

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie **Filière** : Sciences Biologiques
Spécialité : Agro-ressources, Bioprocédés et Sciences Alimentaires

Présentée par
Mme BENHAMMOUCHE Tassadit Epse OUYAHIA

Thème

Valorisation de produits de la filière de *Moringa Oleifera*

Soutenue le : 02 Mars 2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
M. BEN HAMICHE Nadir	MCA	Univ. de Bejaia	Président
M. CHIKHOUNE Amirouche	MCA	Univ. de Bejaia	Rapporteur
M. BOUDRIES Hafid	Professeur	Univ. de Bejaia	Examineur
M. KHALED-KHODJA Yazid	MCA	Univ. de Djelfa	Examineur

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

Tout d'abord, je remercie LE BON DIEU qui m'a accordé la santé, la patience et le courage afin de mener ce travail à terme.

* * * * *

Mis à part, l'accomplissement de ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien de nombreuses personnes à qui je voudrai adresser mes sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent au Professeur ZAIDI FARID de l'université de Bejaia, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire « Nutrition et Alimentation ».

Une profonde gratitude est adressée à mon directeur de thèse Mr CHIKHOUNE AMIROUCHE pour son encadrement, sa disponibilité, son aide et efficacité. Ses conseils et toute la confiance qu'il m'a accordée m'ont permis d'aller de l'avant et d'avancer pour bien mener cette recherche.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent aux membres du Jury :
Monsieur BEN HAMICHE NADIR, maitre de conférences à l'université de Bejaia, pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de présider le Jury et d'évaluer la présente thèse.

Mes remerciements vont également à Messieurs Professeur BOUDERIES HAFID de l'université de Bejaia, KHALED-KHODJA YAZID, maitre de conférences à l'université de Djelfa, qui ont accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examineurs. Vos remarques et suggestions ne feront qu'enrichir et améliorer la qualité de ce document.

Je ne remercierai jamais assez le Professeur ISABELE FERREIRA de l'Université de Porto-Portugal, pour l'honneur qu'elle m'a fait de m'accueillir au sein de son équipe de recherche, ce qui a permis à ce travail d'avancer, et à moi de profiter et d'apprendre de ses compétences scientifiques et son expérience de recherche. Je voudrai aussi lui témoigner ma reconnaissance pour sa disponibilité sans faille et ses conseils judicieux.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire Bromatologie et Hydrologie de la FFUP- Portugal, et plus précisément les membres de l'équipe du Pr. ISABELLE FERRERA (Dr ZITA MARTINES, Dr ARMINDO MELO, Dr MIGUEL FEIRA, Dr SUSANA PINHO, Dr EULALIA, Dr EDGAR PINHO) pour m'avoir accompagné et soutenu tout au long de mon séjour à Porto, pour leur sympathie et les services rendus.

Remerciement

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à madame HASSISSENE NADIA, pour ses précieux conseils et sa contribution dans le présent document.

Mes remerciements vont également à monsieur BACHIR BEY MUSTAPHA., maître de Conférence à l'université de Bejaia, pour son aide et orientations durant l'analyse statistique des résultats.

Je tiens à remercier particulièrement toutes mes collègues et amies (CYLIA, MERIEME, MESSAAD, FAZIA, LILA, KARIMA, HASSINA, LYNDIA, WEZNA et autres) pour les bons moments passés ensemble, notamment pour leurs conseils et amitié, particulièrement, SARA de m'avoir aidé et accompagnée au cours de ces dernières années.

Enfin, je souhaite exprimer toute ma gratitude à tous ceux et celles que je n'ai pas pu citer et qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail grâce à leurs soutiens et encouragements.

Dédicaces

Je dédie cette thèse :

La mémoire de ma mère qui m'est toujours la plus chère, que dieu le miséricordieux ait son âme.

A mon chère père, l'archétype de la bonté et de la fidélité qui était toujours à mes côtés dans les moments les plus difficiles de ma vie. Pour tous ses sacrifices, ses encouragements et à qui, cette thèse revient en premier.

A mon très cher mari qui a toujours cru en moi, pour tout ce qu'il représente pour moi, son soutien, sa présence, tout ce qu'il m'apporte au quotidien.

A ma chère petite fille.

A mon cher frère, mes chères sœurs et leurs familles.

A toute ma famille.

A toute ma belle-famille, particulièrement à mes chers beaux-parents.

A mes amis et collègues.

Tassadit

Table des Matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

I . *Moringa oleifera*: Etat de l'art

I-1 Origine, répartition géographique et nomenclature.....	5
I-2 Description botanique.....	5
I-3 Conditions de cultures	6
I-4 <i>Moringa Oleifera</i> , l'arbre de vie a utilisations multiples	7
I-5 Feuilles de <i>Moringa Oleifera</i> , un potentiel polyvalent.....	7
I-5-1 Potentiel nutritionnel, une source de protéines végétales et polyphénols	8
I-5-2 Potentiel pharmacologique	9
I-5-3 Potentiel d'application comme ingrédient fonctionnel	9

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

II-1 Les pâtes alimentaires, origine, consommation et intérêts.....	11
II-2 Composition des pâtes alimentaires	11
II-2-1 Matière première.....	11
II-2-1-1 La semoule	12
II-2-1-2 L'eau.....	12
II-2-2 Composition biochimique.....	13
II-3 Les paramètres d'évaluation de la qualité des pâtes alimentaires.....	14
II-4 Intérêts et méthodes d'enrichissement des pâtes alimentaires	15

III. Les protéines végétales

III-1 Les protéines végétales, une alternative aux sources animales	17
III-2 Les paramètres d'évaluation de la qualité nutritionnelle de protéines.....	18
III-2-1 La composition en acides aminés.....	18
III-2-2 L'estimation des indices chimiques	19
III-2-3 La digestibilité de protéines	19
III-3 Les facteurs limitants de la qualité nutritionnelle des protéines végétales	20
III-4 Les méthodes d'extraction de protéines végétales et leurs concentrations	20
III-4-1 Méthodes d'extractions physiques.....	21
III-4-2 Méthodes d'extractions chimiques	21
III-4-3 Méthodes d'extractions enzymatiques.....	22
III-5 Modalités de la mise en application industrielle des protéines végétales	22
III-5.1 Denrées alimentaires destinées à des fins médicales spéciales (DADFMS).....	23

Table des Matières

Partie expérimentale

I. Caractérisation de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*

I.1 Matériel et méthodes.....	25
I.1.1 Préparation du matériel végétal	25
I.1.1.1 Séchage.....	25
I.1.1.2 Broyage et Tamisage	25
I.1.2 Analyses physicochimiques de la poudre.....	26
I.1.2.1 Test de couleur.....	26
I.1.2.2 Taux d'humidité.....	26
I.1.2.3 Teneur en cendres	26
I.1.2.4 Teneur en lipides.....	26
I.1.2.5 Détermination des fibres alimentaires.....	27
I.1.2.6 Détermination des minéraux.....	27
I.1.2.7 Détermination de la teneur en protéines.....	28
I.1.3 Evaluation de la qualité proteique.....	29
I.1.3.1 Determinatio n du profil d'acides aminés	29
I.1.3.2 Digestibilités <i>in vitro</i> des protéines.....	30
I.1.4 Teneur en composés phénoliques et potentiel antioxydant.....	32
I.1.4.1 Extraction des composés phénoliques.....	32
I.1.4.2 Dosage des composés phénoliques	32
I.1.4.2.1 Dosage des phénols totaux solubles.....	32
I.1.4.2.2 Dosage des flavonoïdes	32
I.1.4.2.3 Dosage des tannins condensés	33
I.1.4.2.4 Dosage des tannins hydrolysables.....	33
I.1.4.3 Potentiel antioxydant des extraits	34
I.1.4.3.1 Activité antiradicalaire du radical DPPH	34
I.1.4.3.2 Le pouvoir réducteur du fer	34
I.1.4.3.3 Chélation du fer ferreux	35
I.1.5 Analyse statistique	35
I.2.Résultats	36
I.2.1 Analyses physicochimiques de la poudre.....	36
I.2.1.1 Test de couleur.....	36
I.2.1.2 Composition biochimique globale	36
I.2.2 Qualité proteique de la poudre de feuilles de <i>Moringa</i>	38
I.2.2.1 Profil d'acides aminés	38
I.2.2.2 Digestibilité <i>in vitro</i> des proteines.....	39
I.2.3 Teneur en composés phénoliques et potentiel antioxydant.....	40
I.2.3.1 Teneur en phénols totaux solubles	40
I.2.3.2 Teneur en flavonoïdes	41
I.2.3.3 Teneur en Tanins hydrolysables	41
I.2.3.4 Teneur en Tanins condensés.....	42
I.2.4 Potentiel antioxydant.....	43

Table des Matières

I.2.4.1	Activité anti radicalaire du DPPH.....	43
I.2.4.2	Chélation du fer ferreux	44
I.2.4.3	Le pouvoir réducteur	45
I.3.	Discussion	45

II. Formulation et qualité nutritionnelle de pâtes alimentaires enrichies

II.1.	Matériel et méthodes.....	50
II.1.1	Matières premières.....	50
II.1.2	formulation des pâtes alimentaires	50
II.1.3	Préparation des échantillons de pâtes.....	50
II.1.4	Evaluation de la qualité de cuisson des pâtes	51
II.1.5	Analyses physicochimiques des pâtes	52
II.1.5.1	Test de couleur des pâtes.....	52
II.1.5.2	Composition chimique globale	52
II.1.6	Effet de l'enrichissement sur la qualité protéique des pâtes.....	52
II.1.6.1	Profil d'acides aminés.....	52
A)	Scores d'acides aminés essentiels	52
B)	Indice d'acides aminés essentiels	53
C)	Rapport d'efficacité protéique	53
D)	Calcul d'autres paramètres de qualité des protéines	53
II.1.6.2	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines de pâtes.....	53
II.1.7	Effet de l'enrichissement sur les composés phénoliques et le potentiel antioxydant des pâtes.....	53
II.1.7.1	Extraction et dosages des composés phénoliques.....	53
II.1.7.2	Evaluation du potentiel antioxydant des pâtes.....	54
II.1.8	Analyse statistique.....	54
II.2	Résultats.....	54
II.2.1	Qualité de cuisson des pâtes.....	54
II.2.2	La couleur des pâtes.....	55
II.2.3	Composition biochimique globale des pâtes.....	56
II.2.4	La qualité protéique des pâtes.....	57
II.2.4.1	Profil d'acides aminés.....	57
II.2.4.2	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines des pâtes.....	62
II.2.5	Teneur en composés phénoliques et potentiel antioxydant des pâtes.....	62
II.2.5.1	Teneur en composés phénoliques des pâtes.....	62
II.2.5.2	Activité antioxydante des pâtes.....	64
II.3	Discussion.....	67

III Concentré protéique de *Moringa oleifera* : Optimisation des conditions d'extraction, production et caractérisation

III.1	Matériel et méthodes.....	75
-------	---------------------------	----

Table des Matières

III.1.1 Préparation du matériel végétal	75
III.1.2 Composition chimique globale des feuilles delipidées.....	75
III.1.3 Optimisation des conditions d'extraction enzymatique de protéines de feuilles de <i>Moringa Oleifera</i> par RSM.....	75
III.1.3.1 Analyse par la méthode séquentielle factorielle.....	75
III.1.3.2 Conception du composite centrale (Central Composite Design (CCD))	76
III.1.3.3 Détermination des conditions optimales d'extraction.....	76
III.1.3.4 Rendement d'extraction de la protéine végétale.....	76
III.1.4 Evaluation de la qualité protéique du concentré obtenu.....	77
III.1.4.1 Profil d'acides aminés.....	77
III.1.4.2 Digestibilité <i>in vitro</i> de protéines.....	77
III.1.5 Analyse statistique.....	77
III.2 Résultats.	77
III.2.1 Composition chimique globale	77
III.2.2 Optimisation des conditions d'extraction enzymatique des protéines	78
III.2.2.1 Analyse des résultats obtenus par la méthode séquentielle factorielle	78
III.2.2.2 Analyse des résultats obtenus par la conception du composite centrale	79
III.2.2.3 Analyse des surfaces de réponses.....	80
III.2.2.4 Validation des conditions optimales.....	82
III.2.3 Qualité protéique du concentré	82
III.2.3.1 Profil l'acide aminés	82
III.2.3.2 Le score d'acides aminés essentiels	83
III.2.3.3 L'indice d'acides aminés essentiels	84
III. 2.3.4 Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines	84
III.3 Discussion.....	85
Conclusion générale et perspectives	88
Références bibliographique	90
Annexes	
Productions scientifiques	

AA: Amino Acid

AOAC: Association of Official Analysis Chemists

BHA: Butyl hydroxyanisole

BHT: Butyl hydroxytoluène

CCD: Central Composite Design

DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

EAAS: Essential Amino Acid Score

EAAI: Essential Amino Acid Index

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic

Eq: Equivalent

E/S: Enzyme/ Substrat

FAO: Food and Agriculture Organization

FBG: Fungal Beta-Glucanase Units

FDA: Food and Drug Administration

FIDA : Fonds international de développement agricole

FMOC : Fluorenylméthyle

HCl: Acide Chlorhydrique

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

LSD: Fisher's least significant differences

Min : minutes

MO : *Moringa Oleifera*

MODL : *Moringa Oleifera* Deffated Leaves

MS : Matière sèche

NaOH : Sodium Hydroxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA : O- phtaldialdéhyde

PAM : Programme alimentaire mondial

Pc : Proteine concentrate

PER : Proteine Efficacity Ratio

pH : Potentiel d'Hydrogène

RSM : Response Surface Methodology

UNICEF : Fonds des Nations Unies pour l'enfance

UV : Ultraviolet

U: Unité enzymatique

SIF: Stimulated Intestinal Fluid

SGF: Stimulated Gastrique Fluid

SSF: Stimulated Salivary Fluid

WHO: World Health Organization

W/v : Weight / volume

∑AAA: Total Aromatic Amino Acids

∑SAA: Total Sulfur Amino Acids

∑EAA: Total Essential Amino Acids

∑NEAA: Total Non-Essential Amino Acids

∑AA: Total amino acids

Figure 01	Arbre et différentes parties de <i>Moringa oleifera</i>	06
Figure 02	Utilisations traditionnelles et industrielles des différentes parties de Moringa	07
Figure 03	Photographie de la poudre de Feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	25
Figure 04	Diagramme de processus de digestibilité <i>in vitro</i> de protéine INFOGEST digestion	31
Figure 05	Teneur en phénols totaux solubles de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	40
Figure06	Teneur en flavonoïdes de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	41
Figure 07	Teneur en Tanins hydrolysables de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	42
Figure 08	Teneur en tannins condensés de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	43
Figure 09	Activité antiradicalaire du DPPH des extraits de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	43
Figure 10	Chélation du fer des extraits de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	44
Figure 11	Pouvoir réducteur des extraits de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	45
Figure 12	Pâtes alimentaires contrôles et enrichies avec la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	51
Figure 13	effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur les propriétés culinaires des pâtes alimentaires	54
Figure 14	Indice d'acides aminés des pâtes alimentaires enrichies avec la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> par rapport au modèle de score provisoire de FAO/OMS	60
Figure 15	effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur la teneurs en composés phénoliques des pâtes alimentaires crues et cuites	63
Figure 16	effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur la teneurs en flavonoïdes des pâtes alimentaires crues et cuites	64
Figure 17	Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur la l'activité inhibitrice de radical libre DPPH des extraits pâtes alimentaires crues et cuites	65
Figure 18	Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur la chélation de fer des extraits de pâtes alimentaires crues et cuites	66
Figure 19	Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur le pouvoir réducteur des extraits de pâtes alimentaires crues et cuites	67
Figure 20	courbes de surfaces de réponses montrant l'effet de variables sur l'extraction des protéines à partir de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	81
Figure 21	Evaluation du Score d'acides aminés essentiels par rapport au modèle de score provisoire FAO/WHO, de feuilles <i>Moringa oleifera</i> et leur concentré protéique	83
Figure 22	Evaluation de l'indice d'acide aminé essentiels par rapport au modèle de score provisoire FAO/OMS de feuilles Moringa Oleifera et leur concentré protéique	84

Liste des tableaux

Tableau I	Classification systématique de l'espèce <i>Moringa oleifera</i>	05
Tableau II	Composition chimique de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	08
Tableau III	Potentiel d'enrichissement des aliments en feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	10
Tableau IV	Distribution en pourcentage des principaux nutriments dans le grain de blé	12
Tableau V	Composition biochimique des pâtes alimentaires	13
Tableau VI	Les ingrédients fonctionnels utilisés pour la fortification des pâtes alimentaires	16
Tableau VII	Acides aminés indispensables et non indispensables	19
Tableau VIII	Résultats de couleurs de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> .	36
Tableau IX	Composition chimique globale de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	37
Tableau X	Profil en acides aminés de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> par rapport au schéma de notation provisoire de la FAO/OMS	38
Tableau XI	La digestibilité <i>in vitro</i> de protéines de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	39
Tableau XII	Paramètres de couleur des pâtes préparées	55
Tableau XIII	Effet de l'enrichissement en poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur la composition biochimique des pâtes alimentaires crues et cuites	56
Tableau XIV	Effet de la substitution et de la cuisson sur de le profil en acides aminés	57
Tableau XV	Score d'acides aminés (SAAE) des pâtes alimentaires (crues et cuites) par rapport au modèle de score provisoire de la FAO/OMS 2007.	59
Tableau XVI	Effet de l'addition de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur le rapport d'efficacité protéique des pâtes alimentaires crues et cuites	61
Tableau XVII	Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> sur la digestibilité <i>in vitro</i> des protéines de pâtes alimentaires	62
Tableau XVIII	Composition chimique de la poudre de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> délipidée	78
Tableau XIX	Plan factoriel fractionnaire à deux niveaux (2 ⁵ -1) et réponse expérimentale obtenue pour l'extraction enzymatic de protéines de <i>Moringa oleifera</i> .	78
Tableau XX	Niveau des variables codés utilisés dans le CCD pour l'optimisation des conditions d'extraction des protéines.	79
Tableau XXI	Analyse de la variance (ANOVA) du modèle d'ajustement de surface quadratique pour l'extraction de protéines.	80
Tableau XXII	Comparaison du profil d'acides aminés des feuilles de <i>Moringa oleifera</i> délipidées et de leur concentré protéique par rapport au schéma de notation provisoire de la FAO/WHO.	82
Tableau XXIII	Evaluation de la digestibilité <i>in vitro</i> de protéines de feuilles de <i>Moringa oleifera</i> et de leur concentre proteique	85

INTRODUCTION GENERALE

L'ampleur de l'augmentation de la population mondiale, qui devrait atteindre les 9 milliards en 2050 et dernièrement celle de la pandémie du covid-19 sur les systèmes de production alimentaires, doivent être adaptés pour répondre aux enjeux de l'alimentation durable (FAO, 2020).

En effet, le défi actuel consiste à fournir à l'ensemble de la population des régimes alimentaires sains et culturellement acceptables, issus de systèmes de production minimisant l'impact environnemental et économiquement viables. L'apport en protéines occupe une place importante dans ces préoccupations (FAO, 2020), leur demande mondiale accentuée crée un grand défi pour trouver des sources de protéines alternatives, durables et de haute valeur biologique (Sari *et al.*, 2015; Guéguen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

Les protéines végétales sont considérées comme un potentiel alternatif, d'ingrédients fonctionnels polyvalents ou des composants biologiquement actifs en plus d'être des nutriments essentiels (Du *et al.*, 2014). Elle présentent une grande diversité de structures et de propriétés en fonction de leur origine botanique, de la localisation dans la plante et des technologies mises en œuvre (Guéguen *et al.*, 2016).

Les protéines vertes, ou les protéines de feuilles ont été reconnues par la FAO comme une source potentielle et efficace de protéines de haute qualité pour la consommation humaine, en raison de leur abondance de source, de leur valeur nutritive et de leur absence de cholestérol animal (Chen *et al.*, 2003). Plusieurs études ont fait l'objet d'importantes cultures foliaires qui présentent un potentiel pour la production de protéines à savoir : le thé (Zhang *et al.*, 2016), les feuilles de l'olivier (Garcia *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003); feuilles d'alfalfa (Xie *et al.*, 2008), feuilles de betteraves et des épinards (Sari *et al.*, 2015; Tamayo *et al.*, 2016).

Cependant, la qualité protéique de protéines végétales est influencée par leur faible teneur en acides aminés soufrés, leur interaction avec des composants non protéiques appelés métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, tanins) et les fibres alimentaires, qui peuvent former des complexes irréversibles avec les protéines, affectant ainsi leur solubilité (Zhang *et al.*, 2015). De plus, la présence des protéines anti physiologiques (inhibiteurs de protéases, lectines) et leur structure compacte rendent les protéines végétales moins sensibles à la digestion *in vivo* (Wang *et al.*, 2008).

Les procédés technologiques tels que le traitement thermique, l'extrusion et le fractionnement, peuvent réduire les facteurs antinutritionnels contenus dans les protéines végétales ce qui peut améliorer ainsi la qualité nutritionnelle et la biodisponibilité de ces dernières (Montoya *et al.*, 2006).

Introduction générale

Au cours de ces dernières années, l'évolution du marché mondial des protéines végétales est en pleine croissance. Il est engagé principalement sur les technologies d'enrichissement alimentaires (Guéguen *et al.*, 2016). Dans cette optique, l'OMS et la FDA considèrent les pâtes comme un véhicule adéquat pour l'incorporation de nutriments dans le but d'améliorer les qualités nutritionnelles ou sensorielles de ces produits, fortement présentes dans le régime alimentaire méditerranéen.

Les pâtes sont considérées comme un aliment sain en raison de leur faible contenu en sodium, matières grasses et glucides simples et leur richesse en glucides complexes (Pinarli *et al.*, 2004). Elles sont nutritionnellement désaxées, en raison de leur faible contenu en lipides et en fibres et de la faible valeur biologique de leurs protéines, liée principalement à leur pauvre apport en acides aminés lysine et thréonine (Giménez *et al.*, 2013).

L'enrichissement des pâtes alimentaires avec des matrices à protéines végétales a été largement étudié (Torres *et al.*, 2007 ; Petitot *et al.*, 2009 ; Giménez *et al.*, 2013 ; Tazart *et al.*, 2016 ; Armellini *et al.*, 2018). Plusieurs auteurs ont rapporté principalement l'impact de cette substitution sur : l'aspect des pâtes (texture, couleur, qualité de cuisson), la qualité sensorielle et la composition biochimique des pâtes. Cependant, l'interaction entre les composés bioactifs qui affecte la qualité, la biodisponibilité et la digestibilité *in vitro* de des protéines végétales, reste dans le pari de la recherche.

Récemment, plusieurs études mettent en évidence l'extraction de protéines végétales sous le concept de bioraffinerie pour répondre aux exigences environnementales, économiques, nutritionnelles et fonctionnelles (Mune *et al.*, 2016; Görgüç *et al.*, 2019; Espinosa *et al.*, 2020). Mais leurs applications en tant que nouveaux ingrédients alimentaires protéinés sont encore rares.

Il faut rappeler que d'énormes efforts ont été menés pour parvenir à la séparation, l'isolement et la concentration des protéines foliaires par l'extraction alcaline (Zhang *et al.*, 2014), prétraitement avec des solvants organiques et/ou enzymes (Garcia *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2016.) ou sous des conditions extrêmes d'extraction (Vergara *et al.*, 2015; Görgüç *et al.*, 2019). Néanmoins, ces processus sont encore limités en raison du manque de la durabilité environnementale et de la faible valeur nutritive et de digestibilité des protéinés fractionnés (Zhang *et al.*, 2014). En revanche, l'utilisation des carbohydrases est une approche lucrative pour le concept de bioraffinerie dans l'extraction des protéines végétales issues de la biomasse foliaire (Zhang *et al.*, 2016).

Introduction générale

L'arbre de *Moringa oleifera* présente une grande adaptabilité aux conditions climatiques. Il peut produire environ 580 t/ha/an de biomasse (Okuda *et al.*, 2001 ; Nouman *et al.*, 2016). Pratiquement, chaque partie de la plante connaît d'important regain d'intérêt, présentant des bénéfices nutritionnels, thérapeutiques ou industriels (Fahey *et al.*, 2005 ; Nouman *et al.*, 2016 ; Taiwo *et al.*, 2020).

Les feuilles de *Moringa oleifera* sont une bonne source de protéines végétales (22,2 à 34,4 %) (Sánchez *et al.*, 2010 ; Ijarotimi *et al.*, 2013 ; Mune *et al.*, 2016 ;). Néanmoins, les recherches concernant cette espèce sont principalement concentrées sur les composés bioactifs et facteurs anti-nutritionnels (Teixeira *et al.*, 2014 ; Devisetti *et al.*, 2016). En Algérie, les agriculteurs sont de plus en plus intéressés par la culture et le développement du *Moringa oleifera*, en raison de ses multiples intérêts et avantages.

L'objectif de la présente thèse porte sur l'évaluation du potentiel nutritionnel et nutraceutique. Elle traite principalement la fraction protéique de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* cultivé en Algérie. Sous l'axe de la valorisation des produits de cette filière, une utilisation directe de la poudre de feuilles de plante étudiée dans l'enrichissement d'une matrice alimentaire (pâtes alimentaires) est mise en application. Par la suite, une autre voie de valorisation est mise en œuvre, par l'extraction et l'isolement de la fraction protéique de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (préparation de concentré protéique) suivant un nouveau processus d'optimisation des conditions expérimentales d'extraction enzymatique de la protéine végétale.

La première partie de cette thèse est consacrée pour une synthèse bibliographique descriptive de la plante étudiée et l'intérêt de ça partie aérienne (feuilles) comme une nouvelle source de protéines végétales, suivie d'un aperçu sur les pâtes alimentaires comme un vecteur de fortification nutritionnelle et enfin un état de l'art concernant les nouvelles alternatives de protéines végétales.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale qui est subdivisée en trois parties :

- Une caractérisation physico-chimique, étude du pouvoir antioxydant et la digestibilité *in vitro* des protéines de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* seront traitée dans la partie I.

Introduction générale

- La partie II porte sur l'étude de l'effet de la substitution directe lors de la formulation des pâtes alimentaires avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (5 à 15%) sur la qualité nutritionnelle, principalement en protéines et leur digestibilité *in vitro*.
- La partie III est consacrée pour l'extraction de la fraction protéique des feuilles de *Moringa oleifera* en utilisant un nouveau processus d'extraction enzymatique, optimisé par RSM, pour la production de concentré protéique et sa caractérisation.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. *Moringa oleifera* : Etat de l'art

I.1 Origine, répartition géographique et nomenclature

Moringa oleifera Lam, est une espèce d'arbre originaire des régions Subhimalayennes du Nord-Ouest d'Inde (Makkar et Becker 1996). Sa grande adaptabilité aux conditions environnementales les plus sévères, y compris la sécheresse, ainsi que sa propagation rapide et son adaptation facile à différents types de sols ont contribué à sa large distribution vers d'autres régions tropicales et subtropicales tel que l'Afrique et l'Asie du Sud-Est (Foidl *et al.*, 2001; Adejumo *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2022).

Depuis son apparition, l'arbre de *Moringa Oleifera* est communément appelé « Moringo » (Palmer *et al.*, 1972). Il porte aussi différents noms selon les régions : chadjarat el rawag (pays arabophones) ; l'arbre miracle, Moringe à graine ailée, Morungue, néverdié (pays francophones) ; Drumstick tree, Horseradish tree, Ben tree, Never die tree (pays anglophones) (Price, 2000 ; Foidl *et al.*, 2001 ; ; Olaofe *et al.*, 2013).

I.2 Description botanique

Le *Moringa* appartient à la famille monogénérique des *Moringaceae* (tableau I). Cette famille comprend 13 espèces, seules trois espèces sont largement cultivées : *Moringa oleifera*, *M. stenopetala*, et *M. peregrina* (Foidl *et al.*, 2001 ; Ganatra *et al.*, 2012; Abd Rani *et al.*, 2018).

Tableau I : Classification systématique de l'espèce *Moringa oleifera* (Ganatra *et al.*, 2012).

Règne	Plantae
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	Capparales
Famille	<i>Moringaceae</i>
Genre	<i>Moringa</i>
Espèce	<i>Moringa oleifera</i>

Moringa oleifera est un arbre à feuilles vivaces (**figure 1a**) à croissance relativement rapide, qui peut atteindre une hauteur maximale de 10-12 mètres, avec des ramifications à

I. *Moringa oleifera* : Etat de l'art

partir de la base, complétées par une couronne ouverte et étalée de branches tombantes et fragiles (Makkar et Becker 1996 ; Foidl *et al.*, 2001).

Les feuilles sont douces, tripennées, d'une couleur verte pâle, alternes et disposés en spirale sur les rameaux (**figure 1b**), fissurées longitudinalement, avec un long pétiole qui contient 8 à 10 paires de pennes portant chacune deux paires de folioles latérales et opposées (1,2 à 2,0 cm de longueur et 0,6 à 1,0 cm de largeur) (Panchal *et al.*, 2010).

Les fleurs sont parfumées, bisexuées, blanc jaunâtre, d'un diamètre de 2,5 cm (**figure 1c**). Les fruits sont des gousses triangulaires, trilobées, de couleur verte foncée au cours de leur développement et qui brunissent à maturité (**figure 1d**). Ces gousses de 20 à 120 cm de longueur et de 2,0 à 2,5 cm de largeur s'ouvrent longitudinalement, libérant ainsi 12 à 35 graines à la maturité, de forme ronde ou triangulaire (**figure 1e**) avec 3 ailes blanchâtres fines sur les angles (Foidl *et al.*, 2001 ; Panchal *et al.*, 2010).

I.3 Conditions de cultures

Le *Moringa est* cultivé principalement dans les zones semi-arides, tropicales et subtropicales, bien qu'il pousse mieux dans un sol sablonneux sec (Price, 2000 ; Nouman *et al.*, 2014; Navaratne *et al.*, 2019), dont l'altitude est inférieure à 500m et un intervalle de température allant de 25 à 48°C (Saint- Sauveur, 2001; Navaratne *et al.*, 2019). La plantation de l'arbre se fait soit par l'ensemencement direct des graines (le semis), soit par bouture de branches, ou par transplantation (Ramachandran *et al.*, 1980 ; Palada et Chang, 2003).

La récolte des graines peut être effectuée neuf mois après le semis (Ramesh-Kumar *et al.*, 2014), tandis que leurs feuilles persistantes peuvent être récoltées trois à six mois après le semis (Ralezo Maevalandy, 2006). Le rendement dépend fortement de la saison, des conditions climatiques, du cultivar considéré et de l'application des fertilisants (Palada *et al.*,2007).

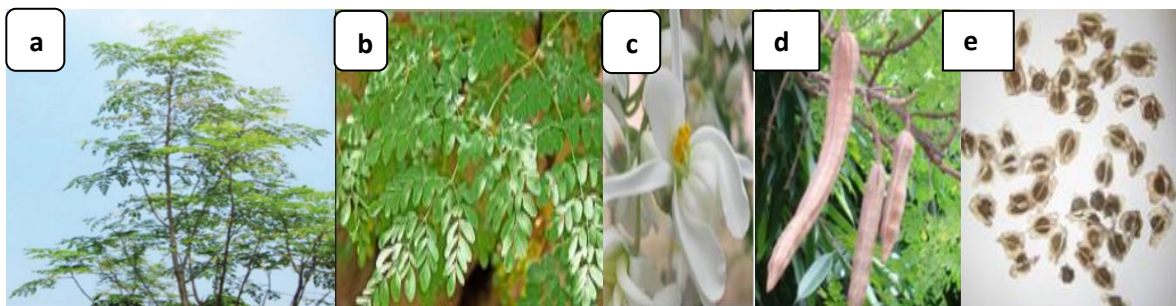


Figure 1 : Arbre (a) et différentes parties de *Moringa oleifera*, feuilles (b), fleurs(c), fruit (d) et graines (e) (Taher *et al.*, 2017 ; Bhattacharya *et al.*,2018).

I-4 *Moringa oleifera*, l'arbre de vie à utilisations multiples

Moringa oleifera est un arbre à usage multiple de toutes ses parties (racines, tiges, feuilles, fleurs, gousses et graines), convenables à la consommation humaine et animale (Foidl *et al.*, 2001 ; Amaglo *et al.*, 2010; Leone *et al.*, 2016; Ziani *et al.*, 2019). D'après Granella *et al.* (2021), cet arbre traduit une rentabilité polyvalente par leur usage traditionnel et industriel sous différents aspects dans plusieurs secteurs économiquement actifs (**figure2**).

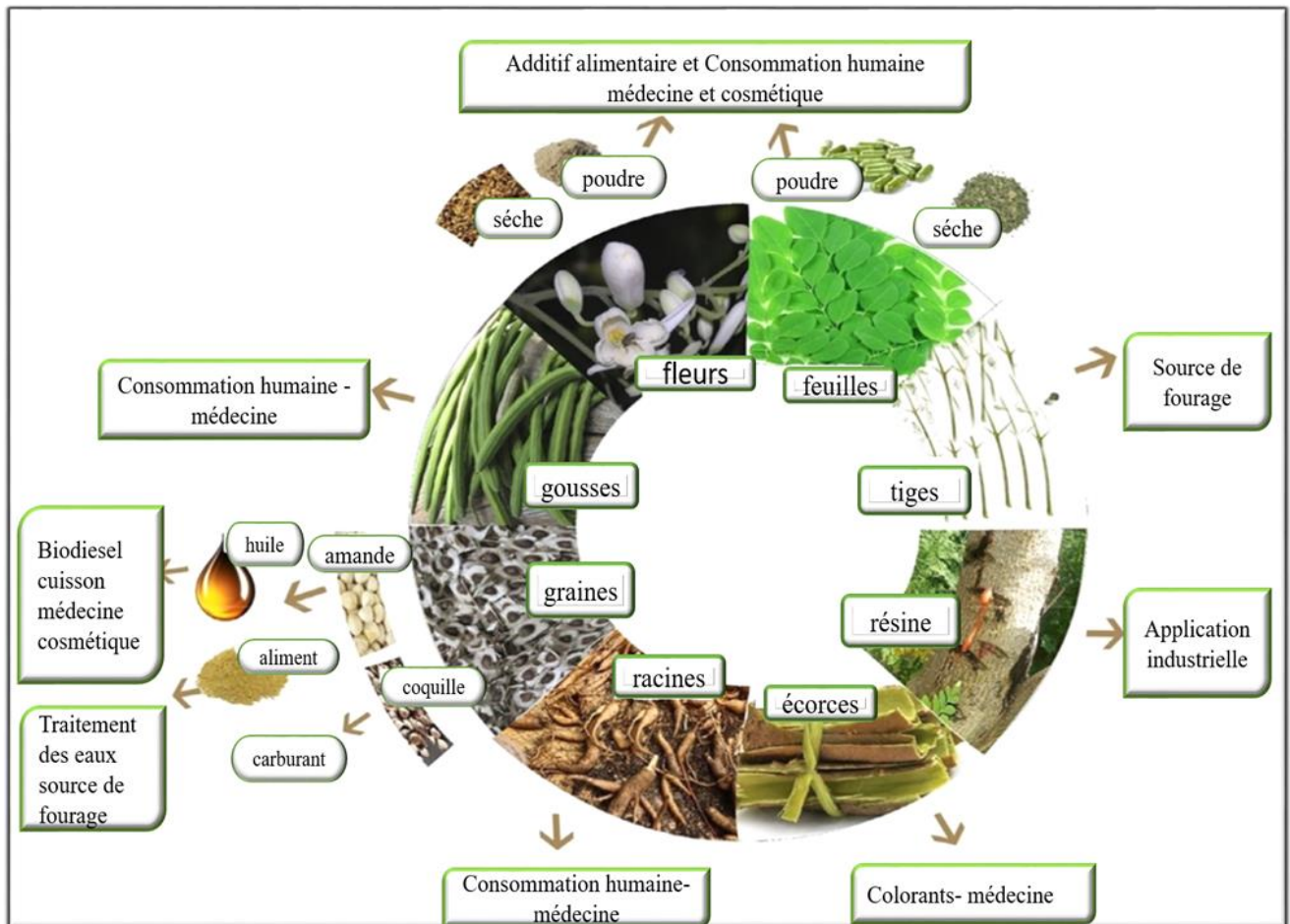


Figure 2 : Utilisations traditionnelles et industrielles des différentes parties de *Moringa oleifera* (Granella *et al.*, 2021).

I-5 Feuilles de *Moringa Oleifera* : un potentiel polyvalent

Les feuilles de *Moringa oleifera* constituent une riche et rare combinaison de composés bioactifs et d'éléments nutritionnels essentiels pour la vitalité humaine et animale (Fahey, 2005 ; Ashfaq *et al.*, 2011; Ariani *et al.* 2023).

I. *Moringa oleifera* : Etat de l'art

I-5.1 Potentiel nutritionnel, une Source de protéines végétales et composés phénoliques

Malgré leurs faibles teneurs en glucides et lipides, les feuilles de *Moringa oleifera* possèdent une composition nutritionnelle riche en protéines et fibres (Sebola *et al.* 2019 ; Patil *et al.*, 2022).

Tableau II : Composition chimique des feuilles de *Moringa oleifera* (Sebola *et al.* 2019).

Eléments chimiques	Teneurs (g/100 g de matière sèche)
Protéines	19,0 – 32,4
Cendres	6,8 – 8,2
Lipides	5,2 – 7,7
Fibres	33,2 – 38,7
Carbohydrates	4,3 – 4,8

Les feuilles de *Moringa Oleifera* contiennent une grande variété de minéraux, tels que le calcium, le zinc, le potassium, le magnésium, le fer, le sodium et le cuivre (Kasolo *et al.*, 2010 ; Promkum *et al.*, 2010 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2016 ; Patil *et al.* 2022) et vitamines, telles que la vitamine A, B, C, D et E, y compris l'acide folique, la pyridoxine et l'acide nicotinique (Stohs *et al.*, 2015 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2016 ; Patil *et al.* 2022).

Diverses études ont montré que les feuilles de *M. oleifera* contiennent 7 fois plus de vitamine C que l'orange, 10 fois la vitamine A que la carotte, 17 fois le calcium que le lait, 15 fois le potassium que les bananes, 25 fois le fer que les épinards et 9 fois les protéines que le yaourt (Fuglie, 1999 ; Fahey, 2005 ; Rockwood *et al.*, 2013 ; Taher *et al.*, 2017 ; Patil *et al.*, 2022).

Leur teneur élevée en protéines est l'un des avantages les plus cités dans la littérature, d'où sa récente considération, comme étant un complément alimentaire complet (Patil *et al.*, 2022). Un bon nombre de travaux sur le Moringa ont signalé que ces feuilles possèdent entre 19 et 32 % de protéines (Chandan *et al.*, 2006 ; Nouman *et al.*, 2014 ; Sebola *et al.*, 2019). Cette teneur est largement supérieure à celle des protéines du lait de vache, chèvre et brebis (3,4 à 6,3 %) (Nouman *et al.*, 2014).

Des études ont également signalé l'apport considérable en terme de tous les acides aminés essentiels y compris la lysine, qui est présente en faible teneur dans les végétaux, particulièrement dans les céréales (Nouman *et al.*, 2014 ; Teixeira *et al.*, 2014 ; Oyeyinka *et al.*, 2018) .

I. Moringa oleifera : Etat de l'art

La composition phytochimique menée sur les feuilles de *Moringa oleifera*, révèle divers métabolites secondaires à savoir les polyphénols, les alcaloïdes et les terpénoïdes (Ma *et al.* 2020). Les feuilles de *Moringa* contiennent des teneurs importantes en polyphénols, dont les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tannins (Joshi et Mehta 2010; Adeyemi *et al.*, 2014; Navaratne *et al.*, 2019; Ariani *et al.* 2023). Les flavonoïdes les plus courants dans les feuilles de *Moringa oleifera* sont la quercétine et le kaempférol glycosides, les acides phénoliques les plus couramment rencontrés sont notamment représentés par l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide coumarique (Ariani *et al.*, 2023).

