Expert Consultation. Food and Nutrition Paper N°. 51, Rome (Italy).

**FAO / WHO (Food and Agriculture Organization and the World Health Organization) (2007).** Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a Joint WHO / FAO / UNU Expert. Technical Report Series 935. Cholé – Doc N° 111.

**FAO (2008).** Soaring food prices facts, perspectives, impacts and actions required. Background paper prepared for the high level conference on World Food Security: the challenges of climate change and bioenergy, Rome June 3-5.

**FAO (2013).** Agricultural Statistics Database. Rome: World Agricultural. Information Center. Available online: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx> (accessed on 10 February 2013).

**FAOSTAT (2020).** [www.fao.org/faostat/fr/](http://www.fao.org/faostat/fr/) Consulté le 10 Decembre 2022.

**Farrell, Jr., H. M. Wickham, E., D. Unruh, J., J. Qi, P., X. & Hoagland, P., D. (2001).** Secondary structural studies of bovine caseins: Temperature dependence of  $\beta$ -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*, **15**, 341–354. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00080-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00080-7).

**Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. & Varidi, M.J. (2015).** Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 3165–3176.

**Friedman M (1996).** Nutritional value of proteins from different food source. *A review. Journal Agricultural. Chemistry*, **44**, 6-29.

**Gasymov, O., K. Abduragimov, A., R. Yusifov, T., N. Glasgow, B., J. (2000).** Resolution of ligand positions by site-directed tryptophan fluorescence in tear lipocalin, *Protein Science*. **9(2)**, 325–331.

**Gessendorfer B., Koehler P., Wieser H. (2009).** Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395 (6)**, 1721–1728.

**Giri, P. and Pal, C. (2014).** An Overview on the Thermodynamic Techniques used in Food Chemistry. *Modern Chemistry Application 2*: 142. doi:10.4172/23296798.1000142.

**Glew, R. H., Vanderjagt, D. J., Lockett, C., Grivetti, L. E., Smith, G. C., Pastuszyn, A., et Millson, M. (1997).** Amino Acid, Fatty Acid, and Mineral composition of 24 Indigenous Plants of Burkina Faso. *Journal of Food Composition and Analysis*, **10**, 205-217.

**Goering, H. K., et Van Soest, P. J. (1970).** Forage fiber analysis (apparatus, procedures, and some applications). Agriculture handbook, agricultural research service, USA.

**Goli, A. E. (1995).** Bambara groundnut. In Heller, J., Begemann, et Mushonga (Eds), Proceedings of the workshop on conservation and improvement of Bambara groundnut (pp. 1-142). Harare: *International Plant Genetic Resources Institute*.

**Goli, A., Begemann, F. and Ng, N. (1997).** Characterization and evaluation of IITA's Bambara groundnut collection. In: Proceedings of Proceedings of the workshop on conservation and improvement of Bambara groundnut. 101-11.

**Goormaghtigh, E., V. Raussens, and J.-M. Ruyschaert. (1999).** Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1422: p. 105-185.

**Graf, E. (1986).** *Phytic acid: chemistry and applications*. Pilatus press (USA), 343 p.

**Greer, J. (1990).** Comparative modelling methods: application to the family of the mammalian serine proteases. *Proteins*, **7** :317–334.

**Guégen, J. et Lemarié, J. (1996).** Composition, structure et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In : Godon, B. (ed), *Protéines végétales*, Paris : Lavoisier Tech Doc, 80-119.

**Gueguen, J. et Azanza, J., L. (1983).** *Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines végétales*. In : *Protéines végétales 2<sup>ème</sup> édition*. Techniques et documentation- Lavoisier, Paris, (France). 666pp.

**Guex, N., Peitsch, M., C. Schwede, T. (2009).** Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: *A historical perspective*. *Electrophoresis*. 30(S1): S162-S73. 219.

**Gupta, M. Sarkar, K. Baral, R. and Laskar, S. (2010).** Some chemical investigations of *amoora rohitaka* seed proteins. *Food Chemistry*, **119**(5), 1057-1062.

**Hermansson, A. M. (1986).** Soy protein gelation. *Journal of the American Oil Chemist' Society*, **63**, 658 - 666.

**Hess, B. Kutzner, C. Van der Spoel, D. & Lindahl, E. (2008).** Gromacs 4: Algorithms

- for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4, 435–447.
- Hilbert, M. Bohm, G. Jaenicke, R. (1993).** Structural relationships of homologous proteins as a fundamental principle in homology modeling. *Proteins*. **17**(2):138-51.
- Hillocks, R., Bennett, C. and Mponda, O. (2012).** Bambara nut: A review of utilization, market potential and crop improvement. *African Crop Science Journal*, 20 (1): 1-16.
- Himeda Makhoulf (2012).** Propriétés physico-chimiques et rhéologiques de la farine et de l'amidon de taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) variété Sosso du Tchad en fonction de la maturité et du mode de séchage. Université de Lille, Thèse Unique, p. 245.
- Hojilla-Evangelista, M., P. Selling, G., W. Berhow, M., A. and Evangelista, R., L. (2014).** Preparation, composition and functional properties of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seed protein isolates. *Industrial Crops and Products*, **55**: 173-179.
- Holm, J., M. et Marloth, B., W. (1998).** The Bambara groundnut or njugo bean. Farming in South Africa, **15**, 195-198; 200.
- Horton, H., R. Moran, L., A. Ochs, R., S. Rawn, J., D. & Scrimgeour, K., J. (2000).** *Principes de biochimie*. Ed. De Boeck Université.
- Humphrey, W. Dalke, A. & Schulten, K. (1996).** Vmd - visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 33–38.
- Hurrell, R., F. Finot, P., A. et Cuq, J., L. (1982).** Protein's polyphenols reactions In: Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic and the lysine residues of casein. *British Journal Nutrition*. **47**: 191- 211.
- Hurrell, R., F. Lerman, P. et Carpenter, K., J. (1979).** Reactive lysine in foodstuffs as measured by a rapid dye- binding procedure. *Journal of Food Science*, **44**, 1221-1227, 1231.
- Ijarotimi, O., S. and Esho, T., R. (2009).** Comparison of nutritional composition and anti-nutritional status of fermented, germinated and roasted Bambara groundnut seeds (*Vigna subterranea*). *British Food Journal*, **111** (4): 376-386.
- Ijarotimi, O., S. Malomo, S., A. Fagbemi T., N. Osundahunsi, O., F. et Akuko R., E. (2018).** Structural and functional properties of *Buchholzia Coriacea* seed flour and protein concentrate at different pH and different concentrations, *Food Hydrocolloids* DOI: 10.1016/j.foodhydrd.2017.08.018 ,
- Jipara, P. Normah, H. Zamaliah, M., M. Asmah, R. et Mohamad, K. (2001).** Nutritional quality of germinated cowpea flour (*Vigna unguiculata*) and its application in home prepared powdered weaning foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, **56**, 203-216.

- Jyothirmayi, T., Prabhakara, P. G., et Walde, S. G. (2006).** Nitrogen extractability and functional properties of defatted *Erythrina variegata* flour. *Food Chemistry*, **96**(2), 242-247.
- Kangfu, Y. (2011).** Bacterial Artificial Chromosome Libraries of Pulse Crops: Characteristics and Applications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID: 493186, 8 pages.
- Kaptso, G., K. Njintang, N., Y. Hounhouigan, J., D. Scher, J. et Mbofung, C., M. F. (2007).** Production of Bambara Groundnut (*Voandzeia subterranean*) flour for use in the preparation of koki (a steamed cooked paste): effect of pH and salt concentration on the physicochemical properties of flour. *International Journal of Food Engineering*, **3**(3), 1-18.
- Kaptso, K., G. Njintang, Y., N. Nguemtchouin, M., M. G. Scher, J. Hounhouigan, J. & Mbofung, C., M. (2015).** Physicochemical and micro-structural properties of flours, starch and proteins from two varieties of legumes: Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *Journal of Food Science & Technology*, **52**(8), 4915–4924. <http://doi.org/10.1007/s13197-014-1580-7>.
- Karaca, A., C. Low, N. and Nickerson, M. (2011).** Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, **44** (9): 2991-2998.
- Kataeva, I., A. Uversky, V., N. Brewer, J., M. Schubot, F., Rose, J., P. Wang, B., C. Ljungdahl, L., G. (2004).** Interactions between Immunoglobulin-Like and Catalytic Modules in *Clostridium thermocellum* Cellulosomal Cellobiohydrolase CbhA. *Protein Engineering, Design and Selection*. **17**, 759–769.
- Kelly, S., M. & Price, N., C. (2000).** The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein & Peptide Science* **1** (4): 349–384.
- Kelly, S., M. Jess. T. J. and Price, N., C. (2005).** How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, (2): 119-139.
- Khan, M., M. H. Rafii, M. Y., Ramlee, S. I., Jusoh, M. Al-Mamun, M. (2021).** Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc): A Crop for the New Millennium, Its Genetic Diversity, and Improvements to Mitigate Future Food and Nutritional Challenges. *Sustainability*, **13**, 5530. <https://doi.org/10.3390/su13105530>.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2008).** The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. **37**(suppl\_1): D387-D92.
- Kinsella, J., E. (1976).** Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **7**, 219-280.



**Klepeis, J., L. Floudas, C., A. (2003).** ASTRO-FOLD: a combinatorial and global optimization framework for Ab initio prediction of three-dimensional structures of proteins from the amino acid sequence. *Biophysical Journal*. **85**(4): 2119-46.

**Kudre, T. G., Benjakul, S. and Kishimura, H. (2013).** Comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean, and Bambara groundnut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93** (10): 2429-2436.

**Kuntz, I., D. (1971).** Hydration of macromolecules. III. Hydration of polypeptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **93**, 514-515.

**Kuznetsova, I. Turoverov, K. Uversky, U. (2004).** Use of the phase diagram method to analyze the protein unfolding - refolding reaction: fishing out the invisible intermediates, *Journal Proteome Research*, 485- 494.

**Kwon, K., S. Bae, D. Park, K., H. et Rhee, K., C. (1996).** Aqueous extraction and membrane techniques improve coconut protein concentrate functionality. *Journal of Food Science*, **61**, 753–756.

**Laemmli, U., K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680.

**Lam, A., C. Y. Can Karaca, A. Tyler, R., T. & Nickerson, M., T. (2018).** Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, **34**(2), 126-147.

**Lam, R., S. H., and Nickerson, M., T. (2013).** Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry* **141** (2): 975–84. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.038.

**Laskowsk, R., A. Macarthur, M., W. Moss, D., S. Thornton, J., M. et Procheck (1993):** a program to check the stereo chemical quality of protein structures. *Journal Applied of Crystallography*. **26**: 283-291.

**Laskowski, R., A. (2009).** PDB sum new things. *Nucleic Acids Research*, **37**, D355–D359.

**Latif, S., Pfannstiel, J., Makkar, H. and Becker, K. (2013).** Amino acid composition, antinutrients and allergens in the peanut protein fraction obtained by an aqueous enzymatic process. *Food Chemistry*, **136** (1): 213-217.

**Lawal, O. S (2004).** Functionality of African locust bean (*Parkia Biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, **86**,345-355.

**Lawal, O. S., Adebawale, K. O., et Adebawale, Y. A. (2007).** Functional properties of native and chemical modified protein concentrated from Bambara groundnut. *Food Research International*, **40**, 1003 – 1011.

**Lesk, A., M. et Chothia, C. (1980).** How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globin. *Journal of Molecular Biology*. **136**(3): 225-70.

**Leung, W., T. W. Busson, F. et Jardin, C., (1968).** *Food composition table for use in Africa*. FAO, Rome, Italy. 306 pp.

**Lianzhou, J., Zhongjiang, W., Yang L., Xianghe M., Xiaonan, S., Baokun. Q. & Linyi Z. (2015).** Relationship Between Surface Hydrophobicity and Structure of Soy Protein Isolate Subjected to Different Ionic Strength, *International Journal of Food Properties*, **18** :5, 1059-1074, DOI: 10.1080/10942912.2013.865057.

**Lin, M., J. Y., Humbert, E., S., et Sosulki, F., W. (1974).** Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, **39**,368-370.

**Linnemann, A., R. (1990).** Cultivation of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) in Western Province, Zambia. Report of a Field Study. Tropical Crops Communication. No. 16. Wageningen Agricultural University.

**Liu, B. Peng, J., Zhang, S. Zou, B. and Zhong, G. (2013).** Chemical composition, in vitro starch digestibility and amino acid analysis of an underexplored kidney bean (*Phaseolus vulgaris*. L.) grown in Chongqing, China. *International Journal of Food Science & Technology*, **48** (3): 527-532.

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**, 265–275.

**Lqari, H. Vioque, J. Pedroche, J. Millan, F. (2002).** *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry* **76**: 349-356.

**MacKerell, A., D. Brooks, B. Brooks, C., L. Nilsson, L. Roux, B. Won, Y. and Karplus. C., M. (1998).** The energy function and its parameterization with an overview of the program. *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, **1**: 271–277.

**Maguire, L., S. O'sullivan, S., M. Galvin, K. O'connor, T., P. & O'brien, N., M. (2004).** Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **55**(3), 171–178.

- Mahmoud, M., I. (1994).** Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Journal. Food Sciences.* **59**, 89–95.
- Malomo, S. (2015).** Structure-function properties of hemp seed proteins and protein-derived acetylcholinesterase-inhibitory peptides. PhD Thesis. University of Manitoba (Canada).
- Malomo, S., A. He, R. and Aluko, R., E. (2014).** Structural and Functional Properties of Hemp Seed Protein Products. *Journal of Food Science*, **79** (8): C1512-C1521.
- Malomo, S. A., Onuh, J. O., Girgih, A. T. and Aluko, R. E. (2015).** Structural and Antihypertensive Properties of Enzymatic Hemp Seed Protein Hydrolysates. *Nutrients*, **7** (9): 7616-7632.
- Martí-Renom, M., A. Stuart, A., C. Fiser, A. Sánchez, R. Melo, F. et Šali. A. (2000).** Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* **29**(1): 291-325.
- Mathaus, B. (2002).** Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of agricultural and food Chemistry*, **50**, 3444 -3452.
- Mayes, S. Ho, W., K. Chai, H., H. Gao, X., Kundy, A., C. Mateva, K., I. Zahrulakmal, M., Hahiree, M., K. I. M., Kendabie, P., Licea, L., C. et al. (2019).** Bambara groundnut: An exemplar underutilized legume for resilience under climate change. *Planta*, **250**, 803–820.
- Mazahib, A. Nuha, M. Salawa, I. and Babiker, E. (2013).** Some nutritional attributes of Bambara groundnut as influenced by domestic processing. *International Food Research Journal*, **20** (3): 1165-1171.
- Mc Watters, K. H., Ouedraogo, J. B., Resurreccion, A. V. A., Hung, Y.-C., et Phillips, R. D. (2003).** Physical and sensory characteristics of sugar cookies containing mixtures of wheat, fonio (*Digitaria exilis*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) flours. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**, 403-410.
- McClements, D., J. 2004.** Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **9** (5) :305–13. Doi: 10.1016/j.cocis.2004. 09.003.
- McClements, D., J. 2007.** Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47** (7) :611–49. Doi: 10.1080/ 10408390701289292.
- Minka, S., R. and Bruneteau, M. (2000).** Partial chemical composition of Bambara pea *Vigna subterranean* (L) Verdc. *Food Chemistry.* **68** (3), 273-276.

- Mizubuti, I., Y., Biondo, O., Jr. Souza, L., W. O. Da Silva, R., S. S. F., et Ida, E., I. (2000).** Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry*, **70**(2), 259 – 265.
- Montreuil, J. Spik, G. et Tollier, M., T. (1981).** *Dosages colorimétriques des glucides*. In Deymié B., Multon, J.-L., et Simon, D. (Eds). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire, 4 : 85-143. Paris : Technique et Documentation.
- Mougha, J., P. Rutherford, M., S. (2008).** Available lysine in foods: a brief historical overview. *Journal of AOAC International*, **91**(4), 901-906.
- Moult, J. (2005).** A decade of CASP: progress, bottlenecks and prognosis in protein structure prediction. *Current Opin Structural Biology*. **15**(3): 285-9.
- Moure, A. Dominguez, H. Parajo, J., C. (2006).** Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*. **41**, 447–456.
- Moure, A., Dominguez, H., Zuniga, M. E., Soto, C., et Chamy, R. (2002).** Characterisation of protein concentrates from pressed cakes of Guevina avellana (*Chilean hazelnut*). *Food Chemistry*, **78**, 179-186.
- Moure, A. Sineiro, J. and Dominguez, H. (2001).** Extraction and functionality of membrane concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. *Food Chemistry*, **74**(3), 327-339.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., and Balny, G. (1996).** High pressure effects on protein structure and function. *Proteins: structure, Function, and Bioinformatics*, **24**(1), 81-91.
- Muller O., et Krawinkel M (2005).** Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal* **173**(3), 279- 286.
- Mundi, S. 2012.** Structural and functional characterization of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins and enzymatic protein hydrolysates. University of Manitoba.
- Mundi, S. and Aluko, R. (2012).** Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions. *Food Research International*, **48**(1): 299-306.
- Mundi, S. and Aluko, R. E. (2013).** Effects of NaCl and pH on the structural conformations of kidney bean vicilin. *Food Chemistry*, **139**(1): 624-630.
- Mune Mune, M., A. Minka, S., R. Mbome, I., L. and Etoa, F. (2011).** Nutritional potential of Bambara bean protein concentrate. *Pakistan Journal of Nutrition*, **10** (2): 112-119.

**Mune Mune, M., A. & Sogi, D., S. (2015).** Functional Properties of Protein Concentrates of Cowpea and Bambara Bean Involving Different Drying Techniques. *Journal of Food Processing and Preservation*, **39**(6), 2304-2313.

**Mune Mune, M., A. & Sogi, D., S. (2016).** Emulsifying and Foaming Properties of Protein Concentrates Prepared from Cowpea and Bambara bean Using Different Drying Methods. *International Journal of Food Properties*, **19**(2), 371-384.

**Mune, Mune, M., Bakwo, C., Nyobe, E., Minka, S. (2016b).** Physicochemical and functional properties of *Moringa oleifera* seed and leaf flour. *Cogent Food and Agriculture*, **2**, 1220352.

**Mune Mune, M., A. Minka, S., R. & Henle, T. (2018).** Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, **250**, 162–169.

**Mune Mune, M., A. Bayiga, A., Nyobe, E., C. Bassogog, C., B. & Minka, S., R. (2018).** Protein Quality, Secondary Structure and Effect of Physicochemical Factors on Emulsifying Properties of *Irvingia gabonensis* Almonds. *Current Nutrition and Food Science*, **14**, 1-19.

**Mune Mune, M., A. Stănciuc, N. Grigore-Gurgub, L. Aprodub, I. Borda, D. (2020).** Structural changes induced by high pressure processing in Bambara bean proteins at different pH. *Food Science and Technology* **124**. 109-187.

**Murevanhema, Y., Y. and Jideani, V., A. (2013).** Potential of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) Milk as a Probiotic Beverage. A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **53** (9): 954-967.

**Mwasaru, M., A. Muhammad, K. Bakar, J. and Man, Y., B. C. (1999a).** Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chemistry*, **67**(4): 435-443.

**Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., et Che Man, Y. B. (1999b).** Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional properties. *Food Chemistry*, **67**(4), 445–452.

**Mwasaru, M., A. Muhammad, K. Bakar, J. et Che Man, Y., B. (2000).** Influence of altered solvent environment on the functionality of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. *Food Chemistry*, **71**, 157–165.

**Nadathur, S., R. Wanasundara, J., P. D. & Scanlin, L. (2016).** Proteins in the diet: Challenges in feeding the global population. Sustainable protein sources (pp. 1–19). *Elsevier Inc.* <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00001-9>.

**Nosenko, T., Kot, T. and Kichshenko, V. (2014).** Rape seeds as a source of feed and food proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **64**(2): 109-114.

**Oancea, A-M., Aprodu, I., Râpeanu, G., Bahrim, G & Stanciuc, N. (2017).** The Binding mechanism of anthocyanins from sour cherries (*Prunus cerasus* L) skins to bovine  $\beta$ -lactoglobulin: A fluorescence and *in silico* based approach, *International Journal of Food Properties*, **20**:sup3, S3096-S3111, DOI: 10.1080/10942912.2017.1343347.

**Odeigah, P. and Osanyinpeju, A. (1998).** Evaluating the genetic biodiversity of Bambara groundnut accessions from Nigeria using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **45**(5): 451-458.

**Okafor, P., N. Abara, C., N. Nwabuko, C., U. et Ogbanna, U. (2002).** Assessment of cyanogenic potential nitrite contents and trypsin inhibitor activity of some Nigeria legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(17), 4965-4968.

**Okpuzor, J., Ogbunugafor, H. A., Okafor, U., & Sofidiya, M. O. (2010).** Identification of protein types in Bambara nut seeds: Perspectives for dietary protein supply in developing countries. *EXCLI Journal*, **9**, 17–28.

**Olalekan, A., J. and Bosede, B., F. (2010).** Comparative study on chemical composition and functional properties of three Nigerian legumes (Jack beans, Pigeon pea and Cowpea). *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, **1**: 89-95.

**Oluyemi, J., A. Fetuga, B., L. et Endeley, H., L. N. (1976).** The metabolizable energy value of some feed ingredients for young chicks. *Poultry Science*, **55**, 611-618.

**Onyenekwe, P. C., Njoku, G. C., et Ameh, D. A. (2000).** Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. *Nutrition Research*, **20**(3), 349 – 358.

**Onwuliri, A., V. et Obu, A., J. (2002).** Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* grown in Nigeria. *Food Chemistry*, **78**, 1-7.

**Osborne, T., B. (1924).** *The vegetable proteins. (2nd edition)*. New York: Longman.

**Pande, M. Kumari, N., K. P. Dubey, V., K. Tripathi, P., & Jagannadham, M., V. (2009).** Stability and unfolding studies on alkaline denatured state (Ip) of pepsin. *Process Biochemistry* **44**(8): 906–911.

- Panyam, D. et Kilara, A. (1996).** Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science and Technology*, **7**, 120-125.
- Paredes-López, O. Ordorica-Falomir, C. and Olivares-Vázquez, M. (1991).** Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science*, **56**(3): 726-729.
- Parker, C., A. (1968).** Photoluminescence of solutions: With applications to photochemistry and analytical chemistry. *Elsevier Pub. Co.*
- Pasquet, R. S., et Fotso M. (1991).** *Les légumineuses alimentaires du Cameroun*, premiers résultats. In J. Boutrais (Ed), Du politique à l'économique, études historiques dans le bassin du lac Tchad (pp. 317-360). Paris: ORSTOM.
- Pastor-Cavada, E. Juan, R. Pastor, J. E., Alaiz, M. and Vioque, J. (2014).** Protein and amino acid composition of select wild legume species of tribe Fabaceae. *Food Chemistry*, **163**: 97-102.
- Pedroche, J. Yust, M., M. Lqari, H. Giron-Calle, J. Alaiz, M. Vioque, J. et Millan, F. (2004).** *Brassica carinita* protein isolate: chemical composition; protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chemistry*, **88**, 337-346.
- Peterbauer, T., et Richter, A. (1998).** Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean; purification and characterisation of stachyose synthase. *Plant Physiology*, **117**, 165 – 172.
- Pernollet, J. C., Mosse, J. (1983).** Structure and location of legume and cereal seed storage. In: Seed Proteins; Daussant, J.; Mosse, J.; Vaughan, J.; Eds.; Academic Press: New York; 155–192.
- Peyrano, F., Speroni, F. and Avanza, M. (2015).** Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **33**: 38-46.
- Phillips, R., D. et Abbey, B., W. (1989).** Composition and flatulence producing potential of commonly eaten Nigerian and American legumes. *Food Chemistry*, **33**, 271–280.
- Phillips, L., G. Yang, S., T. et Kinsella, J., E. (1991).** Neutral salt effect on solubility of whep protein isolates foams. *Journal of Food Science* **56**, 588-589.
- Privalov, P., L. (1979).** Stability of proteins: small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry* **33**: 167-241.
- Priyadarshini, P., Kumar, N., P. Dipankar, S. Kumar, S., S. Chanderdeep, T. (2011).** Mode of interaction of calcium oxalate crystal with human phosphate cytidylyl transferase 1: a novel

inhibitor purified from human renal stone matrix. *Journal Biomedical Science and Engineering*, **4**: 591-598.