I-5-2 Potentiel pharmacologique

En raison de ses vertus thérapeutiques, les feuilles de *Moringa oleifera* sont largement utilisées en médecine traditionnelle (Biswas *et al.*, 2020). Plusieurs recherches affirment leur potentiel pharmacologique qui est principalement lié à ses composés bioactifs (Ma *et al.*, 2020; Patil *et al.*, 2022; Ariani *et al.*, 2023). Cependant, diverses activités pharmacologiques ont été rapportés, notamment : antioxydante (Anwar *et al.*, 2007 ; Zhao et Zhang, 2013; Bamagous *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2022), anti hypertensive (Zhao et Zhang, 2013), antidiabétique (Khan *et al.*, 2017; Chigurupati *et al.*, 2021; Patil *et al.*, 2022), anticancéreuse (Gopalakrishnan *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2023), antibactérienne et antifongique (Singh *et al.*, 2015; Elgamily *et al.*, 2016; van *et al.*, 2022), hypocholestérolémique (Ghasi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2020), anti-inflammatoire (Arulselvan *et al.*, 2016; Cuellar-Nunez *et al.*, 2021). Dernièrement, et à la lumière des nouvelles circonstances universelles du coronavirus, Sivani *et al.* (2021) rapportent l'effet de feuilles de *Moringa oleifera* contre les infections à coronavirus.

I-5-3 Potentiel d'application comme ingrédient fonctionnel

Les feuilles de *Moringa oleifera* peuvent être consommées fraîches ou cuites (Dhakar *et al.*, 2011 ; Tété-Bénissan *et al.*, 2012 ; Leone *et al.*, 2016). Elles peuvent être conservées sous forme d'une poudre et s'ajouter à toutes sortes de plats en tant que complément nutritionnel (Fahey, 2005 ; Andriambelo *et al.*, 2015) ou bien utilisées comme ingrédient fonctionnel pour formuler des produits diététiques (Oyeyinka *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2022), d'où nombreuses voies de valorisation ont été développées (tableau III).

Diverses études ont montré que les feuilles de *Moringa* ont le potentiel d'être utilisées dans la formulation alimentaire afin d'améliorer l'activité antioxydante, la digestibilité, l'apport en macronutriments (notamment les protéines,) et en micronutriments (minéraux et vitamines) (Oyeyinka *et al.*, 2018 ; Giuberti *et al.*, 2021 ; Milla *et al.*, 2021 et Ariani *et al.*, 2023).

I. *Moringa oleifera* : Etat de l'art

En raison d'enrichissement par des feuilles de *Moringa*, les préférences sensorielles demeurent faibles, ce qui est principalement lié à la couleur, qui est un important attribut sensoriel préliminaire (Oyeyinka *et al.*, 2018 ; Aly *et al.*, 2022). Sur l'axe de fortification nutritionnelle, Ariani *et al.*, 2023, supposent l'utilisation de concentré de protéines issu de feuilles de *Moringa oleifera*, comme un ingrédient fonctionnel, et l'un des moyens pour éliminer les effets néfastes de la chlorophylle sur les aliments enrichis.

Tableau III : Potentiel d'enrichissement des aliments en feuilles de *Moringa oleifera*

Produit alimentaire enrichi	Taux d'incorporation en poudre /extrait (%)	Révélation	Références
Pain boulanger	Poudre 5 à 20	Amélioration de l'apport en protéine (21,85%), en cendre (5,21%), en Ca, Fe, Mg Diminution du profil textural et rhéologique à savoir le caractère gommeux, moelleux, élasticité et résilience.	(El-gammal <i>et al.</i> , 2016)
Biscuits	Poudre 1 à 3	Amélioration de la teneur en protéines, fibres, cendres et carbohydrates. Une acceptabilité organoleptique de biscuits à un taux de 1% d'incorporation.	(Alam <i>et al.</i> .,2014)
Thé	Poudre 5 à 20	Une amélioration de 22,85 % de la teneur en catéchines du thé enrichi à 10% et séché à température ambiante, comparé à un apport de 16.33% de catéchines lors du séchage au soleil.	(Budaraga <i>et al.</i> .,2020)
Yaourt	Poudre 0,5 à 2,5	Une amélioration de la teneur en protéines (30,6 à 56,8%), cendres (0,4 à 0,7%), lipides (0,9 à 3,7%).	(Akajiaku <i>et al.</i> , 2018)
Yaourt	Extrait 0.05 à 0,20	Effet sur la fermentation, la qualité nutritionnelle et sensorielle et les propriétés bioactives du yaourt.	Zhang <i>et al.</i> 2019; Bikheet <i>et al.</i> 2021)
Fromage	Extrait 1 à 3	l'effet sur la stabilité à l'oxydation, la composition chimique, les propriétés microbiologiques et sensorielles du fromage.	(Badmos <i>et al.</i> 2014; El-wahed. A, Osman and Mark 2020)

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

II.1 Les pâtes alimentaires, origine, consommation et intérêts

La technique rudimentaire de la fabrication des pâtes alimentaires faisant référence à la Mésopotamie, transmise par la suite en Inde, puis vers la Chine, et s'est rapidement répandue en Italie en 1279 puis dans d'autres parties de l'Europe et méditerranée (Rizza et Go, 2002). Vers 1800, le premier procédé mécanique de fabrication industrielle des pâtes alimentaires est apparu en Italie, et ce n'est qu'en 1934 que le premier système entièrement automatisé a été développé, tout en remplaçant le processus manuel de fabrication. C'est ce dernier qui s'encadre jusqu'à nos jours dans les processus originaux de préparations de pâte alimentaire dites artisanales (Walsh et Gilles., 1977 ; Sissons., 2004).

Selon la FAO 1975, les pâtes alimentaires constituent un groupe de produits obtenus par dessiccation d'une masse non fermentée à base de semoule ou de farine dérivée de blé ou de leurs mélanges et d'eau potable.

Les pâtes constituent un aliment populaire qui est consommé dans le monde entier, par toutes les catégories d'âges quel que soit leur statut socio-économiques (Rafiq *et al.*, 2018 ; Karin *et al.*, 2022). Elles sont régulièrement consommées dans la plupart des pays méditerranéens, d'Europe et des États-Unis, avec une consommation hebdomadaire en Afrique du Nord (Clemente *et al.*, 2001), et une quantité annuelle d'environ 28,3 kg/personne/an en Italie et de 1,0 kg/personne/ an en Irlande (Raffaella *et al.*, 2005).

La combinaison de leurs propriétés favorise une telle consommation; la simplicité de leur fabrication, leur excellente aptitude à la conservation, leur facilité de transport, l'abordabilité, la facilité et la diversité de modes de préparations, leur bonne qualité nutritionnelle et hygiénique (Ainsa *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Récemment, elles sont classées par le FAO/OMS/FIDA/PAM. 2020, comme un aliment de sécurité alimentaire, suite au cycle épidémiologique, vu l'impact de la stratégie de survie des populations par confinement contre le COVID-19.

II.2 Composition des pâtes alimentaires

II.2.1 Matière première

Les principaux ingrédients des pâtes alimentaires sont la semoule, qui est usuellement fabriquée à partir de blé dur, et le liquide qui est l'eau.

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

II.2.1.1 La semoule

Selon Simonato et al. (2015), la matière première préférée et la plus souvent utilisée pour la production de pâtes alimentaires de bonne qualité est la semoule obtenue à partir du blé dur (*Triticum turgidum ssp durum*). Cette dernière est connue par sa teneur en gluten qui confère aux pâtes des propriétés technologiques et rhéologiques spécifiques. La qualité d'une semoule pour la fabrication des pâtes alimentaires est définie par son aptitude à donner des produits finis dont l'aspect et la qualité culinaire répondent aux désirs des consommateurs ; à savoir sa couleur unique, sa dureté, sa flaveur et sa qualité de cuisson (Feillet, 2000 ; Petitot *et al.*, 2009). Ces caractéristiques sont influencées par la composition biochimique du grain de blé (tableau IV) et de la granulométrie de la semoule, eux même liés à l'origine histologique des produits (Abecassis *et al.*, 1991).

Tableau IV : Distribution en pourcentage des principaux nutriments dans le grain de blé (Brouns *et al.*, 2012).

	Grain		Péricarpe		Aleurone		Albumen		Germe	
	G	T	G	T	G	T	G	T	G	
Protéines (%)	13	10	4,4	30	15,3	12	73,5	31	6,8	
Lipides (%)	2,7	0	0	9	23,6	2	62,9	12	13,5	
Amidon (%)	68,9	0	0	0	0	82	100	0	0	
Cellulose (%)	28	40	87,1	3	7,6	0,1	3,1	2	2,2	
Minéraux (%)	1,9	7	22,6	12	43,6	0,5	22,6	6	9,7	

T : Tissu spécifié ; G : Grain entier.

II.2.1.2 L'eau

L'eau joue un rôle majeur dans la confection des pâtes alimentaires. Elle gonfle le grain d'amidon et favorise l'assouplissement et l'allongement des protéines ce qui donne à la pâte ses propriétés d'élasticité (Martin-Esperanza *et al.*, 2021). En revanche, selon de nombreuses observations faites par les industriels, il ressort que la qualité de l'eau utilisée au cours de la préparation des pâtes alimentaires peut exercer une influence non négligeable sur l'aspect et le comportement des produits finis au cours de la cuisson. Des eaux de faible dureté hydrotimétrique sont généralement recommandées (Feillet, 2000).

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

II.2.2 Composition biochimique

D'un point de vue nutritionnel, les pâtes alimentaires sont considérées comme un aliment sain à source d'énergie précieuse, étant relativement riches en glucides, pauvres en lipides et en fibres (tableau V), reconnues comme une source modérée de protéines, de vitamines B6 et du fer (Pinarli *et al.*, 2004 ; Bhagya *et al.*, 2008 ; Borneo *et al.*, 2008). En dépit de ces attributs, les pâtes alimentaires sont reconnues par leurs faibles quantités de micronutriments et de composés bioactifs (Karin *et al.*, 2022). Reconnues par leurs faibles teneurs en minéraux notamment en sodium (Bhagya *et al.*, 2008) et en composés phénoliques (Krishna et Rabhasankar, 2010). Leurs protéines possèdent une faible valeur biologique ; liée en grande partie à leur pauvre apport en lysine et thréonine (Giménez *et al.*, 2013).

Tableau V : Composition biochimique des pâtes alimentaires (Mohtadji-Lamballais, 1989 ; Sissons, 2004).

Eléments	Teneur (/100g de pâtes)
Eau (g)	8,6 – 12,5
Protéines (g)	12,0 – 12,8
Glucides(g)	74,0 – 76,5
Lipides(g)	1,20 – 1,80
Fibres (g)	2,0 – 3,0
Minéraux	
Calcium (mg)	22 – 25
Fer (mg)	1,50 – 2,10
Phosphore (mg)	165 – 190
Potassium (mg)	220 – 260
Sodium (mg)	2,0 – 4,0
Vitamines	
Thiamine (mg)	0,09 – 0,20
Riboflavine (mg)	0,06 – 0,30
Niacine (mg)	2,00 – 3,10
Vitamine B6 (µg)	0,10 – 0,20
Folacine (µg)	30 – 36

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

II.3 Paramètres d'évaluation de la qualité des pâtes alimentaires

La qualité des pâtes alimentaires dépend essentiellement des matières premières utilisées. Toutefois, elle peut être affectée par les conditions de fabrication et de cuisson (Cubadda et Carcea, 2007 ; Armellini *et al.*, 2018).

Pour les consommateurs et les producteurs, les paramètres d'évaluation de la qualité des pâtes alimentaires sont définis par leurs qualités sensorielles, culinaires et nutritionnelles (Mercier *et al.*, 2015).

Les paramètres clés pour évaluer la qualité des pâtes par rapport à l'acceptabilité du consommateur, sont définies par les propriétés rhéologiques telles que le caractère collant, la fermeté et l'uniformité de forme et l'énergie de rupture des pâtes (Karin *et al.*, 2022) et organoleptiques telle que la couleur, l'arôme et le goût (Diantom *et al.*, 2018).

A l'égard de diverses études, la qualité culinaire des pâtes, demeure le critère d'évaluation le plus important, vu comme la capacité du produit à maintenir sa forme et de garder une bonne texture une fois cuit dans l'eau bouillante (Pinarli *et al.*, 2004 ; Torres *et al.*, 2007 ; Petitot *et al.*, 2010; Giménez *et al.*, 2013 ; Mercier *et al.*, 2015; Armellini *et al.*, 2018; Martin-Esperanza *et al.*, 2021). Les pâtes de haute qualité culinaire se caractérisent par leur résistance et leur élasticité, une perte de cuisson minimale et une cuisson à un temps optimal réduit (Martinez-villaluenga *et al.*, 2022).

La qualité de cuisson est principalement attribuée aux principaux changements de la fraction amidon /protéine. Ces derniers se produisent dans la structure des pâtes pendant la cuisson (Hirawan *et al.*, 2010). En effet, entre les granules, l'interaction et la coagulation des protéines mènent à la formation d'un réseau fort et continu, qui emprisonne l'amidon, qui par humidification et gélatinisation, occupe ces inter-espaces Migliori *et al.* (2005). La capacité du gluten à former un réseau protéique est responsable de la qualité de cuisson et des propriétés texturales des pâtes de blé dur (Krishna et Rabhasankar, 2010).

Selon Petitot *et al.* (2010), les protéines de blé dur sont principalement composées de gluténines et de gliadines qui forment des liaisons disulfures intra- et intermoléculaires au cours de la transformation, cela conduit à la formation d'un réseau de gluten tridimensionnel responsable des propriétés rhéologiques des pâtes.

Toutefois, les températures élevées lors de la fabrication ou la cuisson peuvent affecter l'aspect des pâtes alimentaires. Elles favorisent le développement des réactions de Maillard, qui donnent une couleur brune au produit ; couleur non appréciée par les consommateurs (Feillet, 2000). Elles conduisent également à la diminution de la valeur nutritionnelle du produit en raison

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

de la dénaturation des protéines et vitamines (Petitot *et al.*, 2010; Mercier *et al.*, 2015).

D'un point de vue nutritionnel, les pâtes alimentaires sont des aliments à forte densité énergétique contenant de faibles quantités de micronutriments et de composés bioactifs (Karin *et al.*, 2022). L'enrichissement des pâtes avec des matrices nutritives denses contenant des composés bioactifs pourrait être une voie intéressante et innovante pour améliorer la qualité nutritionnelle et les bienfaits de ces produits pour la santé (Wang *et al.*, 2021).

II-4 Intérêts et méthodes d'enrichissement des pâtes alimentaires

Les pâtes alimentaires constituent la denrée la plus fréquemment consommée à travers le monde, c'est donc un véhicule efficace d'ingrédients fonctionnels, pour fournir les nutriments manquants dans l'alimentation (Borneo *et al.*, 2008; Mercier *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021; Karin *et al.*, 2022). Elles furent l'un des premiers aliments pour lesquels la FDA (Food and Drug Administration) a permis l'enrichissement en vitamines et en fer dans les années 1940 (Chillo *et al.*, 2008).

Étant un produit formulé, les pâtes alimentaires pourraient être conçues de manière appropriée et fonctionner comme un aliment fonctionnel et cela par l'ajout d'ingrédients riches en nutriments et en composés bioactifs d'origine végétale ou animale (tableau VI) (Borneo *et al.*, 2008 ; Mercier *et al.*, 2015 ; Ainsa *et al.*, 2021).

Ainsi, enrichir les pâtes en protéines principalement suite à leurs déficiences en acides aminés essentiels tels que la lysine et la thréonine (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2010; Giménez *et al.*, 2013), en fibres, vitamines et minéraux (Wang *et al.*, 2021) est une démarche primordiale plus satisfaisante aux besoins nutritionnels du consommateur (Ainsa *et al.*, 2021).

Diverses préparations de pâtes alimentaires ont fait l'objet d'enrichissement par des substitutifs d'origine végétale ; graines de légumineuses (Torres *et al.*, 2007 ; Petitot *et al.*, 2009 ; Giménez *et al.*, 2013 ; Tazart, *et al.*, 2016), les végétaux (Carini *et al.*, 2009 ; Armellini *et al.*, 2018 ; Padalino *et al.*, 2019), les algues (Özyurt *et al.*, 2015).

Les végétaux sont connus par leurs apports en composés phénoliques, vitamine C (acide ascorbique), vitamine E (tocophérol), caroténoïdes et isoflavone, ils présentent ainsi un fort potentiel antioxydant (Abuajah *et al.*, 2015). Cependant, cet apport en composés phénoliques peut réduire la biodisponibilité des protéines, car un complexe insoluble peut se former entre les protéines et les phénols limitant ainsi leur biodisponibilité (Wang *et al.*, 2021).

Par ailleurs, des études sur l'enrichissement des pâtes alimentaires avec des matrices d'origine végétale ou animale, montrent que cette pratique peut affecter les propriétés des pâtes

II. Enrichissement des pâtes alimentaires par des ingrédients fonctionnels

liées à la texture (Nielson *et al.*, 1980), à la couleur (Gallegos *et al.*, 2010), aux propriétés de cuisson (Zhao *et al.*, 2005) et aux propriétés organoleptiques (Alireza Sadeghi et Bhagya, 2008).

En fait, afin d'obtenir des pâtes de bonne qualité d'enrichissement, il est souvent nécessaire d'utiliser un processus technologique de production adéquat, qui doit être adapté pour contrebalancer les éventuelles changements des propriétés (Simonato *et al.*,2020; Ainsa *et al.* 2021; Wang *et al.*,2021).

Tableau VI : Les ingrédients fonctionnels utilisés pour la fortification des pâtes alimentaires.

Matrice d'enrichissement	Ingrédients bioactifs	Description fonctionnelle	Références
Poudre d'avoine 2,5 à 15 %	- Polyphénols - Stanoles - Fibres	-Améliorer l'activité antioxydante - réduite l'index glycémique (IG) - baisser le taux du cholestérol sanguin	Carcea <i>et al.</i> (2017) ; Hager <i>et al.</i> (2013) ; Kaur <i>et al.</i> (2013).
Poudre de pois 20 à 100 %	-Polyphénols -protéines -fibres -vitamines	-Abaissement du cholestérol sanguin - réduction de l'IG -amélioration de la teneur en protéines.	Petitot <i>et al.</i> (2010)
Purée de carotte 5 à 15 %	-Caroténoïde -polyphénols -acides gras	- Amélioration de l'activité antioxydante	Boroski <i>et al.</i> (2011); Carini <i>et al.</i> (2012).
Purée/jus de betterave 6–18%	-bétalaïnes -caroténoïdes, phénols,minéraux	- Augmentation de la teneur en polyphénols, -amélioration du système anti-cancer - Amélioration de l'activité antioxydante.	Wang <i>et al.</i> , 2021 Mridula <i>et al.</i> , (2016).
Poudre/ purée de tomate (1,5 à 15 %)	-Fibres/ Lycopène -B carotène, -Vitamine C et E, -phénols	-Augmentation de la teneur en composés phénoliques -amélioration de la capacité antioxydante -fournir une couleur attrayante.	Padalino <i>et al.</i> , (2013);; Yadav <i>et al.</i> , (2014); Rekha <i>et al.</i> ,(2013).
Poudre de persil 1 à 4%	-flavonoïdes, - phénols -protéines -amidon	-amélioration de la teneur en polyphénols et protéines et la capacité antioxydante- diminution de la digestibilité <i>in vitro</i> de protéines.	(Sęczyk <i>et al.</i> 2016)
œufs 0,4 à 0,8 v/v	-protéines -fibres -lipides	-amélioration de la qualité nutritionnelle, culinaire et texturale.	(Martin-Esperanza <i>et al.</i> , 2021)
Concentré protéique de poisson 10%	-protéines -acides gras	- amélioration de teneurs en protéines- acides gras- de la capacité antioxydante et de la qualité culinaire.	(Ainsa <i>et al.</i> 2021)

III. Les protéines végétales

III.1 Protéines végétales, une alternative aux sources animales

Plusieurs discriminations sont imposées, où la satisfaction des besoins en protéines animales semble particulièrement difficile, d'un consommateur qui devient de plus en plus exigeant en matière de diversité alimentaire, demandant ainsi des aliments innovants de hautes qualités nutritionnelles, des cas d'allergies, de végétarisme et du Halal (Sari *et al.*, 2015).

En revanche, l'occurrence de ces attributs a créé un grand défi pour trouver de nouvelles sources alternatives de protéines durables et de haute valeur biologique (Guéguen, Walrand, et Bourgeois.2016; Zhang *et al.*, 2018).

Dans cette optique, les protéines du règne végétal présentent un potentiel alternatif aux protéines du règne animal, en raison de leur valeur nutritive et de leur absence en cholestérol animal (Chen *et al.*, 2003). Elles présentant ainsi une grande diversité de structures et de propriétés en fonction de leur origine botanique, de leur localisation dans la plante, et des technologies mises en œuvre (Guéguen, Walrand, et Bourgeois. 2016).

En effet, l'évolution du marché mondial des protéines végétales est en pleine croissance. Il est engagé sur les protéines de soja et du riz, qui entrent dans la composition de plusieurs nouveaux produits lancés sur le marché, où la progression a été estimée à plus de 40 % entre 2013 et 2016, (Guéguen, Walrand, et Bourgeois. 2016).

Afin d'anticiper cette évolution, les protéines végétales font l'objet d'un nombre croissant de recherches. Ces dernières sont étendues sur une variabilité de biomasses végétales (Guéguen, Walrand, et Bourgeois 2016; Zhang *et al.*, 2018) notamment, micro et macro algues (Sari *et al.*, 2015), légumes (Braudo *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Tamayo *et al.*, 2016), légumineuses (Adebowale *et al.*, 2007) et oléagineux (Moure *et al.*, 2006 ; Mao et Hua. 2012).

Les protéines vertes, ou les protéines de feuilles ont été reconnues par la FAO comme une source potentielle et efficace de protéines de haute qualité pour la consommation humaine, en raison de leur abondance de source et de leur valeur nutritive (Chen et Qiu, 2003).

Plusieurs études ont fait l'objet d'importantes cultures foliaires qui présentent un potentiel pour la production de protéines à savoir ; le thé (Zhang *et al.*, 2016 ; Ruan *et al.*, 2019), les feuilles d'olivier (Garcia *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003 ;Vergara-Barberán *et al.*,2015), feuilles d'alfalfa (Xie *et al.*, 2008) et feuilles de betteraves et d'épinards (Sari *et al.*, 2015; Tamayo Tenorio *et al.*, 2016).

A cet égard, les feuilles de *Moringa oleifera* constituent une bonne source de protéines. Elles renferment entre 22,2 et 34,4 % (Sánchez-Machado *et al.*, 2010; Mune *et al.*, 2016). L'évaluation scientifique de son potentiel comme une source de protéines nutritionnelle et

III. Les protéines végétales

alternative a fait l'objet de plusieurs récentes études (Teixeira et al., 2014; Mune *et al.*, 2016 ; Navaratne *et al.*, 2019).

III.2 Paramètres d'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines

La valeur nutritionnelle d'une source protéique est communément définie par sa capacité à fournir des acides aminés pour la croissance de notre organisme et le renouvellement de nos protéines corporelles. Cette capacité dépend de deux phénomènes interdépendants. Le premier est la biodisponibilité de la protéine, c'est-à-dire la proportion des acides aminés disponibles. Le second est l'efficacité de ces acides aminés à être utilisés pour répondre aux besoins spécifiques à des niveaux tissulaires après les processus de digestion et d'absorption (FAO/OMS/UNU,2007).

III.2.1 Composition en acides aminés

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement d'acides aminés (AA) reliés par des liaisons peptidiques. La qualité nutritionnelle d'une protéine est définie en premier lieu par sa composition en acides aminés. Il existe 20 AA constituants de protéines alimentaires. Si tous ces AA peuvent être considérés comme essentiels puisque nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, seuls neuf sont considérés comme nutritionnellement indispensables (AAI) chez l'Homme (FAO/OMS/UNU,1985). Le caractère indispensable de ces AA a été initialement défini sur la base de « l'impossibilité de l'organisme animal à les synthétiser ».

D'un point de vue métabolique, on peut également distinguer les AA strictement indispensables (tableau VII), qui ne peuvent en aucun cas être synthétisés par l'organisme et les AA strictement non indispensables qui peuvent être synthétisés à partir de composés non aminés (Boutry *et al.*, 2008). Parmi les AA non indispensables, certains sont considérés comme conditionnellement indispensables soit parce que la capacité de biosynthèse de l'organisme est insuffisante lorsque le besoin de ces AA est augmenté dans certaines situations pathologiques, soit parce que leur synthèse nécessite la présence d'un autre AAI (par exemple, la méthionine est le précurseur de la cystéine et la phénylalanine est le précurseur de la tyrosine) et peut donc être limitée dans des conditions d'apports insuffisants en précurseurs (Reeds, 2000; Boutry *et al.*,2008).

III. Les protéines végétales

Tableau VII: Acides aminés indispensables et non indispensables (Boutry *et al.*, 2008).

Acides aminés indispensables		Acides aminés non indispensables	
Strictement indispensables	Indispensables	Conditionnellement indispensables	Non indispensables
Lysine Thréonine	Histidine Isoleucine Leucine Méthionine Phénylalanine Tryptophane Valine	Arginine Cystéine Glutamine Acide glutamique Tyrosine	Alanine Asparagine Proline Sérine Glycocolle Acide aspartique

III.2.2 L'estimation des indices chimiques

Introduite par la FAO/OMS/ UNU en 2007, la détermination des indices chimiques est également un paramètre clé pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéiques. Il est basé sur la comparaison de la composition en AA des protéines qui représente à ce jour la méthode officielle d'évaluation de la qualité des protéines alimentaires (Corgneau *et al.*, 2019).

Selon la FAO/OMS/UNU, 2007, l'estimation des indices chimiques comporte :

- Le score d'acide aminé essentiel (SAAE) ;
- L'indice d'acides aminés essentiels (IAAE) ;
- Le rapport d'efficacité protéique (REP) ;
- Le rapport (AAET /AAT) : acides aminés essentiels totaux (AAET) aux acides aminés totaux (AAT) ;
- Le rapport (Cys / AAST) : cystine aux acides aminés soufrés totaux ;
- Le rapport (Leu / Ile) : leucine sur isoleucine.

III.2.3 La digestibilité des protéines

Le rapport de la FAO/OMS/UNU en 1985, définit la mesure de la digestibilité comme un moyen d'évaluation de la qualité des protéines à la fois des mélanges alimentaires (par exemple, blé, pois chiche et lait) et des sources alimentaires protéiques individuelle. Désignant la proportion de l'apport protéique mise à disposition de l'organisme après digestion et absorption. Il est évalué *in vivo*, où la digestibilité est obtenue par le ratio entre la quantité d'azote ou d'acides aminés absorbée relativement à la quantité ingérée. Le point central repose sur la mesure des

III. Les protéines végétales

pertes d'azote au niveau fécal. Par conséquent, les essais de cette intervention peuvent être difficiles à entreprendre, inadaptés et coûteux. Pour ces raisons, des modèles *in vitro* sont utilisés pour simuler la digestion des aliments, par une évaluation qui vise à reproduire les phases : orale, gastrique, et intestinale du processus de digestion FAO/OMS/UNU 2007 ; Brodkorb *et al.*, 2018).

En 1989, la consultation conjointe d'experts FAO/OMS/UNU sur l'évaluation de la qualité des protéines a recommandé l'adoption du PDCAAS (Score d'acides aminés corrigé à la digestibilité des protéines) en tant que méthode officielle au niveau international. Un PDCAAS inférieur à 1 signifie qu'au moins un des acides aminés indispensables est fourni en quantité insuffisante après ingestion et absorption de la protéine étudiée.

III .3 Les facteurs limitant de la qualité nutritionnelle des protéines végétales

Les protéines végétales sont connues généralement par leur faible digestibilité, qui résulte de la complexité de leurs parois cellulaires et de la présence de fibres et de facteurs antinutritionnels tels que : les phénols, les flavonoïdes et les tanins (Teixeira *et al.*, 2014). Ces derniers peuvent établir des complexes irréversibles avec des protéines, affectant ainsi leur solubilité (Zhang *et al.*, 2015).

Parmi les facteurs qui affectent également la qualité nutritionnelle des protéines : la présence des inhibiteurs de protéines anti physiologiques (inhibiteurs de protéases, lectines) et leur faible teneur en acides aminés soufrés (Wang *et al.*, 2008). En effet, la digestibilité et la biodisponibilité des protéines et d'acides aminés d'origine végétale, varient selon la protéine (composition, structure), l'aliment et selon l'état physiologique et/ou génétique des individus (Wolfe *et al.*, 2016).

III .4 Méthodes d'extraction des protéines végétales et leurs concentrations

Plusieurs études mettent en évidence l'extraction des protéines végétales sous le concept de bioraffinerie afin de répondre aux exigences environnementales, économiques, nutritionnelles, et aux préoccupations fonctionnelles (Mune *et al.*, 2016; Görgüç, Bircan et Yılmaz. 2019; Espinosa *et al.*, 2020). En effet, l'extraction et la purification de protéines végétales constitue un moyen efficace de valorisation. En tant que nouveaux ingrédients alimentaires protéinés, leur application est encore rare. Cependant, d'énormes efforts ont été engagés pour parvenir aux procédés d'extractions, de concentrations et d'isollements des protéines végétales, afin d'obtenir un produit convenable à l'utilisation (Mune *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018 ; Espinosa *et al.*, 2020).

III. Les protéines végétales

III.4.1 Méthodes d'extraction physique

D'énormes efforts ont été mis en œuvre pour parvenir à la séparation et la concentration des protéines issues de tissus végétaux. Dans le cas des légumineuses, Siegel *et al.*, 1978, adoptent d'une part, le fractionnement pneumatique ou le fractionnement à sec des protéines, qui est un procédé des agglomérations de protéines, de petite taille (~3 µm) et les particules d'amidon de grande taille (15-40 µm).

D'autre part, la centrifugation des purées, en mélangeant une partie de farine des légumineuses avec cinq parties d'eau, produisant ainsi, une substance surnageant riche en protéines et des solides d'amidons. Cependant, l'effet négatif de ces méthodes, pourrait résulter en une consommation accrue des légumineuses pour de faible rendement. L'équipe de Wang *et al.* (2003) ont utilisé dans leur étude, la rupture tissulaire ; une méthode mécanique courante de perturbation des tissus végétaux. D'autres travaux rapportent l'extraction des protéines sous des conditions plus extrêmes, telles que le traitement à températures élevées et l'utilisation d'ultrason (Vergara-Barberán *et al.*, 2015 ; Görgüç, Bircan, et Yılmaz, 2019). Néanmoins, ces processus sont encore limités en raison de l'altération des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles de la fraction protéique extraite.

III.4.2 Méthodes d'extraction chimique

Les protéines végétales sont généralement insolubles en raison de leur hydrophobicité et de leur liaison disulfure entre les molécules protéiques. L'extraction dans un milieu alcalin est adoptée comme une méthode efficace et réalisable, vue que la concentration alcaline aide à briser les liaisons hydrogène et à dissocier l'hydrogène des groupes sulfates carboniques, ce qui induit la solubilité des protéines dans l'eau (Shen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014). Ce procédé a été démontré par plusieurs études et sur divers matrices végétales (Xie *et al.*, 2008; Mao et Hua, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2016). Cependant, le procédé d'extraction par traitement alcalin, affecte le plan nutritionnel des protéines (Yang *et al.*, 2018). Selon Fabian et Ju (2011), le rendement d'extraction en protéines, augmente avec l'augmentation du pH. Par conséquent, l'exposition des protéines à des conditions alcalines sévères, modifie les caractéristiques nutritionnelles de ces dernières. Une autre étude, rapportée par Zhang *et al.* (2016), indique que la forte application du traitement alcalin conduit à générer une grande quantité de sels, et une baisse de la qualité des protéines (goût et valeur nutritionnelle), ce qui limite ainsi son utilité.

III. Les protéines végétales

L'utilisation des solvants organiques, pour la séparation de protéines végétales et l'élimination des métabolites secondaires a fait l'objet d'autres études menées par Garcia *et al.*, 2000 ; Toth *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2016. En revanche, les solvants organiques sont rarement utilisés pour l'extraction des protéines à cause de leurs effets négatifs sur la structure et les fonctionnalités de celles-ci. Cependant, les doutes relatifs aux effets négatifs au niveau de la valeur nutritionnelle, ainsi qu'à la présence de résidus de l'agent chimique, limitent l'utilisation des protéines modifiées chimiquement (Zhang *et al.*, 2016).

III.4.3 Méthodes d'extraction enzymatique

Pour pallier aux inconvénients issus des traitements physiques et chimiques, l'hydrolyse enzymatique a été considérée comme un procédé alternatif pour l'extraction des protéines (Xie *et al.*, 2008). Cependant, l'extraction enzymatique est une approche lucrative pour une extraction rapide et écologique, favorisant ainsi la désintégration des polysaccharides de la paroi cellulaire, rendant les composants intracellulaires plus accessibles, notamment les protéines (Zhang *et al.*, 2016).

Plusieurs enzymes spécifiques issues de carbohydrases ont été employées dans l'extraction de protéines végétales (Jodayree *et al.*, 2012). Nous citons par exemple : la gamanase pour l'extraction des protéines des légumineuses (Sebastián *et al.*, 2004), la neutrase, alcalase, protamex, et flavourzyme pour les protéines du thé (Shen *et al.*, 2008), celluclast pour les feuilles de l'olivier (Vergara-Barberán *et al.*, 2015).

L'effet et l'efficacité du traitement enzymatique est affectée par différents facteurs, tels que le ratio (enzyme/substrat), le pH du milieu, le temps de traitement et la température (Rosset *et al.*, 2014). Pour cela, l'adéquation de l'intégrité de ces paramètres lors du processus enzymatique est une démarche indispensable, qui a fait l'objet de plusieurs récentes études d'optimisations, qui envisage une application industrielle (Zhang *et al.*, 2018, Corgneau *et al.*, 2019).

III-5 Modalités de mise en application industrielle des protéiques végétales

Sur le marché actuel des protéines végétales, nous retrouvons les protéines de soja, de pois et de riz, non utilisées à l'état pur (Overduin *et al.*, 2015; Corgneau *et al.*, 2019). En effet, elles subissent des traitements de fractionnement afin d'améliorer leur qualité nutritionnelle. Elles sont transformées donc en concentrés ou en isolats protéiques (Guéguen *et al.*, 2016; Corgneau *et al.*, 2019). Elles sont essentiellement tirées pour le développement de nouveaux

III. Les protéines végétales

aliments protéiques, destinées à des fins médicales spéciales (DADFMS), obtenues soit par méthodes d'enrichissements des aliments traditionnels ou par le développement de compléments nutritionnels oraux (Almeida *et al.*, 2015;Corgneau *et al.*, 2019).

III.5.1 Denrées alimentaires destinées à des fins médicales spéciales (DADFMS)

a) Cas d'enrichissements par des protéines végétales

L'enrichissement de l'alimentation en protéines végétales, consiste à enrichir l'alimentation courante par une fraction protéique bien déterminée. Il a pour but d'augmenter l'apport protéique d'une ration sans augmenter le volume attribué (Bocquet *et al.*, 2019).

Actuellement, sur le marché, il existe plusieurs laits infantiles à base de protéines végétales. Nous pouvons citer ; la formule du lait NOVALAC® riz commercialisée en Algérie est adaptée aux nourrissons, dès leur naissance. Ce lait a été élaboré pour les enfants allergiques aux protéines de lait de vache. De même, ces dernières sont remplacées par un isolat de protéine de riz, choisie pour sa bonne digestibilité (environ 88%) et son hypo allergénicité. Il est fabriqué à partir de protéines de riz traité par hydrolyse enzymatique (Bocquet *et al.*, 2019). Cette technique repose sur une enzyme venant couper la protéine de riz en molécules de plus petites tailles, dans le but de diminuer son allergénicité. Les enzymes utilisées sont ensuite dénaturées par traitement thermique pour ne pas apparaître dans le produit fini (Fiocchi *et al.*, 2018).

Le Pain brioché G-Nutrition®, est une autre préparation industrielle d'enrichissement d'aliment par le concentré protéique du riz, destinée aux personnes âgées souffrant de dénutrition ou à risque de dénutrition (Allaert *et al.*, 2014).

b) Cas des compléments nutritionnels oraux d'origine végétale

Les compléments nutritionnels oraux, sont des mélanges nutritifs complets, hyper-énergétiques et/ou hyper-protidiques, de goût et de textures variés. Ils sont composés de protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux. Cette composition est variable en fonction de l'indication (Corgneau *et al.*, 2019).

Les compléments alimentaires végétaux commercialisés sont composés soit de protéines de pois, de soja ou de protéines de riz (Corgneau *et al.*, 2019). Actuellement, seule le complément alimentaire hyper-protidique d'origine végétale, le Fresubin® Xtra, est fabriqué à base de concentré de protéine de pois (Tedeschi-jockers *et al.*, 2021). Il se présente sous forme de petite bouteille de 200ml. Il est indiqué chez les patients souffrant d'une intolérance aux protéines de lait et/aux protéines de soja, ayant des besoins énergétiques accrus et/ou en cas de

III. Les protéines végétales

malabsorption. Un deuxième complément nutritionnel oral, hyperprotidique et hyperénergétique, FORTIMEL ®, constitué de concentrés de protéines de soja et du pois, mais aussi des protéines de lait, destinées à des fins médicales spéciales pour les besoins nutritionnels en cas de dénutrition associée à une maladie sans gluten.

PARTIE EXPERIMENTALE

I.1. Matériel et méthodes

I.1.1 Préparation du matériel végétal

Les feuilles de *Moringa oleifera* utilisées dans notre expérimentation proviennent de la région d'Oued Souf (Algérie), cueillies en juin 2017.

I.1.1.1 Séchage

Les feuilles de *Moringa oleifera* sont triées séparément, nettoyées à l'eau, étalées et séchées sur un filet à l'air libre dans un endroit sec, ventilé et ombragé à température ambiante. Le séchage du matériel végétal est arrêté lorsque la teneur en eau est inférieure à 10%.

I.1.1.2 Broyage et tamisage

Les Feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique (CGR-8001, Chine). La poudre est ensuite tamisée par le biais d'un tamis ayant un diamètre inférieur à 0,5 mm (Retsch Analytical seive shaker AS200). La poudre de feuilles obtenue (figure 3) est conservée dans des récipients hermétiquement fermé, à l'abri de la lumière pendant toute la période expérimentale.



Figure 3 : Photographie de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.

I.1.2 Analyses physicochimiques de la poudre

I.1.2.1 Test de couleur

La couleur de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est déterminée à l'aide d'un colorimètre (Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Japan). L'analyse est réalisée en tripléte.

Les résultats sont exprimés en accord avec le système CIELAB (illuminant D65 et angle de vision de 10°) ; et les composantes étudiées pour le test de couleur sont :

- L^* : la clarté ; $L^*=0$ [noir], $L^*=100$ [blanc]
- a^* : la rougeur ; du vert ($-a^*$) au rouge ($+a^*$)
- b^* : le jaune ; du bleu ($-b^*$) au jaune ($+b^*$)
- C^* : la chromaticité ; obtenue par l'équation suivante : $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$
- h° : la teinte (angle de tonalité), obtenue par l'équation suivante : $h^\circ = [\text{tg}^{-1}(b^*/a^*)]$.

I.1.2.2 Taux d'humidité

Le taux d'humidité de la poudre de feuille de *Moringa oleifera* est effectuée en utilisant un séchoir infrarouge (Scaltec SMO 01, Heiligtstadt, Allemagne) à une température de 105 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Les tests sont menés en trois répétitions et les résultats sont exprimés en g/100 g d'échantillon.

I.1.2.3 Teneur en cendres

La détermination du taux de cendres totales est obtenue par incinération dans un four à moufle à 525 C°, selon la méthode officielle AOAC, 2000 et les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage du poids sec.