**Ptaszek, P. (2013)**. The non-linear rheological properties of fresh wet foams based on egg white proteins and selected hydrocolloids. *Food Research International*, **54** (1): 478-486.

**Qayyum, M., Butt, M., Anjum, F. and Nawaz, H. (2012)**. Composition analysis of some selected legumes for protein isolates recovery. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, **22**: 1156-1162.

**Quanhong, L. et Caili, F. (2005)**. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, **92**(4), 701–706.

**Rackis, J. J., Sessa, D. J., et Honing, D. H. (1979)**. Flavour problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **56**, 262-271.

**Rassel, A. (1960)**. Le voandzou *Voandzeia subterranea* Thouars et sa culture au Kwango. *Bulletin Agricultural du Congo Belge et du Ruanda-Burundi*, **51**, 1-26.

**Rebholz, C. Reynolds, K. Wofford, M. Chen, J. Kelly, T. Mei, H. Whelton, P. and He, J. (2012)**. Effect of soybean protein on novel cardiovascular disease risk factors: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, **67**(1) : 58-63.

**Rimbach, G. Ingmann, H., J. et Pallauf, J. (1994)**. The role of phytase in the dietary bioavailability of minerals and trace elements. *Ernaehrungsforschung*, **39**, 1–10.

**Rodrigues R., M. Martins, A., J. Ramos, O., L. Malcata, F., X. Teixeira, J., A. and Vicente, A., A. (2015)**. Influence of Moderate Electric Fields on Gelation of Whey Protein Isolate. *Food Hydrocolloids*, **43**, 329–339.

**Rubio, L. A., Pérez, A., Ruiz, R., Guzman, M., Aranda-Olmedo, I. and Clemente, A. (2014)**. Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94** (2): 280-287.

**Sanchez-Vioque, R. Clemente, A. Viogue, J. Bautista, J. et Millan, F. (1999)**. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, **64**, 237–243.

**Sánchez, R. and Sali. A. (1997)**. Advances in comparative protein-structure modeling. *Current Opinied Structural Biologaly*. **7** :206–214.

**Sali, A. (1995)**. Modelling mutations and homologous proteins. *Current. Open. Biotechnology*. **6**: 437–451.

**Sali, A. and Blundell, T., L. (1993)**. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal Molecular and Biology*, **234** :779–815.



- Sathe, S. et Salunkhe, D., K. (1981).** Investigations in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC). Protein and nutritional factors. *Journal of Food Science*, **46**, 1389 – 1393.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M., C. (2003).** SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*. **31**(13): 3381-5.
- Sefa-Deleh, S. Agyir-Sackey, K., E. (2004).** Chemical composition and the effect of processing on oxalate content of cocoyam *Xanthosoma sagittifolium* and *Colocasia esculenta* cormels. *Food Chemistry*, **85**, 479-487.
- Shalini, G., R. Shruti, S., Jha, S., K. and Rajeev, K. (2015).** Physic-chemical and functional properties of cowpea protein isolate as affected by the dehydration technique *Legume Research*, **39** (3) 2016: 370-378 DOI:10.18805/lr.v0iOF.9441.
- Silvestre, M., P. C. (1997).** Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, **60**, 2, 263271.
- Simic, M., G. et Karel, M. (1980).** *Autoxidation in food and biological systems*. New York: plenum press.
- Sorgentini, D., A. Wagner, J., R. and Añón, M., C. (1995).** “Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, no. 9, pp. 2471–2479.
- Stănciuc, N. Aprodu, I. Râpeanu, G. & Bahrim, G. (2012).** Fluorescence spectroscopy and molecular modelling investigations on the thermally induced structural changes of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **15**, 50-56.
- Stănciuc, N. Aprodu, I. Ionița, E. Bahrim, G. & Râpeanu, G. (2015).** Exploring the process–structure–function relationship of horseradish peroxidase through investigation of pH- and heat induced conformational changes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **147**, 43-50.
- Stone, A., K. Karalash, A., Tyler, R., T. Warkentin, T., D. and Nickerson, M., T. (2015).** Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, **76**: 31-38.
- Stone, K., A. Avarmenko, N. Tom, A. Warkentin, D. and Nickerson, T., M. (2015).** Functional Properties of Protein Isolates from Different Pea Cultivars. *Food Science and Biotechnology* **24**(3): 827-833.
- Sumner, A. K., Nielsen, M. A., et Youngs, C. G. (1981).** Production and evaluation of pea protein isolate. *Journal of Food Science*, **46**, 364-367.

- Surewicz, W., K. Mantsch, H., H. and Chapman, D. (1993).** Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment, *Biochemistry*, **32(2)** 389- 394.
- Surowka, K. Zmudzinski, D. et Surowka, J. (2004).** Enzyme modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends in Food Science and Technology*, **15**, 153-160.
- Sutcliffe, M., J. Haneef, I. Carney, D. and Blundell. T., L. (1987).** Knowledge based modelling of homologous proteins, part I: Three dimensional frameworks derived from the simultaneous superposition of multiple structures. *Protein Engineering*, **1** :377–384.
- Suskovic, J., Blazenska, K., Goreta, J., et Matošić, S. (2001).** Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology*, **39(3)**, 227–235.
- Sze-Tao, K., W. C. et Saathe, S., K. (2000).** Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L) protein isolate. *Food Chemistry*, **69**, 153-160.
- Tan, E. S., Ying-Yuan, N. and Gan, C. Y. (2014).** A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimization. *Food Chemistry*, **152**: 447-455.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L. and Agboola, S. O. (2011).** Canola proteins for human consumption: extraction, profile, and functional properties. *Journal of Food Science*, **76** (1): R16-R28.
- Tan, X. L., Azam-Ali, S., Goh, E. V., Mustafa, M., Chai, H. H., Ho, W. K., Mayes, S., Mabhaudhi, T., Azam-Ali, S. and Massawe, F. (2020).** Bambara Groundnut: An Underutilized Leguminous Crop for Global Food Security and Nutrition. *Frontiers In Nutrition*. 7:601496. doi: 10.3389/fnut.2020.601496.
- Tchiagam, L. Bell, J. M., Nassourou, A. M., Njintang, N. Y. and Youmbi, E. (2013).** Genetic analysis of seed proteins contents in cowpea (*Vigna unguiculata*. L. Walp.). *African Journal of Biotechnology*, **10** (16): 3077-3086.
- The UniProt Consortium (2012).** Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acid Research*, **40**, D71–5.
- Timilsena YP, Adhikari R, Barrow CJ, Adhikari B. (2016).** Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*. **212**: 648-656.

**Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., & Guamis, B. (2002).** Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **3**(4), 295-307.

**United Nations (2017).** World population prospects : The 2017 revision, key findings and advance tables. Working paper No. ESA/P/WP/248. Department of economic and social affairs, population division. New York. Retrieved from [https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/wpp2017\\_keyfindings.pdf](https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/wpp2017_keyfindings.pdf).

**Vaštag, Ž. Popović, L. Popović, S. Krimer, V. & Peričin, D. (2011).** Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, **124**(4), 1316-1321.

**Vitkup, D. Melamud, E. Moul, J., Sander, C. (2001).** Completeness in structural genomics. *Nature Structural Biology*. **8**(6): 559-66.

**Vose, J. (1980).** Production and functionality of starches and protein isolates from legume seeds (field peas and horse beans). *Cereal Chemistry* (USA).

**Wang, J. Wei, Z. Li, L. Bian, K. & Zhao, M. (2009).** Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten. *Journal of Cereal Science* **50** (2): 205–209.

**Wani, I. A., Sogi, D. S., Wani, A. A. and Gill, B. S. (2013).** Physic-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus Vulgaris L.*) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, **53**(1): 278-284.

**Wu, H. Wang, Q. Ma, T. et Ren. (2009).** Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate. *Food Research International* **42**, 343-348.

**Yang, J. Yan, R. Roy, A. Xu, D. Poisson, J. & Zhang, Y. (2015).** The I-TASSER Suite : Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, **12**, 7–8.

**Yao, D. N., Kouassi, K. N., Erba, D., Scazzina, F., Pellegrini, N. and Casiraghi, M. C. (2015).** Nutritive Evaluation of the Bambara Groundnut Ci12 Landrace [*Vigna subterranea (L.)* Verdc. (Fabaceae)] Produced in Côte d'Ivoire. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(9): 21428-21441.

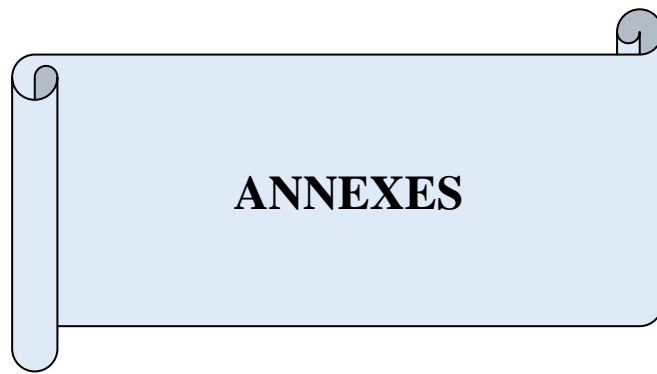
**Yusuf, A., A. Ayedun, H., et Sanni, L., O. (2008).** Chemical composition and functional properties of raw and roasted Nigerian benniseed (*Sesam umindicum*) and Bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *Food Chemistry* **111**(2): 277-282.

**Zaidi, F., Hassissene, N., Allouache, H. Kichou, M. Ourdani, S. Rezki, K. Bellal, M., M. Li, J. Liu, J. et Tao, S. (2003).** Effects of tannic acid on the food intake and protein digestibility of root voles. *Acta Theriologica Sinica*. **23**(1), 52-57.

**Zaroog, M., S. & Tayyab, S. (2012).** Formation of molten globule-like state during acid denaturation of *Aspergillus Niger* glucoamylase. *Process Biochemistry* **47** (5): 775–784.