I.1.2.4 Teneur en lipides

Les lipides totaux de poudres de feuilles de *Moringa oleifera* sont déterminés au moyen d'un appareil de Soxhlet, suivant la méthode officielle AOAC, (1998). Cette méthode consiste en une extraction de la matière grasse par solvant organique (cas d'hexane) sur une matrice solide (poudre de de feuilles). L'extraction a été réalisée dans une enceinte fermée selon un processus semi-continu à partir de 40g de poudre et 250ml de solvant organique pendant 6 heures. Le solvant d'extraction contenant les lipides dissous a été ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. La teneur en lipides a été calculée selon la formule suivante :

$$MG\% = \frac{p_2 - p_1}{p_0} \times 100$$

P2 : représente la masse en gramme du ballon contenant la matière grasse, **P1** : représente la masse en gramme du ballon vide, **P0** : représente la masse en gramme de la prise d'essai

I.1.2.5 Détermination de la teneur en fibres alimentaires

La teneur en fibres alimentaires totaux, solubles et insolubles de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est déterminée suivant la méthode enzymatique (kits K-TDFR Megazyme, crok Irlande), basée sur la méthode de Prosky *et al.*, (1985).

La poudre est chauffée et gélatinisée avec de l' α -amylase thermostable, puis, digérée enzymatiquement avec la protéase et l'amyloglucosidase pour éliminer les protéines et l'amidon présents dans l'échantillon. L'éthanol est ajouté par la suite pour précipiter les fibres solubles. Les résidus sont ensuite filtrés et lavés avec de l'éthanol et l'acétone. Après séchage à l'étuve, les résidus fibreux sont pesés (fibres totaux).

La teneur en fibres alimentaires solubles est déterminée par différence entre les teneurs en fibres totaux et fibres insolubles. La teneur en carbohydrates est calculée par différence avec tous les macronutriments (protéines, cendres, lipides et fibres totaux). Les analyses sont effectuées en triples et les résultats sont exprimées en g/100g de MS.

I.1.2.6 Détermination de la teneur en minéraux

Les teneurs en K, Ca et Mg de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* ont été déterminées en utilisant un spectromètre d'absorption atomique (HRCS-FAAS, Analytik Jena, Germany) et les teneurs en Fe, Cu, Zn, Mn and Mo par un spectromètre iCAPTM Q ICP-MS (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). Le système de digestion par micro-ondes MARS-X (CEM- Mathews, NC) est utilisé pour la digestion acide pour toutes les analyses.

Une prise d'essai de 300 mg de l'échantillon est placée dans des récipients en téflon perfluoroalkoxy (PFA), puis traitée avec 4 ml d'acide nitrique (HNO_3 : 69%) suivant un programme de digestion de 3 min à 60 °C, 3 min à 90 °C, 15 min à 190 °C suivi d'un refroidissement pendant 15 min. L'échantillon digéré est recueilli dans des tubes en polypropylène et ajustés pour atteindre un volume connu avec de l'HCl à 5%. La quantification de chaque minéral est réalisée suivant des courbes d'étalonnage (annexe 4), préparées à partir de solutions multiéléments de 10mg/ml (*PlasmaCAL* SCP-33-MS, SCP Science, Baie-d'Urfe, Quebec, Canada). Les analyses sont effectuées en triples et les teneurs en minéraux sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de MS.

I.1.2.7 Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines totales est déterminée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 2000) en utilisant un facteur de conversion de l'azote de 6,25. Cette technique est basée sur le dosage de l'azote total présent dans l'échantillon. Elle se résume en trois étapes :

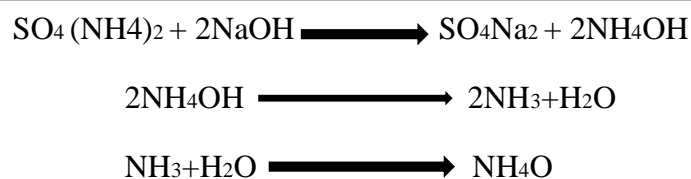
a) La minéralisation

Son but est de dégrader la matière organique azotée sous la forme de sel d'ammonium à l'aide d'un catalyseur (du sulfate de cuivre et du sulfate de potassium), de l'acide sulfurique à haute température (421 °C). Le carbone s'élimine sous forme de dioxyde de carbone (CO₂), l'hydrogène sous forme d'eau et l'azote reste en solution sous forme d'ion ammonium (NH₄⁺).



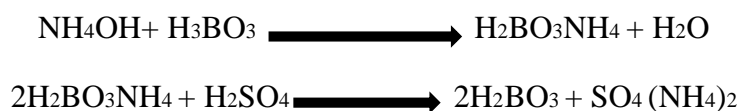
b) La distillation

Réalisée à froid par l'ajout de la soude à l'ammonium obtenu précédemment afin de changer le pH acide en un pH basique, ce qui a pour effet d'obtenir l'ammoniac qui sera entraîné par la vapeur de distillation.



c) Le titrage

Il est effectué par une solution titrante de l'acide sulfurique en présence d'un indicateur coloré, sur l'ammoniac complexé avec de l'acide borique (H₃BO₃).



1g d'échantillon de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est additionné de 20ml d'acide sulfurique (96-98%) et de 2g de catalyseur de sélénium. Le mélange est ensuite chauffé progressivement sur une rampe chauffante (minéralisateur de type Gerhardt-Kjeldatherme) jusqu'à ce que la solution soit limpide (couleur vert pâle). Après

refroidissement, le volume est complété à 100ml avec de l'eau distillée. Ensuite, 15ml de soude (40%) sont ajoutés à 10ml de l'échantillon minéralisé. Il se forme de l'ammoniac volatil qui sera condensé et recueilli dans une la solution de l'acide borique saturé (4%, pH 5,5) contenant le réactif du Tashiro. La distillation est arrêtée lorsque le volume recueilli atteint 100 ml. L'ammoniac distillé est ensuite titré par l'acide chlorhydrique (0,1 N). La teneur en azote total est calculée selon la formule suivante :

$$N (\%) = \frac{1.40 \times N(v_1 - v_2)}{PE}$$

N : normalité de l'acide chlorhydrique, **V₁** : volume en millilitre de l'acide chlorhydrique titré, **V₀** : volume en millilitre de l'acide chlorhydrique utilisé lors de l'essai à blanc, **PE** : la masse en gramme de la prise d'essai.

Si l'on admet que l'azote représente une moyenne de 16% de la masse des protéines, la concentration en protéines sera :

$$P (\%) = N (\%) \times 6,25$$

I.1.3 Evaluation de la qualité protéique

I.1.3.1 Détermination du profil en acides aminés

Une quantité de 50 mg de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est hydrolysée à une température de 110 °C pendant 24 h avec 10 ml de HCL (6 M) contenant 0,5 % (p/v) de phénol, dans des tubes scellées sous vide d'azote gazeux AOAC 982.30 (AOAC, 2000). Ensuite, 1 ml de chaque l'hydrolysats obtenu est neutralisé avec du NaOH (6 N) et le volume final est ajusté à 10 ml avec du tampon borate (0,1M). La teneur en tryptophane est déterminée séparément selon la méthode AOAC 988.15, par l'hydrolyse alcaline avec du NaOH (4,2 N) à 110 °C pendant 18 h.

Après l'hydrolyse, les particules non dissoutes sont éliminées par filtration à l'aide d'un filtre seringue cellulosique (0,2µm), et la dérivation des acides aminés est réalisée avec du chloroformiate 9 – fluorenylméthyle (FMOC) et du O- phtaldialdéhyde (OPA) en présence d'un (Norvaline, Sigma Chemical). La dérivation résultante de chaque échantillon est ensuite soumise à une analyse HPLC. Cette dernière est réalisée dans une unité d'HPLC analytique (Jasco, Tokyo, Japon) équipée de Pompe Jasco HPLC PU-2080, d'un détecteur de fluorescence FP-920, d'un injecteur d'échantillon AS-950 et d'un réchauffeur de colonne

(modèle 7981 ; Jones Chromatography, Hengoed, Royaume-Uni). La colonne utilisée était de type Zorbax Eclipse Plus C18 (5 m ; longueur 250 mm ; ID 4,6 mm).

La séparation chromatographique est réalisée en utilisant un mélange de deux éluants :

-Une phase mobile A : constituée d'hydrogénophosphate de sodium 10 mM, 10 mM de tétraborate de sodium et 5 mM de sodium à pH 8,2.

-Une phase mobile B : constituée d'acétonitrile, de méthanol et d'eau ultra pure au format 45:45:10.

-L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/min, en utilisant le gradient d'élution qui démarre à 4% de 0 à 2 min, après une augmentation de 4 à 10% entre 2 et 15 min et à 10% entre 15 à 18 min, cela donne lieu à une augmentation à 47% à 61 min et une nouvelle augmentation à 100 % jusqu'à 66 min, entre 66 et 71 min la concentration est maintenue à 100 %, puis on effectue le rinçage et le rééquilibrage de la colonne. Le pourcentage présenté est la concentration de la phase mobile B dans A.

Les courbes d'étalonnage des acides aminés (annexes 4) sont construites en utilisant les modèles de régression des moindres carrés linéaires, en traçant les rapports de surface des pics de chaque acide aminé et de l'étalon interne respectif en fonction de la concentration de chaque acide aminé en cours d'étude. La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont calculées sur la base des paramètres de la courbe d'étalonnage, et les teneurs en acides aminés sont rapportées en mg d'acide aminé/g de protéine.

I.1.3.2 Digestibilité *in vitro* des protéines

La digestibilité *in vitro* des protéines est déterminée selon la méthode internationale normalisée décrite par Minekus *et al* (2014), utilisant des fluides digestifs stimulés. Elle est réalisée en trois phases distinctes et séquentielles (figure 4) :

A) La phase orale

Une digestion initiale, stimulée avec l' α -amylase 1500 U/ml (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)). Elle est réalisée dans un fluide salivaire stimulé (Stimulated Salivary Fluid (SSF), la composition en Annexe 6).

B) La phase gastrique

Il s'agit d'une digestion secondaire, stimulée avec de la pepsine/HCl (25,000 U/ml) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)). Elle est réalisée dans un fluide gastrique stimulé (Stimulated Gastric Fluid (SGF), la composition en annexe 6).

C) La phase intestinale

C'est une digestion finale stimulée avec la bile (160 Mm) / pancréatine (800U/ ml) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA). Elle est réalisée dans un fluide intestinal stimulé (Stimulated Intestinal Fluid(SIF), la composition en annexe 6).

La mesure de la digestibilité *in vitro* est réalisée en triple essais pour chaque échantillon. Des essais parallèles sont effectués pour chaque échantillon afin de déterminer le volume d'HCl (1N) / NaOH (1N) nécessaire pour l'ajustement de pH de la phase en digestion. Des blancs sont réalisés uniquement avec les enzymes, et toutes les mesures de digestibilité sont à blanc corrigées. La digestibilité *in vitro* de protéines est calculée selon la formule suivante :

$$\text{La digestibilité } in vitro \text{ de protéines (\%)} = \frac{\text{teneur en Protéines bioaccessibles ((mg/g))}}{\text{Teneur initiale en protéines(mg/g)}} \times 100$$

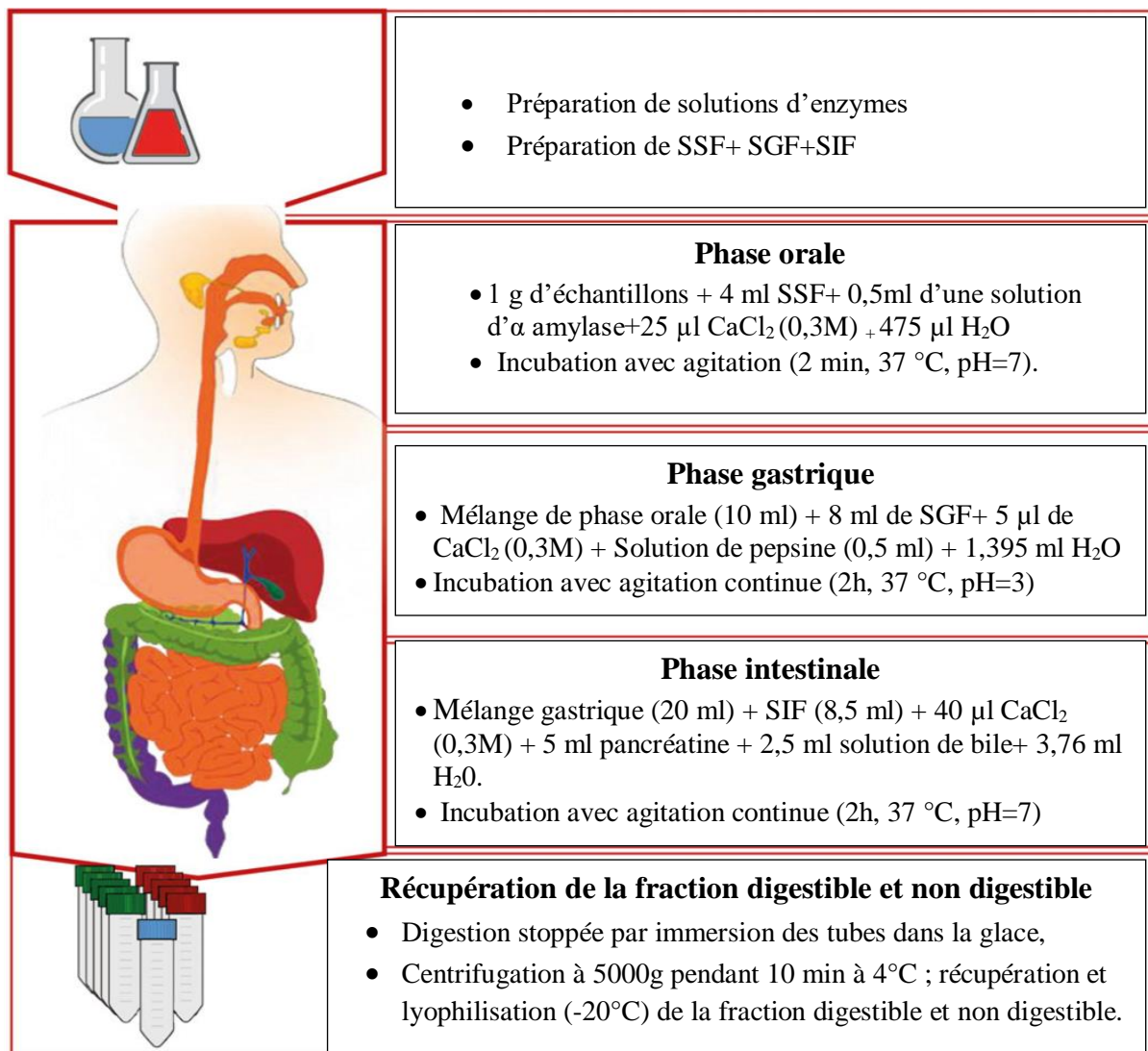


Figure 4 : Diagramme du processus de digestibilité *in vitro* des protéines INFOGEST digestion (Minekus *et al.*,2014).

I.1.4 Teneur en composés phénoliques et potentiel antioxydant

I.1.4.1 Extraction des composés phénoliques

L'extraction est effectuée selon la technique rapportée par Oomah *et al.* (2010) où 2g d'échantillon sont extraits avec 80ml de différents solvants (eau distillée, éthanol 60%, éthanol 80%, méthanol 60% et méthanol 80%) sur une plaque agitatrice pendant 2 heures à la température ambiante (température du laboratoire). L'extrait obtenu est filtré sous vide au moyen de creusets filtrants en verre fritté (porosité 4) puis centrifugés à 4500 tr pendant 15min. Par la suite, les solvants d'extractions sont éliminés par le passage au Rotavapor et les extraits obtenus sont lyophilisés et conservés au sec jusqu'à utilisation.

I.1.4.2 Dosage des composés phénoliques

I.1.4.2.1 Dosage des phénols totaux solubles

Le dosage des phénols totaux solubles est effectué par la méthode au Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi (1965) rapportée par Škerget *et al.* (2005). Le réactif du Folin-Ciocalteu ; mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (Lapornik *et al.*, 2005).

500 μ l d'extrait sont mélangés avec 2,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu puis additionnés de 2ml de carbonate de sodium (7,5%). Après 5 minutes d'incubation au bain marie à 50 °C, l'absorbance est mesurée à 760nm.

La teneur en composés phénoliques est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche d'échantillon (mg Eq AG/g MS). Une courbe d'étalonnage est obtenue avec de l'acide gallique utilisé comme standard (annexe 5).

I.1.4.2.2 Dosage des flavonoïdes

La quantité de flavonoïdes contenue dans les extraits de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est déterminée selon la méthode colorimétrique de Lamaison et Carnat (1990). Cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à se complexer avec le chlorure d'aluminium. Il résulte de cette réaction une coloration jaunâtre avec un maximum d'absorption à 430nm.

2 ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium hydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 2%) sont additionnés à 2ml d'extrait brut. Les tubes sont vigoureusement secoués et laissés à l'obscurité pendant 15min à température ambiante. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de la quercétine utilisée comme standard (annexe 5). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EqQ/g MS).

I.1.4.2.3 Dosage des tannins condensés

La teneur en tannins condensés est déterminée par la méthode à la vanilline (Deshpande et al.,1986). Elle est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tannins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré et mesuré à 500 nm. En premier lieu, 5ml de vanilline-HCl (1:1) sont ajoutés à 1ml de l'extrait. Après homogénéisation et incubation au bain marie à 30°C pendant 20min, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 500nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

Les résultats sont rapportés à une gamme étalon (annexe 5) et exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg Eq C / g de MS).

I.1.4.2.4 Dosage des tannins hydrolysables

La teneur en tannins hydrolysables est déterminée par la méthode au chlorure ferrique décrite par Mole et Waterman (1987). Cette méthode est basée sur la capacité du chlorure ferrique à réagir avec les unités des tannins hydrolysables pour donner une coloration bleue mesurée par spectrophotométrie à 660nm.

Au départ, 3,5 ml de chlorure ferrique (FeCl_3 à 0,01M dans HCl à 0.001M) sont ajoutés à 1ml d'extrait. Après homogénéisation, l'absorbance est mesurée à 660 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La teneur en tannins hydrolysables est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide tannique (annexe 5). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg Eq AT/g MS).

I.1.4.3 Potentiel antioxydant des extraits

Le potentiel antioxydant des extraits de poudre de feuilles de *Moringa Oleifera* est évalué au moyen de trois tests : l'activité antiradicalaire du DPPH, le pouvoir réducteur et la chélation du fer ferreux.

I.1.4.3.1 Activité antiradicalaire du radical DPPH

L'activité antiradicalaire du DPPH des extraits phénoliques est déterminée selon la méthode décrite par Brand-Williams *et al.* (1995). Elle est basée sur la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. Plus la perte de couleur est élevée plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort.

Un volume de 50 µl d'extrait brut est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (65µmol/l) fraîchement préparée. Après homogénéisation et incubation pendant 30 min (à l'abri de la lumière et à température ambiante), L'absorbance à 515 nm est mesurée. Un témoin positif avec l'acide ascorbique et du BHT est réalisé dans les mêmes conditions.

La capacité antioxydante de nos extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation :

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

- $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du milieu réactionnel (solution méthanolique du DPPH sans l'échantillon);

- A_{extrait} : Absorbance de l'extrait.

I.1.4.3.2 Le pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986). Elle repose sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} (FeCl_3) en fer ferreux Fe^{2+} (FeCl_2) en présence d'un agent chromogène, le ferricyanure de potassium $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

200µl d'extrait sont mélangés avec 500µl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 500µl d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium ($[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à 1%). Après incubation de ce mélange à 50°C pendant 20min, 500µl d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique (TCA à 10 %) sont ajoutés. Après centrifugation à 4500 tpm pendant 10 min, 1 ml de surnageant est mélangé avec 1 ml de l'eau distillée et 200µl de chlorure ferrique FeCl_3 (0,1%, P/V). Enfin l'absorbance est lue à 700nm.

Le pouvoir réducteur du fer est exprimé en mg équivalent d'acide ascorbique (mg Eq A ASC/g MS, par référence à une courbe d'étalonnage (annexe 5).

I.1.4.3.3 Chélation du fer ferreux

La chélation du fer ferreux des extraits est déterminée selon la méthode décrite par Zhao *et al.*, 2008, suivant le principe de la complexation des ions ferreux avec un composé ligand : 3-(2-pyridyl)-5, 6-diphényl-1, 2, 4 triazine-4',4''-disulfonate de sodium (ferrozine). Le complexe ferrozine-fer II de couleur violette présente un maximum d'absorption à 562 nm.

50µl de FeCl₂ (2mM) sont ajoutées 100µl d'extrait. La réaction est initiée avec 100µl de ferrozine (5mM) et 2,75ml d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé et incubé pendant 10min à température ambiante et l'absorbance est lue à 562 nm. Un témoin positif avec l'EDTA est réalisé de la même manière. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

- $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du milieu réactionnel ;

- A_{extrait} : Absorbance de l'extrait.

I.1.5 Analyse statistique des résultats

Toutes les analyses sont menées en triple et les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de la variance, suivie d'une comparaison multiple des moyennes (Test LSD) au moyen du logiciel STATISTICA (version 5.5). Les différences sont considérées significatives à $p < 0.05$.

I.2 Résultats

I.2.1 Analyses physicochimiques de la poudre

I.2.1.1 Test de couleur

Les résultats obtenus lors du test de couleur, déterminé à l'aide d'un colorimètre, sont résumés dans le tableau X.

Tableau VIII : Résultats de couleurs de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.

Paramètres	Valeurs
L^*	$55,60 \pm 1,47$
a^*	$-9,12 \pm 0,14$
b^*	$36,50 \pm 0,45$
C^*	$36,50 \pm 0,47$
h	$104,47 \pm 0,11$

D'après les résultats du tableau X, la valeur du paramètre L^* (55,60) enregistrée pour la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est relativement inférieure à la valeur de 100, ce qui indique une faible clarté. En ce qui concerne la valeur négative d' a^* (-9,12), ceci indique que la couleur tend légèrement vers le vert et la valeur positive du paramètre b^* (36,50) désigne une tendance vers le jaune. Enfin, les grandeurs dérivées de chromaticité C^* et teinte h sont relativement prononcées (36,5 et 104,47 respectivement).

I.2.1.2 Composition biochimique globale

La composition chimique de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* étudiée est indiquée dans le tableau IX.

Tableau IX: Composition chimique globale de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*

Eléments	Teneurs
Eléments principaux (g/100g MS)	
Humidité	9,15 ± 0,2
Protéine	23,64 ± 0,1
Cendres	7,2 ± 0,2
Lipides	6,84 ± 0,5
Carbohydrates	28,25 ± 0,1
Fibres alimentaires (g/100g MS)	
Insolubles	20,8 ± 4,9
Solubles	4,14 ± 0,1
Totales	24,92 ± 0,3
Minéraux (µg / g)	
Ca	29373,92 ± 0,46
Mg	11351,9 ± 1,8
Fe	248,10 ± 5,4
Na	4,00 ± 0,08
K	12,99 ± 0,23
Mn	19,62 ± 0,54
Cu	3,92 ± 0,04
Zn	18,17 ± 0,62

Les résultats du tableau XI montrent une teneur importante en protéines (23,64 g/100g MS), en lipides (6,84 g/100g de MS) et en cendres (7,2 g/100g de MS). Les feuilles de *Moringa* sont caractérisées par une teneur appréciables en fibres alimentaires (24,92g/100g), dont la fraction insoluble occupe une proportion relativement élevée (20,8g/100g). La matière

minérale présente est dominée par le calcium, le magnésium et le fer (29373,92 µg /g, 11351,9 µg /g et 248,10 µg /g) respectivement.

I.2.2 Qualité protéique de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*

I.2.2.1 Profil d'acides aminés

La composition et les teneurs en acides aminés de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera* comparées au modèle recommandé FAO/OMS/UNU (2007) est indiquée dans le tableau XII.

Tableau X : Profil en acides aminés de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera* par rapport au schéma de notation provisoire de la FAO/OMS/UNU (mg/g de protéines).

Acides aminés	Teneur mg /g de proteines	FAO/OMS
Asp	91,45 ± 2,18	
Glu	74,62 ± 2,48	
Ser	40,59 ± 0,56	
His	14,14 ± 0,72	15
Gly	20,70 ± 0,68	
Thr	40,12 ± 0,69	23
Arg	144,95 ± 0,09	
Ala	11,64 ± 1,91	
Tyr	24,89 ± 1,41	30
Val	43,75 ± 0,01	39
Met	17,41 ± 0,78	
Phe	47,55 ± 1,91	
Ile	26,22 ± 3,19	30
Leu	58,17 ± 0,09	59
Ly	57,49 ± 1,44	45
Pro	16,98 ± 0,69	
Trp	18,28 ± 0,04	6
Cys	50,53 ± 8,87	22

ΣAAA^1	$72,4 \pm 7,6$	
ΣAAS^2	$67,9 \pm 0,8$	
ΣAAE^3	$375,6 \pm 51,6$	
$\Sigma AANE^4$	$400,9 \pm 16,2$	
ΣAA^5	$776,5 \pm 59,5$	

- 1) Acides aminés aromatiques : Phe + Tyr.
- 2) Acides aminés sulfuriques : Cys + Met.
- 3) Acides aminés essentiels : Thr + Cys + Val + Met + Ile + Leu + Tyr + Phe + His + Lys + Trp.
- 4) Acides aminés non essentiels : Asp + Ser + Glu + Pro + Gly + Ala + Arg.
- 5) Acides aminés totaux.

Les résultats du tableau XII montrent que les teneurs en acides aminés non essentiels minoritaires (alanine, proline et méthionine) oscillent entre 11,64 et 17,41 mg/g de protéines. Le profil en acides aminés des feuilles de *Moringa oleifera* indique la présence de tous les acides aminés essentiels (histidine, thréonine, tyrosine, valine, isoleucine, leucine, lysine, tryptophane et cystine) avec une teneur globale : $\Sigma AAE = 375.6$ mg/g de protéine. Les acides aminés essentiels majoritaires sont : Leucine, lysine et valine avec des teneurs respectivement de 58,17, 57,49 et 43,75 mg /g de protéines. Par contre les acides aminés essentiels minoritaires (histidine, tryptophane et tyrosine) sont présents avec des teneurs variant entre 14,14 et 18,28 mg/g de protéine.

Ces résultats montrent que les feuilles de *Moringa oleifera* ont un bon équilibre en acides aminés ce qui s'accorde avec le modèle de référence FAO/OMS/UNU (2007).

I.2.2.2 Digestibilité *in vitro* des protéines

La digestibilité *in vitro* des protéines est déterminée selon la méthode décrite par Minekus *et al* (2014) et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau XI.

Tableau XI. Digestibilité *in vitro* de protéines de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.

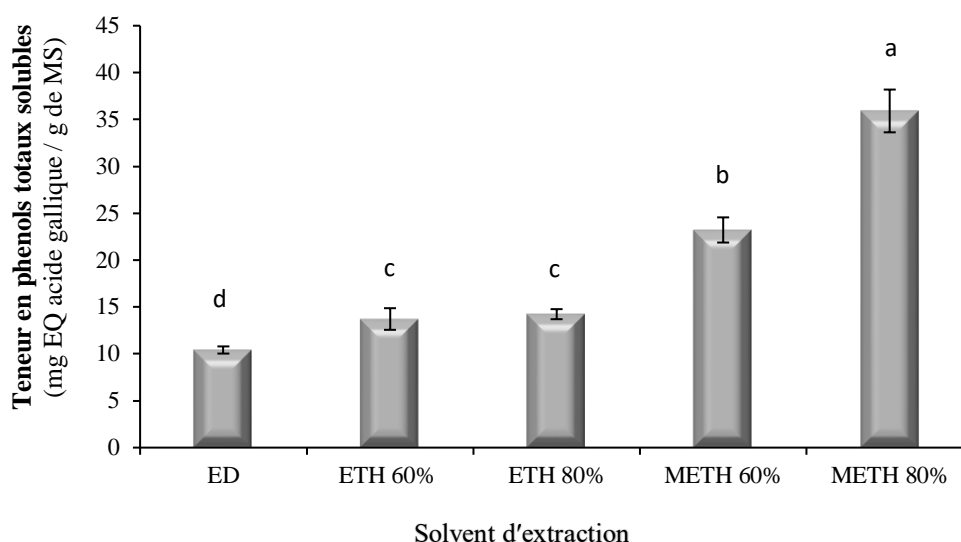
Protéines initiales (mg/g)	Protéines bio-accessibles (mg/g)	Digestibilité (%)
$236,41a \pm 1,71$	$158,24b \pm 8,75$	$66,94 \pm 4,27$

Les résultats du tableau XII montre une différence significative ($p < 0.05$) entre la teneur en protéines initiale et la proportion bioaccessibles. Nos données analytiques montrent qu'à l'issue des trois phases de digestibilité des protéines contenues dans les feuilles (236,41 mg/g), 66,9% sont digestibles *in vitro*.

I.2.3 Teneur en composés phénoliques et potentiel antioxydant

I.2.3.1 Teneur en polyphénols totaux solubles

La figure 5 illustre une variabilité de teneurs en phénols totaux solubles entre les différents extraits de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.



*les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD où $a > b > c > d$).

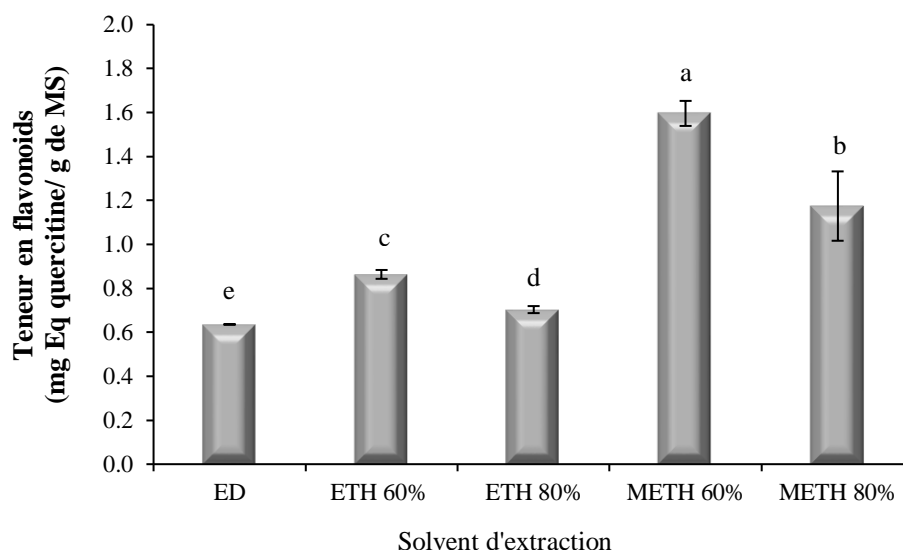
Figure 5 : Teneur en polyphénols totaux solubles de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.

L'analyse de la variance révèle que le facteur « solvant d'extraction » exerce un effet significatif ($p < 0.05$) sur les teneurs enregistrées. Les résultats montrent que l'extrait aqueux renferme la plus faible teneur en composés phénoliques (10,41 mg EQ AG / g de MS).

La substitution de l'eau avec le méthanol s'accompagne d'une amélioration significative ($p < 0.05$) de la solubilisation des phénols extraits. L'optimum d'extraction est enregistré pour le méthanol (80%) suivi du méthanol (60%) avec des teneurs de 35,90 et 23,21 mg Eq AG/g MS respectivement. Toutefois, aucune différence significative n'est enregistrée entre l'extraction avec Ethanol 60% et 80%.

I.2.3.2 Teneur en flavonoïdes

Les résultats des teneurs en flavonoïdes des différents extraits de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sont illustrés dans la figure 6.



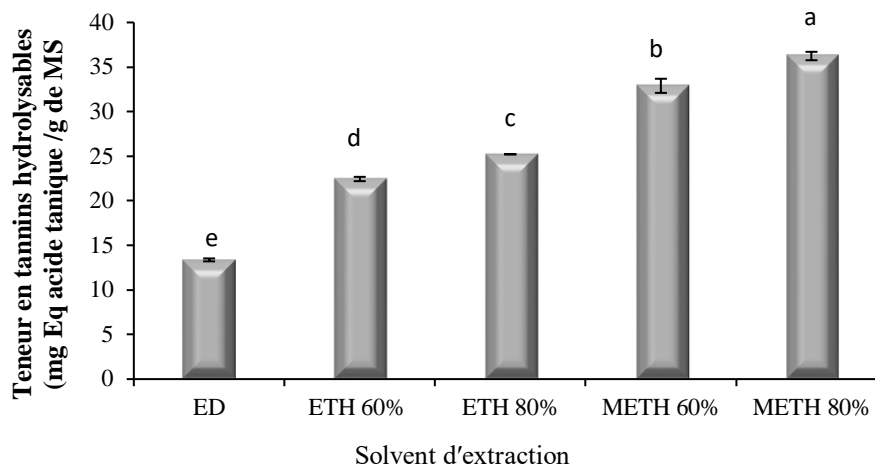
Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD où $a > b > c > d > e$).

Figure 6 : Teneur en flavonoïdes de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.

Quel que soit le solvant d'extraction utilisé, l'analyse de la variance révèle un effet significatif ($p < 0.05$) des teneurs enregistrées. L'extrait aqueux des feuilles se caractérisent par la plus faible teneur en flavonoïdes (0,67mg EQ Quercetine/g de MS). Tandis que l'optimum d'extraction est enregistré avec le méthanol 60% où une teneur de 1,6 mg EQ Quercetine/g de MS est enregistrée.

I.2.3.3 Teneur en tanins hydrolysables

La figure 7 illustre la variabilité des teneurs en tanins hydrolysables des extraits de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.



Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD où $a > b > c > d > e$).

Figure 7 : Teneur en tanins hydrolysables de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*

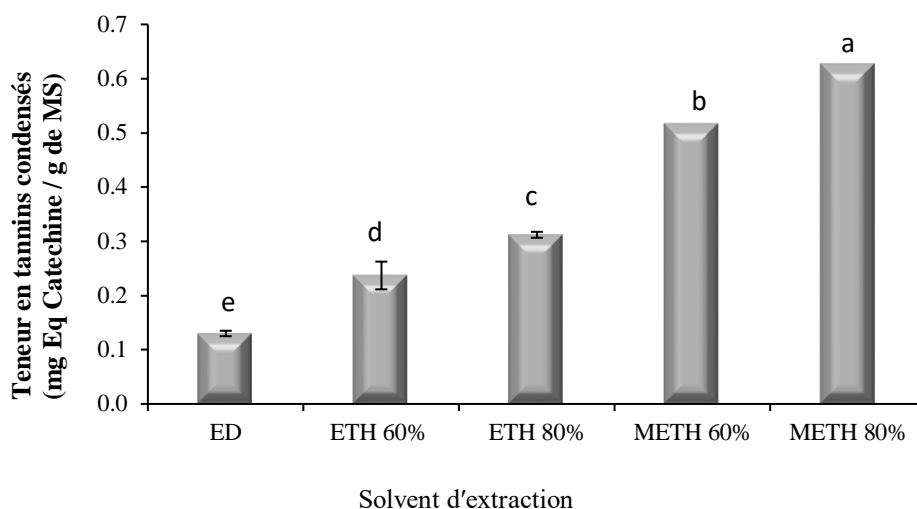
L'analyse de la variance révèle que le facteur solvant d'extraction, exerce un effet significatif ($p < 0,05$) sur les teneurs enregistrées. L'extrait aqueux affiche la plus faible teneur (13,37 mg Eq AT/g MS). Cependant lors de son utilisation en substitution de 60% et 80% de l'eau, l'éthanol et le méthanol améliorent de manière significative ($p < 0.05$) la solubilisation des tannins hydrolysables.

Le maximum d'extraction est enregistré avec l'utilisation du méthanol 80 % (36,23 mg Eq AT/g MS) suivie par le méthanol 60%, éthanol 80% et enfin éthanol 60%. Les valeurs enregistrées sont respectivement : 32.89, 25.21 et 22.44 mg Eq AT/g MS.

I.2.3.4 Teneur en tanins condensés

La variation des teneurs en tanins condensés des extraits de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* est présentée dans la figure 8.

Dans nos conditions expérimentales, l'analyse de la variance révèle que le facteur solvant d'extraction, exerce un effet significatif ($p < 0.05$) sur les teneurs enregistrées. L'extrait aqueux de feuilles renferme la plus faible quantité en tanins condensés (0,13 mg Eq C/g MS). Nous notons également que la substitution de 60% et 80% de l'eau à l'éthanol ou méthanol améliore de manière significative ($p < 0.05$) la solubilisation des tanins condensés. Le méthanol s'avère le meilleur extracteur, à 80% le maximum d'extraction est atteint avec une teneur de 0.62 mg Eq C/g de MS suivi par le méthanol 60% avec une teneur de 0,51 mg Eq C/g de MS.



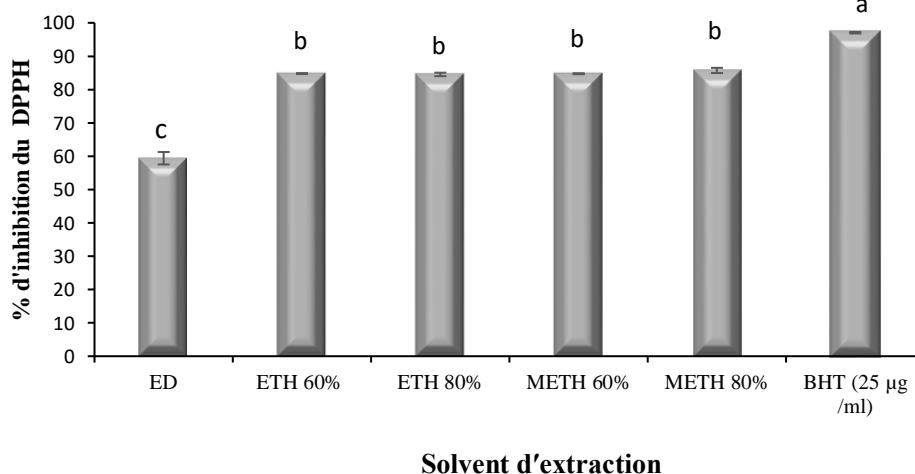
Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD où $a > b > c > d > e$).

Figure 8 : Teneur en tannins condensés de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera*

I.2.4 Potentiel antioxydant

I.2.4.1 Activité anti radicalaire du DPPH

Les résultats du test du radical DPPH réalisé sur les différents extraits de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sont illustrés dans la figure 9.



Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD où $a > b > c$).

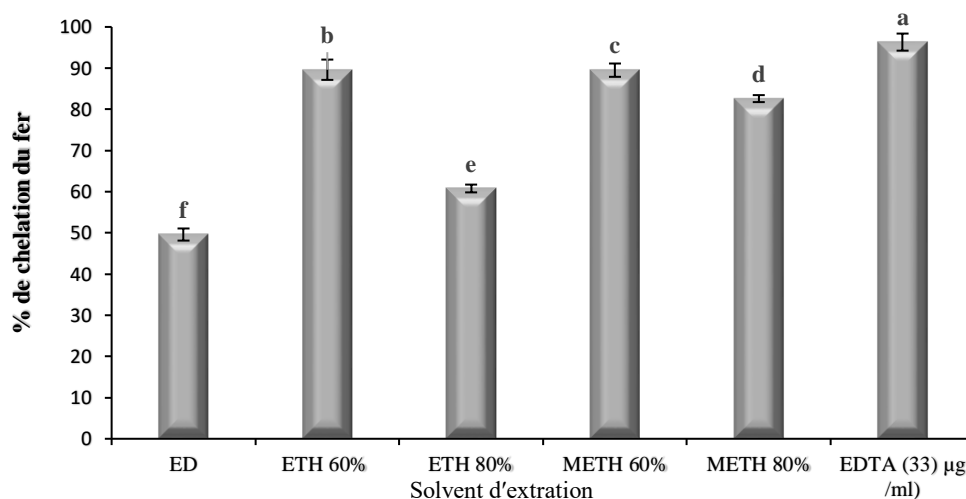
Figure 9 : Activité anti radicalaire du DPPH des extraits de feuilles de *Moringa oleifera*.

D'après les résultats de la figure 9, l'activité antiradicalaire des différents extraits s'intègre dans l'intervalle des données observées avec l'antioxydant de synthèse utilisé à 25 µg/ml où

nous avons noté une valeur de 97,02%, La plus faible valeur du piégeage du radical DPPH est observée avec l'extrait aqueux (59,38%). La substitution de l'eau avec le solvant organique améliore l'activité du piégeage du DPPH. Cependant, aucun effet significatif ($p > 0,05$) n'est enregistré sur l'activité antioxydante et ce quel que soit le solvant d'extraction (éthanol ou méthanol) et la concentration (60% et 80%) utilisé.

I.2.4.2 Chélation du fer

Les résultats du pouvoir chélateur du fer par les extraits de feuilles de *Moringa oleifera* sont illustrés dans la figure 10.



Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD où $a > b > c > d > e > f$).

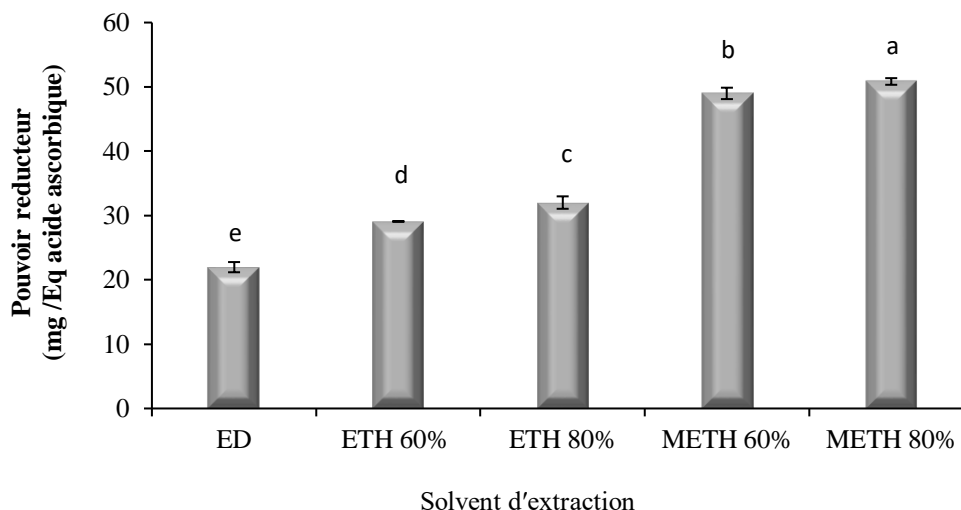
Figure 10 : Chélation du fer par les extraits de feuilles de *Moringa oleifera*.

D'une manière générale, le pouvoir de chélation du fer varie significativement ($p < 0,05$) selon le solvant d'extraction utilisé. D'après les données de la figure 10, le pouvoir chélateur maximum est enregistré avec l'EDTA 33 µg/ml (96,31%) et la plus faible est observée avec l'extrait aqueux (49,58%).

Nous notons également que la substitution avec 60% de solvant s'accompagne d'une augmentation de l'activité chélatrice du fer, ou l'optimum de chélation est enregistré avec l'extrait à l'éthanol 60% (89,60) suivie de l'extrait au méthanol 60% (89,49%).

I.2.4.3 Pouvoir réducteur

La figure 11 illustre les résultats du pouvoir réducteur des différents extraits étudiés où tous ces derniers manifestent un pouvoir réducteur ferrique qui varie significativement ($p < 0,05$) avec le type du solvant utilisé.



Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD où $a > b > c > d > e$).

Figure 11 : pouvoir réducteur des extraits de feuilles de *Moringa oleifera*.

Les données analytiques montrent que l'extrait aqueux se caractérise par la plus faible activité réductrice du fer (21,97 mg EQ acide ascorbique/ g de MS) tandis que l'extrait méthanolique à 80% marque l'activité réductrice la plus élevée (50,84 mg EQ acide ascorbique/ g de MS).

I.3. Discussion

La première partie de notre travail porte sur la caractérisation biochimique, l'activité antioxydante ainsi que l'étude de la digestibilité *in vitro* des protéines de feuilles issues de l'arbre de *Moringa oleifera* poussant en Algérie.

Les échantillons de feuilles analysés ont montré l'importance de la teneur en protéines (23,64 g/100g de MS). Cette teneur s'intègre dans l'intervalle de valeurs (22,2 et 34,4 g/100g de MS) rapportées dans la littérature (Makkar et Becker 1996; Foidl *et al.*, 2001; Oduro *et al.*, 2008; Sánchez Machado *et al.*, 2010; Moyo *et al.*, 2011; Ijarotimi *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2019; Sebola *et al.*, 2019). Ces auteurs désignent les feuilles de *Moringa* comme une excellente source de protéines végétales. Par ailleurs, certaines études (Amabye *et al.*, 2015 et Mune *et al.*, 2016) ont rapporté des teneurs en protéines beaucoup plus faibles pour les

feuilles de *Moringa oleifera* cultivé en Ethiopie (10.31g/100g de MS) et au Cameroun (18,63 g/100 g de MS).

La teneur en lipides que renferme nos échantillons de feuilles de *Moringa oleifera* (6,84g/100g de MS) est très proche de celle signalée par Ziani *et al.* (2019) en travaillant sur les feuilles de la même espèce cultivée à Tamanrasset. Ces derniers ont enregistré une teneur de l'ordre de 6,5 g/100g de MS. Cependant, Oduro *et al.* (2008) ont signalé une teneur en lipide inférieure (2,5g/100g de MS) pour le même type d'échantillons cultivés en Guinée, tandis qu'en Ethiopie, Gebregiorgis *et al.*, 2015 ont rapporté une teneur élevée en lipides (10,32 g/100g de MS).

Les feuilles de *Moringa oleifera* sont caractérisées par une teneur relativement élevée en fibres (24,92 g /100g de MS) dont 83% sont représentées par la fraction insoluble. La teneur en fibres enregistrée s'accorde aux données rapportées par divers auteurs (Foidl *et al.*, 2001 ; Moyo *et al.*, 2011; Nouman *et al.*, 2014; Sebola *et al.*, 2019).

Les teneurs en minéraux sont également en accord avec celles notées par Anjorin *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2014; Nouman *et al.*, 2014; Gebregiorgis *et al.*, 2015 ; Granellaa *et al.*, 2021. Ces derniers révèlent une dominance en Ca, Mg et en fer.

De tels écarts dans la composition biochimique de feuilles de *Moringa Oleifera* peut être attribuer selon Makkar et Becker 1996 et Foidl *et al.*, 2001 aux variations des facteurs géographiques, climatiques, environnementaux, génétique et aux stades de maturité des feuilles. D'autres facteurs interviennent à savoir : utilisation des fertilisants, la saison de récolte, les conditions de stockages de feuilles après leur récolte ainsi que la variabilité du procédé adopté pour chaque évaluation (Anjorin *et al.*, 2010; Nouman *et al.*, 2013 ; Ziani *et al.*, 2019).

Le nombre d'acides aminés identifiés dans les protéines de feuilles de *M. oleifera* (18 AA) est comparable aux données rapportées par Sánchez-Machado *et al.*, 2010; Moyo *et al.*, 2011 ; Okereke *et al.*, 2013. Ces derniers ont signalé un nombre acides aminés variant entre 16 et 19. De plus, 52% des acides aminés recensés sont représentés par les acides aminés non essentiels, à l'exception de l'acide aminé glutamine et OH-proline ; ces deux derniers sont des dérivés respectivement de l'acide glutamique et de la proline (Navaratne *et al.*, 2019).

Parmi les acides aminés identifiés, l'arginine est l'élément majoritaire avec une teneur de 144,95 mg/g de protéines, tandis que l'alanine (11,64 mg/g de protéines) est l'acide amine minoritaire. Ce résultat est comparable aux données rapportées par Olaofe *et al.* (2013). D'autres études révèlent la dominance de l'acide glutamique au sein du profil d'acides aminés de *Moringa oleifera* (Okereke *et al.*, 2013; Mune *et al.*, 2016), tandis que Moyo *et al.*,

2011;Sohaimy *et al.*,2015 signalent la dominance de deux acides aminés : leucine et alanine. Selon les études d'Okereke et al.(2013) et Olaofe *et al.* (2013), la plus faible proportion est retrouvée chez la méthionine, tandis que Mune et al. (2016) l'attribue à la cystine.

Toutefois, l'analyse du profil en acide aminés des échantillons étudiés révèle la présence de tous les acides aminés dits essentiels, avec une proportion de 48%. Cette dernière dépasse la teneur signalée dans l'étude de Sánchez-Machado et al. 2010 (44%) et légèrement inférieure à celle rapportée par Lalas et al. 2017 (50%).

La dominance des acides aminés essentiels « leucine et lysine » (58,2 et 57,5 mg/g de protéines respectivement), est confirmée par les données rapportées par Sohaimy *et al.* 2015 et Mune *et al.* 2016. Ces deux acides aminés sont généralement présents à des niveaux très faibles dans les matières végétales notamment les céréales (Moyo et al. 2011). Sur ce point, Mune et al. (2016) ont mentionné que la farine de feuilles de *Moringa oleifera* pourrait être utilisée pour compléter les protéines des céréales. Ces deux éléments sont également signalés comme de puissants acides aminés à pouvoir antioxydant qui contribuent à la détoxification des composés nocifs et la protection du corps contre les radiations (Brisibe *et al.*, 2009). En revanche, la lysine assure une absorption adéquate du calcium et aide à la production d'anticorps dans le ceps animal (Moyo *et al.*, 2011).

Sur cette approche, la présence de tous les acides aminés essentiels dans les feuilles de *Moringa oleifera* est un résultat approuvé par plusieurs auteurs (Foidl *et al.*, 2001 ;Sánchez-Machado *et al.*, 2010; Moyo *et al.*, 2011; Mune *et al.*, 2016 ; Lalas *et al.*, 2017; Navaratne *et al.*, 2019). Ce qui affirme l'hypothèse rapportée par Rockwood et al. (2013) ; indiquant que la structure foliaire de la plante contient des quantités importantes en 10 acides aminés essentiels.

Les variations de la composition en acides aminés pourraient être influencées par la qualité de la protéine et l'origine de la plante (Sánchez-Machado *et al.*, 2010 ; Moyo *et al.*, 2011).

Le potentiel de qualité alimentaire des protéines comme source d'acides aminés peut être généralement justifiée par la comparaison avec le modèle de référence FAO/OMS/UNU (2007) ; modèle recommandé d'acides aminés essentiels. Les résultats rapportées dans notre étude sur le profils en acides aminés essentiels des feuilles de *Moringa oleifera* étaient au-dessus de la référence (FAO/OMS/UNU, 2007), un résultat qui s'accorde avec les travaux de différents auteurs (Nouman *et al.*, 2014; Mune *et al.*, 2016) . Ces derniers ont observé un bon équilibre des acides aminés dans les feuilles de *Moringa oleifera*, ce qui pourrait être utilisé comme une bonne source d'acides aminés essentiels. Toutefois, l'apport d'adéquation le plus

élevé est enregistré avec la cystine. Ce résultat est confirmé dans les études rapportées par divers auteurs (Akajiaku *et al.*, 2018 ; Navaratne *et al.*, 2019) où la dominance des acides aminés soufrés dans les feuilles de *Moringa oleifera* est signalée. Suivie par la suite par l'apport élevé en thréonine, ceux qui confirment l'hypothèse rapportée par Mune *et al.* (2016) qui notent la possibilité d'utiliser la farine de feuilles de *Moringa oleifera* comme complément protéique des céréales (pauvres en thréonine).

La qualité d'une protéine dépend aussi de la digestibilité et de la biodisponibilité des acides aminés qui la composent pour leur utilisation anabolique (Boye *et al.*, 2012). L'évaluation de la digestibilité *in vitro* des protéines, des feuilles de *Moringa oleifera* révèle une digestibilité de 66,9 %. Cette valeur est légèrement inférieure à celle rapportée par Foidl *et al.*, 2001 qui est de 79%. Une telle différence peut être aussi liée à la méthodologie utilisée.

Cependant, ce résultat est nettement supérieur aux pourcentages récemment rapportés par Teixeira *et al.* 2014 ; Nouman *et al.* 2014; Mune *et al.* 2016. Les valeurs signalées par ces auteurs sont de 31,8, 56,5 et 57,2 % respectivement). Sur ce point, Teixeira *et al.* 2014 expliquent cette faible digestibilité *in vitro* de protéines par la dominance de protéines insolubles (70,1%), en raison de leur faible teneur en acides aminés soufrés, de l'interaction avec des composants non protéiques, appelés métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, tanins) et fibres alimentaires, qui peuvent former des complexes irréversibles avec des protéines, affectant ainsi leur solubilité, leur structure compacte et à la présence des inhibiteurs de protéases (Wang *et al.*, 2008 ; Boye *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015 ; Devisetti *et al.*, 2016). Ce qui confirme que les protéines végétales sont moins sensibles à la digestibilité *in vivo* par rapport aux protéines animales (Wang *et al.*, 2008; Nouman *et al.*, 2014).

La mise en évidence de ses métabolites secondaires (phénols totaux solubles, flavonoïdes, tanins hydrolysables et tanins condensés) dans les extraits de feuilles de *Moringa oleifera* est en accord avec les données de la littérature (Foidl *et al.*, 2001; Amaglo *et al.*, 2010; Sohaimy *et al.*, 2015; Nouman *et al.*, 2016; Lalas *et al.*, 2017; Ziani *et al.*, 2019).

La comparaison avec les données de la littérature n'est pas aisée, tant divers facteurs (facteurs géographiques, climatiques, utilisation de fertilisants, stade de maturité, saison de récoltes, condition de stockage, procédé d'extraction, etc) peuvent influencer. Dans le présent travail seul le solvant d'extraction intervient dans la variabilité des teneurs en ces différentes classes de métabolites secondaires étudiées.

Les teneurs en phénols totaux solubles (10,41 à 35,9 mg Eq AG /g MS) s'intègrent dans l'intervalle des valeurs rapportées par Makkar *et al.* (1996) ; Rodríguez *et al.* (2015) ;

Sohaimy et al. (2015) ; Lalas et al. (2017). Les valeurs trouvées par ces auteurs oscillent entre 6,00 et 48,35 mg Eq AG /g MS. Cependant, dans une autre étude, Wangcharoen et al. (2011) ont trouvé une teneur beaucoup plus faible (4.59 mg EQ AG/g MS).

La teneur en flavonoïdes de nos échantillons (0,67 à 1,6 mg Eq Q/g MS) est comparable à celle rapportée par Sohaimy et al. (2015) (0.26 mg Eq Q/g MS), mais inférieure à celle signalée par Lalas et al. (2017) (12.64 mg Eq Q/g MS). Toutefois, les feuilles de *Moringa oleifera* renferment des teneurs considérables en tannins hydrolysables (13,37 à 36,23 mg Eq AT/g MS) et des teneurs plus faibles en tannins condensées (0,13 à 0,62 mg Eq C/g MS). Un résultat similaire est rapporté par Foidl et al., (2001). Ce constat pourrait être expliqué par la dépolymérisation et l'oxydation des tanins lors du séchage des feuilles (Moyo *et al.*, 2011).

Le facteur solvant est généralement en faveur du méthanol. Le plus grand pouvoir extracteur de ce dernier est lié à sa capacité à lyser les membranes cellulaires et à libérer les composés, en augmentant leurs taux de diffusion et d'extraction (Sohaimy *et al.*, 2015). Nous avons noté que l'incorporation du méthanol à l'eau en raison de 80% améliore la solubilité des phénols et tannins, ce qui est en accord avec les travaux publiés par Sohaimy et al. (2015) ; Devisetti et al. (2016). Les flavonoïdes enregistrent une meilleure solubilisation dans l'éthanol : eau (80%), ce résultat s'accorde avec ceux signalés par Wang et al. (2017) et Xie et al. (2017) qui ont obtenu une meilleure solubilisation avec éthanol 70% et 75% respectivement.

L'adéquation de polarité peut expliquer l'utilité du solvant, comme le soulignent Sohaimy et al. (2015) et Xie et al. (2017), où le méthanol ou l'éthanol sont favorisés pour l'extraction des composés semi-polaires, tandis que l'eau pour l'extraction des composés polaires.

En parallèle, diverses études ont rapporté le potentiel biologique des extraits de feuilles de *Moringa oleifera*, notamment l'activité antioxydante (Siddhuraju *et al.*, 2003; Iqbal *et al.*, 2006; Amaglo *et al.*, 2010; Moyo *et al.*, 2011). L'activité antioxydante des extraits est évaluée au moyen de trois tests : effet scavenger du radical DPPH, pouvoir réducteur ferrique et la chélation du fer ferreux. Quel que soit le solvant organique utilisé (méthanol ou éthanol), tous les extraits élaborés, exercent des activités antioxydantes considérables à l'égard des tests réalisés, cela peut s'expliquer par l'apport non seulement quantitatif mais aussi qualitatif des composés phénoliques contenus dans les feuilles de *Moringa oleifera* (Padma *et al.*, 2009; Amaglo *et al.*, 2010).

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1 Matières premières

Les matières premières utilisées pour l'élaboration des pâtes alimentaires sujettes à la formulation sont composées de :

- **Semoule**

L'ensemble des essais relatifs aux pâtes sèches sont réalisés avec le même lot de semoule de blé dur du commerce, conservée à température ambiante dans un endroit sec.

- **Poudre de feuilles de *Moringa oleifera***

Cette poudre est obtenue à partir des feuilles de *Moringa oleifera* cueillies en juin 2017 dont la taille des particules est inférieure à 0,5 mm.

- **Eau**

L'eau utilisée pour la fabrication des pâtes alimentaires est une eau potable du robinet.

II.1.2 Formulation des pâtes alimentaires

Pour un poids de 500g, quatre sortes de pâtes sont produites : un contrôle à base de semoule de blé dur à 100% et trois autres enrichies avec de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* en raison de 5, 10 et 15%.

Pour chaque formulation de pâte, l'eau et la matière solide sont mixés pendant 10 min en utilisant un pétrin pour l'obtention d'une pâte homogène, à l'aide d'un laminoir destiné à la fabrication des pâtes traditionnelles type MARCATO (Mod 2171, Chine). Les feuilles de pâtes sont ensuite découpées en rubans avec l'emporte-pièce attaché au laminoir (section découpage à 10mm de largeur). Les pâtes produites sont séchées à température ambiante, stockées dans des sacs en polyéthylène.

II.1.3 Préparation des échantillons de pâtes

Une partie des différents types de pâtes élaborées (figure 12) est moulue avec un moulin (CGR-8001, Chine) ensuite tamisés à un diamètre inférieur à 0,5 mm (Retsch Analytical seive shaker AS200). Les poudres obtenues représentent les pâtes crues et sont conservées au réfrigérateur (4°C) dans des tubes en polyéthylène pour des analyses physicochimiques. L'autre partie représente les pâtes brutes intégrales. Elles sont conservées également au réfrigérateur et seront utilisées pour évaluer la couleur et la qualité de cuisson.

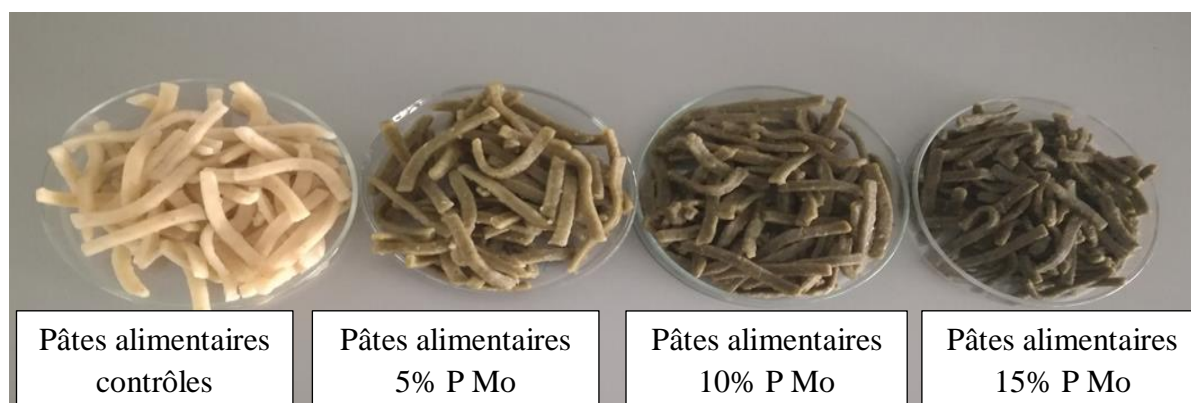


Figure 12 : Pâtes alimentaires contrôles et enrichies avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*.

La procédure de cuisson appliquée est la même que celle décrite par Petitot *et al.* (2010). Une quantité de 25 g de pâtes est cuite dans 500 ml d'eau distillée bouillante au temps de cuisson optimal, qui correspond à la durée nécessaire pour obtenir la gélatinisation complète de l'amidon (Gelencsér *et al.*, 2008). Celle-ci est déterminée en retirant un morceau de pâtes de l'eau à 30 secondes d'intervalle et le pressant entre les doigts. Après cuisson, les échantillons de pâtes sont rincés avec de l'eau distillée et laissés s'égoutter pendant 2 minutes. Ces derniers sont lyophilisés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, moulue et tamisés à un diamètre inférieure à 0,5 mm. Les poudres obtenues représentent les pâtes cuites, et sont conservées au réfrigérateur (4°C) dans des tubes en polyéthylène pour les analyses physicochimiques.

II.1.4 Evaluation de la qualité de cuisson des pâtes

La détermination du temps optimal de cuisson des pâtes est précédemment expliquée par Petitot *et al.* (2010). Les pertes à la cuisson sont évaluées après combinaison des eaux de cuisson et de rinçage dans un bécher. Des aliquotes de 1 ml sont ensuite transférés dans des tubes Eppendorf pré-pesés, puis, concentrés dans un concentrateur (Eppendorf AG 5301 Concentrator 22331, Allemagne) pour évaporer l'eau. Les tubes sont ensuite séchés pendant une nuit à l'étuve à $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à poids constant. Le résidu résultant est pesé et exprimé en pourcentage de l'échantillon de pâtes d'origine. L'absorption d'eau des pâtes égouttées a été évaluée en pesant les pâtes avant et après cuisson suivant la formule suivante :

$$AE (\%) = [(W_1 - W_2) / W_2] * 100$$

AE : Absorption d'eau, *W₁* : Poids du produit cuit (g), *W₂* : Poids des pâtes crues (g).

II.1.5 Analyses physicochimiques des pâtes

II.1.5.1 Test de couleur des pâtes

La couleur des échantillons de pâtes crues et cuites (contrôles et enrichies) est mesurée à l'aide d'un colorimètre (Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Japan). Les différences de couleur sont enregistrées en triple selon les composantes de CIELAB, tel que décrit dans la partie I (I.1.2.1).

II.1.5.2 Composition chimique globale

Les pâtes contrôles et enrichies (crues et cuites) sont analysées pour leur contenu en eau par séchage infrarouge à 105°C (Scaltec SMO 01, Heiligtstadt, Allemagne). Les teneurs en cendres, en lipides totaux et en protéines sont également déterminées respectivement suivant les méthodes AOAC (2000), AOAC (1998) et Kjeldahl (AOAC, 2000). Les teneurs en fibres alimentaires totales (TDF) sont déterminés à l'aide de kits enzymatique (K-TDFR Megazyme, crok, Irlande) suivant la méthode de Prosky et al. (1985).

Les analyses sont conduites en trois répétitions et les résultats sont exprimés en g/100 pour l'humidité et en g/100g de MS pour les autres constituants.

II.1.6 Effet de l'enrichissement sur la qualité protéique des pâtes

II.1.6.1 Profil en acides aminés

Les échantillons de pâtes crues et cuites (contrôles et enrichies) sont analysés pour leurs profils en acides aminés en utilisant une HPLC analytique (Jasco, Tokyo, Japon) équipée de Jasco Pompe HPLC PU-2080, tel que décrit dans la partie I (I.1.3.1). Les teneurs en acides aminés sont rapportées en mg d'acide aminé/g MS d'échantillon.

A) Scores d'acide aminé essentiel (SAAE)

Le score d'acide aminé essentiel (SAAE) est calculé pour chaque acide aminé essentiel (AAE). Ce dernier reflète les besoins quotidiens en AAE fournis par la (FAO, 2007). Lorsque la valeur de SAAE est inférieure à 1 : l'acide aminé essentiel correspondant est considéré comme un AAE limitant. Le score d'acide aminé essentiel (SAAE) est donné selon la formule

$$\text{SAAE} = \frac{a_p}{a_s}$$

B) Indice d'acides aminés essentiels (IAAE)

L'indice d'acides aminés essentiels (IAAE) est calculé en utilisant le rapport de la protéine d'essai à la protéine de référence de la FAO/WHO (2007) pour chaque acide aminé

essentiel suivant la formule suivante : $IAAE (\%) = \sqrt[n]{\frac{Lys_{1p}}{Lys_{1s}} \times \frac{Tyr_{2p}}{Tyr_{2s}} \times \dots \times \frac{Hist_{np}}{Hist_{ns}}} \times 100$

Où : **a** correspond à un acide aminé essentiel, **p** correspond à la teneur en AAE de la protéine testée (mg/g de protéine), **s** correspond à l'acide aminé en référence de la protéine testée, donnée par FAO/WHO/ UNU (2007), et **n** est le nombre d'acides aminés inclus dans le calcul.

C) Rapport d'efficacité protéique

Le rapport d'efficacité protéique (REP) est estimé selon les équations de régression développées par Alsmeyer *et al.*, (1974), comme indiqué ci-dessous :

$$REP1 = -0.684 + 0.456 (LEU) - 0.047 (PRO)$$

$$REP2 = -0.468 + 0.454 (LEU) - 0.105 (TYR)$$

D) Calcul d'autres paramètres de qualité des protéines

La détermination des paramètres de qualités des protéines sont estimés à partir des résultats obtenus des profils en acides aminés. Ils sont de trois types :

- **AAET / AAT (%)** : rapport acides aminés essentiels totaux (TEAA) aux acides aminés totaux (AAT) ;
- **Cys / AAST (%)** : rapport acide aminé cystine aux acides aminés soufrés totaux ;
- **Leu / Ile (%)** : rapport leucine/ isoleucine.

II.1.6.2 Digestibilité *in vitro* des protéines de pâtes cuites

La digestibilité *in vitro* des protéines de pâtes cuites (contrôle et enrichies) est déterminée selon la méthode internationale normalisée INFOGEST de Minekus *et al* (2014), tel que décrit dans La partie I (I.1.3.2).

II.1.7 Effet de l'enrichissement sur les composés phénoliques et le potentiel antioxydant des pâtes**II.1.7.1 Extraction et dosages des composés phénoliques**

L'extraction des composés phénoliques contenues dans les échantillons de pâtes crues et cuites, dans le méthanol 80 %, est réalisée selon la technique rapportée par Oomah *et al.* (2010) tel que décrite dans la partie I (I.1.4.1). Les dosages des composés phénoliques et des

flavonoïdes sont effectués selon les méthodes décrites par Škerget et al. (2005) et Lamaison et Carnat (1990), tel que décrites respectivement dans la partie I (I.1.4.2).

II.1.7.2 Evaluation du potentiel antioxydant des pâtes

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de pâtes crues et cuites est évaluée au moyen de trois tests :

- Effet scavenger du radical DPPH selon la méthode de Brand-Williams *et al.* (1995),
- Le pouvoir réducteur selon la technique d'Oyaizu (1986) ;
- Chélation du fer ferreux selon la méthode de Zhao *et al.*, 2008.

Les protocoles expérimentaux sont décrits dans la partie I (I.1.4.3).

II.1.8 Analyse statistique

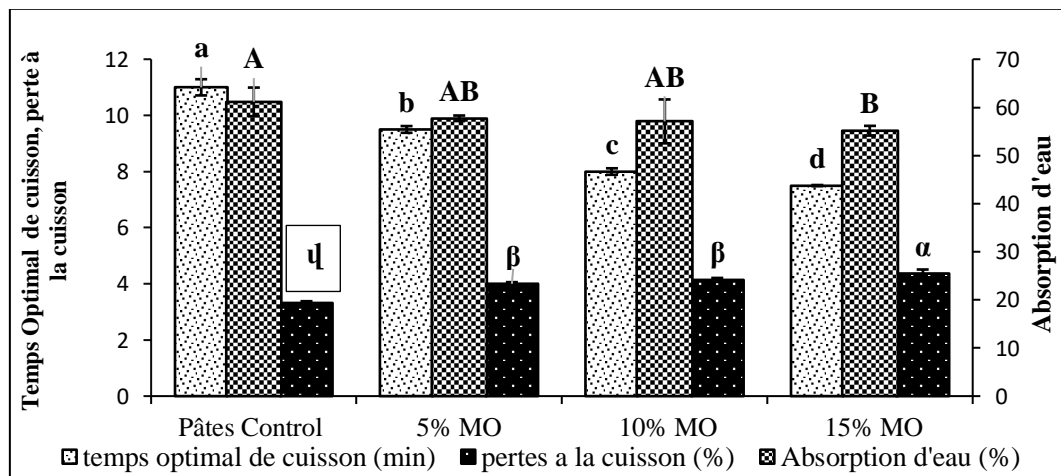
Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de la variance, suivie d'une comparaison multiple des moyennes (Test LSD) au moyen du logiciel Statistica (version 5.5). Les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$.

Pour la composition chimique des pâtes, nous avons introduit le facteur cuisson ; les données sont traitées par une analyse de la variance à 2 facteurs (taux d'incorporation et la cuisson), suivie d'une comparaison multiple des moyennes.

II.2 Résultats

II.2.1 Qualité de cuisson des pâtes

La qualité culinaire des pâtes étudiées est représentée dans la figure 13.



* les résultats qui portent des lettres minuscules (Temps optimal de cuisson), des lettres majuscules (Absorption d'eau) ou des lettres grecques (Pertes à la cuisson) sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD).

Figure 13 : Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de Moringa oleifera sur les propriétés culinaires des pâtes alimentaires.

La fortification des pâtes avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (contrôle, 5, 10 et 15%) diminue de manière significative ($p < 0,05$) le temps de cuisson optimal. Cette diminution est accompagnée d'une faible absorption d'eau et d'une perte à la cuisson plus élevée.

II.2.2 Couleur des pâtes

Les résultats obtenus lors du test de couleur, sont résumés dans le tableau XII.

La fortification des pâtes avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* affecte significativement ($p < 0,05$) la couleur des pâtes préparées.

Tableau XII : Paramètres de couleur des pâtes préparées.

Paramètres	cuisson	% de la poudre de <i>Moringa</i> dans la formulation des pâtes			
		0	5	10	15
L^*	Crues	83,35 ± 0,09 a	70,87 ± 1,81 g	60,76 ± 1,08 b	58,60 ± 1,49 c
	Cuites	71,53 ± 0,93 g	51,87 ± 2,62 d	41,03 ± 1,84 e	34,28 ± 1,56 f
a^*	Crues	-0,83 ± 0,13 d	-3,19 ± 0,11 b	-3,97 ± 0,07 e	-3,99 ± 0,17 e
	Cuites	-0,21 ± 0,09 c	-1,35 ± 0,09 a	-0,71 ± 0,17 d	-0,08 ± 0,10 c
b^*	Crues	17,05 ± 0,18 e	23,30 ± 0,48 c	27,20 ± 0,39 f	27,40 ± 0,44 f
	Cuites	19,82 ± 0,22 d	30,03 ± 1,02 a	27,81 ± 0,90 f	25,90 ± 0,92 b
C	Crues	17,07 ± 0,18 e	23,52 ± 0,48 c	27,49 ± 0,39 f	27,69 ± 0,45 f
	Cuites	19,83 ± 0,22 d	30,06 ± 1,02 a	27,82 ± 0,90 f	25,90 ± 0,92 b
h	Crues	92,79 ± 0,44 f	97,78 ± 0,29 a	98,30 ± 0,10 e	98,28 ± 0,25 e
	Cuites	90,62 ± 0,25 c	92,58 ± 0,22 f	91,45 ± 0,34 b	90,19 ± 0,23 d

* les résultats sur la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD).

La fortification des pâtes par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* affecte leur luminosité (valeurs L^*) à tous les niveaux de substitution, indiquant que les échantillons sont devenus plus foncé. Une diminution significative ($p < 0,05$) de la rougeur (valeurs a^* négatives) est également observée dans les pâtes enrichies crues et cuites par rapport au témoin ce qui indique que nos échantillons tendent globalement vers le vert.

La jaunisse (valeurs de b^* négatives) des pâtes fortifiées augmentent significativement ($p < 0,05$) à l'état crus. Tandis que la valeur de b^* a moins augmenté après la cuisson des pâtes fortifiées à 10 et 15%. Les valeurs dérivées de chromaticité (valeur C) et teinte (valeur h) sont relativement prononcées ($p < 0,05$) suite à la fortification des pâtes. Cependant, le processus de cuisson engendre une variation significative ($p < 0,05$) par une augmentation de la chromaticité, et une diminution de la teinte.

II.2.3 Composition biochimique globale des pâtes

La composition biochimique des pâtes préparées crues et cuites est indiquée dans le tableau XIII

Tableau XIII : Effet de l'enrichissement en poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sur la composition biochimique des pâtes alimentaires crues et cuites

Constituants	cuisson	Formulation (% de substitution)			
		0	5	10	15
Humidité	Crues	10,48 ± 0,37 f	10,07 ± 0,09 f	10,54 ± 0,16 f	11,30 ± 0,15 e
	Cuites	49,97 ± 0,17 c	48,7 ± 0,4 d	52,73 ± 0,28 b	55,65 ± 0,09 a
Protéines	Crues	11,32 ± 0,30 d	11,95 ± 0,02 c	12,71 ± 0,32 b	14,11 ± 0,42 a
	Cuites	11,49 ± 0,15 d	11,74 ± 0,17 c	12,21 ± 0,08 b	14,41 ± 0,12 a
Cendres	Crues	1,56 ± 0,06 d	1,70 ± 0,02 c	2,41 ± 0,02 b	2,82 ± 0,03 a
	Cuites	0,46 ± 0,03 h	0,71 ± 0,02 g	0,84 ± 0,02 f	1,25 ± 0,01 e
Lipides	Crues	1,28 ± 0,11 b	1,44 ± 0,09 d	1,52 ± 0,01 d	1,80 ± 0,03 a
	Cuites	0,15 ± 0,05 e	0,13 ± 0,02 e	0,21 ± 0,03 e	0,37 ± 0,01 c
Fibres alimentaires+ carbohydrates	Crues	70,49 ± 0,27 e	72,89 ± 0,52 e	74,77 ± 0,18 a	74,83 ± 0,72 b
	Cuites	37,82 ± 0,35 d	39,25 ± 0,36 c	43,68 ± 0,23 f	44,25 ± 0,15 f

*Pour un même constituant, les résultats sur la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD).

Les données analytiques du tableau XIII révèlent des variations de la composition chimique des pâtes préparées. L'analyse de la variance montre d'une manière générale un effet significatif ($p < 0,05$) du taux d'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* et la cuisson des pâtes.

A l'état cru, la teneur en protéines des pâtes préparées augmente de manière significative ($p < 0,05$) dans les pâtes enrichies, allons de 11,32 % dans les pâtes contrôles pour atteindre 11,95, 12,71 et 14,11 % dans les pâtes enrichies respectivement à 5, 10 et 15%. Tandis que la cuisson des pâtes n'a pas d'effet sur la teneur en protéines ($p > 0,05$).

L'humidité des pâtes crues augmente de manière significative ($p < 0,05$) dans les pâtes enrichies, allons de 10,48 % d'humidité pour le control pour atteindre 10,54 et 11,30 % d'humidité pour les pâtes enrichies à 10 et 15% respectivement. La cuisson des pâtes engendre ainsi une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'humidité des différents échantillons, allons

d'un contrôle de 49,97% d'humidité pour atteindre 55,65 % d'humidité pour les pâtes enrichies à 15%,

Les teneurs en cendres, lipides et fibres augmentent significativement ($p < 0,05$) dans les pâtes enrichies et marque leurs teneurs maximales lors de la substitution à 15% avec *Moringa oleifera* (2,82% en cendres, 1,80% en lipides et 74,83 % en fibres alimentaires+ carbohydrates).

Une tendance inverse est observée pour l'effet d'interaction de la cuisson et l'enrichissement sur la teneur en cendres, lipides et fibres, où les teneurs diminuent significativement ($p < 0,05$) lors de la substitution à 15% avec le *Moringa oleifera*.

II.2.4 Qualité protéiques des pâtes

II.2.4.1 Profil en acides aminés

La composition et les teneurs en acides aminés des pâtes préparées crues et cuites est indiquée dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Effet de la substitution et de la cuisson sur de le profil en acides aminés

Acide aminé	Cuisson	Taux de substitution (%)			
		0%	5%	10%	15%
Asp	Crues	1,91 ± 0,22 e	2,04 ± 0,01 e	3,41 ± 0,06 d	4,16 ± 0,04 c
	Cuites	2,36 ± 0,03 b	2,80 ± 0,02 a	3,39 ± 0,20 d	4,32 ± 0,18 c
Glu	Crues	7,53 ± 0,71 bc	8,41 ± 1,43 abc	8,78 ± 0,43 ab	9,32 ± 0,06 a
	Cuites	7,15 ± 1,68 c	8,38 ± 0,31 abc	7,30 ± 0,54 bc	9,79 ± 0,49 a
Ser	Crues	2,25 ± 0,07 d	2,51 ± 0,01 f	2,56 ± 0,05 ef	2,91 ± 0,02 b
	Cuites	2,47 ± 0,08 f	2,63 ± 0,01 e	2,77 ± 0,06 c	3,07 ± 0,14 a
His	Crues	0,82 ± 0,01 c	0,90 ± 0,01 g	0,98 ± 0,02 ef	1,15 ± 0,03 b
	Cuites	0,93 ± 0,01 fg	1,02 ± 0,01 de	1,07 ± 0,10 d	1,23 ± 0,02 a
Gly	Crues	0,98 ± 0,03 de	1,17 ± 0,05 c	1,04 ± 0,03 d	1,30 ± 0,01 b
	Cuites	0,82 ± 0,04 a	0,94 ± 0,01 e	1,02 ± 0,03 de	1,24 ± 0,12 bc
Thr	Crues	0,87 ± 0,22 c	1,23 ± 0,04 b	1,67 ± 0,04 d	1,75 ± 0,01 a
	Cuites	1,02 ± 0,01 c	1,25 ± 0,01 b	1,69 ± 0,08 d	1,88 ± 0,01 ad
Arg	Crues	2,78 ± 0,03 b	3,38 ± 0,10 a	2,64 ± 0,06 f	3,00 ± 0,05 e
	Cuites	2,04 ± 0,05 d	2,39 ± 0,04 c	2,57 ± 0,09 f	2,99 ± 0,11 e
Ala	Crues	1,21 ± 0,03 b	1,42 ± 0,11 e	1,85 ± 0,04 d	2,29 ± 0,02 c
	Cuites	1,36 ± 0,02 e	1,61 ± 0,01 a	1,91 ± 0,04 d	2,20 ± 0,10 c
Tyr	Crues	0,84 ± 0,02 a	0,97 ± 0,04 c	1,23 ± 0,02 d	1,45 ± 0,04 b
	Cuites	0,95 ± 0,01 c	1,25 ± 0,05 d	1,27 ± 0,02 d	1,46 ± 0,04 b
Val	Crues	2,02 ± 0,14 d	2,08 ± 0,04 d	2,50 ± 0,05 c	2,86 ± 0,04 b
	Cuites	2,07 ± 0,04 d	2,43 ± 0,01 c	2,65 ± 0,03 a	2,96 ± 0,09 b
Met	Crues	0,80 ± 0,05 a	1,23 ± 0,09 b	1,28 ± 0,11 b	1,30 ± 0,06 b
	Cuites	0,94 ± 0,04 a	1,21 ± 0,11 b	1,32 ± 0,15 b	1,33 ± 0,01 b
Phe	Crues	0,76 ± 0,09 e	2,81 ± 0,08 g	2,95 ± 0,06 f	3,34 ± 0,09 b
	Cuites	0,91 ± 0,07 d	2,89 ± 0,05 fg	3,21 ± 0,07 c	3,79 ± 0,10 a
Ile	Crues	1,37 ± 0,25 c	1,55 ± 0,06 e	1,74 ± 0,02 bd	1,87 ± 0,06 ad
	Cuites	1,53 ± 0,03 ce	1,62 ± 0,03 b e	1,84 ± 0,01 d	2,02 ± 0,04 a

Leu	Crues	2,74 ± 0,12 a	3,14 ± 0,14 ef	3,39 ± 0,06 cd	3,83 ± 0,05 b
	Cuites	3,01 ± 0,05 f	3,27 ± 0,02 de	3,53 ± 0,04 c	3,91 ± 0,11 b
Ly	Crues	1,61 ± 0,45 a	2,01 ± 0,20 c	2,23 ± 0,04 c	2,67 ± 0,03 b
	Cuites	2,00 ± 0,26 c	2,18 ± 0,13 c	2,27 ± 0,04 c	2,91 ± 0,18 b
Pro	Crues	1,60 ± 0,41 cd	3,60 ± 0,07 a	2,99 ± 0,06 ab	2,70 ± 0,29 b
	Cuites	1,44 ± 0,03 d	2,26 ± 0,04 bcd	2,36 ± 0,14 bc	1,59 ± 1,23 cd
Trp	Crues	0,84 ± 0,01 b	0,99 ± 0,01 bc	1,08 ± 0,08 c	1,38 ± 0,07 a
	Cuites	0,93 ± 0,07 bc	1,04 ± 0,01 bc	1,13 ± 0,13 c	1,55 ± 0,15 a
Cys	Crues	1,95 ± 0,19 e	2,23 ± 0,38 e	2,37 ± 0,04 de	2,87 ± 0,16 cd
	Cuites	3,08 ± 0,21 c	5,99 ± 0,36 b	6,20 ± 0,15 b	7,01 ± 0,38 a

Σ AAA ¹	Crues	1,60 ± 0,08 f	3,78 ± 0,12 d	4,19 ± 0,08 g	4,80 ± 0,13 b
	Cuites	1,85 ± 0,07 e	4,14 ± 0,08 g	4,48 ± 0,09 c	5,25 ± 0,14 a
Σ AAS ²	Crues	2,75 ± 0,05 f	3,46 ± 0,09 e	3,66 ± 0,15 d	4,17 ± 0,06 g
	Cuites	4,03 ± 0,04 g	7,21 ± 0,10 c	7,52 ± 0,11 b	8,35 ± 0,01 a
Σ AAE ³	Crues	14,63 ± 0,16 f	19,13 ± 0,69 d	21,43 ± 0,27 c	24,67 ± 0,27 g
	Cuites	17,42 ± 0,38 e	24,10 ± 0,24 g	26,22 ± 0,44 b	30,01 ± 0,14 a
Σ AANE ⁴	Crues	18,26 ± 0,76 c	22,52 ± 1,11 de	23,20 ± 0,68 bd	25,68 ± 0,32 a
	Cuites	17,64 ± 1,63 c	21,00 ± 0,28 e	21,38 ± 0,03 de	26,32 ± 1,87 ab
Σ AA ⁵	Crues	32,89 ± 0,39 f	41,65 ± 0,47 d	44,64 ± 0,94 g	50,28 ± 0,31 b
	Cuites	35,00 ± 1,58 e	45,16 ± 0,34 g	47,56 ± 0,43 c	55,14 ± 2,46 a

*Pour un même constituant, les résultats sur la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD).