**Zayas, J. F. (1997).** Functionality of proteins in food (p. 373). *New York, NY: Springer.*

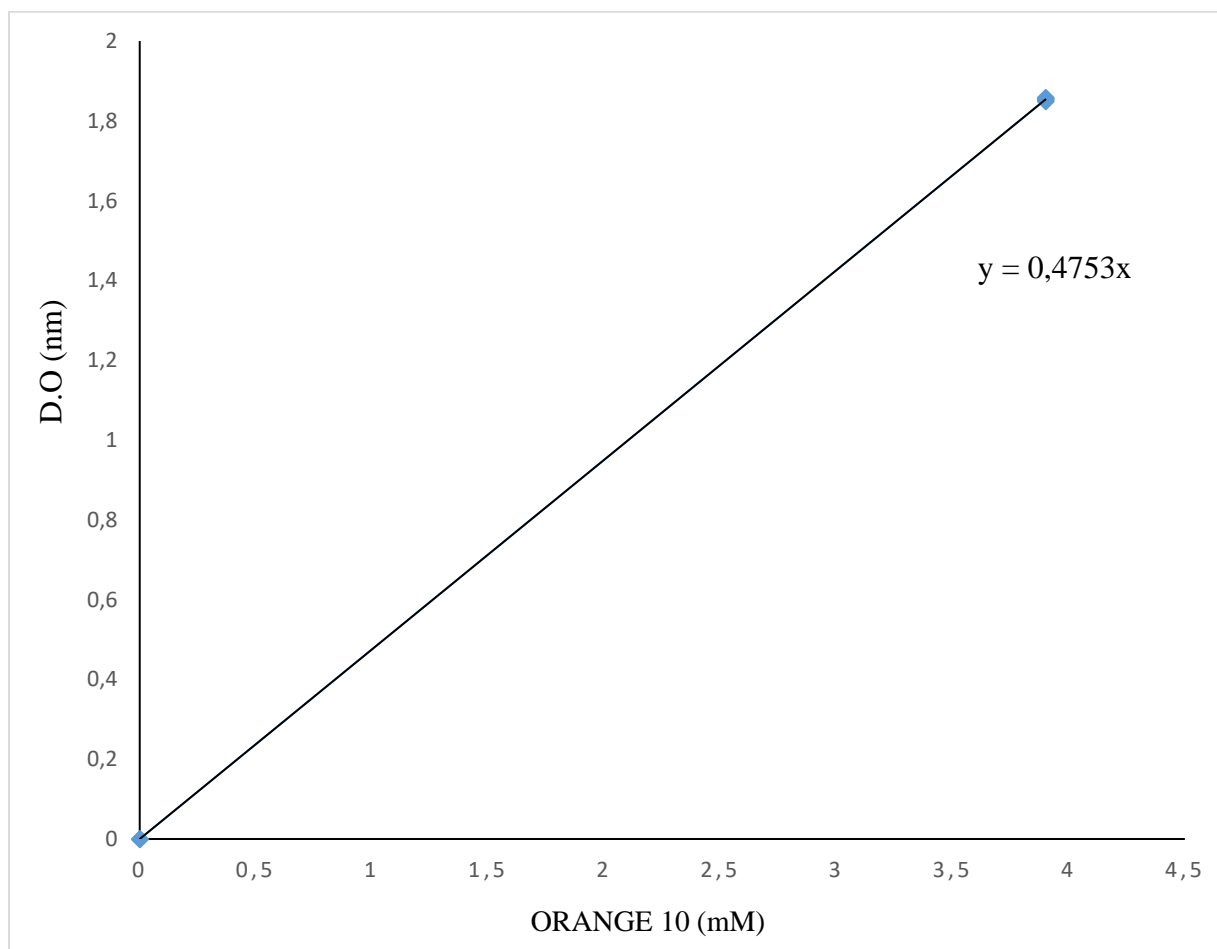
**Zhang, Y. (2008).** I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40



## ANNEXES

## ANNEXE 1 : Étallonnage de l'orange 10

N° tubes	0	1	2	3
Orange (Mm)	10 0	3,9	3,9	3,9
DO (475nm)	0	0 1,849	1,854	1,858



**ANNEXE 2: Changements structurels induits par le traitement thermique sur la protéine de pois Bambara, suivis par le spectre d'émission à 274 nm (a) ; 280 (b) et 295 nm (c), la protéine est équilibrée à 25 °C.**

pH	TEMPERATURE (°C)	Excitation 295nm		Excitation 280nm		Excitation 274nm	
		Max. Fluo. (a.u)	λ max.(nm)	Max. Fluo. (a.u)	λ max.(nm)	Max. Fluo. (a.u)	λ max.(nm)
4	25	792.6	347	1000.6	336.5	1003.3	335.5
4	50	569.9	347.5	833.5	336	841.8	340.5
4	60	401.4	350.5	602.1	340	626.7	334.5
4	70	457.6	347.5	734.3	340	783.4	335
4	80	371.3	347.5	602.1	340	631.7	338
4	90	457.6	347.5	760.9	336.5	787.4	337.5
4	100	521.1	347.5	891.3	336	913.0	340
7	25	516.2	347.5	909.4	340	909.1	341
7	50	445.6	350	793.2	341.5	793.2	341
7	60	434.5	350	781.1	341.5	781.2	341.5
7	70	355.9	350.5	644.5	343.5	644.5	343.5
7	80	349.2	350.5	668.7	341.5	668.7	340.5
7	90	475.4	350.5	813.5	340.5	813.4	341
7	100	445.5	350.5	752.3	342	752.5	343.5
9	25	497.7	347.5	866.9	346.5	894.3	346.5
9	50	424.0	351.5	711.5	348.5	720.9	352
9	60	391.9	351	711.5	348.5	724.6	352
9	70	424.9	351.5	748.1	348.5	762.4	347
9	80	407.7	352	711.5	348.5	732.1	349
9	90	407.7	352	732.7	348.5	762.4	347
9	100	391.9	351	711.5	348.5	732.0	349

**ANNEXE 3 : Effets du traitement thermique à différents pH sur la structure secondaire de l'isolat protéique de pois Bambara.**

pH	Temperature	Structure secondaire (%)			
		Feuillet $\beta$ (%)	Hélice $\alpha$ (%)	Structure irrégulière (%)	Coudes $\beta$ (%)
4	25	15.20±0.51 <sup>e2</sup>	75.69±2.52 <sup>a1</sup>	1.58±0.05 <sup>N<sup>h4</sup></sup>	7.53±0.25 <sup>f3</sup>
	50	53.57±1.78 <sup>b1</sup>	33.17±1.10 <sup>ef2</sup>	9.54±0.32 <sup>c3</sup>	3.72±0.12 <sup>ij4</sup>
	70	27.80±0.93 <sup>d2</sup>	61.38±2.04 <sup>b1</sup>	2.41±0.08 <sup>h4</sup>	7.24±0.24 <sup>f3</sup>
	80	29.28±0.98 <sup>d2</sup>	63.75±2.12 <sup>b1</sup>	5.59±0.19 <sup>e3</sup>	2.55±0.08 <sup>j3</sup>
	100	71.80±2.4 <sup>a1</sup>	23.04±0.77 <sup>g2</sup>	1.51±0.05 <sup>h4</sup>	3.65±0.12 <sup>ij3</sup>
7	25	67.34±2.24 <sup>a1</sup>	15.47±0.52 <sup>h2</sup>	11.59±0.38 <sup>b3</sup>	5.6±0.19 <sup>gh4</sup>
	50	45.69±1.53 <sup>c1</sup>	37.09±1.24 <sup>ef2</sup>	4.95±0.17 <sup>ef4</sup>	12.27±0.41 <sup>d3</sup>
	70	30.73±1.02 <sup>d2</sup>	46.96±1.57 <sup>c1</sup>	4.56±0.15 <sup>fg4</sup>	17.75±0.60 <sup>b3</sup>
	80	20.85±0.70 <sup>e2</sup>	63.21±2.11 <sup>b1</sup>	5.80±0.20 <sup>e4</sup>	10.14±0.34 <sup>e3</sup>
	100	43.39±1.45 <sup>c1</sup>	39.64±1.32 <sup>de2</sup>	12.72±0.42 <sup>a3</sup>	4.25±0.14 <sup>hi4</sup>
9	25	40.74±1.36 <sup>c1</sup>	35.00±1.17 <sup>ef2</sup>	12.57±0.27 <sup>a4</sup>	16.03±0.53 <sup>c3</sup>
	50	55.57±1.85 <sup>b1</sup>	44.43±1.49 <sup>cd2</sup>	0.00±0.00 <sup>i3</sup>	0.00±0.00 <sup>k3</sup>
	70	41.76±1.40 <sup>c1</sup>	31.18±1.04 <sup>f2</sup>	5.32±0.18 <sup>ef4</sup>	21.74±0.72 <sup>a3</sup>
	80	29.89±1.00 <sup>d2</sup>	61.51±2.05 <sup>b1</sup>	1.70±0.06 <sup>h4</sup>	6.90±0.23 <sup>fg3</sup>
	100	44.89±1.50 <sup>c1</sup>	46.91±1.53 <sup>c1</sup>	3.96±1.29 <sup>g3</sup>	4.24±0.14 <sup>hi3</sup>

\* les données sont déterminées en triplets. Les moyennes suivies de lettres différentes (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) à une même colonne sont significativement différents ( $p < 0,05$ ). Les moyennes suivies de chiffres différents (1, 2, 3, 4) à la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).



**ANNEXE 4 : Spectres synchrones au  $\Delta\lambda$  15 et 60 nm de l'isolat protéique de pois Bambara aux pH 4, 7 et 9 après traitement thermique.**

pH	TEMPERATURE (°C)	$\Delta\lambda$ 15 nm		$\Delta\lambda$ 60 nm	
		$\lambda$ max.(nm)	Fluo. Max. (a.u)	$\lambda$ max.(nm)	Fluo. Max. (a.u)
4	25	373.36	284.5	1013.95	279.5
4	50	308.75	284	844.15	278.5
4	60	232.57	284	603.54	278
4	70	278.06	284.5	750.42	277.5
4	80	230.5	283.5	615.16	277
4	90	286.95	284	780.48	277.5
4	100	327.74	283	914.77	277
7	25	211.98	284	898.14	277
7	50	182.41	284	778.88	277.5
7	60	179.56	284	771.34	277.5
7	70	155.14	283.5	633.54	277.5
7	80	195.19	283.5	661.44	277
7	90	248.44	283.5	803.65	277.5
7	100	243.27	283.5	737.46	277.5
9	25	193.72	283	872.62	278
9	50	164.28	281.5	693.75	278.5
9	60	163.70	283	707.49	278
9	70	170.09	282.5	737.97	278.5
9	80	168.69	282.5	711.15	278
9	90	172.98	282.5	722.61	278
9	100	171.58	282.5	698.17	278

**Annexe 5 : Protéines utilisées pour l'analyse *in silico* et pourcentage de similarités avec la protéine de pois de Bambara.**

No	Protéine	Abréviation	Source	Masse (Da)	Longueur (amino acide)	Uniprot ID /AC	% similarité
1	Protéine Viciline	VP	<i>Vigna unguiculata</i>	49,685	433	VIGUN/A8YQH5	64.43
2	7S globuline-3	7SG3	<i>Vigna angularis</i>	49,759	433	PHAAN/A4PIA0	64.20
3	7S globuline-2	7SG2	<i>Vigna angularis</i>	49,980	434	PHAAN/A4PI99	60.60
4	Protéine de stockage de la farine B	STPB	<i>Vigna luteola</i>	49,856	437	9FABA/A5WYF9	48.74

\* % similarité avec les protéines de pois Bambara a été déterminé avec la digestion trypsique (Okpuzor *et al.*, 2010).

**ANNEXE 6: Séquence primaire de la 7SG3 en format FASTA**

>gi|167013181|pdb|2EAA|A Chain A, 7S globulin-3

IVHREHQESQEESDSRGENNPFFYFSSDRRFHTLFTNQYGHRLILHRFDQRSKQIQNLENYRVVEFKSKPN

TLLPHHADADFLLVVLNGRAILTLVNPDSRDSYILEQGHAQKIPAGTTFFLVNPDDNENLRIIKLAIPV

NNPHRFQDFFLSSTEAQQSYLRGFSKNILEASFDSDFKEINRVLFGEERQQQGEESREEGVIVELKREQ

IQELMKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRNSKPIYSNKFGRWYEMTPEKNPQLKDLDFISSVDMKEGALLP

HYNSKAIVIMVINEGEAKIELVGLSDQQQKQQEESLEVQRRAELSEDDVFPAAAYPVAINATSNLNF

FAFGINAENNQRNFLAGGKDNVMSEIPTEVLEVSFPASGKKVEKLIKKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKG

RKGSLSILGSLY

**ANNEXE 7 : Fichier pdb de 7SG3**

TITLE 7sg 50 degrees

CRYST1 115.316 115.316 115.316 90.00 90.00 90.00 P 1 1

MODEL 1

ATOM 1 N ILE 1 60.470 25.510 54.230 1.00 0.00

ATOM 2 H1 ILE 1 59.490 25.260 54.120 1.00 0.00

ATOM 3 H2 ILE 1 60.840 25.990 53.430 1.00 0.00

ATOM 4 CA ILE 1 60.380 26.370 55.470 1.00 0.00

ATOM 5 HA ILE 1 59.990 27.330 55.120 1.00 0.00

ATOM 6 CB ILE 1 59.320 25.810 56.370 1.00 0.00

ATOM 7 HB ILE 1 58.450 25.810 55.720 1.00 0.00

ATOM 8 CG1 ILE 1 58.940 26.830 57.460 1.00 0.00

ATOM 9 1HG1 ILE 1 59.250 27.820 57.120 1.00 0.00

ATOM 10 2HG1 ILE 1 57.870 26.980 57.590 1.00 0.00

ATOM 11 CG2 ILE 1 59.520 24.380 56.830 1.00 0.00

ATOM 12 1HG2 ILE 1 60.590 24.230 56.980 1.00 0.00

ATOM 13 2HG2 ILE 1 59.000 24.100 57.750 1.00 0.00

ATOM 14 3HG2 ILE 1 59.300 23.650 56.060 1.00 0.00

.....