- 1) Acides aminés aromatiques : Phe + Tyr.
- 2) Acides aminés sulfuriques : Cys + Met.
- 3) Acides aminés essentiels : Thr + Cys + Val + Met + Ile + Leu + Tyr + Phe + His + Lys + Trp.
- 4) Acides aminés non essentiels : Asp + Ser + Glu + Pro + Gly + Ala + Arg.
- 5) Acides aminés totaux.

L'analyse de la variance des données montre d'une manière générale un effet significatif ($p < 0,05$) du taux d'incorporation en poudre et la cuisson des pâtes sur la composition en acides aminés, ainsi qu'à l'interaction de ces deux facteurs.

Les données analytiques montrent que la substitution avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* induit une amélioration significative ($p < 0,05$) des apports en acides aminés (acides aminés totaux (Σ AA), non essentiels (Σ AANE), essentiels (Σ AAE), sulfuriques (Σ AAS) et aromatiques (Σ AAA)) dans les pâtes enrichies par rapport aux pâtes contrôles sauf pour la méthionine, qui ne montre aucune différence significative.

Le profil en acides aminés des pâtes préparées affiche des teneurs relativement plus élevées en acide aspartique et glutamique. Les teneurs varient respectivement de 1,91 et 7,53 mg/g de MS pour des pâtes contrôles pour atteindre des taux respectivement de 4,16 et 9,32 mg/g de MS pour les échantillons de pâtes enrichies à 15%.

Les résultats ont montré également que la cuisson des pâtes contrôle et enrichies n'induit aucun effet dépressif ($p > 0,05$) sur les concentrations en acides aminés. Tandis que les teneurs

en acide aspartique, serine, histidine, alanine, tyrosine, valine, phénylalanine, isoleucine, leucine, lysine, cystine affichent des valeurs significativement ($p < 0,05$) plus élevées. Les acides glutamique, aspartique et la cystine présentent des concentrations significativement ($p < 0,05$) plus élevées dans les pâtes cuites enrichies à 15% (9,79, 7,01 et 4,32 mg/g de MS respectivement),

A) Scores d'acides aminés essentiels (SAAE)

Le tableau XV fournit un aperçu comparatif des scores en acides aminés essentiels (EAAS) des pâtes alimentaires préparées.

pâtes	His	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Trp	Val
control crues	0,486± 0,008 c	0,404± 0,073 e	0,41± 0,018 e	0,316± 0,089 d	1,122± 0,051 d	0,47± 0,023 e	0,334± 0,084 g	1,244± 0,01 d	0,458± 0,033 d
control cuites	1,08± 0,009 b	0,888± 0,015 c	0,888± 0,015 c	0,773± 0,099 b	3,149± 0,166 c	1,075± 0,038 cd	0,771± 0,01 d	2,715± 0,213 c	0,617± 0,249 c
5% MO crues	0,501± 0,005 c	0,432± 0,016 de	0,446± 0,02 d	0,373± 0,037 cd	1,351± 0,148 c	1,053± 0,033 d	0,447± 0,013 f	1,38± 0,013 d	0,447± 0,009 d
5% MO cuites	1,096± 0,009 b	0,871± 0,015 c	0,892± 0,005 c	0,781± 0,045 b	5,342± 0,249 b	2,222± 0,044 b	0,875± 0,007 c	2,789± 0,023 c	1,005± 0,005 b
10% MO crues	0,515± 0,01 c	0,455± 0,002 d	0,452± 0,009 d	0,39± 0,007 cd	1,405± 0,205 d	1,098± 0,021 cd	0,57± 0,014 e	1,415± 0,107 d	0,504± 0,011 cd
10% MO cuites	1,301± 0,115 a	1,115± 0,014 a	1,09± 0,013 a	0,918± 0,054 a	6,2± 0,134 a	2,72± 0,054 a	1,336± 0,067 a	3,424± 0,405 b	1,239± 0,013a
15% MO crues	0,543± 0,014 c	0,441± 0,015 de	0,46± 0,006 d	0,421± 0,004 c	1,33± 0,059 d	1,133± 0,03 c	0,579± 0,004 e	1,631± 0,085 d	0,519± 0,007 cd
15% MO cuites	1,282± 0,021 a	1,051± 0,023 b	1,033± 0,029 b	1,011± 0,064 a	5,984± 0,223 a	2,733± 0,072 a	1,19± 0,004 b	4,036± 0,391 a	1,186± 0,036 a

*Les valeurs des scores écrites en bleue sont > 1 .

* les scores sur la même colonne qui porte des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD).

Tableau XV : Score d'acides aminés (SAAE) des pâtes alimentaires (crues et cuites)

enrichies avec la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera*, par rapport au modèle de score provisoire de la FAO/OMS 2007.

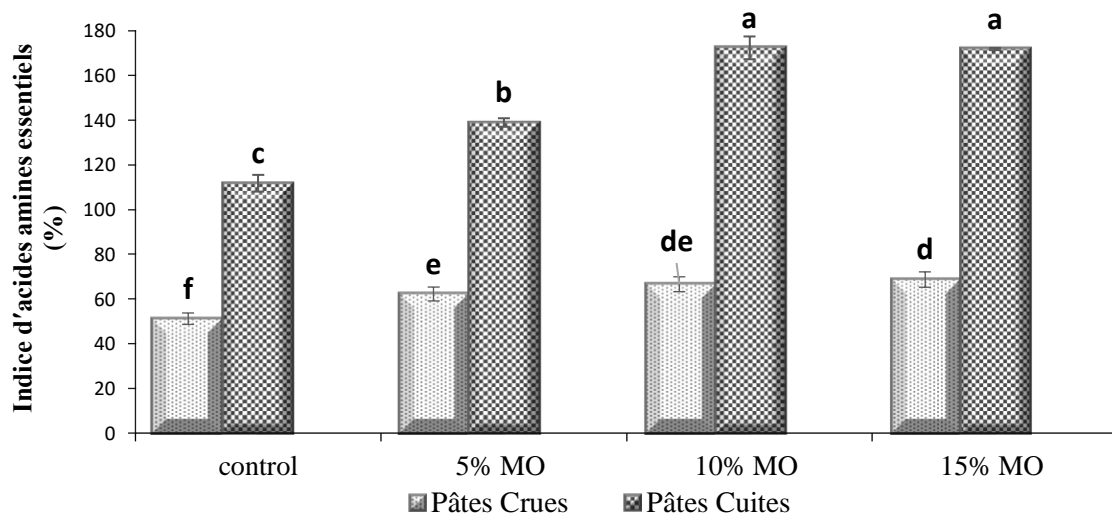
L'analyse de la variance montre globalement un effet significatif ($p < 0,05$) du taux d'incorporation de poudre de feuilles de *Moringa oleifera*, et de la cuisson des pâtes, ainsi qu'à l'interaction entre les deux facteurs étudiés.

La substitution des pâtes montre des scores (SAAE) supérieurs à ceux suggérés par la FAO/OMS, 2007, le meilleur score est enregistré (SAAE ≥ 1) pour des acides aminés (meth+cys), (Phe + Tyr) et Trp à l'égard des pâtes substituées (avec 5%, 10% et 15%) après cuisson.

La cuisson des pâtes (contrôles, enrichies) engendre une augmentation significative ($P < 0,05$) de tous les scores (SAAE) étudiés, pour atteindre des valeurs maximales (SAAE > 1) lors de la cuisson de l'échantillon de pâtes à 15% de substitution, notant ainsi que, le score (SAAE) le plus élevé est enregistré par la Met et la Cys.

B) Indice d'acides aminés essentiels (IAAE)

Les indices d'aides amines essentiels (IAAE) des pâtes préparées sont illustres sur la figure 14.



* les résultats qui portes des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD).

Figure 14 : Indice d'acides aminés des pâtes alimentaires (cruées et cuites) enrichies avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* par rapport au modèle de score provisoire de FAO/OMS,

L'analyse de la variance montre également un effet significatif ($p < 0,05$) du taux d'incorporation de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* et de la cuisson des pâtes, ainsi qu'à l'interaction entre les deux facteurs étudiés.

Les résultats obtenus montrent que l'IAAE des pâtes augmente significativement ($p < 0,05$) de 51,25 % chez le control pour atteindre un taux de 68,7% au niveau de l'échantillon enrichi avec 15% de poudre de *Moringa oleifera*.

La cuisson des pâtes préparées (contrôle et enrichies) améliore significativement ($p < 0,05$) l'EAAI pour atteindre des valeurs dépassant les 100%. Par ailleurs, aucune différence significative d'EAAI n'est enregistrée après la cuisson de pâtes à 10% et 15% de substitution.

C) Rapport d'efficacité protéique

Le tableau XV présente les valeurs des différents paramètres calculés afin d'évaluer l'effet de la substitution par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* et de la cuisson des pâtes sur le rapport d'efficacité protéique.

Tableau XVI : Effet de l'addition de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sur le rapport d'efficacité protéique des pâtes alimentaires crues et cuites (mg/ g MS)

Paramètres	cuisson	Formulation (% de substitution)			
		0	5	10	15
% AAET /AAT	Crues	44,49 ± 1,64 b	45,94 ± 2,09 a b	48,02 ± 0,44 ad	48,92 ± 0,45 d
	Cuites	49,67 ± 2,40 d	53,49 ± 0,45 c	55,04 ± 0,43 c	54,37 ± 2,23 c
% Cys / AAST	Crues	70,85 ± 1,19 b	64,56 ± 1,60 c	64,99 ± 2,70 c	68,82 ± 0,97 b
	Cuites	76,57 ± 0,73 a	83,18 ± 1,17 d	82,40 ± 1,15 d	84,03 ± 0,09 d
% Leu / Ile	Crues	2,05 ± 0,43 a	2,03 ± 0,01 a	1,95 ± 0,04 a	2,05 ± 0,09 a
	Cuites	1,97 ± 0,06 a	2,02 ± 0,02 a	1,92 ± 0,02 a	1,93 ± 0,09 a
P-REP1	Crues	0,49 ± 0,04 d	0,58 ± 0,06 f	0,72 ± 0,03 e	0,93 ± 0,03 b
	Cuites	0,62 ± 0,02 f	0,70 ± 0,01 e	0,82 ± 0,01 c	1,02 ± 0,01 a
P-REP2	Crues	0,68 ± 0,07 b	0,87 ± 0,04 d	1,07 ± 0,02 e	1,07 ± 0,02 e
	Cuites	0,79 ± 0,02 a	0,93 ± 0,03 cd	0,96 ± 0,01 c	1,12 ± 0,05 e

*Pour un même paramètre, les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD).

L'analyse de nos résultats montre que l'augmentation du niveau de substitution des pâtes préparées (0, 5, 10 et 15%) entraîne une augmentation significative ($p < 0,05$) des paramètres déterminants la qualité des protéines (AAET /AAT, P-REP1, P-REP2) ou la substitution à 15% marque les valeurs maximales (48,92, 0,93 et 1,07 respectivement). Cependant, les valeurs du paramètre Cys/AAST montre une diminution significative ($p < 0,05$) suite à l'augmentation du taux d'enrichissement des pâtes par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Il est à noter également qu'aucun effet significatif ($p < 0,05$) du taux de substitution de pâtes préparées n'est enregistré pour le rapport Leu / Ile.

La cuisson des pâtes préparées (0%, 5%,10% et 15%) entraîne une augmentation significative ($p<0,05$) des paramètres AAET /AAT, Cys / AAST, P-REP1. Tandis qu'aucune différence significative ($p<0,05$) n'est enregistrée pour les paramètres Leu / Ile et P-REP2.

II.2.4.2 Digestibilité *in vitro* des protéines des pâtes

La digestibilité *in vitro* des protéines des pâtes élaborées est représentée dans le tableau XVI.

Tableau XVII : Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sur la digestibilité *in vitro* des protéines de pâtes alimentaires

Formulation de pâtes		Digestibilité <i>in vitro</i>
Pâtes contrôles		77,86 ± 1,12 a
Pâtes	5%	63,36 ± 0,18 b
Pâtes	10%	60,61 ± 2,01 bc
Pâtes	15%	58,50 ± 0,75 c

* les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p<0.05$, test LSD ou $a> b>bc>c$).

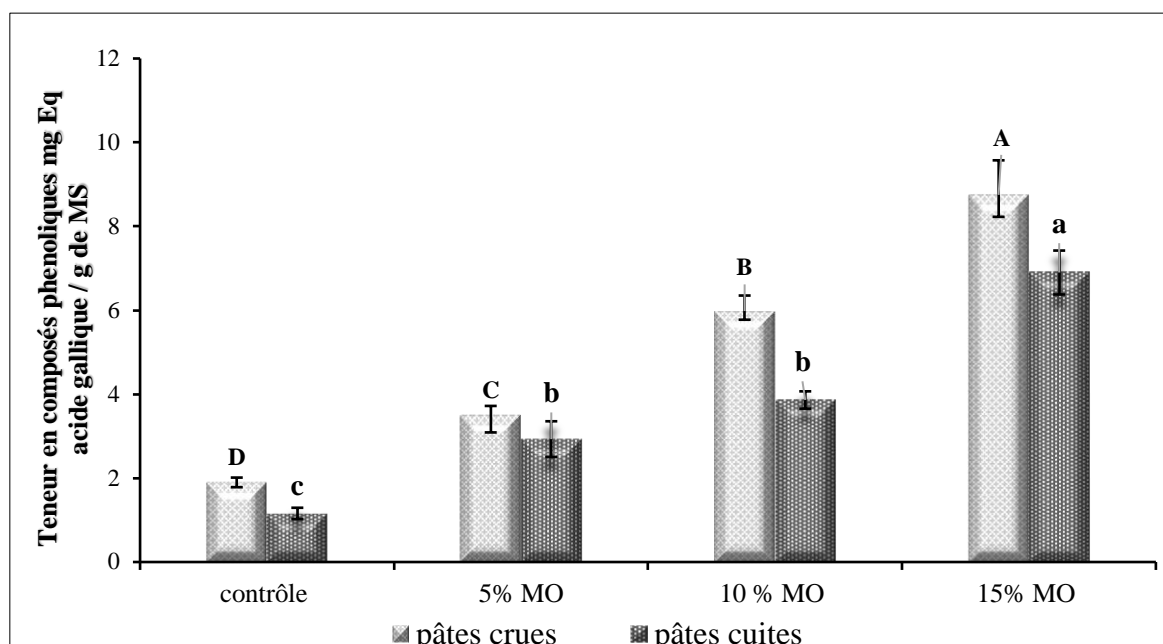
Les résultats expérimentaux du tableau XVI révèlent que le pourcentage des protéines digérées diminue de manière significative ($p<0,05$) avec l'augmentation du taux de substitution de pâtes préparées. De ce fait, la digestibilité maximale est observée chez les pâtes contrôles (77,86%) alors que la valeur minimale est signalée pour l'échantillon de pâtes enrichi à 15% (58, 50%).

II.2.5 Teneur en composés phénoliques et potentiel antioxydant des pâtes

II.2.5.1 Teneur en composés phénoliques

a) Teneur en phénols totaux solubles

Les différentes teneurs en phénols totaux solubles des échantillons de pâtes alimentaires élaborées sont illustrées dans la figure 15.



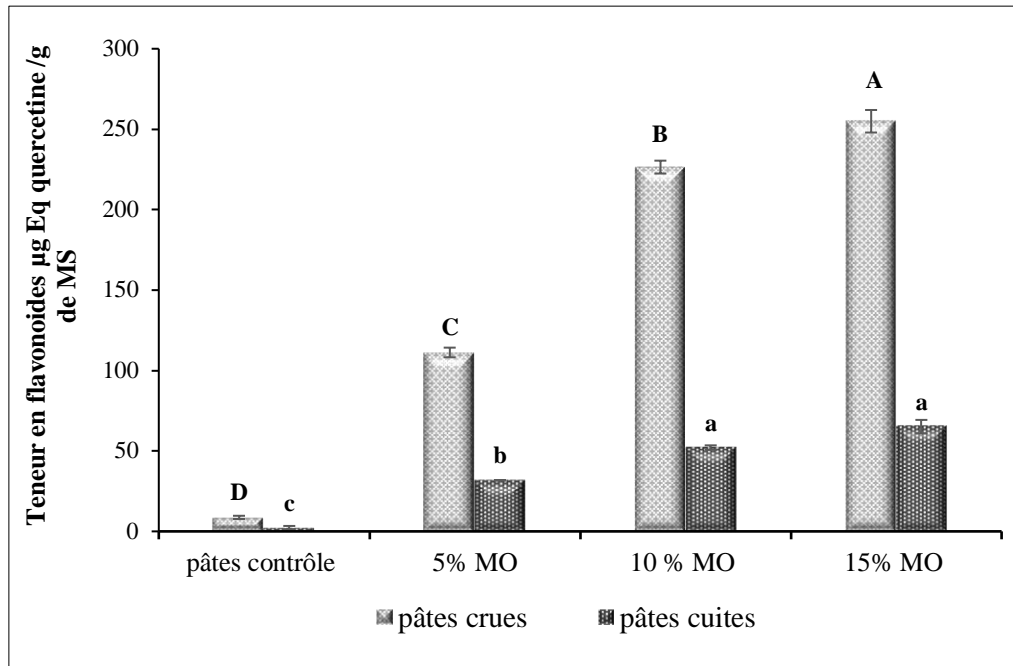
*Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD, où à l'état cru: A > B > C > D et à l'état cuit: a > b > c > d).

Figure 15 : effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera* sur la teneur en phénols totaux solubles des pâtes alimentaires crues et cuites.

D'après les résultats de la figure 15, la fortification des pâtes alimentaires avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* induit une augmentation significative ($p < 0,05$) de la teneur en composés phénoliques. Les valeurs enregistrées oscillent entre 1,9 mg Eq AG/g de MS pour l'échantillon control (0% de substitution) et 8,8mg Eq AG/g de MS pour l'échantillon de pâtes avec 15% de substitution. Cependant une tendance inverse est observée pour l'effet de la cuisson où une diminution significative ($p < 0,05$) de la teneur en composés phénoliques est enregistrée.

b) Teneur en flavonoïdes

Les variations des teneurs en flavonoïdes des échantillons de pâtes alimentaires élaborées sont illustrées dans la figure 16.



*Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD, à l'état cru: A > B > C > D et à l'état cuit : a > b > c).

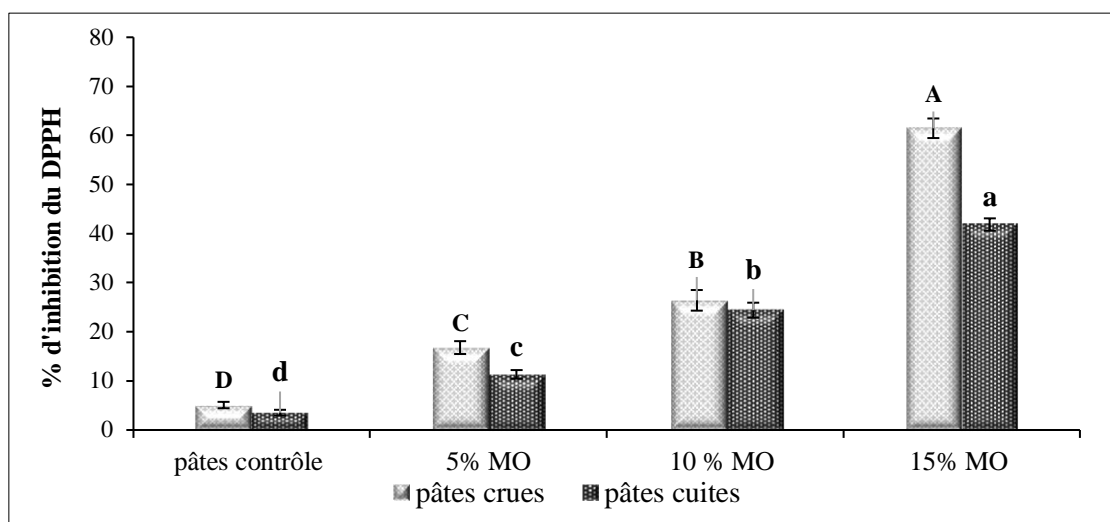
Figure 16 : effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera* sur la teneurs en flavonoïdes des pâtes alimentaires crues et cuites.

Les résultats de la figure 16 indiquent que la fortification des pâtes alimentaires avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* engendre une augmentation significative ($p < 0,05$) du contenu en flavonoïdes. La valeur minimale est observée chez le contrôle (8,71 µg Eq Quercetine/g de MS) tandis que les pâtes substituées à 15% ont la plus grande teneur en flavonoïdes (254,93 µg Eq Quercetine/g de MS). La cuisson en revanche a induit une diminution significative ($p < 0,05$) du contenu en flavonoïdes des pâtes préparées. La valeur maximale est enregistrée chez les pâtes avec 15% de substitution (65,09 µg Eq Quercetine/g de MS).

II.2.5.2 Activité antioxydante des pâtes

a) Activité anti radicalaire du DPPH

Les résultats de l'activité anti radicalaire du DPPH des extraits méthanoliques des pâtes préparées sont illustrés dans la figure 17.



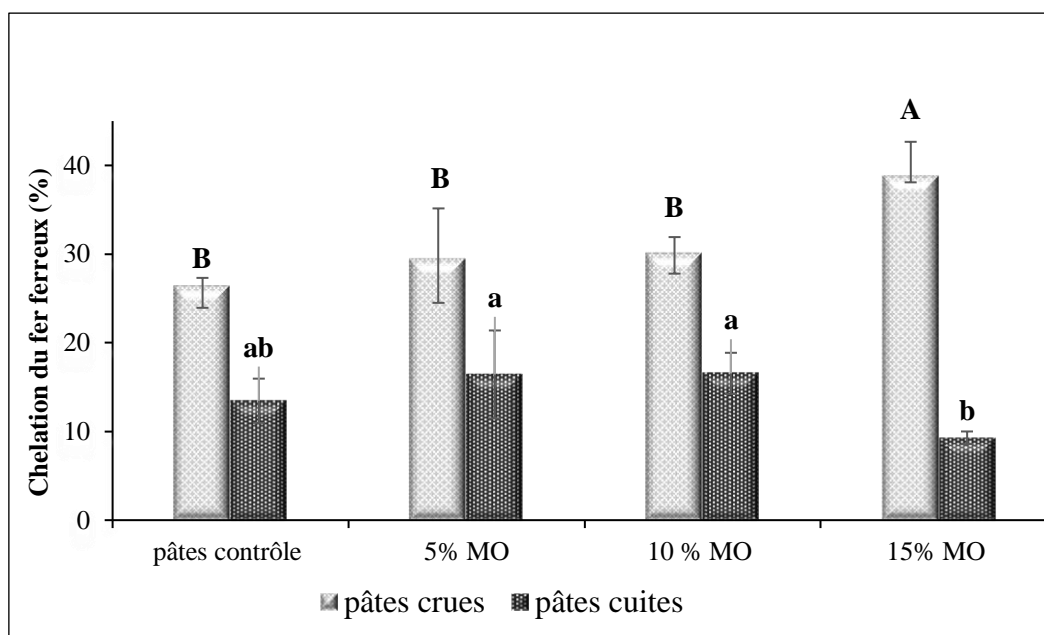
*Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$, test LSD, à l'état cru: A > B > C > D et à l'état cuit: a > b > c > d).

Figure 17 : Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* des pâtes alimentaires crues et cuites sur l'activité inhibitrice du radical libre DPPH.

Les résultats de la figure 17 montrent que le pourcentage de piégeage du radical libre DPPH des extraits méthanoliques de pâtes préparées augmentent significativement ($p < 0,05$) avec l'augmentation des niveaux de substitutions en poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. La plus faible activité des pâtes est observée avec les échantillons de contrôles (5,08%) tandis que les pâtes enrichies à 15% ont la plus forte activité de piégeage du radical libre DPPH (64,46%). En ce qui concerne l'effet de cuisson des pâtes sur le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, les résultats ont montré une nette diminution par rapport aux valeurs observées avec les pâtes crues. La plus faible activité (3,53%) est attribuée aux pâtes contrôles, et la plus élevée (41,85%) aux pâtes substituées à 15%.

b) Chélation du fer

Les résultats de l'activité chélatrice des extraits méthanoliques des pâtes préparées sont illustrés dans la figure 18.



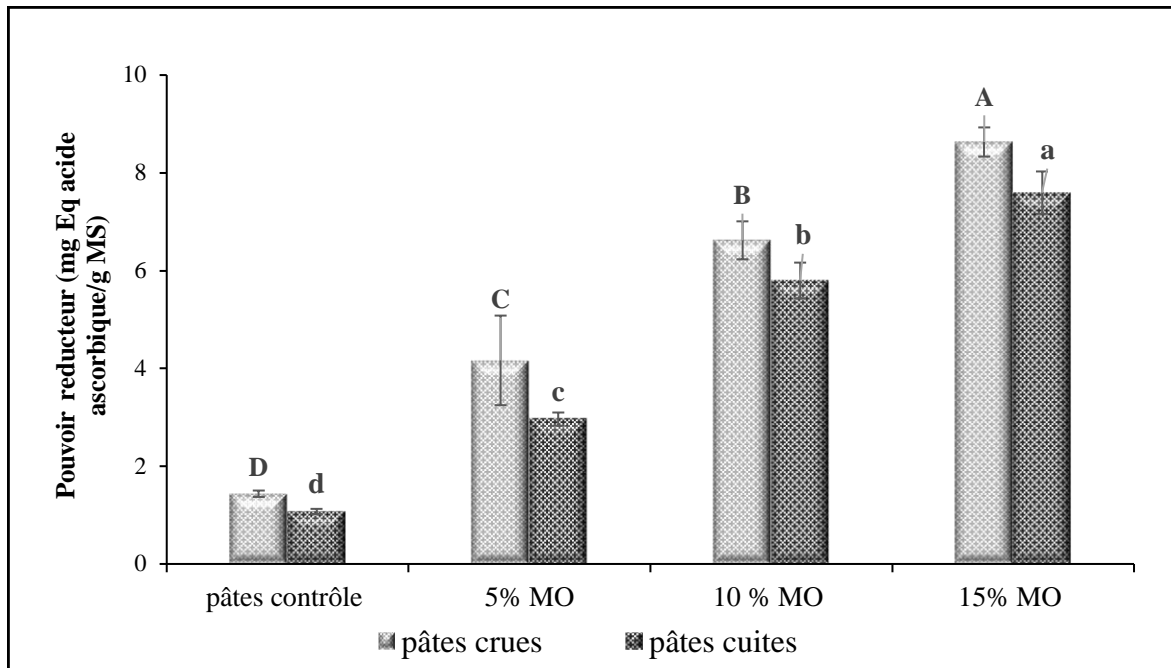
*Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD, à l'état cru : A > B et à l'état cuit : a > b).

Figure 18 : Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sur la chélation du fer des extraits de pâtes alimentaires crues et cuites.

Les résultats de la figure 18 n'ont montré aucune différence significative ($p < 0,05$) entre l'activité chélatrice des pâtes contrôles et les échantillons de pâtes enrichis avec 5 et 10 %. La meilleure activité de chélation du fer est significativement enregistrée chez les pâtes contenant 15% de poudre de feuilles (38,8%). Nous avons constaté ainsi une diminution significative ($p < 0,05$) des activités de chélation du fer sous l'effet de la cuisson de toutes les pâtes alimentaires étudiées.

c) Le pouvoir réducteur

La figure 19 montre les résultats du pouvoir réducteur du fer les extraits méthanolique de pâtes préparées.



*Les résultats avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0.05$, test LSD, à l'état cru: $A > B > C > D$ et à l'état cuit : $a > b > c > d$).

Figure 19 : Effet de l'incorporation de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sur le pouvoir réducteur des extraits de pâtes alimentaires crues et cuites.

L'analyse de la variance des résultats de la figure 19, révèle une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité réductrice en fonction du taux de substitution des pâtes en poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (0, 5, 10 et 15%). La meilleure activité réductrice est observée avec l'échantillon contenant 15% de poudre (8,63 mg EQ acide ascorbique/ g de MS). La cuisson des pâtes provoque une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité réductrice.

II.3 Discussion

La composition biochimique et la qualité nutritionnelle, essentiellement protéique de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* présentées dans la première partie de notre travail, nous ont incités à chercher une voie pour les valoriser. L'une des voies était de les substituer partiellement dans la farine de blé dur en raison de 5, 10 et 15% pour la fortification de pâtes alimentaires.

La performance culinaire des pâtes alimentaires est un paramètre affectant la qualité technologique et l'acceptance de cet aliment par le consommateur (Diantom *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021; Karin *et al.*, 2022).

La substitution progressive de la farine de pâtes par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* induit une réduction progressive ($p < 0,05$) du temps optimal de cuisson (allons de 11 min pour le contrôle à 7,5 min pour les pâtes substituées à 15%). Cette constatation est en accord avec les données rapportées par Rocchetti *et al.* (2020); Simonato *et al.* (2020) sur les pâtes fraîches de blé dur enrichies avec la poudre de feuilles *Moringa oleifera*. Cette diminution est expliquée par ces mêmes auteurs par la forte teneur en fibres apportées par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Ces dernières piégées dans le réseau gluten des pâtes induisent en particulier, l'altération de la structure amidon-gluten ce qui provoque une diffusion plus rapide de l'eau de cuisson au cœur des pâtes et une gélatinisation plus rapide des granules d'amidon, réduisant ainsi le temps optimal de cuisson (Rakshesh *et al.*, 2015).

L'absorption d'eau, relativement élevée dans le contrôle peut être dû à la forte teneur en amidon de la pâte. En effet, Pinarli *et al.*, (2004) et Sozer *et al.*, (2007) ont également signalé qu'un temps de cuisson plus long induit une absorption d'eau supérieure. Un résultat similaire récemment rapporté par Wang *et al.* (2021), qui suggèrent qu'à l'égard des pâtes fortifiées par des matrices végétales, l'absorption d'eau est potentiellement liée à l'intégrité du réseau de gluten et à la capacité de rétention d'eau des composées apportées par la matrice végétale incorporée. Une telle hypothèse peut être expliquée dans les travaux rapportés par Foidl *et al.*, 2001 ; Moyo *et al.*, 2011 ; Nouman *et al.*, 2014 ; Teixeira *et al.*, 2014 ; Sebola *et al.*, 2019 par un apport considérable en fractions insolubles de protéines et fibres issues de feuilles de *Moringa oleifera*.

L'augmentation des pertes à la cuisson dans le cas des pâtes enrichies (3,3 % pour le contrôle et 4,4% pour les pâtes enrichies à 15%) est un phénomène rapportés précédemment dans plusieurs travaux scientifiques (Torres *et al.*, 2007; Petitot *et al.*, 2010; Giménez *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2021. D'après ces auteurs, ce phénomène peut être expliqué par l'introduction de fibres apportées par la fortification, qui induit à l'affaiblissement du réseau de gluten et la lixiviation des matériaux secs dans l'eau de cuisson notamment la dilution du gluten.

En accord avec Rayas *et al.*, 1996 ; Alzuwaid *et al.*, 2021, les pertes à la cuisson enregistrées (inférieures à 7% pour toutes les formulations), attribuent aux produits pâteux une bonne qualité culinaire.

La couleur des pâtes est une caractéristique très importante qui influence beaucoup sur la qualité d'acceptation du consommateur, étant la première propriété que les consommateurs peuvent évaluer lors de la sélection d'un produit sur le marché (Carini *et al.*, 2009).

La fortification des pâtes par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* affecte leur luminosité (valeurs L^*) à tous les niveaux de substitution, indiquant que les échantillons sont

devenus plus foncé. La cuisson diminue d'avantage la clarté des pâtes enrichies. Dans ce contexte, Petitot et al. (2010) attribuent la diminution de luminosité des pâtes fortifiées par la féverole à l'apport en cendres des légumineuses, tandis que Simonato et al. (2020) expliquent une telle diminution de luminosité par la différence de couleur entre la poudre de *feuilles de Moringa oleifera* et la farine du blé lors de la préparation des pâtes fraîches.

Une diminution significative ($p < 0,05$) de la rougeur (valeurs a^* négatives) est également observée dans les pâtes enrichies crues et cuites par rapport au témoin ce qui indique que nos échantillons tendent globalement vers le vert. Ce résultat est prévisible suite à la couleur verte de poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Une tendance similaire est notée par Özyurt et al., 2015 et Simonato et al., 2020 sur des pâtes sèches et fraîches respectivement enrichies par la spiruline et les feuilles de *Moringa oleifera*. La jaunisse (valeurs de b^* négatives) des pâtes fortifiées augmentent significativement ($p < 0,05$) à l'état crus. Cependant la valeur de b^* a moins augmenté après la cuisson des pâtes fortifiées à 10 et 15%. Ceci est probablement due à la présence des particules non dissoutes à la surface de pâtes (Armellini *et al.*, 2018). Les valeurs dérivées de chromaticité (valeur C) et teinte (valeur h) sont relativement prononcées ($p < 0,05$) suite à la fortification des pâtes. Cependant, le processus de cuisson engendre une variation significative ($p < 0,05$) par une augmentation de la chromaticité, et une diminution de la teinte. Ce résultat est expliqué par Özyurt et al., 2015 et Wang et al., 2021 par l'hydrophobicité des composés phytochimiques responsables des colorations. En effet, une diffusion des pigments dans l'eau de cuisson a été légèrement détectée visuellement.

La teneur relativement élevée en protéines de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* induit une augmentation significative ($p < 0,05$) dans le contenu protéique des pâtes enrichies (de 11,32 g/100g de MS dans les pâtes contrôles à 14,11 g de protéine/100g de MS dans les pâtes enrichies à 15%). Les résultats obtenus sont en accord à ceux rapportés dans la littérature en particulier les travaux de Pinarli *et al.*, (2004) sur la fortification à 15% avec poudre de germe de blé, Borneo et Aguirre (2008) sur la poudre de feuilles d'amarantes (25%), Petitot et al., (2010) avec 35% de substitution par la poudre de poids et à 20% de substitution par la poudre de graines de *Moringa Oleifera* (Karin *et al.*, 2022). Cependant, dans certains travaux, des teneurs en protéines plus faible ont été enregistrées lors de la fortification en poudre végétales (Krishanan *et al.*, 2010 et Zula *et al.*, 2021). Tandis que Torres *et al.*, (2007) ; Wood *et al.*, (2009) Tazart *et al.*, (2016) et Ainsa *et al.*, (2021); ont signalé des teneurs élevées en protéines lors de la fortification des pâtes alimentaires avec des pois d'Angole, du pois chiche, de la féverole et du poisson respectivement.

La cuisson des pâtes n'a pas d'effet significatif sur les teneurs en protéines. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Sissons *et al.*, (2005). Ces derniers soulignent l'absence de toute relation entre les pertes à la cuisson et la teneur en protéine des pâtes. Cette hypothèse est expliquée par Simonato *et al.*, (2015) et Rafiq *et al.*, (2018) par la gélatinisation de l'amidon et la coagulation des protéines sous l'action de la cuisson. Cependant, Wang *et al.*, (2021) expliquent l'amélioration de la teneur en protéines des pâtes après cuisson par le fait de la diffusion de l'amidon dans l'eau de cuisson, augmentant ainsi la concentration des protéines dans les pâtes.

Le taux d'humidité et les teneurs en cendres, lipides et fibres alimentaires augmentent de manière significative dans les pâtes enrichies crues. Ce résultat prévisible, vu leurs teneurs relativement élevée dans la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Nos données s'accordent avec des résultats de la littérature rapportée par Bahnassey *et al.*, (1986) ; Bergman *et al.*, (1994) ; Granito *et al.*, (2003); Pinarli *et al.*, (2004); Torres *et al.*, (2007) ;Petitot *et al.*,(2010); Krishanan *et al.*, (2010); Tazart *et al.*, (2016).

Le processus de cuisson des pâtes enrichies induit une forte augmentation du taux d'humidité. Selon les rapports publiés par Sozer *et al.*, (2007) et Armellini *et al.*, (2018), il existe une forte interaction entre l'absorption de l'eau de cuisson et taux de gluten et d'amidon. En fait, le gluten agit comme une éponge pendant la cuisson, à structure ouverte, intègre les granules d'amidon à l'intérieur de ce réseau, ce qui engendre le gonflement des pâtes. En revanche, une tendance inverse est observée pour l'effet de la cuisson des pâtes enrichies sur les teneurs en cendres, lipides et fibres alimentaires où une diminution significative est marquée. A de telles conditions, Mercier *et al.*, (2015), rapportent l'impact de ce traitement thermique sur le mécanisme de transfert de masse.

Selon Alzuwaid *et al.*, (2021), la composition en acides aminés joue un rôle important dans la détermination de la qualité protéique. Les teneurs en acides aminés des pâtes préparées révèlent une amélioration significative ($P < 0,05$) suite à l'enrichissement par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Une tendance similaire a été rapportée dans les travaux de Abdel-Rahman, (1983) ; Zhao *et al.*, (2005) ; Prabhasankar *et al.*, (2009) ; Wood *et al.*, (2009) et Alzuwaid *et al.*, (2021). Cependant les teneurs en méthionine restent stables pour les deux formules étudiées. Ce résultat semble être lié, d'une part, à la composition en acides aminés limitant, contenus dans les feuilles de *Moringa oleifera*, dont Okereke *et al.*, (2013); Olaofe *et al.*, (2013) et Sohaimy *et al.*, (2015) l'ont suggéré à l'égard de la méthionine et d'autre part, aux acides aminés limitant du gluten du blé dont Shewry *et al.*, (2002) l'attribuent ainsi à la

méthionine, le tryptophane et la lysine. Wood *et al.* (2009) confirment cette hypothèse dans ses travaux suite à la fortification des pâtes par la poudre de pois-chiche.

Les teneurs relativement élevées en acides aspartique et glutamique des pâtes enrichies est un résultat prévisible vu leurs teneurs significativement importants dans les feuilles de *Moringa oleifera*. Les travaux de l'équipe de Mune *et al.* (2016) confirment les résultats obtenus.

La cuisson n'a aucun effet négatif sur les concentrations en acides aminés des pâtes contrôlée et enrichies. En effet, notre travail a révélé des concentrations relativement similaires ou supérieures à celles des pâtes crues.

La lysine et la thréonine sont connus d'être parmi les acides aminés déficients dans le blé et ses produits dérivés (Kies *et al.*, 1970 ; Abdel-Aal *et al.*, 2002; Borneo *et al.*, 2008; Petitot *et al.*, 2010; Brouns *et al.*, 2012). Cependant leurs concentrations sont significativement ($p < 0,05$) plus élevée dans le cas des pâtes enrichies et cuites. Nos résultats sont en accord avec les données publiées par Petitot *et al.* (2009) ; Martinez *et al.* (2010); Filip *et al.* (2015); Hussin *et al.* (2020) et Alzuwaid *et al.* (2021).

Les résultats du profil en acides aminés dits essentiels (Thr + Cys + Val + Met + Ile + Leu + Tyr + Phe + His+ Lys + Trp) affichent des valeurs significativement ($p < 0,05$) plus élevées dans le cas des pâtes enrichies cuites. Ces données sont en accord avec ceux rapportées par la littérature sur l'enrichissement des produits pâteux (Abdel Rahman, 1983 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Sadeghi et Bhagya, 2008 ; Prabhasankar *et al.*, 2009 ; Wood *et al.*, 2009 ; Alzuwaid *et al.*, 2021). Nous avons constaté que le rapport TEAA/TAA des pâtes enrichies à 15% après cuisson (48,9%) est nettement supérieur à celui signalé par Alzuwaid *et al.*, 2021 dans le cas des pâtes enrichies à 20% avec le concentré protéique du blé. La valeur citée par ses auteurs était de 35,2%.

Les scores et indices d'acides aminés essentiels (EAAS et EAAI) des pâtes enrichies crues et cuites sont supérieurs au modèle de référence recommandé par la FAO/OMS 2007. Notant ainsi que le EAAS le plus élevé est calculé avec les acides aminés sulfuriques (Meth & Cys) et aromatiques (Phe & Try). Ce résultat confirme l'hypothèse rapportée par Mune *et al.*, (2011) sur la possibilité de complémentarité des protéines issues de feuilles de *Moringa oleifera* et les protéines de céréales.

La fortification des pâtes alimentaires renforce non seulement la teneur en protéines, mais également améliore les paramètres de qualité protéique. En effet, nos résultats répondent parfaitement aux attentes de qualité recommandées par la FAO/OMS/UNU (2007). Nos formulations présentent ainsi une qualité protéique supérieure à celle rapportée par Sadeghi et

Bhagya (2008) en travaillant sur la fortification des pâtes jusqu'à 10% avec l'isolat de protéines de moutarde.

La digestibilité *in vitro* des protéines est un déterminant principal de la biodisponibilité des acides aminés (FAO/OMS/UNU, 1985). Selon Emine *et al.* (2006), l'utilisation biologique des protéines, dans n'importe quel produit alimentaire, dépend principalement de leurs digestibilités. Les résultats obtenus dans le présent travail révèlent une diminution significative ($p < 0,05$) du pourcentage de protéines digérées dans les échantillons de pâtes enrichies par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Les valeurs oscillent entre 77,86% pour le contrôle à 58,50% pour les pâtes enrichies à 15%.

Nos données sont en accord avec ceux rapportées par Casagrandi *et al.* (1999) et Rathi *et al.* (2004). Ces derniers ont constaté une diminution de digestibilité *in vitro* des protéines de pâtes alimentaires fortifiées respectivement avec de la farine de pois et des graines de *Pennisetum glaucum*. Contrairement aux données citées de Sadeghi et Bhagya (2008) ; Tazart *et al.* (2016), ces derniers ont constaté une nette amélioration de la digestibilité *in vitro* de protéines suite à l'enrichissement des pâtes par l'isolat protéique de moutarde et la farine de féverole respectivement. Cependant, la fortification des pâtes par la farine d'amarante, de lupin et celle de niébé conserve la valeur de la digestibilité *in vitro* des protéines analysées (Rayas-Duarte *et al.*, 1996 ; Emine *et al.*, 2006).

La diminution de la digestibilité *in vitro* des protéines des pâtes enrichies avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*, pourrait être expliquée par l'augmentation de l'apport en protéines insolubles apportées par la poudre végétale utilisée (Rathi, *et al.* 2004; Emine *et al.*, 2006 ; Teixeira *et al.*, 2014 et Sęczyk *et al.*, 2016). Ces auteurs attribuent de telle diminution à la présence des antis nutriments. Ces derniers forment des complexes avec les protéines, inhibant ainsi leur biodisponibilité et digestibilité,

Egalement, selon Zhao *et al.* (2005); Mercier *et al.* (2015) et Rafiq *et al.* (2018), le traitement thermique dû à la cuisson favorise la coagulation et l'agrégation des protéines de blé, principalement composées de gluténines et les gliadines. Ces dernières ont la capacité de former des liaisons disulfures intra et intermoléculaires, conduisant à la formation d'un réseau de gluten tridimensionnel solide avec l'amidon faiblement digestibles.

Les pâtes alimentaires dites nutritives repose selon leurs apports en antioxydants (Simonato *et al.*, 2020). Une telle détermination est très importante lors de l'évaluation de la qualité nutritionnelle et pour la conservation de cet aliment (Ainsa *et al.*, 2021). Selon Anese *et al.* (1999) et Hirawan *et al.* (2010), les antioxydants sont souvent perdus suite au processus de transformation, de stockage et de cuisson.

L'efficace des polyphénols en tant qu'antioxydants des pâtes fortifiées a fait l'objet de plusieurs études (Torres *et al.*, 2007; Hirawan *et al.*, 2010; Aravind *et al.*, 2012; Sęczyk *et al.*, 2015; Rafiq *et al.*, 2018; Simonato *et al.*, 2020; Ainsa *et al.*, 2021 et Karin *et al.*, 2022). A l'état cru, les teneurs en composés phénoliques des pâtes augmentent significativement en fonction du taux de substitution. Pour un taux 15% de substitution, les valeurs maximales enregistrées sont de 8,7mg EQAG/g de MS pour les phénols totaux solubles et 254,93µg EqQ/g de MS pour les flavonoïdes enregistrés. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Simonato *et al.* (2020), sur les pâtes fraîches enrichies avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. Tandis que Sęczyk *et al.* (2016); Rafiq *et al.* (2018) et Rocchetti *et al.* (2020); et ont signalé des teneur beaucoup plus faibles pour les pâtes du commerce et les pâtes enrichies avec les feuilles de persil.

Les différences des teneurs en composés phénoliques s'expliquaient par des différences de leur teneurs initiales dans les matières premières, par le taux de substitution, par le processus de préparation, par le mode de conservation et par la méthodologie d'extraction et du dosage (Rocchetti *et al.*, 2020).

Bien que les potentiels antioxydants étudiés (test DPPH, pouvoir réducteur et de chélation de fer) montrent une amélioration significative ($p < 0,05$) suite à la fortification des pâtes par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*, ce qui concorde avec les travaux de Krishnan *et al.* (2010); Armellini *et al.* (2018); Simonato *et al.* (2020), qui montrent que l'activité antioxydante est positivement corrélée avec la teneur en composés phénoliques des pâtes fortifiées.

En accord avec plusieurs auteurs (Hirawan *et al.*, 2010; Armellini *et al.*, 2018; Rafiq *et al.*, 2018; Rocchetti *et al.*, 2020; Simonato *et al.*, 2020), le processus de cuisson entraîne une diminution significative des teneurs en composés phénoliques des échantillons de pâtes. Cette diminution est attribuée par ces mêmes auteurs à la thermo stabilité relativement faible et le lessivage de ces composées dans l'eau de cuisson.

La réduction de la teneur en phénols totaux solubles est plus significative suite à la cuisson des pâtes contrôle (une réduction de 40%), Selon Armellini *et al.* (2018) ces pertes augmentent en fonction du temps optimal de cuisson, ce dernier qui marque son optimum à l'égard du contrôle (11 min).

La réduction de 21% de phénols totaux est marquée suite à la cuisson des pâtes substituées à 15%. Tandis que, Simonato *et al.* (2020) révèlent une perte plus considérable (35%) pour les pâtes fraîches enrichies à 15% par de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera*. La considérable perte en flavonoïdes est plus marquée suite à la cuisson des pâtes enrichies. De

même, Rafiq *et al.*,(2018) ont constaté l'effet décroissant du traitement thermique sur les teneurs en flavonoïdes des pâtes.

Par conséquent, le processus de cuisson affecte significative ($p<0,05$) le potentiel antioxydant des pâtes préparée. Des études antérieures ont rapporté que la cuisson par ébullition des pâtes peut causer des pertes d'eau et/ou dégradation oxydative de plusieurs composants antioxydants (Hirawan *et al.*, 2010; Armellini *et al.*, 2018; Rocchetti *et al.*, 2020; Simonato *et al.*, 2020).

III.1 Matériel et méthodes

III.1.1. Préparation du matériel végétal

La poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (diamètre $\leq 0,5$ mm) est delipidée à l'hexane (1 :3 w/v) au moyen d'un appareil Soxhlet selon la méthode officielle AOAC, (1998). La poudre delipidée est ensuite stockée à température ambiante pour être utilisée ultérieurement pour l'optimisation des conditions d'extraction des protéines.

III.1.2 Composition chimique globale des feuilles delipidées

La poudre de feuilles delipidée de *Moringa oleifera* est analysée pour son contenu en eau par séchage infrarouge à 105 °C (Scaltec SMO 01, Heiligtstadt, Allemagne, Heiligtstadt, Allemagne). La teneur en cendres (AOAC, 2000), en protéines (Kjeldahl, AOAC, 2000) sont également mesurées. Les teneurs en fibres alimentaires totales (TDF) et fibres insolubles diététiques (IDF) sont déterminés à l'aide de kits enzymatique (K-TDFR Megazyme, crok, Irlande) selon la méthode de Prosky *et al.* (1985). La teneur en fibres alimentaires solubles (SDF) est déterminée comme étant une différence entre les valeurs TDF et IDF. La teneur en carbohydrates est calculée par différence avec tous les autres macronutriments.

Toutes les analyses sont effectuées en triple et les résultats sont exprimés en g/100 d'échantillon pour l'humidité et en g/100g de matière sèche pour les autres constituants.

III.1.3 Optimisation des conditions d'extraction enzymatique des protéines de feuilles de *Moringa oleifera* par RSM

L'extraction enzymatique des protéines des feuilles de *Moringa oleifera* délipidée est réalisée à l'aide d'une carbohydrase (Viscozyme® L) ; un complexe multienzymatique contenant une large gamme de carbohydrases : arabanase, cellulase, glucanase, hemicellulase et xylanase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) d'ont l'activité de la viscozyme est de 100 unités de bêta-glucanase fongique (FBG).

III.1.3.1 Analyse par la méthode séquentielle factorielle

Afin d'optimiser les variables qui affectent l'extraction des protéines à partir de la poudre de feuilles délipidées de *Moringa oleifera*, un plan factoriel à deux niveaux (2^{K-1}) a été réalisée pour sélectionner les variables à optimisées dans un système multivariable. Les cinq variables expérimentales étudiées (X1 : température ; X2 : pH ; X3 : concentration enzymatique ; X4 : temps d'incubation ; X5 : enzyme/ substrat (E/S)) sont évalués à l'aide d'une méthode

fractionnaire à deux niveaux du plan factoriel (2^{5-1}). Le plan expérimental est obtenu avec 20 combinaisons de ces cinq variables à différents niveaux. La gamme de chaque variable est sélectionnée en tenant compte des niveaux acceptables pour l'activité enzymatique et le temps d'extraction, tandis que la réponse évaluée est fixée à la quantité de protéines extraites. La significativité de ces cinq variables est évaluée (annexe 07), par la suite les variables clés (significatif $p < 0,05$) sont optimisées grâce à l'utilisation de conception composite centrale (CCD).

III.1.3.2 Conception du composite centrale (Central Composite Design (CCD))

Les trois variables significatives utilisées pour la Conception du composite centrale sont : la température (X1), le temps (X2) et la concentration enzymatique (X3). Ces variables sont explorées à cinq niveaux différents, ($\alpha, 1, 0, +1, +\alpha$) afin d'effectuer un plan factoriel (2^3) en points cubiques. Pour optimiser les conditions d'extraction des protéines de *Moringa oleifera*, la Conception du composite centrale génère 19 expériences, y compris cinq répétitions du point central dont la réponse évaluée est la quantité de protéines extraites.

III.1.3.3 Détermination des conditions optimales d'extraction

Les protéines de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* delipidée sont extraites à l'eau distillée (ratio 1 :20, p/v), le pH est ajusté à 5,5 avec la solution HCl (2N). Le mélange est placé dans un bain-marie en tenant compte des variables suivant : la température (X1), le temps (X2) et la concentration enzymatique (X3). Suite à l'extraction enzymatique, le pH est ajusté à 11 par une solution de NaOH (2N), suivie d'une agitation à 25 C° (50 rpm pendant 60 min) à l'aide d'un agitateur orbital, puis centrifugé à 2500 g à 4 C° pendant 10 min pour séparer la fraction soluble de la fraction résiduelle. La précipitation isoélectrique des protéines extraites est réalisée en ajustant le pH à 4,5 par HCl (2N) pendant une période de 24h à 4C°, puis centrifugés à 2500g pendant 30 min à 4 C°. Le concentré de protéines précipités obtenues est séparé du surnageant puis lyophilisé.

III.1.3.4 Rendement d'extraction de la protéine végétale

La teneur en protéine extraite du concentré est déterminée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 2000). Le rendement de la protéine extraite est calculé comme suit :

$$\text{Le rendement de protéines extraites (\%)} = \frac{\text{La teneur en protéines extraites } (\frac{mg}{g})}{\text{La teneur en protéines initiale } (\frac{mg}{g})}$$

III.1.4 Evaluation de la qualité protéique du concentré obtenu

III.1.4.1 Profil d'acides aminés

La comparaison du profil d'acides aminés contenu dans les feuilles de *Moringa oleifera* délipidées et leur concentré protéique obtenu est réalisé suivant la méthode décrite dans la partie I (I.1.3.1). Les teneurs en acides aminés sont rapportées en mg d'acide aminé/g de protéine.

L'évaluation de la qualité protéique du profil d'acides aminés du concentré produit est réalisée selon la méthode décrite dans la partie II (II.1.6) en déterminant le score d'acide aminé essentiel (EAAS) et l'indice d'acides aminés essentiels (EAAI). Les résultats seront comparés à l'estimation obtenue pour l'intégralité de feuilles de *Moringa oleifera* délipidées.

III.1.4.2 Digestibilité *in vitro* de protéines

La digestibilité *in vitro* des protéines du concentré protéique obtenu est réalisée selon la méthode décrite dans la partie I (I.1.3.2), en comparant à la digestibilité *in vitro* obtenue pour l'intégralité de feuilles de *Moringa oleifera* délipidées.

III.1.5 Analyse statistique

Toutes les analyses ont été effectuées en triples. Les analyses statistiques ont été réalisées avec XLSTAT (Addinsoft, Paris, France) au niveau de signification de 5 %. L'optimisation du plan d'expérience RSM ; séquentielle factorielle (2^{5-1}) et la Conception du composite centrale (CCD) sont réalisées avec Design-Expert software version 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

III.2 Résultats

III.2.1 Composition chimique globale

La délipidation à l'hexane de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* constitue un processus préliminaire pour le fractionnement de ses protéines végétales. La composition chimique de la poudre délipidée est indiquée dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Composition chimique de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* délipidée.

Eléments	Teneurs (%)
Humidité	9,8 ± 0,1
Protéines	24,1 ± 0,1
Cendres	7,8 ± 0,1
Lipides	0
Fibres totales	24,3 ± 0,1
Fibres insolubles	20,3 ± 0,3
Fibres solubles	4,0
Carbohydrates	34,0

D'après les résultats du tableau XVIII, la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* délipidée se caractérise par une teneur importante en protéines (24,1%) et une fraction dominante en fibres insolubles (20,3%).

III.2.2 Optimisation des conditions d'extraction enzymatique des protéines

III.2.2.1 Analyse des résultats obtenus par la méthode séquentielle factorielle

Le plan expérimental pour l'extraction des protéines obtenu avec les 20 combinaisons à différents niveaux des cinq variables étudiés (X1 : température, X2 : pH, X3 : concentration d'enzyme, X4 : le temps d'incubation et X5 : ratio E/S) est représenté sur le tableau XIX.

Tableau XIX : Plan factoriel fractionnaire à deux niveaux (2^{5-1}) et réponse expérimentale obtenue pour l'extraction enzymatique de protéines de *Moringa Oleifera*.

Essais	Temperature	pH	[Vis L]	Time	Ratio	Proteine (mg)
1	40	4,4	37,5	3,25	0,075	22,75
2	50	5,5	15,0	6,00	0,05	8,75
3	50	3,3	15,0	0,50	0,05	14,00
4	30	3,3	60,0	6,00	0,10	33,25
5	30	3,3	60,0	0,50	0,05	36,75
6	50	5,5	15,0	0,50	0,10	12,25
7	50	3,3	15,0	6,00	0,10	7,00
8	40	4,4	37,5	3,25	0,075	17,5
9	30	5,5	15,0	0,50	0,05	35,00
10	50	3,3	60,0	6,00	0,05	21,00
11	40	4,4	37,5	3,25	0,075	19,25
12	40	4,4	37,5	3,25	0,075	19,25
13	50	5,5	60,0	0,50	0,05	33,25

14	30	3,3	15,0	6,00	0,05	15,75
15	30	3,3	15,0	0,50	0,10	17,50
16	50	5,5	60,0	6,00	0,10	21,00
17	30	5,5	15,0	6,00	0,10	12,25
18	50	3,3	60,0	0,50	0,10	22,75
19	30	5,5	60,0	6,00	0,05	36,75
20	30	5,5	60,0	0,50	0,10	35,00

Les résultats du tableau XIX montrent que la teneur en protéine extraite est comprise entre 7 et 36,75 mg. A la lumière de ces résultats, la sélection et l'effet des probabilités des paramètres d'optimisation des conditions d'extraction (annexe 07 figure 30 et 31), les variables ; température (X1), concentration d'enzyme (X3) et le temps d'incubation (X4) constituent les variables statistiquement significatives (tableau XIX). Par conséquent, les variables pH et rapport E/S ne montrent aucun effet significatif lors de l'extraction de protéines, fixes à 5,5 et 1 :20 respectivement.

III.2.2.2 Analyse des résultats obtenus par la conception du composite centrale (CCD)

Les trois variables indépendantes : température (X1), temps d'incubation (X2) et concentration d'enzyme (X3) à différentes combinaisons (tableau annexe), ont faits l'objet d'une optimisation à l'aide de Central Composite Design (CCD), avec les paramètres indiqués dans le tableau XX.

Tableau XX : Niveau des variables codés utilisés dans le CCD pour l'optimisation des conditions d'extraction des protéines.

Variables	-α	-1	0	+1	+α
Temperature (X ₁)	26,6	30	35	40	43,4
Temps (X ₂)	0,1	0,3	0,6	0,9	1,1
Concentration d'enzyme (X ₃)	33,2	40	50	60	66,8

L'adéquation et la signification des modèles quadratiques a été évaluée par l'analyse de variance (ANOVA) au moyen du test F-Fisher (tableau XXI). Le modèle présentait une significativité (p value < 0.0001) avec une valeur F de 74,40.

Tableau XXI : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle d'ajustement de surface quadratique pour l'extraction de protéines.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	203,09	9	22,57	74,40	<0,0001	significant
X ₁	53,96	1	53,96	177,90	<0,0001	significant
X ₂	69,16	1	69,16	228,03	<0,0001	significant
X ₃	34,708	1	34,70	114,40	<0,0001	significant
X ₁ X ₂	13,52	1	13,52	44,58	<0,0001	significant
X ₁ X ₃	0,0078	1	0,0078	0,0258	0,8760	not significant
X ₂ X ₃	0,2112	1	0,2112	0,6965	0,4256	not significant
X ₁ ²	9,95	1	9,95	32,79	0,0003	significant
X ₂ ²	23,70	1	23,70	78,14	<0,0001	significant
X ₃ ²	0,0758	1	0,0758	0,2498	0,6292	not significant
Residual	2,73	9	0,3033			
Lack of Fit	0,6226	5	0,1245	0,2364	0,9272	not significant
Pure Error	2,11	4	0,5268			
Cor Total	205,82	18				

La conception expérimentale du CCD est indiquée par X₁, X₂ et X₃ comme variables indépendantes, X₁ X₂ comme variables d'interaction, X₁² et X₂² à terme quadratique. Elle implique un effet significatif de ces variables sur la réponse ($p < 0,05$) pour l'extraction des protéines.

Le modèle présente une bonne aptitude à l'interaction quadratique. Le « manque de valeur d'ajustement » a été également évaluée, et un Lack of Fit > F était de 0,9272 indiquant un manque d'ajustement non significatif ($p > 0,05$) à l'erreur pure, ce qui signifie que le modèle est valable pour la présente étude.

III.2.2.3 Analyse des surfaces de réponses

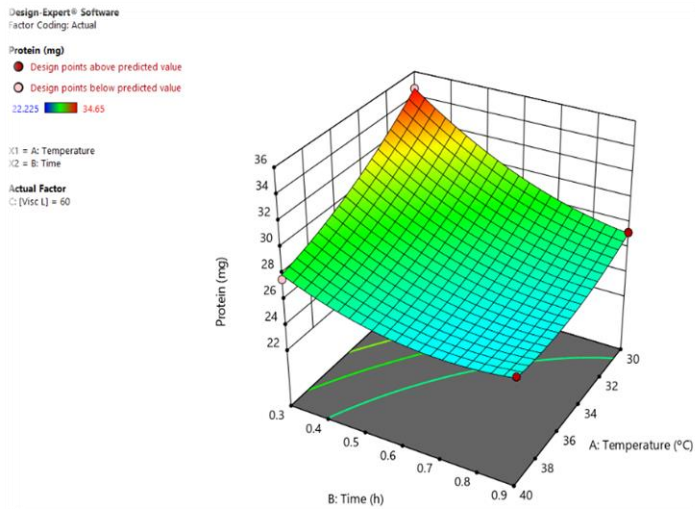
Les courbes de surfaces de réponses (figure 20) sont tracées pour illustrer les effets des différentes variables et leurs interactions sur l'extraction des protéines.

La figure A montré l'effet de l'interaction entre la température (X1) et le temps d'incubation (X2) avec le maintien de la concentration enzymatique constante à haut niveau (60 FBG). L'extraction la plus  lev e de protéines a été obtenue avec des températures plus basses et des temps d'incubation inférieurs.

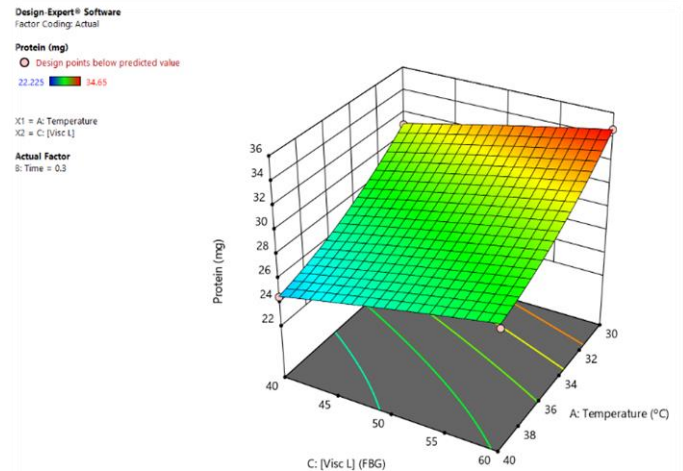
La figure B montre l'effet de l'interaction entre la concentration d'enzyme (X3) et la température (X1). L'extraction des protéines augmente lors de l'utilisation des concentrations  lev e en enzyme activ e à des températures réduites.

La figure C montre l'effet de l'interaction entre la concentration d'enzyme (X3) et le temps d'incubation (X2). L'extraction des protéines augmente à l'utilisation de concentrations  lev es d'enzyme activ e pendant un temps inferieur.

(A)



(B)



(C)

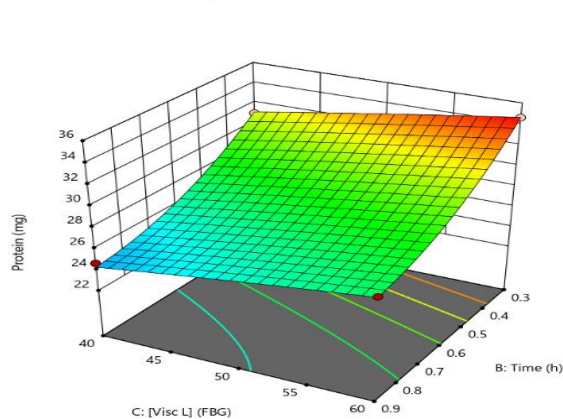


Figure 20 : Courbes de surfaces de réponses montrant l'effet des variables sur l'extraction des protéines à partir des feuilles de *Moringa oleifera* ;

(A) : temps d'incubation (h) et température (C ) ; (B) : concentration d'enzyme (FBG) et température (C ) ; (C) : concentration d'enzyme (FBG) et temps d'incubation (h).

III.2.2.4 Validation des conditions optimales

L'optimisation par RSM montre la combinaison optimale des conditions qui fournit l'extraction maximale de protéines des feuilles de *Moringa oleifera* délipidée (température d'incubation de 30 °C, temps d'incubation de 30 min et concentration d'enzyme de 60 FBG).

La confirmation de ces conditions optimales prévues (annexe 07, tableau VII) par les modèles sont testées et les valeurs expérimentales ont données $34,30 \pm 0,49$ mg/g. Les quantités d'extraction des protéines prévues étaient de $34,66 \pm 1,02$ mg/g, ce qui indique que les valeurs expérimentales et prédites sont presque similaires. Par conséquent, les modèles proposés pourraient être utilisés pour prédire la réponse étudiée.

Le rendement d'extraction des protéines était de 14,2 % et la teneur en protéines du concentré préparé était de 55,7 %.

III.2.3 Qualité protéique du concentré

III.2.3.1 Profil d'acides aminés

La composition et les teneurs en acides aminés du concentré protéique préparé et de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera* délipidées sont comparées par rapport au modèle recommandé FAO/OMS/UNU (2007). Les résultats sont indiqués dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Comparaison du profil d'acides aminés des feuilles de *Moringa oleifera* délipidées et de leur concentré protéique par rapport au schéma de notation provisoire de la FAO/ WHO (les valeurs des acides aminés étaient en mg/g de protéines).

Acides aminés	<i>Moringa oleifera</i>	Concentré protéique	FAO/OMS
Asp	92,2 a \pm 2,0	121,5 b \pm 6,5	
Glu	71,3 a \pm 6,8	108,2 a \pm 2,3	
Ser	41,8 a \pm 2,9	59,0 a \pm 4,8	
His	14,4 a \pm 0,8	13,7 b \pm 1,4	15
Gly	20,3 a \pm 0,9	23,3 b \pm 1,3	
Thr	39,0 a \pm 1,1	68,6 b \pm 3,6	23
Arg	143,3 a \pm 5,7	94,2 b \pm 4,3	
Ala	10,5 a \pm 0,4	22,6 b \pm 2,6	
Tyr	24,2 a \pm 0,6	39,4 b \pm 1,8	
Val	42,8 a \pm 2,6	53,1 b \pm 2,8	39
Met	15,4 a \pm 0,3	14,4 b \pm 0,5	
Phe	49,9 a \pm 1,4	50,4 b \pm 2,0	
Ile	28,8 a \pm 2,0	36,1 b \pm 1,7	30
Leu	56,6 a \pm 2,0	58,9 a \pm 2,4	59
Ly	58,2 a \pm 2,9	50,5 b \pm 3,6	45

Pro	20,0 a ± 4,5	27,9 b ± 1,5	
Trp	17,6 a ± 0,4	22,4 b ± 0,5	6
Cys	56,0 a ± 7,2	81,2 b ± 5,0	
∑AAA	74,1 a ± 1,9	89,8 b ± 3,7	30
∑SAA	71,4 a ± 0,3	95,6 b ± 0,5	22
∑EAA	402,9 a ± 0,6	488,6 b ± 13,7	
∑NEAA	399,5 a ± 0,5	456,7 b ± 14,0	
∑AA	802,4 a ± 0,1	945,4 b ± 37,4	

Les données du tableau XXII montrent que les feuilles de *Moringa oleifera* délipidées et leur concentré protéique renferment un total de 18 acides aminés. L'extraction enzymatique des protéines augmente significativement ($p < 0,05$) la teneur de tous les acides aminés à l'exception des acides aminés histidine et leucine qui ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$).

L'analyse de la variance révèle que les feuilles délipidées de *Moringa oleifera* et leur concentré protéique se caractérisent par une dominance des acides aminés essentiels (∑EAA) avec une teneur plus prononcée à l'égard du concentré protéique (488,6 mg/g de protéine).

La comparaison au modèle recommandé FAO/OMS/UNU (2007) indique que les valeurs obtenues pour tous les acides aminés sont supérieures et le concentré protéique de feuilles de *Moringa oleifera* présente l'apport le plus élevé.

III.2.3.2 Score d'acides aminés essentiels

La figure 21 illustre l'étude comparative des scores en acides aminés essentiels (SAAE) des feuilles de *Moringa oleifera* délipidées et de leur concentré protéique.

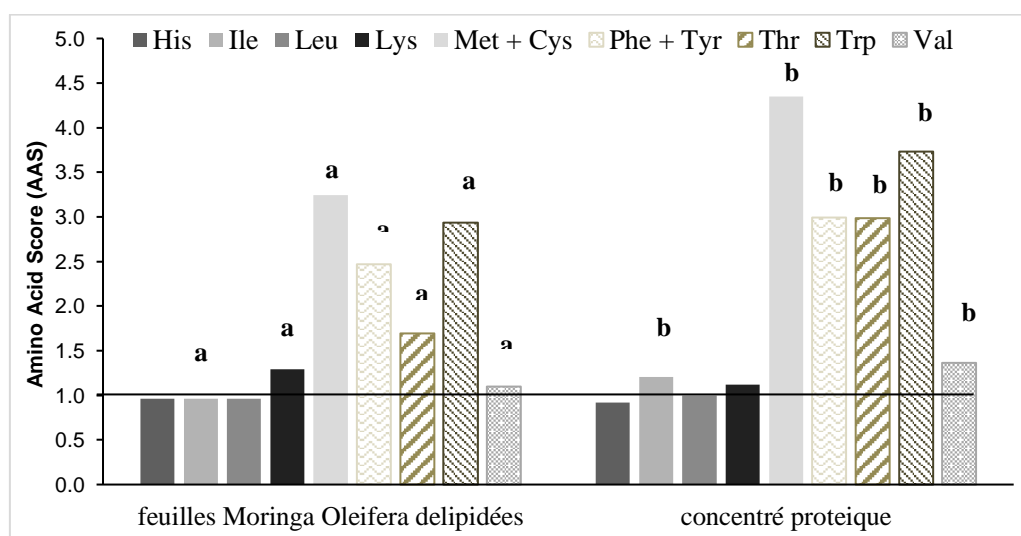


Figure 21 : Evaluation du Score d'acides aminés essentiels (SAAE) par rapport au modèle de score provisoire FAO/WHO, de feuilles *Moringa Oleifera* et leur concentré protéique.

Les résultats de la figure 21 montrent que les scores d'acides aminés essentiels (SAAE) sont supérieurs ou égales ($SAA \geq 1$) à ceux suggérés par la FAO/OMS 2007, aussi bien au niveau de l'intégralité de feuilles de *Moringa Oleifera* ou dans leur concentré protéique. L'analyse de la variance montre que les scores d'acides aminés essentiels (SAAE) du concentré protéique sont significativement plus élevés ($p < 0,05$) et le score des acides aminés « méthionine et cystine » est nettement plus élevé.

III.2.3.3 Indice d'acides aminés essentiels (IAAE)

La figure 22 montre l'étude comparative des indices en acides aminés essentiels (IAAE) des feuilles de *Moringa oleifera* délipidées et de leur concentré protéique.

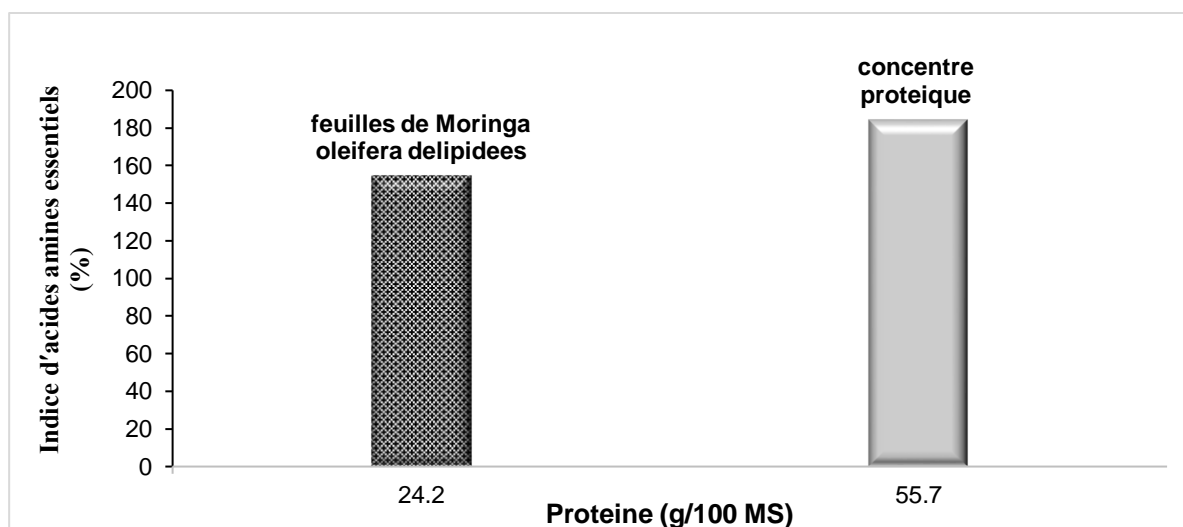


Figure 22 : Evaluation de l'indice d'acide aminé essentiels (IAAE) par rapport au modèle de score provisoire FAO/OMS de feuilles *Moringa Oleifera* et leur concentré protéique.

Les valeurs d'indices d'acides aminés essentiels (IAAE) calculés par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (154,4%) et de leur concentré protéique (184,3%) sont significativement ($p < 0,05$) supérieurs à 100.

III.2.3.4 Digestibilité *in vitro* des protéines

Le tableau XXIII montre le résultat obtenu pour l'étude de la digestibilité *in vitro* des protéines de *Moringa oleifera* et de leur concentré protéique.

Tableau XXIII : Evaluation de la digestibilité *in vitro* de protéines de feuilles de *Moringa oleifera* et de leur concentré protéique

Echantillon	Protéines initiales (mg/g)	Protéines Bioaccessibles (mg/g)	Digestibilité (%)
Feuilles de <i>Moringa oleifera</i> délipidées	241,63 a ± 1,01	156,47 a ± 2,97	64,75 a ± 1,23
Concentré protéique	556,9 ab ± 16,02	556,11 ab ± 0,09	99,86 ab ± 0,02

D'après les résultats du tableau XXIII, nous remarquons une augmentation significative ($p < 0,05$) de la digestibilité après l'extraction des protéines de feuilles de *Moringa oleifera* dans un concentré protéique (99,86%), par rapport aux protéines contenues dans la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (64,75%).

III.3 Discussion

Le procédé d'obtention d'un concentré protéique à partir de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* a fait l'objet d'une délipidation préliminaire à l'hexane de la matière végétale. Une étape qui a permis d'une part, de concentrer les protéines (Teh *et al.*, 2014), et d'autre part, de réduire la présence de composés non polaires qui peuvent se lier aux chaînes d'hydrocarbures de certains résidus d'acides aminées, entraînant ainsi une séparation difficile des protéines (Mao et Hua, 2012).

La concentration en protéines contenues dans les feuilles de *Moringa oleifera* délipidées (24.1 g/100g de MS) est supérieure à celles enregistrées dans d'autres matrices végétales foliaires, précédemment utilisées pour l'extraction de protéines. Par exemple : les feuilles d'olivier présentent une teneur qui oscillent entre 7 à 12,9 % (Garcia *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2003 et Vergara-Barberan *et al.*, 2015) et les résidus de feuilles de thé contiennent environ 17 à 19 % de protéines (Zhang *et al.*, 2016). Ainsi, nos résultats suggèrent une aptitude potentielle de feuilles de *Moringa Oleifera* pour la production de protéines foliaires.

A l'issue de l'optimisation des conditions d'extraction enzymatique de protéines foliaires de *Moringa oleifera*, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (RMS). Cinq variables expérimentales (X1 : température ; X2 : pH ; X3 : concentration enzymatique ; X4 : temps d'incubation et X5 : rapport E/S) affectent l'extraction de ces protéines végétales par hydrolyse enzymatique utilisant le Viscozyme L. Cette approche est rapportée précédemment

par divers auteurs (Ansharullah *et al.*, 1997 ; Guan et Yao, 2008 ; Vergara-Barberan *et al.*, 2015 ; Gorgüç *et al.*, 2019). Par conséquent, les variables pH et E/S ne montrent aucun effet significatif, fixés à 1 :20 et 5,5 respectivement. Nos résultats sont en accord avec les données rapportées par Rosset *et al.* (2014) et Zhang *et al.* (2016).

La combinaison des conditions optimales d'extraction des protéines de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* délipidée sont fixées à une température d'incubation de 30 °C, un temps d'incubation de 30 min et à une concentration de viscozyme de 60 FBG. La validité de ce model optimal est confirmée par une similarité statistique ($P \leq 0,05$) de la valeur prédite et expérimentale ($34,66 \pm 1,02$ mg/g et $34,30 \pm 0,49$ mg/g respectivement). Des conditions similaires ont été signalées par Vergara-Barberan *et al.* (2015), traduisant ainsi, que les températures élevées conduisent à la diminution de l'extraction enzymatique des protéines des feuilles d'olivier. De plus, les temps d'incubations prolongés ne sont pas suggérés, en raison du risque de croissance microbienne, alors que des conditions sévères pourraient entraîner une dégradation chimique et/ou thermique des protéines, réduisant ainsi la valeur nutritive des protéines et l'activité enzymatique (Gorgüç *et al.*, 2019). Par conséquent, l'approche proposée pourrait être intégrée dans un processus sûr, rapide et environnemental lors de la production de concentré protéique végétal.

Le profil en acides aminés du concentré protéique obtenu se caractérise par une augmentation significative ($p < 0,05$) de la teneur en 18 acides aminés analysés, particulièrement en acides aminés essentiels avec une proportion de 51,7%. Ce résultat affirme l'efficacité du processus d'extraction enzymatique adopté. Une telle hypothèse est confirmée par plusieurs travaux de recherche (Xie *et al.*, 2008; Jodayree *et al.*, 2012; Tamayo *et al.*, 2016; Taiwo *et al.*, 2018; Görgüç *et al.*, 2019). Ces derniers rapportent une interaction de désintégration des carbohydrases (cellulase, pectinase, viscozyme) avec la paroi polysaccharidique du matériel végétal, et la libération de protéines intra cellulaires.

La qualité d'une protéine alimentaire est appréciée en termes de scores et d'indices d'acides aminés essentiels, comparés au modelé de référence recommandé par FAO/OMS/UNU (2007). Dans cette optique, et à l'égard du concentré protéique obtenu, nos résultats répondent parfaitement aux attentes de qualité FAO/OMS/UNU (2007) présentant ainsi, une qualité protéique supérieure à celle des d'isolats protéiques commerciaux (Olaofe *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2018; Corgneau *et al.*, 2019).