**ANNEXE 8 : Conditions appliquées pour la minimisation de l'énergie lors de la simulation (Minim.mdp)**

```
; minim.mdp - used as input into grompp to generate em.tpr
; Parameters describing what to do, when to stop and what to save
integrator = steep      ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol      = 1000.0     ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm
emstep     = 0.01      ; Minimization step size
nsteps     = 50000     ; Maximum number of (minimization) steps to perform

; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the interactions
nstlist    = 1         ; Frequency to update the neighbor list and long range forces
cutoff-scheme = Verlet  ; Buffered neighbor searching
ns_type    = grid      ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
coulombtype = PME       ; Treatment of long range electrostatic interactions
rcoulomb   = 1.0       ; Short-range electrostatic cut-off
rvdw       = 1.0       ; Short-range Van der Waals cut-off

pbc        = xyz       ; Periodic Boundary Conditions in all 3 dimensions
```

**ANNEXE 9 : Conditions appliquées pour équilibrer la température (nvt.mdp)**

```

title          = OPLS Lysozyme NVT equilibration
define         = -DPOSRES ; position restrain the protein
; Run parameters
integrator     = md      ; leap-frog integrator
nsteps        = 50000   ; 2 * 50000 = 100 ps
dt            = 0.002   ; 2 fs
; Output control
nstxout       = 500     ; save coordinates every 1.0 ps
nstvout       = 500     ; save velocities every 1.0 ps
nstenergy     = 500     ; save energies every 1.0 ps
nstlog        = 500     ; update log file every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation   = no     ; first dynamics run
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints    = h-bonds ; bonds involving H are constrained
lincs_iter    = 1       ; accuracy of LINCS
lincs_order   = 4       ; also related to accuracy
; Nonbonded settings
cutoff-scheme = Verlet  ; Buffered neighbor searching
ns_type       = grid    ; search neighboring grid cells
nstlist       = 10      ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet
rcoulomb      = 1.0     ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw          = 1.0     ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
DispCorr      = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Electrostatics
coulombtype   = PME     ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order     = 4       ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16  ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl        = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps       = Protein Non-Protein ; two coupling groups - more accurate
tau_t         = 0.1 0.1  ; time constant, in ps
ref_t         = 300 300  ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is off
pcoupl        = no      ; no pressure coupling in NVT
; Periodic boundary conditions
pbc           = xyz     ; 3-D PBC
; Velocity generation
gen_vel       = yes     ; assign velocities from Maxwell distribution
gen_temp      = 300     ; temperature for Maxwell distribution

gen_seed      = -1     ; generate a random seed

```

**ANNEXE 10 : Conditions appliquées pour équilibrer la température et la pression (npt.mdp)**

```

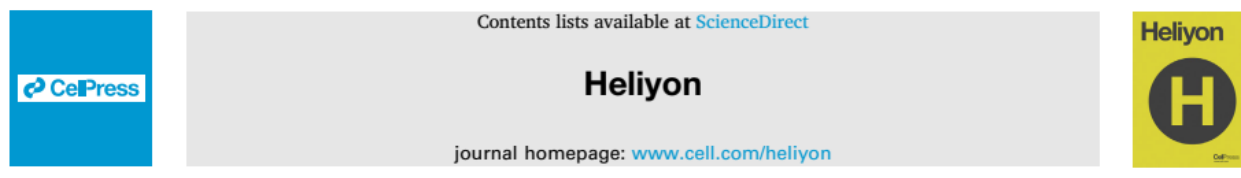
title          = OPLS Lysozyme NPT equilibration
define         = -DPOSRES ; position restrain the protein
; Run parameters
integrator     = md      ; leap-frog integrator
nsteps        = 50000   ; 2 * 50000 = 100 ps
dt            = 0.002   ; 2 fs
; Output control
nstxout       = 500     ; save coordinates every 1.0 ps
nstvout       = 500     ; save velocities every 1.0 ps
nstenergy     = 500     ; save energies every 1.0 ps
nstlog        = 500     ; update log file every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation  = yes     ; Restarting after NVT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints    = h-bonds ; bonds involving H are constrained
lincs_iter    = 1       ; accuracy of LINCS
lincs_order   = 4       ; also related to accuracy
; Nonbonded settings
cutoff-scheme = Verlet  ; Buffered neighbor searching
ns_type       = grid    ; search neighboring grid cells
nstlist       = 10      ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet scheme
rcoulomb      = 1.0     ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw         = 1.0     ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
DispCorr      = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Electrostatics
coulombtype   = PME     ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order     = 4       ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16  ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl        = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps       = Protein Non-Protein ; two coupling groups - more accurate
tau_t         = 0.1 0.1  ; time constant, in ps
ref_t         = 300 300  ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl        = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype    = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p         = 2.0     ; time constant, in ps
ref_p         = 1.0     ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
refcoord_scaling = com
; Periodic boundary conditions
pbc           = xyz     ; 3-D PBC
; Velocity generation

gen_vel       = no     ; Velocity generation is off

```

## ANNEXE 11. Liste de(s) publication(s)

Heliyon 7 (2021) e07824



## Research article

## Influence of pH and temperature on the physicochemical and functional properties of Bambara bean protein isolate



Simon Pierre Ngui<sup>a</sup>, Carine Emilienne Nyobe<sup>a,c</sup>, Christian Bernard Bakwo Bassogog<sup>a,c</sup>, Erasmus Nchuaaji Tang<sup>d</sup>, Samuel René Minka<sup>a</sup>, Martin Alain Mune Mune<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, University of Yaoundé I, PO Box 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>b</sup> Faculty of Science, The University of Maroua, PO Box 814, Maroua, Cameroon

<sup>c</sup> Centre for Food and Nutrition Research, PO Box 6163, Yaoundé, Cameroon

<sup>d</sup> Institute of Agricultural Research for Development, Njombe, Cameroon

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Bambara bean  
Protein isolate  
Heat treatment  
Secondary structure  
Functionality

## ABSTRACT

Bambara bean is a rich low-cost protein source and a functional ingredient in the food industry. We investigated the effects of temperature and different pH on the physicochemical and functional properties of Bambara bean protein isolate. Vicilin was the major protein of Bambara bean as revealed by SDS PAGE analysis. The emulsifying capacity of protein isolate was highest at 80 °C, pH 9 while emulsion stability was highest at pH 4. Generally, increase in temperature decreased protein solubility at pH 4 and 7, while increase was observed at pH 9 and 100 °C. The hydrophobicity of isolate was highest at pH 4 and lowest at pH 9, regardless of temperature. Protein isolate possessed highly compact  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix secondary structures in proportions greater than 75% (at pH 9 and 50 °C). Increase in temperature generally promoted protein rearrangement and partial unfolding. Protein secondary structure and surface hydrophobicity can predict food functionality, directly affecting protein behavior during formulation and long-term storage. This study clearly demonstrated the potential of exploiting pulse protein isolates as nutritional and functional ingredients through temperature and pH control.

## 1. Introduction

Bambara groundnut (*Vigna subterranea*), extensively cultivated in low altitudes of sub-Saharan Africa is a legume crop of little relevance on a global scale (Eltayeb et al., 2011; Mazahib et al., 2013). However, in Africa, it compares to groundnut (*Arachis hypogea*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) in terms of productivity (Adebawale et al., 2011; Hillolocks et al., 2012). Bambara groundnut is also under considerable production in America, India, Sri Lanka, and Indonesia (Mcwatters et al., 2003; Goli et al., 1997). In Cameroon, it is common in all the ten regions with the exception of a few production basins in the South West and South East plains (Pasquet and Fosto, 1991). Bambara groundnut is drought tolerant with good yield performance in unfertilized soils, exhibiting remarkable resistance to pests and diseases (Thammarat et al., 2015). Besides this, it is a potential replacement of animal protein in local households, often formulated in sauces and consumed with roots, tubers and cereals (Mune Mune and Sogi, 2015). Despite its ability to withstand harsh climate and contribute to household protein requirement, Bambara groundnut is

under little exploitation at both the indigenous and development research communities (Yao et al., 2015).

At the development research level, Bambara groundnut is an exemplar pulse for climate change resilience (Mayes et al., 2019). In addition to climate change adaptation, Bambara groundnut flour perfectly incorporates as a protein ingredient in cookie and vegetable diary formulations (Okafor et al., 2015; Falade et al., 2014; Murevanhema & Jideani, 2013). The successful incorporation of Bambara flour in industrial food formulation depends on its physicochemical and functional properties (Mune et al., 2018). However, limited scientific evidence elucidates the major factors coordinating the successful exploitation of Bambara groundnut flour in the food industry. Bambara protein is rich in essentially amino acids with substantial levels of lysine and methionine that greatly influence structure and function primordial in food formulation (Mune Mune and Sogi, 2015; Mune et al., 2018). The application of protein rich sources in food engineering make use of processing parameters sometimes involving pH and temperature adjustments for stability. Temperature and pH are parameters that differentially affect protein

\* Corresponding author.

E-mail address: alainmune@gmail.com (M.A. Mune Mune).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07824>

Received 5 May 2021; Received in revised form 6 July 2021; Accepted 16 August 2021

2405-8440/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



structure and function (Barba et al., 2012; Trujillo et al., 2002). Under well-defined temperature and pH regimes, the use of Bambara flour as an essential protein ingredient in food formulation is justified. With this justification coordinated by intrinsic properties such as surface hydrophobicity, Bambara protein could improve novel food functional properties such as emulsion capacity and stability (Cui et al., 2013; Nishinari et al., 2014). With this conception, this study aimed to determine the effects of different temperature and pH treatments on the structure and function of Bambara protein isolate.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Material

We purchased dried seeds of the Bambara bean [*Vigna subterrenea* (L) verde] red cultivar at the Mfoundi market (Yaounde, Cameroon). They were then sorted and cleaned and the good quality seeds kept at 4 °C in a polyethylene bag until used. Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) supplied the chemical reagents (acrylamide and potassium iodide).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Preparation of Bambara bean flour

The clean Bambara bean sample was ground in a milling machine (Semap) fitted with a fine sieve of 200 µm mesh size. Thereafter, flour was defatted in hexane at a 1:5 (w/v) ratio (Maguire et al., 2004). All defatted samples were oven-dried at 45 °C, packed in paper bags and cold-stored at 4 °C in a refrigerator.

#### 2.2.2. Extraction of the Bambara bean protein isolate

The extraction of the Bambara bean protein isolate followed the modified isoelectric precipitation method of Mune Mune and Sogi (2016). A slurry of the defatted flour was prepared by washing 100 g of flour in 1000 ml of distilled water in duplicate after adjusting the pH to 4.5 using 1 M HCl. After washing for 15 min, the slurry was centrifuged at 3800 x g for 20 min and 4 °C and the precipitated protein was re-suspended in distilled water and the pH adjusted to 7 with continuous stirring. The resulting protein suspension was freeze-dried.

#### 2.2.3. Proximate composition of protein isolate

Moisture, ash, total lipid and crude protein (N x 6.25) contents were determined according to AOAC (1990). Crude fibre content of the protein isolate was determined according to Goering and Van Soest (1970).

#### 2.2.4. Heat treatment

Exactly 0.45mg of the Bambara bean protein isolate was suspended in a phosphate buffer at pH 4, 7 and 9 (0.01 M, 45 ml) and stirred for 1 h at 25 °C. Thereafter, 9 ml of the buffer suspension was dispensed in test tubes and heated at 50 °C, 70 °C, 80 °C and 100 °C for 10 min. The heated tubes were cooled to ambient conditions in a water bath and the protein isolate in the tubes used for the determination of hydrophobicity, secondary structure, solubility and emulsifying capacity. Values were compared with the unheated (control) sample.