La digestibilité *in vitro* des protéines montre que le concentré protéique a subi pratiquement une digestibilité complète des protéines (99,9 %) par rapport à la digestibilité des protéines de feuilles de *Moringa oleifera* (64,7 %). En effet, les facteurs anti-nutritionnels induisent une diminution de la biodisponibilité et de la qualité nutritionnelle des protéines (Devisetti *et al.*, 2016). Cependant, leur élimination devrait améliorer la digestibilité *in vitro* des protéines. L'extraction et la concentration des protéines, peut affecter la structure native et la solubilité des protéines et les rendre plus accessibles aux enzymes digestives. Sur ce point, la digestibilité *in vitro* du concentré protéique préparé est supérieure à ceux rapportés par Corgneau *et al.*, 2019 sur des suppléments commerciaux de concentrés de protéines et également dépasse largement celui obtenu avec du concentré issu des graines de *Moringa oleifera* (Taiwo *et al.*, 2020).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Le présent travail porte sur différents axes de valorisation des feuilles de *Moringa oleifera* cultivées en Algérie, essentiellement comme une nouvelle source alternative de protéines végétales.

Les feuilles de *Moringa oleifera* se caractérisent par une teneur élevée en protéines (23,6g/100g MS) et une balance équilibrée en acides aminés essentiels (48%). La poudre de feuille a révélé la présence de métabolites secondaires à savoir : les composés phénoliques (35,90 mg Eq AG/g MS), les flavonoïdes (1,6 mg EQ Quercétine/g de MS) et les tannins (tannins hydrolysables à 36,23 mg Eq AT/g MS et les tannins condensés à 0.62 mg Eq C/g de MS). Ces derniers ont manifesté un fort pouvoir antioxydant (à savoir l'activité anti radicalaire du DPPH avec 85,71%, la chélation du fer avec 89,60% et le pouvoir réducteur avec 50.84 mg EQ acide ascorbique/ g de MS). Ces feuilles renferment une fraction considérable en fibres insolubles (83%), induisant un effet négatif sur la digestibilité *in vitro* de ces protéines (66,9%).

La valorisation par l'enrichissement des pâtes alimentaires avec la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (jusqu'à 15% d'incorporation), a révélé une amélioration significative des teneurs en protéines (14,11 %), en acides aminés essentiels (24,67 mg/g de MS), en fibres alimentaires (74,83%), en métabolites secondaires à savoir : 8,8mg Eq AG/g de MS pour les composés phénoliques et 254,93 µg Eq Quercétine/g de MS pour les flavonoïdes. L'enrichissement des pâtes a montré également une amélioration du pouvoir antioxydant des extraits de pâtes enrichies où nous avons enregistré des taux de 64,46 et de 38,8% respectivement lors du test au radical DPPH et du test de chélation du fer et une valeur de 8,63 mg EQ acide ascorbique/ g de MS pour le test du pouvoir réducteur. En revanche, le traitement thermique des pâtes, lors de la cuisson, a affecté significativement leur composition biochimique, ce qui a diminué l'activité antioxydante de ses extraits (test DPPH avec 41,85%, la chélation du fer avec 9.39 % et le pouvoir réducteur avec 7,3 mg EQ acide ascorbique/ g de MS). Cependant, le processus de cuisson des pâtes n'a pas affecté la teneur en protéines à tous les niveaux de substitution et aucune différence significative n'est enregistrée.

L'insolubilité des protéines, expliquée par la forte teneur en fibres et métabolites secondaires apportées par la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* a induit une diminution du temps de cuisson optimal des pâtes alimentaires enrichies (allons de 11 min pour le contrôle à 7,5 min pour les pâtes substituées à 15%) et une augmentation des pertes à la cuisson des pâtes enrichies (allons de 3,3% pour le contrôle à 4,4% pour les pâtes enrichies à 15%), montrant ainsi une altération des propriétés technologiques.

Conclusion et perspectives

L'étude des paramètres nutritionnels des protéines des pâtes enrichies ont révélé une amélioration des scores et des indices d'acides aminés essentiels (SAAE et IAAE respectivement), ce qui répond aux recommandations alimentaires référencées par FAO/OMS. Dans notre étude, nous avons constaté également une diminution de la digestibilité *in vitro* des protéines contenues dans les pâtes (58,5%) par rapport à celle des protéines de feuilles de *Moringa oleifera* (66,9%).

L'isolement de la fraction protéique issue des feuilles de *Moringa oleifera*, suivant un processus d'extraction enzymatique, s'avère une démarche indispensable pour valoriser cette protéine végétale d'intérêt. L'étude d'optimisation des conditions d'extraction des protéines (température, concentration en viscozyme et temps d'incubation) a fait ressortir des variables clés optimisées par RSM (30°C, 60 unités FBG, 0,3 h respectivement). Le rendement d'extraction de ces protéines est de 14,2 % et la teneur en protéines du concentré obtenu est de 55,7 %.

Le concentré protéique obtenu répond aux recommandations alimentaires de référence FAO/OMS, présentant ainsi, une digestibilité plus élevée (99,8%) par rapport aux protéines de l'intégralité de la matrice végétale étudiée. Par conséquent, plusieurs applications dans l'industrie agroalimentaire, en particulier pour la nutrition des nourrissons, des seniors ou des sportifs, peuvent être exploitées en tant qu'ingrédients protéiniques digestibles.

Enfin, d'après les résultats obtenus, le *Moringa oleifera* cultivé en Algérie offre un puissant potentiel pour le secteur de la santé et de la nutrition humaine, particulièrement pour le développement de nouvelles sources alternatives de protéines végétales.

De nombreuses perspectives s'ouvrent pour la valorisation d'un tel potentiel à savoir :

- Développer diverses actions d'encouragement envers les agriculteurs afin d'augmenter les superficies plantées en *Moringa oleifera*.
- Etude approfondie de l'application des traitements préalables sur les feuilles de *Moringa Oleifera* (effets sur la qualité nutritionnelle et fonctionnelle).
- Des essais sur animaux sont nécessaires pour une évaluation *in vivo* de la qualité nutritionnelle.
- Élargir le procès d'extraction enzymatique des protéines sur des conditions plus extrêmes et leur impact sur le rendement et la qualité du concentré proteique.
- Elargir l'étude par une caractérisation du concentré protéique et son application dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel-Aal, E.S.M., & Hucl, P. (2002). Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (6), 737-747.
- Abdel-Rahman, A. H. (1983). Amino acid composition of two Italian durum wheat varieties and their semolina. *Food Chemistry*, 10 (2),155-158.
- Abd Rani, N. Z., Husain, K & Kumolosasi, E. (2018). Moringa Genus: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Journal of Frontiers in Pharmacology*, (9), 334-368.
- Abecassis, J., Abbou, R., Chaurand, M., Morel, M. H., & Vernoux, P. (1991). Influence of extrusion conditions on extrusion speed, temperature and pressure in the extruder and on pasta quality. *Cereal chemistry*, 71 (3), 247-253.
- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, (52), 2522-2529.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi, I. A., Oshodi, A. A., & Nirranjan, K. (2007). Isolation, Fractionation and Characterisation of Proteins from Mucuna Bean. *Food Chemistry*, 104(1),287–99.
- Adejumo, B. A., Alakowe, A. T., & Obi, D. E. (2013). Effect of Heat Treatment on the Characteristics and Oil Yield of *Moringa oleifera* Seeds. *International Journal of Engineering and Science*, 2(1), 232-239.
- Aderinola, T. A., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., & Aluko, R. E.. (2020). *In Vitro* Digestibility, Structural and Functional Properties of Moringa Oleifera Seed Proteins. *Food Hydrocolloids*, 101, 105574..
- Ainsa, A., Marquina, P.L., Roncalés, P., Beltrán, J.A., Calanche M., J.B. (2021). Enriched Fresh Pasta with a Sea Bass By-Product, a Novel Food: Fatty Acid Stability and Sensory Properties throughout Shelf Life. *Foods*, 10, 255.-267.
- Ajala, O. O., Fayemi, O. E., & Oyeyemi, M. O. (2012). Some reproductive indices of Nigerian local bitches in Ibadan, Nigeria. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 27(1), 49-53..
- Akajiaku, L. O., Kabuo, N. O., Omeire, G. C., Odimegwu, E. N., & Ogbonna, V. G. (2018). Production and evaluation of Moringa oleifera leaves powder enriched yogurt. *Nutrition and Food Toxicology*, 2(5), 459-466.
- Alam, M., Alam, M., Hakim, M., Huq, A. O., & Maktadir, S. G. (2014). Development of fiber enriched herbal biscuits: a preliminary study on sensory evaluation and chemical composition.. *Intnational Journal of Nutrtrion and Food Siences*, 3,246-250.

Références bibliographiques

- Alcázar, A., Ballesteros, O., Jurado, J. M., Pablos, F., Martín, M. J., Vilches, J. L., & Navalón, A. (2007). Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-Erh Teas According to Their Free Amino Acids Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 5960–5965.
- Alireza Sadeghi, M. & Bhagya, S. (2008). Quality Characterization of Pasta Enriched with Mustard Protein Isolate. *Journal of Food Science*, 73(5) S229-S237.
- Allaert, F. A., Van Wymelbeke, V., Bon, F., & Mahdi, M. (2014). Comparaison de l'impact de La Consommation d'un Pain Brioche G-Nutrition® Enrichi en Protéines et vitamines et d'un Complément Nutritionnel Oral Liquide à Forte Densité Protéique Sur Le Statut Nutritionnel des Personnes Âgées, *Nutrition clinique et Métabolisme*. 28: S219–220.
- Almeida, C. C., Monteiro, M. L. G., da Costa-Lima, B. R. C., Alvares, T. S., & Conte-Junior, C. A. (2015). In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 7-11.
- Alsmeyer, R. H., Cunningham, A. E., & Happich, M. L. (1974). Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technology*, 28, 34–40.
- Aly, A. A., Zaky, E. A., Khatab, N. R., Hameed, A. M., & Kadasah, S. (2022). The Biological and chemical ameliorative effects of bread substituted with dried moringa leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(7), 103875.
- Alzuwaid, N. T., Fleming, D., Fellows, C. M., & Sissons, M. (2021). Fortification of durum wheat spaghetti and common wheat bread with wheat bran protein concentrate-impacts on nutrition and technological properties. *Food Chemistry*, 334, 127497.
- Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Curto, R. B. L., Rosa, E. A., Turco, V. L., Giuffrida, A & Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4), 1047-1054.
- Anese, M., Nicoli, M. C., Massini, R., & Lerici, C. R. (1999). Effects of drying processing on the Maillard reaction in pasta. *Food Research International*, 32(3), 193-199.
- Anjorin, T. S., Ikokoh, P., & Okolo, S. (2010). Mineral Composition of *Moringa Oleifera* Leaves, Pods and Seeds from Two Regions in Abuja, Nigeria. *International Journal of Agriculture and Biology* 12(3): 431–34.
- Ansharullah, Hourigan, J. A., & Chesterman, C. F. (1997). Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2), 141-146.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17-25.

Références bibliographiques

- AOAC. (2000). Official methods of analysis. Association of official analytical chemists (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- AOAC. (1998). Official Methods of analysis, (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. (USA).
- Aravind, N., Sissons, M., Egan, N., & Fellows, C. (2012). Effect of insoluble dietary fibre addition on technological, sensory, and structural properties of durum wheat spaghetti. *Food chemistry*, 130(2), 299-309.
- Ariani, L. N., Estiasih, T., Sunarharum, W. B., & Khatib, A. (2023). Potential of moringa (*Moringa oleifera*) leaf powder for functional food ingredients: A review. *Journal of Food Sciences*, 41(1).
- Armellini, R., Peinado, I., Pittia, P., Scampicchio, M., Heredia, A., & Andres, A. (2018). Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) enrichment on antioxidant and sensorial properties of wheat flour pasta. *Food Chemistry*, 254, 55-63.
- Arulselvan, P., Tan, W. S., Gothai, S., Muniandy, K., Fakurazi, S., Esa, N. M & Kumar, S. S. (2016). Anti-inflammatory potential of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in downregulating the NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Molecules*, 21(11), 1452.
- Ashfaq, M., Basra, S. M., & Ashfaq, U. (2011). "moringa" a miracle plant of agro forestry and southern punjab, pakistan. *World Environment*, 11, 41–54.
- Badmos, A. H. A., El-Imam, A. M. A., & Ajiboye, D. J. (2014). The effect of crude leaf extracts of *Moringa oleifera* on the bacterial, nutritional and sensory properties of West African Soft Cheese. *Journal of Animal Science*, 578, 39–46.
- Bahnassey, Y., Khan, K., & Harrold, R. (1986). Fortification of spaghetti with edible legumes. Physicochemical, antinutritional, amino acid, and mineral composition. *Cereal Chemistry*. 63, 210-215.
- Bamagous, G. A., Al Ghamdi, S. S., Ibrahim, I. A. A., Mahfoz, A. M., Afify, M. A., Alsugoor, M. H & Rengarajan, T. (2018). Antidiabetic and antioxidant activity of ethyl acetate extract fraction of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetes rats via inhibition of inflammatory mediators. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(6), 320-327.
- Bellostas, N., Christian Sørensen, J., Nikiema, A., Sørensen, H., Pasternak, D & Kumar, S. (2010). Glucosinolates in leaves of *Moringa* species grown and disseminated in Niger. *African Journal of Agricultural Research*, 5(11), 1338-1340.

Références bibliographiques

- Bergman, C., Gualberto, D., & Weber, C. (1994). Development of high- temperature-dried soft wheat pasta supplemented with cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Cooking quality, color and sensory evaluation. *Cereal Chemistry*, 71 (6), 523–527.
- Bhatnagar, S. S., Santapau, H., Desa, J. D. H., Maniar, A. C., Ghadially, N. C., Solomon, M. J & Rao, T. N. S. (1961). Biological Activity of Indian Medicinal Plants. Antibacterial, Anti-tubercular and Antifungal Action. *Indian Journal of Medical Research*, 49(5), 799-813.
- Bhattacharya, A., Tiwari, P., Sahu, P. K., & Kumar, S. (2018). A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of *Moringa oleifera*. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 10(4), 181-191.
- Bhagya, S., & Alireza Sadeghi, M. (2008). Quality Characterization of Pasta Enriched. *Journal of Food Science* 73 (5): S229–237.
- Bikheet, M. M., Yasien, E. E., & Galal, S. M. (2021). Preparation of Functional Yoghrt Drink Fortified with *Moringa olifera* Leaves. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 12(9), 217-223.
- Biswas, D., Nandy, S., Mukherjee, A., Pandey, D. K., & Dey, A. (2020). *Moringa oleifera* Lam. and derived phytochemicals as promising antiviral agents: A review. *South African Journal of Botany*, 129, 272-282.
- Bocquet, A., Dupont, C., Chouraqui, J. P., Darmaun, D., Feillet, F., Frelut, M. L & Briend, A. (2019). Efficacy and safety of hydrolyzed rice-protein formulas for the treatment of cow's milk protein allergy. *Archives de Pédiatrie*, 26(4), 238-246.
- Borneo, R., & Aguirre, A. (2008). Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1748-1751.
- Boukandoul, S., Casal, S., Cruz, R., Pinho, C., & Zaidi, F. (2017). Algerian *Moringa oleifera* whole seeds and kernels oils: Characterization, oxidative stability, and antioxidant capacity. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10), 1-6.
- Boroski, M., de Aguiar, A. C., Boeing, J. S., Rotta, E. M., Wibby, C. L., Bonafé, E. G., ... & Visentainer, J. V. (2011). Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf. *Food Chemistry*, 125(2), 696-700.
- Boutry, C., Cécile, B., Daniel, T. (2008). Les Besoins En Acides Aminés Amino Acid Requirements. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 22, 151–160.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183-S211.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.

Références bibliographiques

- Braudo, E. E., Plashchina, I. G., & Schwenke, K. D. (2001). Plant protein interactions with polysaccharides and their influence on legume protein functionality A Review. *Food Nahrung*, 45(6), 382-384.
- Brennan, C. S., & Tudorica, C. M. (2007). Fresh pasta quality as affected by enrichment of nonstarch polysaccharides. *Journal of Food Science*, 72(9), S659-S665.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014.
- Brouns, F., Hemery, Y., Price, R., & Anson, N. M. (2012). Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 553-568.
- Budaraga, I. K., & Putra, D. P. (2020). Study of Green Tea Catechin Dipped with Moringa Leaves. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* 515, 012027.
- Carcea, M., Narducci, V., Turfani, V., & Giannini, V. (2017). Polyphenols in raw and cooked cereals/pseudocereals/legume pasta and couscous. *Foods*, 6(9), 80.
- Carini, E., Vittadini, E., Curti, E., & Antoniazzi, F. (2009). Effects of different shaping modes on physico-chemical properties and water status of fresh pasta. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 400-406.
- Carini, E., Curti, E., Spotti, E., & Vittadini, E. (2012). Effect of formulation on physicochemical properties and water status of nutritionally enriched fresh pasta. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1642-1652.
- Casagrandi, D. A., Canniatti-Brazaca, S. G., Salgado, J. M., Pizzinato, A., & Novaes, N. J. (1999). Análise tecnológica, nutricional e sensorial de macarrão elaborado com farinha de trigo adicionada de farinha de feijão-guandu. *Revista de Nutrição*, 12, 137-143.
- Chandan, R. C. (2006). History and consumption trends. Manufacturing yogurt and fermented milks, *Blackwell Ames*, IA, USA, pp. 3–15.
- Chen, W., & Qiu, Y. (2003). Leaf protein's utilization status and its prospect. *Food Science*, 24(2), 158-161.
- Chen, G. L., Xu, Y. B., Wu, J. L., Li, N., & Guo, M. Q. (2020). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Moringa oleifera leaves and their functional chemical constituents. *Food Chemistry*, 333, 127478.
- Chigurupati, S., Al-Murikhy, A., Almahmoud, S. A., Almoshari, Y., Ahmed, A. S., Vijayabalan, S., ... & Palanimuthu, V. R. (2021). Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of Moringa oleifera ethanolic leaves extract from Qassim region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 854-859.

Références bibliographiques

- Chillo, S., Laverse, J., Falcone, P. M., & Del Nobile, M. A. (2008). Quality of spaghetti in base amaranthus wholemeal flour added with quinoa, broad bean and chick pea. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 101-107.
- Clemente, G., Giacco, R., Lasorella, G., Coppola, S., Trapanese, E., Torre, P., & Greco, L. (2001). Homemade gluten-free pasta is as well or better digested than gluten-containing pasta. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(1), 110-113.
- Cubadda, R. E., Carcea, M., Marconi, E., & Trivisonno, M. C. (2007). Influence of gluten proteins and drying temperature on the cooking quality of durum wheat pasta. *Cereal Chemistry*, 84(1), 48-55.
- Cuellar-Núñez, M. L., De Mejia, E. G., & Loarca-Piña, G. (2021). Moringa oleifera leaves alleviated inflammation through downregulation of IL-2, IL-6, and TNF- α in a colitis-associated colorectal cancer model. *Food Research International*, 144, 110318.
- Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., ... & Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2586-2594.
- Dahot, M. U. (1988). Vitamin contents of the flowers and seeds of Moringa oleifera. *Biochemistry* 21, 1–24.
- Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K., & Luh, B. S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24(4), 401-449.
- Devisetti, R., Yadahally, N. Sreerama., Sila Bhattacharya.(2016). Processing Effects on Bioactive Components and Functional Properties of Moringa Leaves: Development of a Snack and Quality Evaluation. *Journal of Food Science and Technology* 53(1): 649–657.
- Dhakar, R. C., Maurya, S. D., Pooniya, B. K., Bairwa, N., & Gupta, M. (2011). Moringa: The herbal gold to combat malnutrition. *Chronicles of Young Scientists*, 2 (3), 119–125.
- Diantom, A., Curti, E., Carini, E., Boukid, F., Mattarozzi, M., Vodovotz, Y., ... & Vittadini, E. (2018). A multi-scale approach for pasta quality features assessment. *LWT - Food Science and Technology*, 101, 285-292.
- Du, P., Gu, S., & Jiao, Y. (2014). PseAAC-General: fast building various modes of general form of Chou's pseudo-amino acid composition for large-scale protein datasets. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3495-3506.
- Elgamily, H., Moussa, A., Elboraey, A., Hoda, E. S., Al-Moghazy, M., & Abdalla, A. (2016). Microbiological assessment of Moringa oleifera extracts and its incorporation in novel dental remedies against some oral pathogens. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(4), 585-290.

Références bibliographiques

- El-Gammal, R. E., Ghoneim, G. A., & ElShehawy, S. M. (2016). Effect of moringa leaves powder (*Moringa oleifera*) on some chemical and physical properties of pan bread. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 7(7), 307-314.
- El-Wahed, A., & Osman, A. (2020). Utilization of Moringa Leaves Extract in The Production of Functional White Soft Cheese. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 11(6), 179-186.
- Emine, H. E. N., İbanog˘lu, Ş., Öner, M. D., & İbanog˘lu, E. (2006). The in vitro protein digestibility, microbiological quality and gelatinization behaviour of macaroni as affected by cowpea flour addition. *Food Chemistry*, 98(4), 664-669.
- Espinosa, P. F. A., Savoie, R., Subra-Paternault, P., & Harscoat-Schiavo, C. (2020). Oil and protein recovery from corn germ: Extraction yield, composition and protein functionality. *Food and Bioproducts Processing*, 120, 131-142.
- Fabian, C., & Ju, Y. H. (2011). A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 816-827.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. *Trees for Life Journal*, 1(5), 1-15.
- FAO. (1975). Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de Pastas Alimenticias; *FAO: Rome, Italy*.
- FAO/WHO/UNU. (1985). Energy and protein requirements. Report of a Joint Expert Consultation. *Geneva, World Health Organization. Technical Report Series*, No. 724.
- FAO/OMS.(1982). Normas CODEX para los Regímenes Especiales para Lactantes y Niños de Corta Edad. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. *Comisión del CODEX Alimentario*, Roma. Italia.
- FAO/WHO. (1991). Protein quality evaluation. Rome: *In Food and Agricultural Organization of the United Nations*.
- FAO/WHO/UNU. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: *World Health Organization. technical Report Series*.
- FAO, FIDA, OMS, PAM et UNICEF. (2020). L'État de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde. *Transformer les systèmes alimentaires pour une alimentation saine et abordable*. Rome, FAO.
- Feillet, P. (2000). Le grain de blé, Composition et Utilisation. *INRA Editions*, Paris. 208 pp.
- Filip, S., & Vidrih, R. (2015). Amino acid composition of protein-enriched dried pasta: is it suitable for a low-carbohydrate diet?. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 298-306.

Références bibliographiques

- Fiocchi, A., Schunemann, H., Ansotegui, I., Assa'ad, A., Bahna, S., Canani, R. B., ... & Brozek, J. (2018). The global impact of the DRACMA guidelines cow's milk allergy clinical practice. *World Allergy Organization Journal*, 11, 1-7.
- Foidl N., Makkar H.P.S. & Becker K. (2001).The potential of Moringa oleifera for agricultural and industrial uses. In: Proceedings of the International Workshop" What development potential for Moringa products", *Dares-Salaam, Tanzania*. pp. 47–67.
- Fuglie L.J. (2001).Introduction to the multiple uses of Moringa J. The miracle tree: the multiple attributes of Moringa. *Wageningen, The Netherlands*, pp. 163-177.
- Fuglie L.J. (1999). The Miracle Tree: Moringa oleifera: Natural nutrition for the tropics. *Church World Service*. Dakar, p. 68.
- Gadzirayi, C. T., Mudyiwa, S. M., Mupangwa, J. F., & Gotosa, J. (2013). Cultivation practices and utilisation of moringa oleifera provenances by small holder farmers: case of Zimbabwe. *Asian Journal of Agricultural Extension, Economics and Sociology*, 2 (2), 152–162.
- Gallegos, I.A., Rocha-Guzman, N. E., Gonzalez-Laredo, R. F., Ochoa-Martínez, L. A., Corzo, N., Bello-Perez, L. A., ... & Peralta-Alvarez, L. E. (2010). Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 119(4), 1544-1549.
- Ganatra, T., Joshi, U., Bhalodia, P., Desai, T., & Tirgar, P. (2012). A panoramic view on pharmacognostic, pharmacological, nutritional, therapeutic and prophylactic values of Moringa oleifera lam. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(6), 1-7.
- Garcia, J. L., Avidan, N., Troncoso, A., Sarmiento, R., & Lavee, S. (2000). Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia horticulturae*, 85(4), 271-284.
- Gebregiorgis,A.T. G., & Gebrehiwot, K. (2015). Chemical compositions and nutritional value of Moringa oleifera available in the market of Mekelle. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 3(5), 187-190.
- Gelencsér, T., Gál, V., Hódsági, M., & Salgó, A. (2008). Evaluation of quality and digestibility characteristics of resistant starch-enriched pasta. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 171-179.
- Ghasi, S., Nwobodo, E., & Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of Moringa oleifera Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(1), 21-25.
- Ghumman.A., Kaur.A., Singh.N., Singh, B.(2016). Effect of feed moisture and extrusion temperature on protein digestibility and extrusion behaviour of lentil and horsegram. *LWT-Food Sciences Technology*,70,349–357.

Références bibliographiques

- Giménez, M. A., González, R. J., Wagner, J., Torres, R., Lobo, M. O., & Samman, N. C. (2013). Effect of extrusion conditions on physicochemical and sensorial properties of corn-broad beans (*Vicia faba*) spaghetti type pasta. *Food Chemistry*, 136(2), 538-545.
- Gopalakrishnan, L. K., & Devarai, S. (2005). Moringa Oleifera: a review on nutritive importance and its Medicinal Application. *Asian Journal Plant Sciences*, 4, 417-421.
- Görgüç, A., Bircan, C., & Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 283, 637-645.
- Granella, S. J., Bechlin, T. R., Christ, D., Coelho, S. R. M., & de Oliveira Paz, C. H. (2021). An approach to recent applications of Moringa oleifera in the agricultural and biofuel industries. *South African Journal of Botany*, 137, 110-116.
- Granito, M., Torres, A., & Guerra, M. (2003). Desarrollo y evaluación de una pasta a base de trigo, maíz, yuca y frijol. *Interciencia*, 28(7), 372-379.
- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1), 345-351.
- Guéguen, J., Walrand, S., & Bourgeois, O. (2016). Les protéines végétales: contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51(4), 177-185.
- Hager, A. S., Czerny, M., Bez, J., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2013). Starch properties, in vitro digestibility and sensory evaluation of fresh egg pasta produced from oat, teff and wheat flour. *Journal of Cereal Sciences*, 58(1), 156-163.
- Hirawan, R., Ser, W. Y., Arntfield, S. D., & Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial, regular-and whole-wheat spaghetti. *Food Chemistry*, 119(1), 258-264.
- Hussin, H., Gregory, P. J., Julkifle, A. L., Sethuraman, G., Tan, X. L., Razi, F., & Azam-Ali, S. N. (2020). Enhancing the nutritional profile of noodles with Bambara groundnut (*Vigna Subterranea*) and Moringa (*Moringa Oleifera*): A food system approach. *Sustainable Food Systems*, 4, 59.
- Ijarotimi, O. S., Adeoti, O. A., & Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented Moringa oleifera seed flour. *Food Science & Nutrition*, 1(6), 452-463.
- Jodayree, S., Smith, J. C., & Tsopmo, A. (2012). Use of carbohydrase to enhance protein extraction efficiency and antioxidative properties of oat bran protein hydrolysates. *Food Research International*, 46(1), 69-75.
- Joshi, P., & Mehta, D. (2010). Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. *Journal of Metabolomics and Systems Biology*, 1(1), 5-9.
- Karín, E.C., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Velasco, P., & Frias, J. (2022). Pasta products enriched with moringa sprout powder as nutritive dense foods with

Références bibliographiques

- bioactive potential. *Food Chemistry*, 360, 130032.
- Kasolo, J. N., Bimenya, G. S., Ojok, L., Ochieng, J., & Ogwal-Okeng, J. W. (2010). Phytochemicals and uses of Moringa oleifera leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Mediterranean Plant Research*. 4(9), 753–7.
- Kaur, M., Kaushal, P., & Sandhu, K. S. (2013). Studies on physicochemical and pasting properties of Taro (*Colocasia esculenta* L.) flour in comparison with a cereal, tuber and legume flour. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 94-100.
- Khan, W., Parveen, R., Chester, K., Parveen, S., & Ahmad, S. (2017). Hypoglycemic potential of aqueous extract of Moringa oleifera leaf and in vivo GC-MS metabolomics. *Frontiers in pharmacology*, 8, 259217.
- Kies, C., & Fox, H. M. (1970). Determination of the first-limiting amino acid of wheat and triticale grain for humans. *Cereal Chemistry*, 47, 615–625.
- Krishnan, M., & Prabhasankar, P. (2010). Studies on pasting, microstructure, sensory, and nutritional profile of pasta influenced by sprouted finger millet (*Eleucina coracana*) and green banana (*Musa paradisiaca*) flours. *Journal of Texture Studies*, 41(6), 825-841.
- Kumar, S., Verma, P. K., Shukla, A., Singh, R. K., Patel, A. K., Yadav, L., ... & Acharya, A. (2023). Moringa oleifera L. leaf extract induces cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis in Dalton's Lymphoma: An in vitro and in vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*, 302, 115849.
- Lalas, S., Athanasiadis, V., Karageorgou, I., Batra, G., Nanos, G. D., & Makris, D. P. (2017). Nutritional characterization of leaves and herbal tea of Moringa oleifera cultivated in Greece. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 23(4), 320-333.
- Lamaison, J. L., & Carnet, A. (1990). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata*. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 65, 315–320.
- Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214-222.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2016). Moringa oleifera seeds and oil: Characteristics and uses for human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2141.
- Lin, L., Qiyuan, Z., Mouming, Z., Kun, Z., & Yuchen. (2019). Purification of Peptide Fraction with Antioxidant Activity from Moringa Oleifera Leaf Hydrolysate and Protective Effect of Its in Vitro Gastrointestinal Digest on Oxidatively Damaged Erythrocytes. *International Journal of Food Science and Technology* 54(1): 84–91.

Références bibliographiques

- Liu, T., Hamid, N., Kantono, K., Pereira, L., Farouk, M. M., & Knowles, S. O. (2016). Effects of meat addition on pasta structure, nutrition and in vitro digestibility. *Food Chemistry*, 213, 108-114.
- Ma, Z. F., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., & Muhammad, S. (2020). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. *South African Journal of Botany*, 129, 40-46.
- Mahmoud, K. B., Wasli, H., Mansour, R. B., Jemai, N., Selmi, S., Jemmali, A., & Ksouri, R. (2021). Antidiabetic, antioxidant and chemical functionalities of *Ziziphus jujuba* (Mill.) and *Moringa oleifera* (Lam.) plants using multivariate data treatment. *South African Journal of Botany*, 144, 219-228.
- Makkar, H. A., & Becker, K. (1996). Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 63(1-4), 211-228.
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *The Journal of Agricultural Science*, 128(3), 311-322.
- Makonnen, E., Hunde, A., & Damecha, G. (1997). Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. *Phytotherapy Research*, 11(2), 147-148.
- Mangale, S. M., Chonde, S. G., Jadhav, A. S., & Raut, P. D. (2012). Study of *Moringa oleifera* (drumstick) seed as natural absorbent and antimicrobial agent for river water treatment. *Journal of Natural Products and Plant Resources*, 2 (1), 89–100.
- Mao, X., & Hua, Y. (2012). Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1561-1581.
- Marconi, E., & Carcea, M. (2001). Pasta from non-traditional raw materials. *Cereal Foods World*, 46 (11), 522-529.
- Martín-Esparza, M. E., Raigón, M. D., García-Martínez, M. D., & Albors, A. (2021). Role of hydrocolloids in the structure, cooking, and nutritional properties of fiber-enriched, fresh egg pasta based on tiger nut flour and durum wheat semolina. *Foods*, 10(10), 2510.
- Martínez-Villaluenga, C., Torres, A., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2010). Semolina supplementation with processed lupin and pigeon pea flours improve protein quality of pasta. *LWT-Food Science and technology*, 43(4), 617-622.
- McCarty, M. F., Barroso-Aranda, J., & Contreras, F. (2009). The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy. *Medical Hypotheses*, 72(2), 125-128.

Références bibliographiques

- Mehta, K., Balaraman, R., Amin, A. H., Bafna, P. A., & Gulati, O. (2003). Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 191-195.
- Mercier, S., Mondor, M., Moresoli, C., Villeneuve, S., & Marcos, B. (2015). Drying of durum wheat pasta and enriched pasta: a review of modeling approaches. *Food Science and Nutrition Sciences*, 56(7), 1146-1168.
- Mercier, S., Villeneuve, S., Mondor, M., Drolet, H., Ippersiel, D., Lamarche, F., & Des Marchais, L.P. (2012). Mixing Properties and Gluten Yield of Dough Enriched with Pea Protein Isolates. *Journal of Food Research*, 1,13-23.
- Migliori, M., Gabriele, D., de Cindio, B., & Pollini, C. M. (2005). Modelling of high quality pasta drying: quality indices and industrial application. *Journal of Food Engineering*, 71(3), 242-251.
- Milla, P. G., Peñalver, R., & Nieto, G. (2021). Health benefits of uses and applications of *Moringa oleifera* in bakery products. *Plants*, 10(2), 318.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124.
- Mridula, D., Gupta, R.K., Bhadwal, S., & Khaira, H. (2016). Optimization of Groundnut Meal and Capsicum Juice for Protein and Antioxidant Rich Pasta. *Agriculture Research*. 5, 293–304.
- Mishra, G., Singh, P., Verma, R., Kumar, S., Srivastav, S., Jha, K. & Khosa, R. (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: An overview. *Scholars Research Library Der Pharmacia*, 3(2): 141-164.
- Mohtadji-Lamballais, C. (1989). Les aliments (pp. 31-66). *Editions Malouine*, Paris.
- Mole, S., & Waterman, P. G. (1987). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*, 72, 137-147.
- Montoya, C. A., Lallés, J. P., Beebe, S., Montagne, L., Souffrant, W. B., & Leterme, P. (2006). Influence of the *Phaseolus vulgaris* phaseolin level of incorporation, type and thermal treatment on gut characteristics in rats. *British journal of Nutrition*, 95(1), 116-123.
- Moodley, I. (2017). Acute toxicity of *Moringa oleifera* leaf powder in rats. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(5), 180-185.

Références bibliographiques

- Morton, J. F. (1991). The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae). *Economic Botany*, 45 (3), 318–333.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9), 945-963.
- Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925-12933.
- Mune, M.A., Nyobe, E. C., Bakwo Bassogog, C., & Minka, S. R. (2016). A comparison on the nutritional quality of proteins from *Moringa oleifera* leaves and seeds. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1213618.
- Mune, M. M., Minka, S. R., Mbome, I. L., & Etoa, F. X. (2011). Nutritional potential of bambara bean protein concentrate. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10, 112–119.
- Nambiar, V. S., Mehta, R., & Daniel, M. (2005). Polyphenol content of three Indian green leafy vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 42(6), 312-315.
- Navaratne, K. ., Senevirathne, H. A., Rathnayake, B.U., & Uthpala, T. G. G. (2019). *Moringa* *Olifera* plant, the nutritional and medicinal properties of *moringa olifera* leaves. *Trends & Prospects in Processing of Horticultural Crops*,18, 251-268.
- Ndabigengesere, A., & Narasiah, K. S. (1998). Use of *Moringa oleifera* seeds as a primary coagulant in wastewater treatment. *Environmental Technology*, 19(8), 789-800.
- Nielsen, M. A. (1980). Fortification of Pasta with Pea Flour and Air-Classified Pea Protein Concentrate. *Cereal Chemistry*, 57(3), 203-206.
- Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E., & Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, 83, 166-176.
- Nouman, W. N., Basra, S. M. A., Siddiqui, M. T., Azra Yasmeen, A. Y., Tehseen Gull, T. G., & Alcayde, M. A. C. (2014). Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: a review. *Turkish Journal of Agriculture and Forestr*,38, 1-14.
- Nouman, W., Siddiqui, M. T., Basra, S., Ahmed, M., Farooq, H., Zubair, M., & Gull, T. (2013). Biomass production and nutritional quality of *Moringa oleifera* as a field crop. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(4), 410-419.
- Okereke, C. J., & Akaninwor, J. O. (2013). The protein quality of raw leaf, seed and root of *Moringa oleifera* grown in Rivers State, Nigeria. *Annals Biological Ressearch*, 4(11), 34-8.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., & Okada, M. (2001). Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research*, 35(2),

Références bibliographiques

- 405-410.
- Olaofe, O., Adeyeye, E. I., & Ojugbo, S. (2013). Comparative study of proximate, amino acids and fatty acids of Moringa oleifera tree. *Elixir Applied Chemistry*, 54, 12543-12554.
- Oomah, B. D., Corbé, A., & Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8225-8230.
- Overduin, J., Guérin-Deremaux, L., Wils, D., & Lambers, T. T. (2015). NUTRALYS® pea protein: characterization of in vitro gastric digestion and in vivo gastrointestinal peptide responses relevant to satiety. *Food & Nutrition Research*, 59(1), 25622.
- Owon, M., Osman, M., Ibrahim, A., Salama, M. A., & Matthäus, B. (2021). Characterisation of different parts from Moringa oleifera regarding protein, lipid composition and extractable phenolic compounds. *Oilseeds & fats, Crops and Lipids*, 28: 45
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- Oyeyinka, A. T., & Oyeyinka, S. A. (2018). Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 127-136.
- Özyurt, G., Uslu, L., Yuvka, I., Gökdoğan, S., Atci, G., Ak, B., & Işık, O. (2015). Evaluation of the cooking quality characteristics of pasta enriched with *Spirulina platensis*. *Journal of Food Quality*, 38(4), 268-272.
- Padalino, L., Costa, C., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2019). Extract of *Salicornia europaea* in fresh pasta to enhance phenolic compounds and antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(11), 3051-3057.
- Palada, M. C., & Chang, L. C. (2003). Suggested cultural practices for bitter melon. *AVRDC International Cooperators' Guide*, 3(547), 1-5.
- Palada, M. C., Chang, L., Yang, R., & Engle, L. M. (2006). Introduction and varietal screening of drumstick tree (*Moringa* spp.) for horticultural traits and adaptation in Taiwan. In I International Conference on Indigenous Vegetables and Legumes. *Prospectus for Fighting Poverty, Hunger and Malnutrition 752* (pp. 249-253).
- Palmer, E., & Pitman, N. (1972). Trees of Southern Africa: covering all known indigenous species in the Republic of South Africa, South-West Africa, Botswana, Lesotho & Swaziland. *Balkema, Cape Town*, 1-2.
- Panchal, M. A., Murti, K., Lambole, V., & Gajera, V. (2010). Pharmacological properties of Moringa oleifera lam.-a review. *Pharmacologyonline*, 2, 768-775.

Références bibliographiques

- Pasini, G., Greco, F., Cremonini, M. A., Brandolini, A., Consonni, R., & Gussoni, M. (2015). Structural and nutritional properties of pasta from *Triticum monococcum* and *Triticum durum* species. A combined ¹H NMR, MRI, and digestibility study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(20), 5072-5082.
- Patil, S. V., Mohite, B. V., Marathe, K. R., Salunkhe, N. S., Marathe, V., & Patil, V. S. (2022). Moringa tree, gift of nature: a review on nutritional and industrial potential. *Current Pharmacology Reports*, 8(4), 262-280.
- Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., & Micard, V. (2010). Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, 43(2), 634-641.
- Petitot, M., Brossard, Ch., Barron, C., Larré, C., Morel, M.H. & Micard, V. (2009). Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects of the in vitro digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 116, 401-412.
- Pınarlı, İ., İbanoğlu, Ş., & Öner, M. D. (2004). Effect of storage on the selected properties of macaroni enriched with wheat germ. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 249-256.
- Prabhasankar, P., Ganesan, P., Bhaskar, N., Hirose, A., Stephen, N., Gowda, L. R., ... & Miyashita, K. J. F. C. (2009). Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*, 115(2), 501-508.
- Price, M.L. The Moringa tree. *Echo Technical Note*. Florida, USA, 2000. pp. 1-13.
- Promkum C, Kupradinun P, Tuntipopipat S, Butryee C. (2010). Nutritive evaluation and effect of Moringa oleifera pod on clastogenic potential in the mouse. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 11(3):627-32.
- Prosky, L., Asp, N. G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F., & Harland, B. F. (1985). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 68(4), 677-679.
- Raffaella, D.C., Angelis, M., Alfonsi, G., de Vincenzi, M., Silano, M., Vincentini, O., & Gobbetti, M. (2005). Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4393-4402.
- Rafiq, A., Sharma, S., & Singh, B. (2018). Effect of pregelatination on rheology, cooking and antioxidant activity of pasta. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 1756-1766.
- Rakesh, N., Fellows, C. M., & Sissons, M. (2015). Evaluation of the technological and sensory properties of durum wheat spaghetti enriched with different dietary fibres. *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 95(1), 2-11.