#### 2.2.5. Hydrophobicity

The bromophenol blue fixation method was used to determine surface hydrophobicity of heat treated samples and the control (Chelh et al., 2006). Aliquots of 500µl of the heat treated samples were mixed with 200µl of BPB (1 mg/ml) and vigorously stirred. The following steps of the procedure were described by Mune et al. (2017) and Mune Mune and Sogi (2016).

#### 2.2.6. Secondary structure

The secondary structure of proteins in the heat-treated samples and the control was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy (Mune Mune and Sogi, 2016; Mune et al., 2017). Briefly,

0.05 mL of the samples was put between two aluminum foils. FTIR spectra were obtained in the wavenumber range of 400–4000 cm<sup>-1</sup> during 32 scans with 4 cm<sup>-1</sup> resolution using a FTIR spectrometer (IRAffinity-1 Shimadzu, Japan). Data were analyzed as described by Mune et al. (2017) and the secondary structural features were calculated from the amide I envelope by non-linear regression fitting of Gaussian peaks of the original spectra. Peaks assignments were generated using the results of Farrell et al. (2001).

#### 2.2.7. Solubility

Aliquots of 1 mL of the protein suspension from the heat treatment and the control were stirred for 30 min and then centrifuged at 4000 rpm for 20 min (Mune Mune and Sogi, 2016). Protein concentration in each supernatant was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1990). Protein solubility was calculated as indicated in Eq. (1):

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

where  $W_1$  was the weight of protein in the supernatant (g),  $W_0$  was the weight of protein in the sample (g).

#### 2.2.8. Emulsifying properties

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

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

ES was determined by heating the emulsion at 80 °C for 30 min before centrifuging at 1100 rpm for 10 min and derived as shown in Eq. (3):

$$\text{Emulsion stability (ES)} = \frac{\text{Height of emulsified layer after heating}}{\text{Height of emulsified layer before heating}} \times 100 \quad (3)$$

#### 2.2.9. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the procedures of Laemmli (1970). The gel system consisted of 12% (w/v) polyacrylamide for the resolving gel (pH 8.8) and 4.5% (w/v) for the stacking gel (pH 6.8). Five milligrams of both flour and the protein isolate of Bambara beans were suspended in 1 mL of distilled water and diluted 25 times before loading. Samples were prepared under reducing conditions using β-mercapto ethanol, heated at 95 °C in a water bath for 5 min, and then centrifuged for 5 min at 5000 rpm. Fifteen microliters of each sample were loaded into the wells. Electrophoretic separation was carried out at 70 V for the stacking gel and at 100 V for the resolving gel. Protein bands were fixed by immersion of the gel in a 10% (v/v) acetic acid solution for 30 min, stained in a 0.1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 solution (Bio-Rad) for 30 min and then destained in 10% (v/v) acetic acid and 10% (v/v) methanol for 40 min.

### 2.3. Statistical analysis

Data analysis and visualization were done using STATISTICA™ (version 5.5, 2002; Statsoft Inc., USA) and SPSS (16.0 version 10.1, 2000, SPSS Inc., USA). Means were compared by the one-way ANOVA applying the Tukey post hoc test for mean separation at  $p < 0.05$  level of significance. Correlation was estimated by the Pearson method. Results are expressed as mean ± standard deviation of triplicate values.

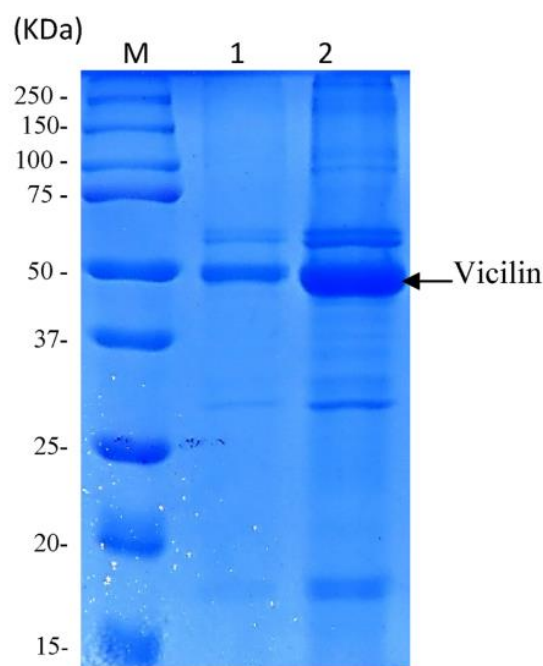


Figure 1. SDS-PAGE patterns of Bambara bean protein. Lane M- Molecular weight standards - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad); Lane 1 -flour of Bambara bean; Lane 2-Bambara bean protein isolate.

### 3. Results and discussion

Protein (81.28%, dwb) was the main component in the protein isolate, which also contained ash (3.71%, dwb), fat (6.17%, dwb) and crude fibre (4.07%, dwb). Moisture content was 3.45%. Similar observations have been reported in previous studies (Mune Mune and Sogi, 2015; Mune Mune et al., 2020).

#### 3.1. Structural characterization

##### 3.1.1. Electrophoretic analysis

The SDS-PAGE pattern of Bambara bean proteins showed specific bands with molecular weight ranging from ~ 17 kDa to ~ 118 kDa (Figure 1; Figure S1 Supplementary material). Generally, protein isolate contained mainly globulins (vicilin) and low amount of albumins. Vicilin is a trimeric or hexameric protein devoid of disulphide bonds that play an important role as seed storage protein. Its molecular weight is reported at  $200.0 \pm 50.0$  kDa (Adebowale et al., 2011; Pernollet and Mosse, 1983). Albumins play metabolic functions in pea such as protease and lectin inhibitors (Lam et al., 2018). Three main bands of vicilin subunits were observed under reducing conditions, with the major band expressing a molecular weight of ~ 50 kDa. The other two medium bands weighed ~ 60 kDa and ~ 66 kDa. Albumins were observed at the top of the gel with molecular weight ~100–118 kDa and, then at the bottom with low molecular weight ~ 17 kDa and ~27 kDa.

##### 3.1.2. Secondary structure of protein

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) is a valuable method for studying conformational changes of proteins in the solid, crystalline and liquid states. Mune Mune et al. (2016; 2018) successfully applied this method and elucidated the secondary structure of legume proteins. The influence of temperature on protein secondary structure at different pH in the amide I region is shown in Table 1 and Figure 2(a,b). The amide I band was further resolved by Fourier self-deconvolution (Figure 2b). Then, the bands were easily assigned as follows:  $\alpha$ -helix:  $1648-1658$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $\beta$ -sheet:  $1616-1640$   $\text{cm}^{-1}$ ;  $\beta$ -turn:  $1660-1700$   $\text{cm}^{-1}$ ; Irregular structure:  $1640-1644$   $\text{cm}^{-1}$  (Farrell et al., 2001; Achouri et al., 2012). In Figure 2a and Table 1, it was observed that  $\beta$  sheet and  $\alpha$  helix were the main secondary structures of Bambara bean protein isolate, with proportions ranging from 15.02 to 67.34 % and 15.47–75.69 %, respectively, depending on pH. In addition, [ $\beta$ -sheet +  $\alpha$ -helix] proportion was found between 73 % (at pH 9 and 70 °C) and 100 % (at pH 9, 50 °C).

High  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix proportion is a main characteristic of compacted globulin storage proteins, and it was also noticed that anti-parallel  $\beta$ -sheet could be formed in aggregated protein molecules (Ellepola et al., 2005). However,  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix proportion behaved differently following heat treatment, depending on pH. At pH 4, heat treatment caused an increase in  $\beta$ -sheet and a decrease in  $\alpha$ -helix, while at pH 7,  $\beta$ -sheet decreased and  $\alpha$ -helix increased proportionally. This observation probably underlined the co-existence of several conformations of protein

Table 1. Effects of heat and pH on Secondary structure (means and standard deviations) of Bambara bean protein isolate.

pH	Temperature	Secondary Structure composition (%)			
		$\beta$ -sheets (%)	$\alpha$ -helix (%)	Irregular structure (%)	$\beta$ -turn (%)
4	25	15.20 $\pm$ 0.51 <sup>e2</sup>	75.69 $\pm$ 2.52 <sup>a1</sup>	1.58 $\pm$ 0.05N <sup>b4</sup>	7.53 $\pm$ 0.25 <sup>c3</sup>
	50	53.57 $\pm$ 1.78 <sup>b1</sup>	33.17 $\pm$ 1.10 <sup>ef2</sup>	9.54 $\pm$ 0.32 <sup>c3</sup>	3.72 $\pm$ 0.12 <sup>d4</sup>
	70	27.80 $\pm$ 0.93 <sup>d2</sup>	61.38 $\pm$ 2.04 <sup>b1</sup>	2.41 $\pm$ 0.08 <sup>b4</sup>	7.24 $\pm$ 0.24 <sup>d3</sup>
	80	29.28 $\pm$ 0.98 <sup>d2</sup>	63.75 $\pm$ 2.12 <sup>b1</sup>	5.59 $\pm$ 0.19 <sup>c3</sup>	2.55 $\pm$ 0.08 <sup>3</sup>
	100	71.80 $\pm$ 2.4 <sup>a1</sup>	23.04 $\pm$ 0.77 <sup>g2</sup>	1.51 $\pm$ 0.05 <sup>b4</sup>	3.65 $\pm$ 0.12 <sup>d3</sup>
7	25	67.34 $\pm$ 2.24 <sup>a1</sup>	15.47 $\pm$ 0.52 <sup>h2</sup>	11.59 $\pm$ 0.38 <sup>b3</sup>	5.6 $\pm$ 0.19 <sup>g4</sup>
	50	45.69 $\pm$ 1.53 <sup>c1</sup>	37.09 $\pm$ 1.24 <sup>ef2</sup>	4.95 $\pm$ 0.17 <sup>ef4</sup>	12.27 $\pm$ 0.41 <sup>d3</sup>
	70	30.73 $\pm$ 1.02 <sup>d2</sup>	46.96 $\pm$ 1.57 <sup>c1</sup>	4.56 $\pm$ 0.15 <sup>g4</sup>	17.75 $\pm$ 0.60 <sup>b3</sup>
	80	20.85 $\pm$ 0.70 <sup>e2</sup>	63.21 $\pm$ 2.11 <sup>b1</sup>	5.80 $\pm$ 0.20 <sup>e4</sup>	10.14 $\pm$ 0.34 <sup>c3</sup>
	100	43.39 $\pm$ 1.45 <sup>c1</sup>	39.64 $\pm$ 1.32 <sup>de2</sup>	12.72 $\pm$ 0.42 <sup>b3</sup>	4.25 $\pm$ 0.14 <sup>h4</sup>
9	25	40.74 $\pm$ 1.36 <sup>c1</sup>	35.00 $\pm$ 1.17 <sup>ef2</sup>	12.570.27 <sup>a4</sup>	16.03 $\pm$ 0.53 <sup>c3</sup>
	50	55.57 $\pm$ 1.85 <sup>b1</sup>	44.43 $\pm$ 1.49 <sup>cd2</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>i3</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k3</sup>
	70	41.76 $\pm$ 1.40 <sup>c1</sup>	31.18 $\pm$ 1.04 <sup>ef2</sup>	5.32 $\pm$ 0.18 <sup>ef4</sup>	21.74 $\pm$ 0.72 <sup>b3</sup>
	80	29.89 $\pm$ 1.00 <sup>d2</sup>	61.51 $\pm$ 2.05 <sup>b1</sup>	1.70 $\pm$ 0.06 <sup>b4</sup>	6.90 $\pm$ 0.23 <sup>g3</sup>
	100	44.89 $\pm$ 1.50 <sup>c1</sup>	46.91 $\pm$ 1.53 <sup>c1</sup>	3.96 $\pm$ 1.29 <sup>g3</sup>	4.24 $\pm$ 0.14 <sup>h3</sup>

Means followed by different letter (a, b, c, d, e, f, g, h, i) in the same column are significantly ( $p < 0.05$ ) different. Means Followed by different number (1, 2, 3, 4, 5) in the same line are significantly ( $p < 0.05$ ) different.

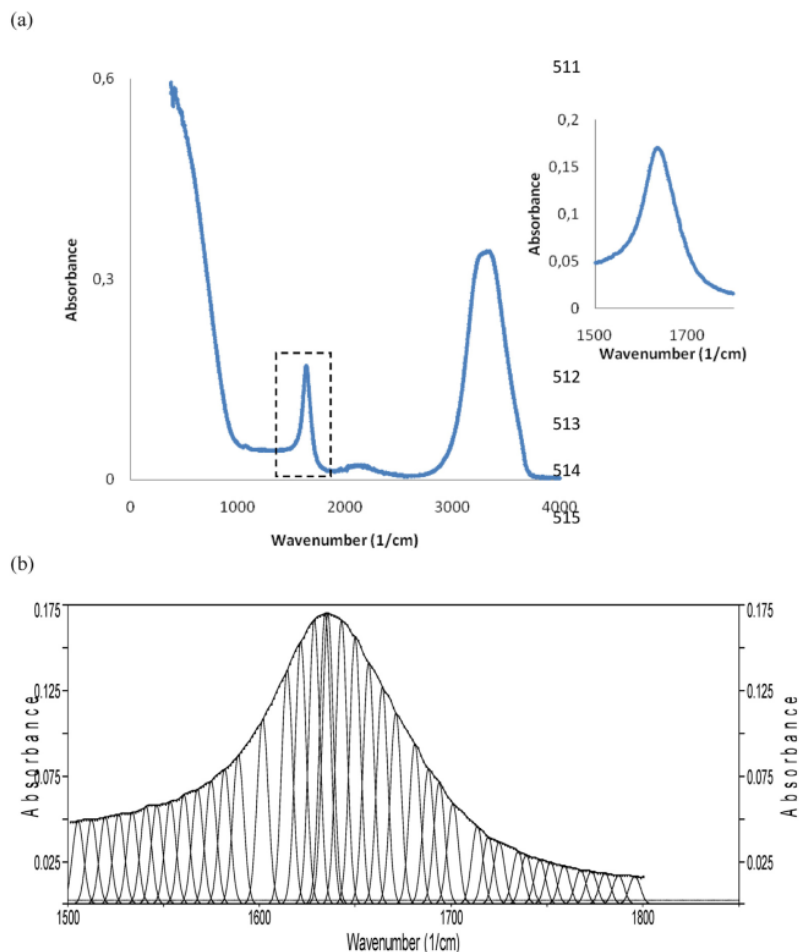


Figure 2. (a–b). Typical FTIR spectra of Bambara bean protein isolate (here at pH 7 and 25 °C) (a) and deconvoluted amide I band (b).

during heating. Furthermore, there was probably inter-conversion between  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix, since correlation between both proportions was significant ( $R^2 = 0.98$ ;  $p < 0.01$ ) during heating at pH 4 and 7. At pH 9, significant ( $p < 0.05$ ) increase in  $\beta$ -sheet proportion was observed at 50 °C compared to untreated sample, and a decrease at 80 °C. At the same pH, heat treatment caused an increased in the  $\alpha$ -helix proportion of protein isolate (except at 70 °C). Irregular structure probably resulted from protein unfolding and denaturation, and high  $\beta$ -turn proportion is a product of protein unfolding of higher order structures. However, high  $\beta$ -turn proportion was important for protein flexibility, which contributed to the stabilization of the water-oil emulsion, increasing globular protein emulsion capacity (Mune Mune and Sogi, 2015).

### 3.2. Physicochemical properties

#### 3.2.1. Hydrophobicity

Surface hydrophobicity of proteins is an important property that eases a quick understanding of solubility, protein-protein interaction and functionality allowing the integration of proteins in food formulation. Protein hydrophobicity is a function of either ionization state of the

chemical functional groups, which results from intrinsic factors (i.e. constitutive amino acids, size, and protein conformation) or extrinsic factors such as solvent (ionic strength and temperature), stirring time and protein concentration. The effect of temperature on hydrophobicity (mg bound BBP/g protein) of the Bambara bean protein isolate at different pH is shown in Figure 3a. As expected, protein hydrophobicity was significantly higher at pH 4 and lower at pH 9. At pH 4, the net charge of protein was around zero then hydrophobic protein-protein interactions were predominant, while at pH 9 the protein is negatively charged and protein-water interactions were predominant. At pH 4, hydrophobicity decreased with temperature up to 70 °C, then increased thereafter. Decrease in hydrophobicity was probably resulting from protein aggregation by the mean of hydrophobic interaction, and the increase was due to partial unfolding and exposure of regions previously buried by steric hindrance of the bulky protein structure. At pH 9, heat treatment caused a decrease in protein hydrophobicity. Decrease in protein hydrophobicity occurred at temperature 50–80 °C, while non-significant differences in hydrophobicity compared to untreated protein showed at 100 °C. Jiang et al. (2015) reported an increase in hydrophobicity with increasing temperature for soy protein isolate at 2% (w/v). Stanciuc et al. (2015)

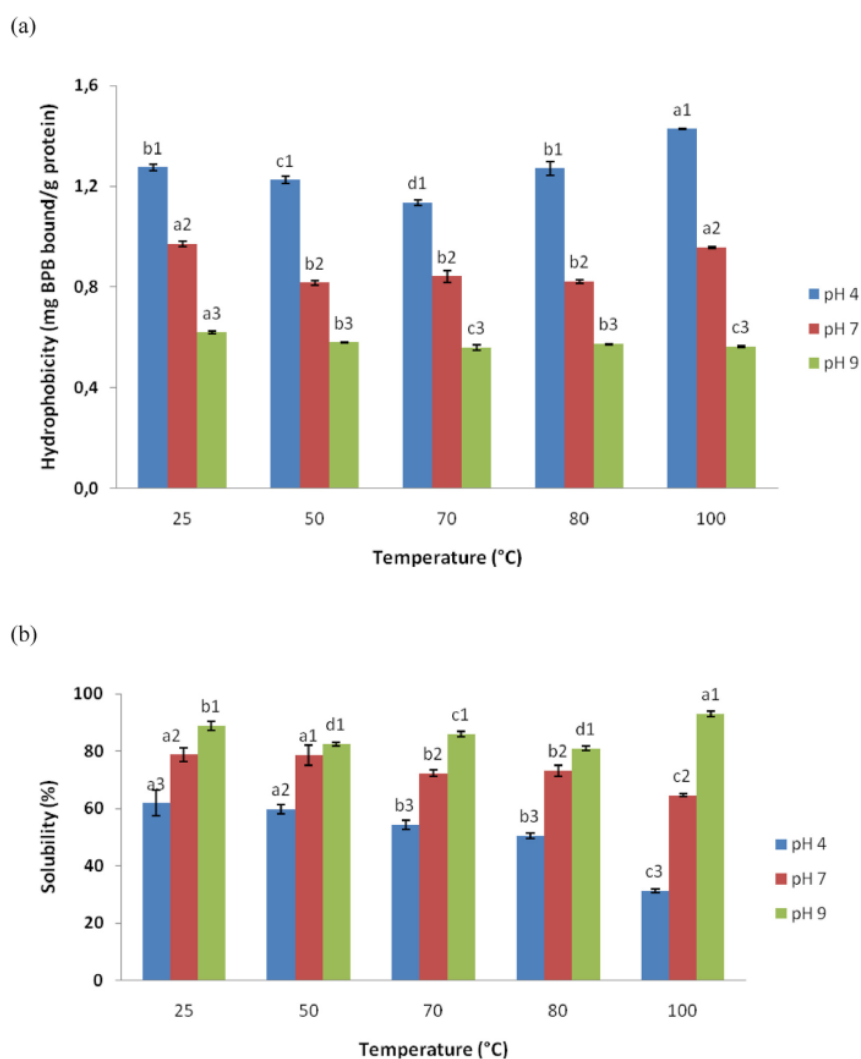


Figure 3. (a–b). Effects of heat and pH on surface hydrophobicity (a) and protein solubility (b) of Bambara bean protein isolate. Means followed by different letters at same pH are significantly ( $p < 0.05$ ) different. Means followed by different numbers (1,2,3) at same temperature are significantly ( $p < 0.05$ ) different.

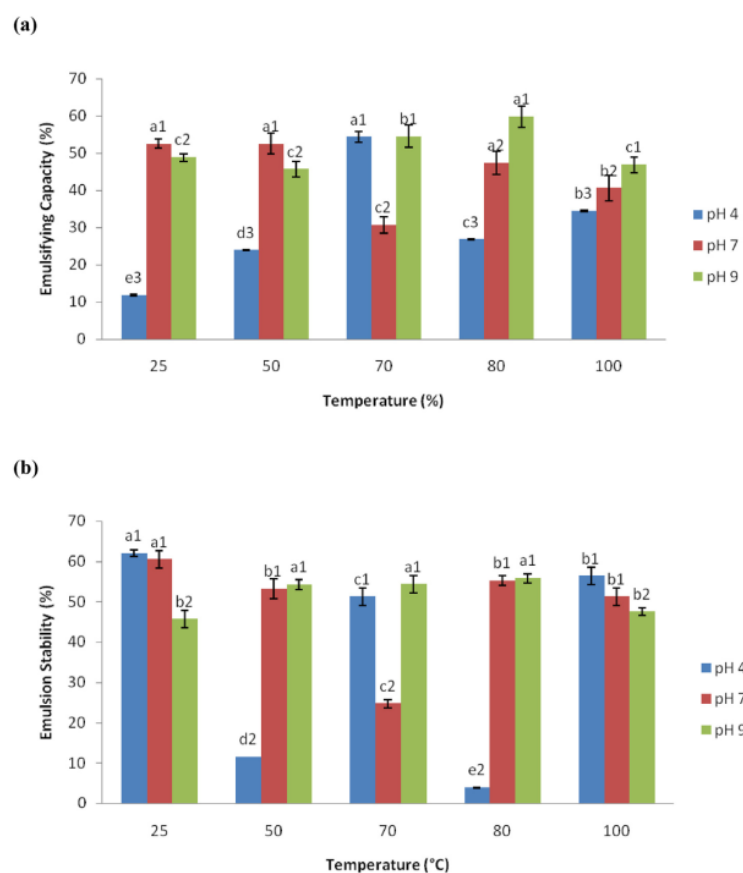
noted that change in surface hydrophobicity reflected change in the structure of horseradish peroxidase in response to heat treatment.

### 3.2.2. Solubility of protein

Protein solubility correlates to foam formation, emulsification, gelation and as such defines the usability of proteins in liquid foods and beverages (Mune et al., 2017; Zayas, 1997). Effect of temperature on the solubility of the Bambara bean protein isolate at different pH is shown in Figure 3b. The shape of the influence of temperature on protein solubility varies at different pH. The solubility of globular proteins generally correlates negatively with hydrophobicity (Mune Mune and Sogi, 2015). In this regard, the solubility of vicilin protein isolate was significantly lower at pH 4, and higher at pH 9. This low protein solubility at pH 4 is

consistent with that of several legumes with isoelectric pH between 4 and 5 (Chavan et al., 2001; Mwasaru et al., 1999; Hermansson, 1979). The negative charge of legume proteins at basic pH explains its high solubility, by maintaining repulsive electrostatic interactions between neighboring side chains, and promoting oligomer dissociation and polypeptide unfolding (Moure et al., 2006). At pH 4 and 7, non-significant difference in solubility was found at 50 °C compared to untreated protein, afterward solubility decreased at temperatures 70–100 °C. The lower protein solubility (31%) occurred at pH 4 and the highest (93%) at pH 9, at 100 °C. The protein solubility behavior upon heat treatment varies with the source of protein. Lee et al. (2019) although working on Yellow Mealworm Larvae proteins also noted that solubility varies not only with temperature but also with the source of the protein.





**Figure 4.** (a–b). Effects of heat and pH on emulsion stability (a) and emulsion capacity (b) of Bambara groundnut isolate protein. Means followed by different letters at same pH are significantly ( $p < 0.05$ ) different. Means followed by different numbers (1,2,3) at same temperature are significantly ( $p < 0.05$ ) different.

### 3.3. Emulsifying properties

#### 3.3.1. Emulsifying capacity

According to Mune et al. (2017), emulsifying properties are essential in developing novel plant foods. This is justified by the influence of solubility, hydrophobicity and molecular flexibility on the emulsifying properties of globular proteins (Zayas, 1997). The influence of temperature on the emulsifying properties of the Bambara bean protein isolate at different pH is shown in Figure 4(a,b). Emulsifying capacity (EC) and emulsion stability (ES) were determined at pH 4, 7 and 9. For utilization of Bambara bean protein isolate without heat treatment in applications where high EC is required, it could be recommended to manage under neutral or basic pH. Mune Mune and Sogi (2015) and Carvalho et al. (2006) found similar results. It was also found that EC of protein isolate was significantly higher at pH 7 and 9 compared to pH 4 at all temperatures, except for the isolate treated at 70 °C. Generally, adequate combination of solubility, hydrophobicity and molecular flexibility account for high EC of globular proteins. Heat treatment increased EC of vicilin isolate at pH 4. The maximum EC (54.4%) occurred for the isolate at 70 °C. At pH 7, non-significant difference was found between EC of the untreated protein isolate and those treated at 50 and 80 °C (52%), and EC decreased for the isolate treated at 70 and 100 °C. At pH 9, increase in EC was observed for the vicilin isolate at 70 °C (55%) and 80 °C (60%)

compared to control, while non-significant difference was found for the isolate treated at 50 and 100 °C. Solubility probably accounted for high EC at pH 7 and 9, since it conferred to the proteins a better ability to diffuse to the oil/water interface then lowering interfacial tension. In another hand, surface hydrophobicity and molecular flexibility of proteins played important role for EC at pH 4.

#### 3.3.2. Emulsion stability

The influence of temperature on the ES of the Bambara bean protein isolate varied according to the pH applied Figure 4(a,b). The untreated protein isolate (at 25 °C) exhibited better ES (62%) at pH 4 and 7. At pH 9, heat treatment at 50–80 °C increased ES of protein isolate (55%), which decreased to 48% when the isolate was heated to 100 °C. Similar results were observed by Mwasaru et al. (1999) who noticed that emulsion stability of the *Cajanus cajan* protein isolate was maximal at pH 4. In addition, Mune et al. (2018) pointed out that High ES required molecular rearrangement of the adsorbed proteins at the oil-water interface to form a thick layer, which prevents coalescence with low repulsive forces between the proteins. In another hand, at pH 4 protein isolate heated at 50 and 80 °C showed low ES (12 and 4%, respectively). At pH 7, non-significant difference ( $p > 0.05$ ) in ES (55%) was observed for isolate heated at 50, 80 and 100 °C, and heat treatment at 70 °C produced protein isolate with lower ES (25%). Molecular flexibility of globular

proteins induced by partial unfolding probably played important role in ES of protein isolate, since it enhanced rearrangement of protein at the oil-water interface.

#### 4. Conclusion

We studied the effect of temperature on secondary structure, physico-chemical and emulsifying properties of Bambara bean protein isolate at different pH conditions. The SDS-PAGE analysis indicated that vicilin (7S globulin) was the main protein in the protein isolate.  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix were the main secondary structures found in Bambara bean protein isolate, and heat treatment produced partial unfolding and aggregation of proteins. Solubility and hydrophobicity were also affected by heat treatment at different pH, and high hydrophobicity was observed at pH 4, while high solubility was found at pH 9. Emulsifying properties were also significantly affected by changes in pH and temperature. Briefly, adequate control of pH and heat treatment could be important for the application of Bambara bean protein in industrial products where high emulsifying properties are required.

#### Declarations

##### Author contribution statement

Simon Pierre NGUI: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Emilienne NYOBE, Christian BakwoBassogog: Performed the experiments; Wrote the paper.

Erasmus NchujiTang: Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Samuel René Minka: Conceived and designed the experiments; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Martin Alain MuneMune: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

##### Funding statement

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

##### Data availability statement

Data will be made available on request.

##### Declaration of interests statement

The authors declare no conflict of interest.

##### Additional information

Supplementary content related to this article has been published online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07824>.

##### Acknowledgements

This work benefited resource provision from the Food and Nutrition Research Centre (IMP) of the Ministry of Scientific Research and Innovation, Cameroon.

##### References

- Achouri, A., Nail, V., Boye, J.I., 2012. Sesame protein isolate: fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Res. Int.* 46, 360–369.
- Adebowale, Y.A., Schwarzenbolz, U., Henle, T., 2011. Protein isolates from Bambara groundnut (*Voandzeia subterranean* L.): chemical characterization and functional

- properties. *Int. J. Food Prop.* 14 (4), 758–775. Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official methods of analysis (15th ed.). Arlington, TX: Author.
- Aoac, 1990. Official Methods of Analysis, fifteenth ed. Association of Official Analytical Chemists. (USA), Arlington.
- Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A., 2012. High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11 (3), 307–322.
- Carvalho, A.V., Garcia, N.H.P., Amaya-Farfán, J., 2006. Physico-chemical properties of the flour, protein concentrate, and protein isolate of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum) seed. *J. Food Sci.* 71 (8), S573–S578.
- Chavan, U.D., McKensie, D.B., Shahidi, F., 2001. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrusmaritimus* L.). *Food Chem.* 74, 177–187.
- Chelb, I., Gatellier, P., Sante-Lhoutellier, V., 2006. Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci.* 74, 681–683.
- Cui, C., Zhao, M., Yuan, B., Zhang, Y., Ren, J., 2013. Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates. *J. Food Sci.* 78 (12), C1871–C1877.
- Ellepola, S.W., Choi, S.M., Ma, C.Y., 2005. Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 37 (1–2), 12–20.
- Eltayeb, A.R.S., Ali, A.O., Abou-Arab, A.A., Abu-Salem, F.M., 2011. Chemical composition and functional properties of flour and protein isolate extracted from Bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *Afr. J. Food Sci.* 5 (2), 82–90.
- Falade, K.O., Ogundele, O.M., Ogunshie, A.O., Fayemi, O.E., Ocloo, F.C., 2014. Physico-chemical, sensory and microbiological characteristics of plain yoghurt from Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) and soybeans (*Glycine max*). *J. Food Sci. Technol.* 1–8.
- Farrell Jr., H.M., Wickham, E.D., Unruh, J.J., Qi, P.X., Hoagland, P.D., 2001. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of b-casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids* 15, 341–354.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Procedures and Some Applications). Agriculture handbook, agricultural research service, USA.
- Goli, A., Begemann, F., Ng, N., 1997. Characterization and evaluation of IITA's Bambara groundnut collection. In: Proceedings of Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut, pp. 101–111.
- Hermansson, A.M., 1979. Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 272–279.
- Hillocks, R., Bennett, C., Mponda, O., 2012. Bambara nut: a review of utilization, market potential and crop improvement. *Afr. Crop Sci. J.* 20 (1), 1–16.
- Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B., Zhou, L., 2015. Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *Int. J. Food Prop.* 18 (5), 1059–1074.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680.
- Lam, A.C.Y., Can Karaca, A., Tyler, R.T., Nickerson, M.T., 2018. Pea protein isolates: structure, extraction, and functionality. *Food Rev. Int.* 34 (2), 126–147.
- Lawal, O.S., 2004. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chem.* 86, 345–355.
- Lee, H.-jung, Kim, Ji-han, Da-som Ji, Lee, Chi-ho, 2019. Effects of heating time and temperature on functional properties of proteins of Yellow Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor* L.). *Food Sci. Anim. Res.* 39 (2), 296–308.
- Maguire, L.S., O'sullivan, S.M., Galvin, K., O'connor, T.P., O'brien, N.M., 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55 (3), 171–178.
- Mayes, S., Ho, W.K., Chai, H.H., Gao, et al., 2019. Bambara groundnut: an exemplar underutilized legume for resilience under climate change. *Planta* 250, 803–820.
- Mazahib, A., Nuha, M., Salawa, I., Babiker, E., 2013. Some nutritional attributes of Bambara groundnut as influenced by domestic processing. *Int. Food Res. J.* 20 (3), 1165–1171.
- Mc Watters, K.H., Ouedraogo, J.B., Ressurrection, A.V.A., Hung, Y.-C., Phillips, R.D., 2003. Physical and sensory characteristics of sugar cookies containing mixtures of wheat, fonio (*Digitaria exilis*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) flours. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 403–410.
- Moure, A., Sineiro, J., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2006. Functionality of oilseed protein products. *Rev. Food Res. Int.* 39 (9), 945–963.
- Mune Mune, M.A., Sogi, D.S., 2015. Functional properties of protein concentrates of cowpea and Bambara bean involving different drying techniques. *J. Food Process. Preserv.* 39 (6), 2304–2313.
- Mune Mune, M.A., Sogi, D.S., 2016. Emulsifying and foaming properties of protein concentrates prepared from cowpea and Bambara bean using different drying methods. *Int. J. Food Prop.* 19 (2), 371–384.
- Mune Mune, M.A., Sogi, D.S., Minka, S.R., 2017. Response surface methodology for investigating structure-function relationship of grain legume proteins. *J. Food Process. Preserv.*, e13524
- Mune Mune, M.A., Bayiga, A., Nyobe, E.C., Bassogog, C.B., Minka, S.R., 2018. Protein quality, secondary structure and effect of physicochemical factors on emulsifying properties of *Irvingia gabonensis* almonds. *Curr. Nutr. Food Sci.* 14, 1–19.
- Mune Mune, M.A., Stănciuc, N., Grigore-Gurgu, L., Aprodou, I., Borda, D., 2020. Structural changes induced by high pressure processing in Bambara bean proteins at different pH. *LWT Food Sci. Technol.* 124, 109–187.
- Murevanhema, Y.Y., Jideani, V.A., 2013. Potential of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc) milk as a probiotic beverage—a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (9), 954–967.
- Mwasaru, M.A., Muhammad, H., bakar, J., Che Man, Y.B., 1999. Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanuscajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. physicochemical properties. *Food Chem.* 67 (4), 435–443.

S.P. Ngui et al.

Heliyon 7 (2021) e07824

- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., Phillips, G., 2014. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids* 39, 301–303.
- Okafor, J., Okafor, G., Leelavathi, K., Bhagya, S., Elemo, G., 2015. Effect of roasted Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) fortification on quality and acceptability of biscuits. *Pakistan J. Nutr.* 14 (10), 653–657.
- Pasquet, R.S., Fosto, M., 1991. Les légumineuses alimentaires du Cameroun, Premiers résultats. In: Boutrais, J. (Ed.), *Du politique à l'économie, études historiques dans le bassin du Lac Tchad*. ORSTOM, Paris, pp. 317–360.
- Pernollet, J.C., Mosse, J., 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage. In: Daussant, J., Mosse, J., Vaughan, J. (Eds.), *Seed Proteins*. Academic Press, New York, pp. 155–192.
- Stanciu, N., Aprodu, J., Ionița, E., Bahrim, G., Răpeanu, G., 2015. Exploring the process–structure–function relationship of horseradish peroxidase through investigation of pH- and heat induced conformational changes. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 147, 43–50.
- Thammarat, K., Leena, N., Punnance, S., Soottawat, B., 2015. Functional and Antioxidative properties of Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) protein hydrolysates. *Int. Food Res. J.* 22 (4), 1584–1595.
- Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., Guamis, B., 2002. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 3 (4), 295–307.
- Yao, D.N., Kouassi, K.N., Erba, D., Scazzino, F., Pellegrini, N., Casiraghi, M.C., 2015. Nutritive evaluation of the Bambara groundnut Ci12 Landrace [*Vignasubterranea* (L.) Verdc. (Fabaceae)] produced in Côte d'Ivoire. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (9), 21428–21441.
- Zayas, J.F., 1997. *Functionality of Proteins in Food*. Springer, New York, NY, p. 373.