Références bibliographiques

- Ralezo-Maevalandy, A. (2006). La Moringa: *Moringa oleifera*. *Antanarivo*, Madagascar.
- Ramachandran, C., Peter, K.V., & Gopalakrishnan, P.K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany*, 34: 276-283.
- Ramesh-Kumar, A.R., Prabhu, M., Ponnuswami, V., Lakshmanan, V. & Nithyadevi, A. (2014). Scientific seed production techniques in Moringa. *Agricultural Reviews*, 35 (1), 69–73.
- Rathi, A., Kawatra, A., & Sehgal, S. (2004). Influence of depigmentation of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) on sensory attributes, nutrient composition, in vitro protein and starch digestibility of pasta. *Food Chemistry*, 85(2), 275-280.
- Rayas-Duarte, P., Mock, C. M., & Satterlee, L. D. (1996). Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth, and lupin flours. *Cereal Chemistry*, 73(3), 381-387.
- Reeds, P. J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. *The Journal of Nutrition*, 130(7), 1835S-1840S.
- Rekha, M. N., Chauhan, A. S., Prabhasankar, P., Ramteke, R. S., & Rao, G. V. (2013). Influence of vegetable purees on quality attributes of pastas made from bread wheat (*T. aestivum*). *Journal of Food*, 11(2), 142-149.
- Ribotta, P. D., León, A. E., Pérez, G. T., & Añón, M. C. (2005). Electrophoresis studies for determining wheat–soy protein interactions in dough and bread. *European Food Research and Technology*, 221, 48-53.
- Rizza, R.A., & Go, V.L.W. (2002). Encyclopedia of foods: A guide to healthy nutrition (pp. 272-295). *Academic Press*.
- Rocchetti, G., Rizzi, C., Pasini, G., Lucini, L., Giuberti, G., & Simonato, B. (2020). Effect of *Moringa oleifera* L. leaf powder addition on the phenolic bioaccessibility and on in vitro starch digestibility of durum wheat fresh pasta. *Foods*, 9(5), 628.
- Rockwood, J. L., Anderson, B. G., & Casamatta, D. A. (2013). Potential uses of *Moringa oleifera* and an examination of antibiotic efficacy conferred by *M. oleifera* seed and leaf extracts using crude extraction techniques available to underserved indigenous populations. *International Journal of Phytotherapy Research*, 3(2), 61-71.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246-254.
- Rosset, M., Acquaro, V. R., & Beléia, A. D. P. (2014). Protein extraction from defatted soybean flour with V iscozyme L pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 784-790.
- Ruan, L., Wei, K., Wang, L., Cheng, H., Wu, L., & Li, H. (2019). Characteristics of free amino acids (the quality chemical components of tea) under spatial heterogeneity of different nitrogen forms in tea (*Camellia sinensis*) plants. *Molecules*, 24(3), 6-9.

Références bibliographiques

- Ruckmani, K., Kavimani, S., Anandan, R., & Jaykar, B. (1998). Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. *Indian Journal of Pharmaceutic Sciences*, 60, 33–35.
- Sabanis, D., Makri, E., & Doxastakis, G. (2006). Effect of durum flour enrichment with chickpea flour on the characteristics of dough and lasagne. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1938-1944.
- Saini, R. K., Manoj, P., Shetty, N. P., Srinivasan, K., & Giridhar, P. (2014). Dietary iron supplements and *Moringa oleifera* leaves influence the liver hepcidin messenger RNA expression and biochemical indices of iron status in rats. *Nutrition Research*, 34(7), 630-638.
- Saint-Sauveur, A.D. (2001). *Moringa* exploitation in the world: State of knowledge and challenges.”Development Potential for *Moringa* Products.” Dar es Salaam, Tanzania, *International Workshop*.
- Sajid Mushtaq. B., Imran Pasha, I. P., Rabia Omer, R. O., Hussain, M. B., Tabassum Tufail, T. T., Shariati, M. A., ... & Kharitonov, D. V. (2018). Characterization of *Moringa oleifera* leaves and its utilization as value added ingredient in unleavened flat bread (chapatti). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*,(8),751-755.
- Sánchez-Machado, D. I., Núñez-Gastélum, J. A., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Wong, B., & López-Cervantes, J. (2010). Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. *Food analytical methods*, 3, 175-180.
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, 10(8), 1138-1157.
- Sebastián-Francisco, I., Simó-Alfonso, E. F., Mongay-Fernández, C., & Ramis-Ramos, G. (2004). Improvement of the electrophoretic protein profiles of Leguminosae gums extracts using gamanase and application to the evaluation of carob–guar mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 508, 135–140.
- Sebola, N. A., Mlambo, V., & Mokoboki, H. K. (2019). Chemical characterisation of *Moringa oleifera* (MO) leaves and the apparent digestibility of MO leaf meal-based diets offered to three chicken strains. *Agroforestry Systems* 93(1):149–160.
- Sęczyk, Ł., Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Luty, M., & Czyż, J. (2016). Effect of fortification with parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) leaves on the nutraceutical and nutritional quality of wheat pasta. *Food Chemistry*, 190, 419-428.
- Sęczyk, Ł., Świeca, M., & Gawlik-Dziki, U. (2015). Changes of antioxidant potential of pasta fortified with parsley (*Petroselinum Crispum* Mill.) leaves in the light of protein-phenolics interactions. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(1), 29-36.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., & Chen, J. (2008). Studies on tea protein extraction

Références bibliographiques

- using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929-938.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., & Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 357(1418), 133-142.
- Shogren, R. L., Hareland, G. A., & Wu, Y. V. (2006). Sensory evaluation and composition of spaghetti fortified with soy flour. *Journal of Food Science*, 71(6), S428-S432.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144-2155.
- Siegel, A., & Fawcett, B. (1978). Transformation et utilisation des légumineuses alimentaires (application particulière aux pays en développement). *CRDI*, Ottawa. 63p.
- Simonato, B., Tolve, R., Rainero, G., Rizzi, C., Segà, D., Rocchetti, G., ... & Giuberti, G. (2020). Technological, nutritional, and sensory properties of durum wheat fresh pasta fortified with *Moringa oleifera* L. leaf powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 1920-1925.
- Simonato, B., Curioni, A., & Pasini, G. (2015). Digestibility of pasta made with three wheat types: A preliminary study. *Food Chemistry*, 174, 219-225.
- Singh, M. K., Paul, J., De, T., & Chakraborti, T. (2015). Bioactivity guided fractionation of *Moringa oleifera* Lam. flower targeting *Leishmania donovani*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53, 747-52.
- Singh, U. (2001). Functional properties of grain legume flours. *Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 191-199.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sissons, M.J. (2004). Pasta. In C. Wrigley; H. Corke, & C. Walker (Eds.), *Encyclopedia of Grain Science*. Oxford: Academic Press.
- Sivani, B. M., Venkatesh, P., Murthy, T. K., & Kumar, S. B. (2021). In silico screening of antiviral compounds from *Moringa oleifera* for inhibition of SARS-CoV-2 main protease. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100202.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89(2), 191-198.
- El Sohaimy, S. A., Hamad, G. M., Mohamed, S. E., Amar, M. H., & Al-Hindi, R. R. (2015). Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food. *Journal of Agricultural Science*, 4(4), 188-199.

Références bibliographiques

- Sozer, N., Dalgıç, A. C., & Kaya, A. (2007). Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. *Journal of Food Engineering*, 81(2), 476-484.
- Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796-804.
- Sun, Q., & Tian, Z. (2003). Studies of rice protein extraction using an alkali method. *Shiping Gongye Keji*, 24, 38-40.
- Taher, M. A., Nyeem, M. A. B., Ahammed, M. M., Hossain, M. M., & Islam, M. N. (2017). *Moringa oleifera* (Shajna): the wonderful indigenous medicinal plant. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 3(1), 20-30.
- Taiwo, A. A., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., & Aluko, R. E. (2020). In vitro digestibility, structural and functional properties of *Moringa oleifera* seed proteins. *Food Hydrocolloids*, 101, 105574.
- Taiwo, A. A., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M., & Aluko, R. E. (2018). Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 4(10).
- Tamayo, A. T., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2017). Understanding leaf membrane protein extraction to develop a food-grade process. *Food Chemistry*, 217, 234-243.
- Tamayo, A. T., Gieteling, J., De Jong, G. A., Boom, R. M., & Van Der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chemistry*, 203, 402-408.
- Tazart, K., Lamacchia, C., Zaidi, F., & Haros, M. (2016). Nutrient composition and in vitro digestibility of fresh pasta enriched with *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 8-15.
- Tedeschi-Jockers, F., Reinhold, S., Hollinger, A., Tuchscherer, D., Kiss, C., Gantner, L., ... & Siegemund, M. (2022). A new high protein-to-energy enteral formula with a whey protein hydrolysate to achieve protein targets in critically ill patients: a prospective observational tolerability study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 419-427.
- Teh, S. S., Bekhit, A. E. D., Carne, A., & Birch, J. (2014). Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 92-104.
- Teixeira, E. M. B., Carvalho, M. R. B., Neves, V. A., Silva, M. A., & Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147, 51-54.

Références bibliographiques

- Tété-Bénissan, A., Lawson-Evi, K. A., Kokou, K., & Gbéassor, M. (2012). Effect of Moringa oleifera Lam. leaves powder on the evolution of hemogram profile in togolese undernourished children: evaluation on HIV-positive patients. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 12(2), 6007-6026.
- Torres, A., Frias, J., Granito, M., & Vidal-Valverde, C. (2007). Germinated Cajanus cajan seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 101(1), 202-211.
- Toth, G. B., & Pavia, H. (2001). Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP). *Journal of Chemical Ecology*, 27(9), 1899-1910.
- Ugrinovits, M., Arrigoni, E., Dossenbach, A., Häberli, G., Hanich, H., Rychener, M., Thormann, M., & Stalder, U. (2004). Pâtes alimentaires et pâtes alimentaires composées, chapitre 20 (pp.1-4). *Manuel Suisse des denrées alimentaires*.
- van den Berg, J., & Kuipers, S. (2022). The antibacterial action of Moringa oleifera: A systematic review. *South African Journal of Botany*, 151, 224-233.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M., Herrero-Martínez, J., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food chemistry*, 169, 28-33.
- Walsh, D. E., & Gilles, K. A. (1977). Pasta Technology Elements of Food Technology. *Desroiser, NW, Ed.*
- Wangcharoen.W, & Gomolmanee.S. (2011). Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Moringa Oleifera Grown Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Moringa Oleifera Grown in Chiang Mai , Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44(5) : 118–124.
- Wang, J., Brennan, M. A., Brennan, C. S., & Serventi, L. (2021). Effect of vegetable juice, puree, and pomace on chemical and technological quality of fresh pasta. *Foods*, 10(8), 1931.
- Wang, J., Brennan, M. A., Serventi, L., & Brennan, C. S. (2022). Impact of functional vegetable ingredients on the technical and nutritional quality of pasta. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6069-6080.
- Wang, W., Tai, F., & Chen, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science*, 31(11), 2032-2039.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375.

Références bibliographiques

- Wolfe, R. R., Rutherford, S. M., Kim, I. Y., & Moughan, P. J. (2016). Protein quality as determined by the Digestible Indispensable Amino Acid Score: evaluation of factors underlying the calculation. *Nutrition reviews*, *74*(9), 584-599.
- Wood, J. A. (2009). Texture, processing and organoleptic properties of chickpea-fortified spaghetti with insights to the underlying mechanisms of traditional durum pasta quality. *Journal of Cereal Science*, *49*(1), 128-133.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *111*(2), 370-376.
- Xi, J., & Yan, L. (2017). Optimization of pressure-enhanced solid-liquid extraction of flavonoids from Flos Sophorae and evaluation of their antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, *175*, 170-176.
- Yadav, D. N., Sharma, M., Chikara, N., Anand, T., & Bansal, S. (2014). Quality characteristics of vegetable-blended wheat-pearl millet composite pasta. *Agricultural Research*, *3*, 263-270.
- Yanez-Farias, G. A., Bernal-Aguilar, V., Ramirez-Rodriguez, L., & Barron-Hoyos, J. M. (1999). Fortification of some cereal foods with a chickpea protein concentrate. *Food Science and Technology International*, *5*(1), 89-93.
- Yang, F., Huang, X., Zhang, C., Zhang, M., Huang, C., & Yang, H. (2018). Amino acid composition and nutritional value evaluation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and its protein subunit. *RSC advances*, *8*(5), 2653-2659.
- Zarkadas, C. G., Yu, Z., & Burrows, V. D. (1995). Protein quality of three new Canadian-developed naked oat cultivars using amino acid compositional data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(2), 415-421.
- Zhang, T., Jeong, C. H., Cheng, W. N., Bae, H., Seo, H. G., Petriello, M. C., & Han, S. G. (2019). Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. *Food Science and Technology*, *101*, 276-284.
- Zhang, C., Slegers, P. M., Wisse, J., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2018). Sustainable scenarios for alkaline protein extraction from leafy biomass using green tea residue as a model material. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *12*(4), 586-599.
- Zhang, C., Van Krimpen, M. M., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2016). Improving yield and composition of protein concentrates from green tea residue in an agri-food supply chain: Effect of pre-treatment. *Food and Bioproducts Processing*, *100*, 92-101.
- Zhang, C., Bozileva, E., van der Klis, F., Dong, Y., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2016). Integration of galacturonic acid extraction with alkaline protein extraction from green tea leaf residue. *Industrial Crops and Products*, *89*, 95-102.

Références bibliographiques

- Zhang, C., Sanders, J. P., Xiao, T. T., & Bruins, M. E. (2015). How does alkali aid protein extraction in green tea leaf residue: a basis for integrated biorefinery of leaves. *PLoS one*, *10*(7),1-14.
- Zhang, C., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, *67*, 466-472.
- Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., ... & Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, *107*(1), 296-304.
- Zhao, Y. H., Manthey, F. A., Chang, S. K., Hou, H. J., & Yuan, S. H. (2005). Quality characteristics of spaghetti as affected by green and yellow pea, lentil, and chickpea flours. *Journal of Food Science*, *70*(6), s371-s376.
- Zhao, S., & Zhang, D. (2013). A parametric study of supercritical carbon dioxide extraction of oil from *Moringa oleifera* seeds using a response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, *113*, 9-17.
- Ziani, B. E., Rached, W., Bachari, K., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. & Dur. and *Moringa oleifera* Lamarck. *Journal of Functional Foods*, *53*, 237-247.
- Zula, A. T., Ayele, D. A., & Egigayhu, W. A. (2021). Proximate composition, antinutritional content, microbial load, and sensory acceptability of noodles formulated from moringa (*Moringa oleifera*) leaf powder and wheat flour blend. *International Journal of Food Science*, *6*, 1–6.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1

Tableau 1 : les vertus thérapeutiques des différentes parties issues de l'arbre de *Moringa Oleifera*.

Partie	vertus thérapeutiques	References
Racines	Anti-fertilité, anti-inflammatoire, traiter les rhumatismes, les douleurs articulaires, les douleurs des reins, les maladies cardiovasculaires et gastro-intestinales.	Padmarao et al., 1996; Dahot, 1988; Ruckmani et al., 1998.
Feuilles	Contre les infections de la peau, les maux de tête, la fièvre, les douleurs de la gorge, la bronchite, les infections de l'œil et de l'oreille, hyperglycémie.	Makonnen et al., 1997; Dahot, 1988; Morton, 1991; Fuglie, 2001.
Ecore de tige	Activité antituberculeuse, soigner les maladies oculaires, guérir les ulcères.	Bhatnagar et al., 1961; Siddhuraju and Becker, 2003.
Fleurs	Soigner les inflammations, les maladies musculaires, l'hystérie, effet sur les maladies cardiovasculaires et gastro-intestinales.	Siddhuraju and Becker, 2003; Mehta et al., 2003; Dahot, 1998.
Graines	Activité antiinflammatoire, utilisées pour traiter l'arthrite, le rhumatisme, les crampes, les maladies sexuellement transmises et l'épilepsie.	Fahey, 2005 ; Ajala et al., 2012.

Annexes

Tableau II : Teneur en vitamines et minéraux de poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (Fuglie.2001).

Composés		Teneur (mg/g de poudre de feuilles)
Vitamines	A (β-carotene)	16,3
	B1 (thiamine)	2,64
	B2 (riboflavine)	20,5
	B3 (acide nicotinique)	8,2
	C (acide ascorbique)	17,3
	E (tocophérol)	113
Minéraux	Ca (Calcium)	2,003
	P (phosphore)	204
	Mg (Magnésium)	368
	K (Potassium)	1,324
	Cu (Cuivre)	0,57
	Fe (Fer)	28,2

Annexes

Tableau III : Teneur en acides aminés de la poudre de feuilles de *Moringa Oleifera*
(Mune et al. 2016).

Acide aminé	Teneur (g/ g de protéine)	FAO/WHO (1991)
Histidine	1.98	1.9
Isoleucine	5.03	2.8
Leucine	9.70	6.6
Lysine	5.53	5.8
Thréonine	5.28	3.4
Tryptophane	Non déterminé	1.1
Valine	6.65	3.5
Méthionine	1.40	
Cystéine	0.41	
Tyrosine	2.20	
Phénylalanine	4.58	
Aspartique	9.76	
Serine	5.75	
Glutamique	11.35	
Proline	5.70	
Glycine	10.57	
Alanine	9.79	
Arginine	4.31	
Acides aminés sulfuriques totaux	1.81	2.3
Acides aminés aromatiques totaux	6.78	6.3
Acides aminés essentiels totaux	42.76	33.9
Acides aminés non essentiels totaux	57.23	

Annexes

Annexe 2

Courbes d'étalonnages

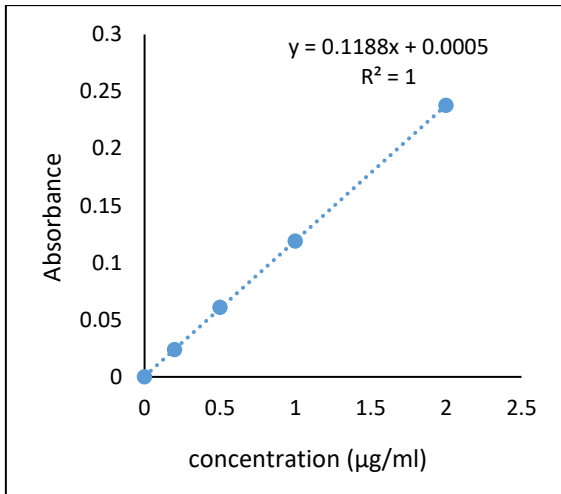


Figure 1 : courbes d'étalonnage du Calcium

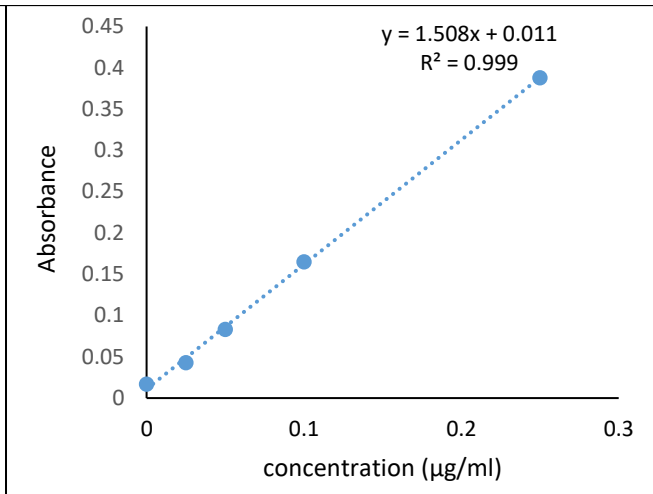


Figure 2 : courbes d'étalonnage du Magnésium

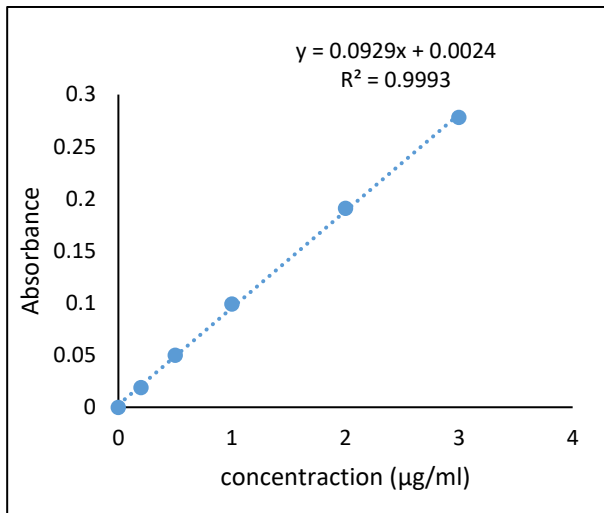


Figure 3 : courbes d'étalonnage du Fer

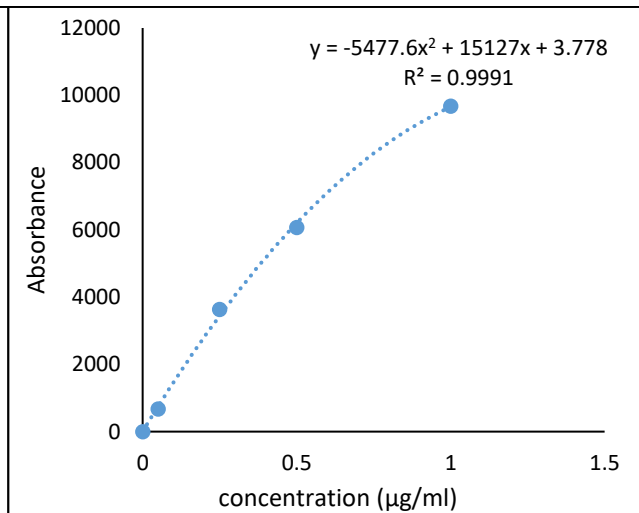


Figure 4 : courbes d'étalonnage du Sodium

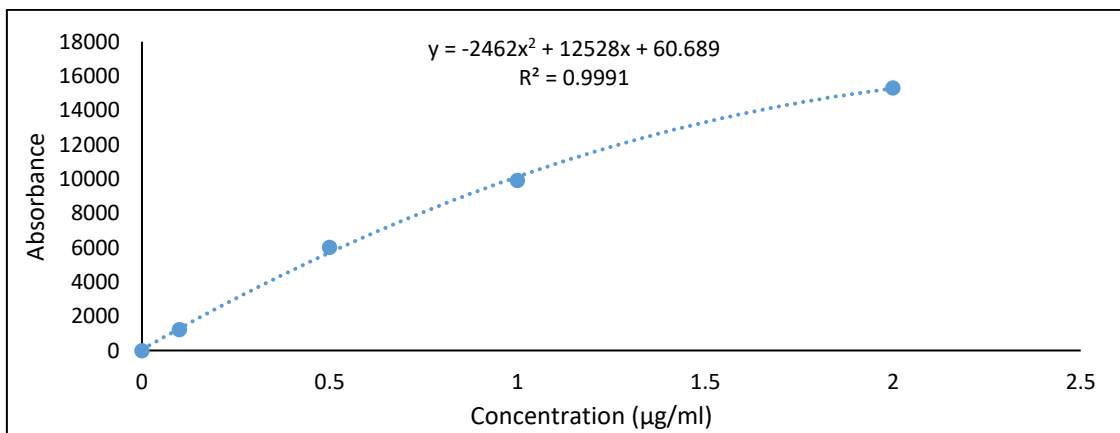


Figure 5 : courbes d'étalonnage du Potassium

Annexes

Annexe 3

Tableau IV : Limites de détection et de quantification des profils d'acides aminés utilisant HPLC-FMOC /OPA.

	b	a	r²	∑%ER	LD	LQ	Sy/x	Sb	Sa	Sb/b(x100)
Asp	0.0143	0.0035	0.9997	10.49	2.3468	7.8227	0.0112	0.00015	0.0086	1.0715
Glu	0.0148	0	0.9989	20.71	4.1253	13.751	0.0204	0.00028	0.0157	1.8835
Asn	0.0145	-0.0017	0.9997	8.23	2.2543	7.5144	0.0109	0.00015	0.0084	1.0293
Ser	0.0181	0.0203	0.9996	16.38	2.4385	8.1284	0.0147	0.0002	0.0113	1.1134
Gln	0.0173	0.0196	0.9989	38.67	3.8224	12.7413	0.0221	0.0003	0.017	1.7452
His	0.0154	0.0009	0.9997	12.37	2.011	6.7033	0.0103	0.00014	0.0079	0.9182
Gly	0.0367	0.0331	0.9993	16.64	3.3913	11.3042	0.0415	0.00057	0.0319	1.5484
Thr	0.0151	0.0094	0.9991	38.58	3.3992	11.3307	0.0171	0.00023	0.0132	1.552
Arg	0.0208	-0.0058	0.9995	7.97	2.8104	9.368	0.0195	0.00027	0.015	1.2832
Ala	0.0196	0.0118	0.999	16.2	4.0606	13.5352	0.0265	0.00036	0.0204	1.854
Tyr	0.0256	0.0049	0.9997	15.95	2.187	7.2901	0.0187	0.00026	0.0143	0.9985
Val	0.0208	-0.0004	0.999	12.73	4.0641	13.5471	0.0281	0.00039	0.0216	1.8556
Met	0.0214	-0.0215	0.999	18.48	3.9137	13.0458	0.028	0.00038	0.0215	1.7869
Trp	0.017	-0.0031	0.9996	9.04	2.4939	8.3131	0.0141	0.00019	0.0108	1.1387
Phe	0.0189	0.0065	0.9994	14.18	3.0846	10.282	0.0195	0.00027	0.0149	1.4084
Ile	0.0264	-0.0162	0.9988	12.83	4.388	14.6267	0.0386	0.00053	0.0296	2.0035
Leu	0.0261	-0.0012	0.999	10.41	3.973	13.2433	0.0346			
Lys	0.0078	-0.001	0.999	20.94	3.8999	12.9996	0.0101	0.00014	0.0077	1.7806
Pro	0.0648	-0.0287	0.9992	30.44	3.2423	10.8075	0.07	0.00096	0.0537	1.4803
Cys	0.0037	0.0039	0.9993	31.89	3.2874	10.958	0.0041	0.00006	0.0031	1.501

Annexes

Annexe 4

Courbe d'étalonnage d'acide aminé injecté dans HPLC-FMOC/OPA derivatization UP-2080 HPLC pump, FP-920 fluorescence détecteur, Aas-950 :

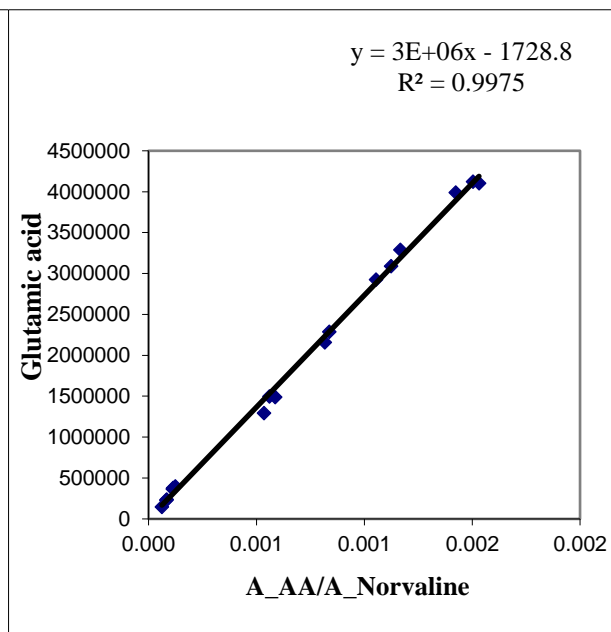
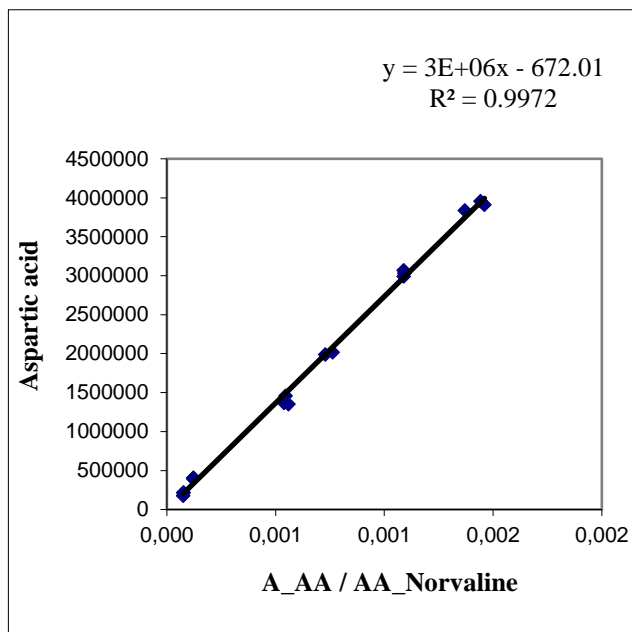


Figure 6 : courbe d'étalonnage de l'acide aspartique **Figure 7 :** courbe d'étalonnage de l'acide glutamique

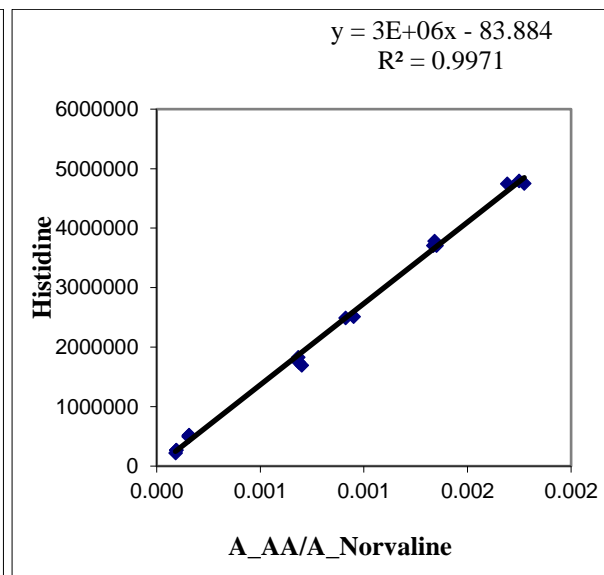
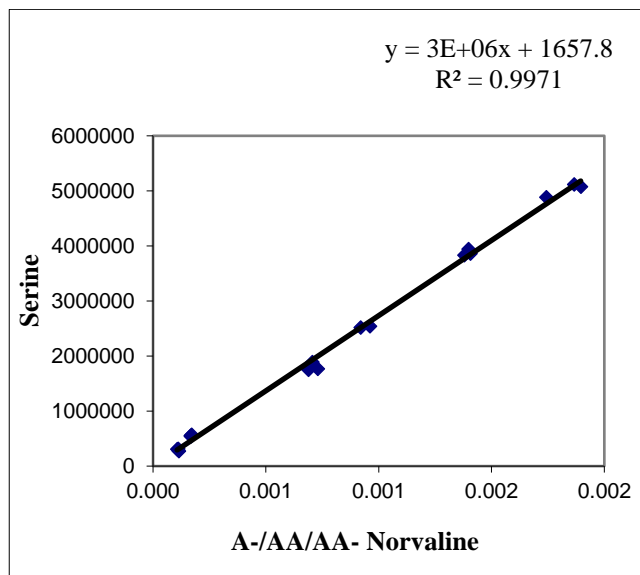


Figure 8 : courbe d'étalonnage de Serine

Figure 9 : courbe d'étalonnage de l'Histidine

Annexes

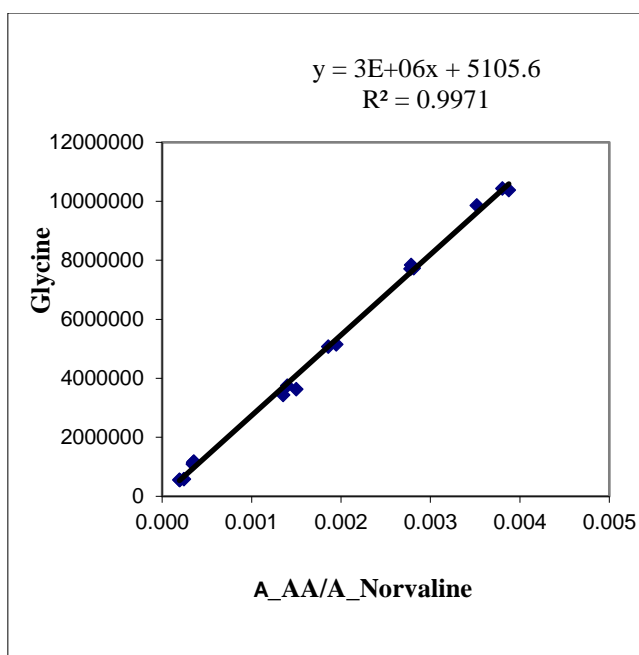


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de Glycine

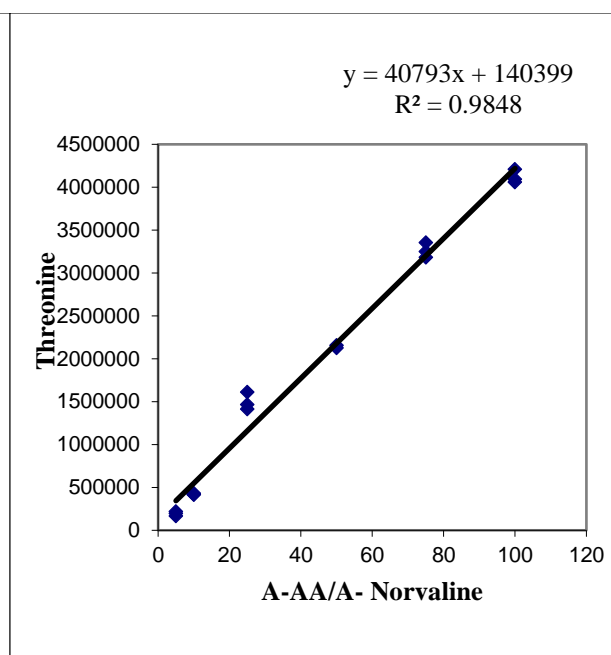


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de Thréonine

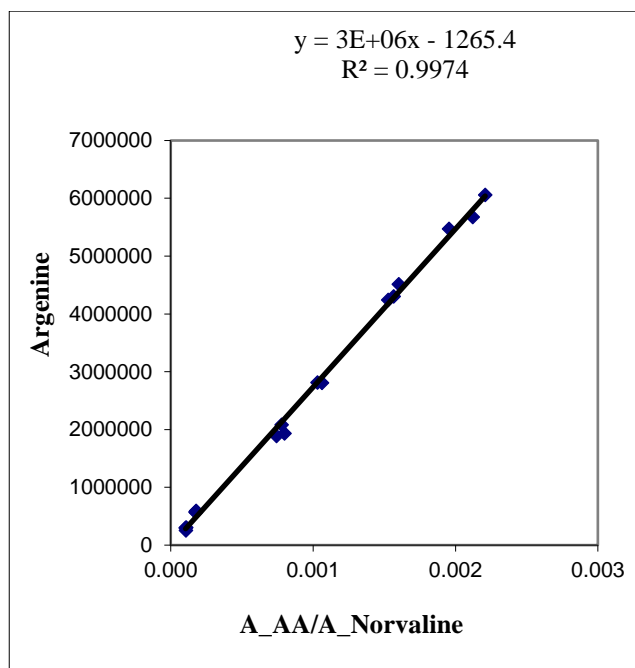


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'Argénine

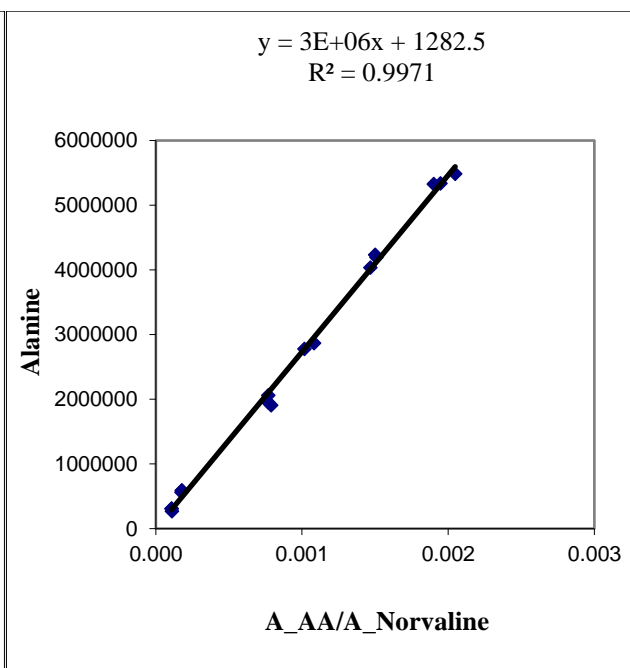


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'Alanine

Annexes

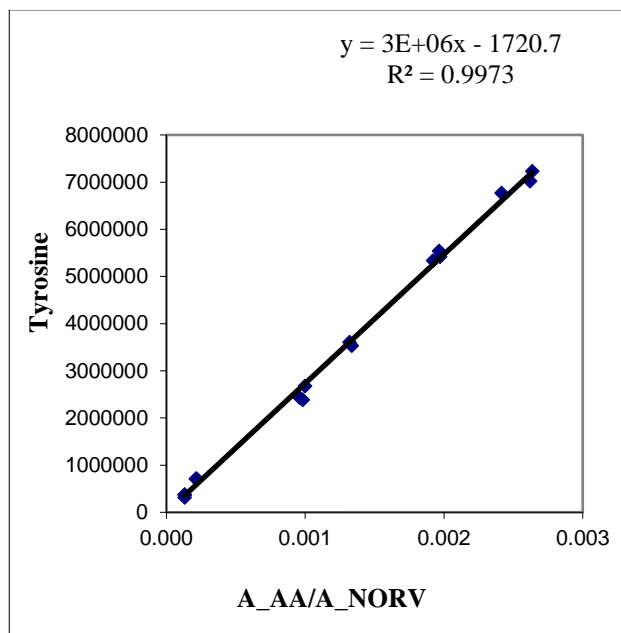


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de Tyrosine

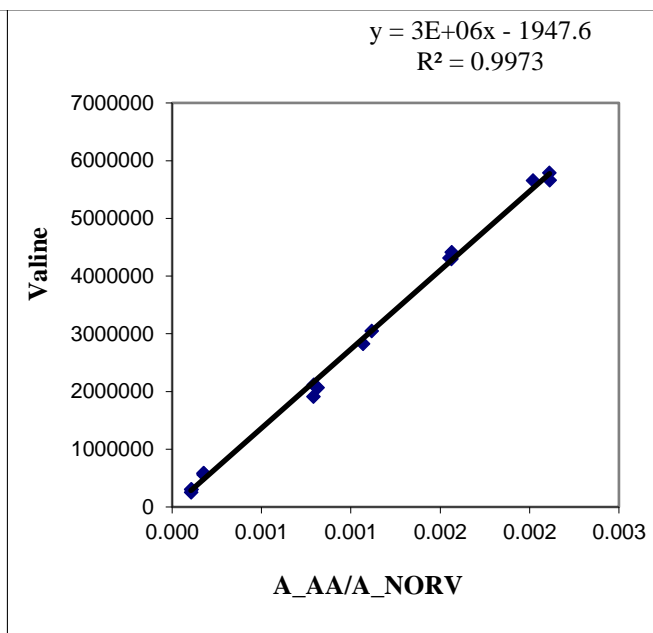


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de Valine

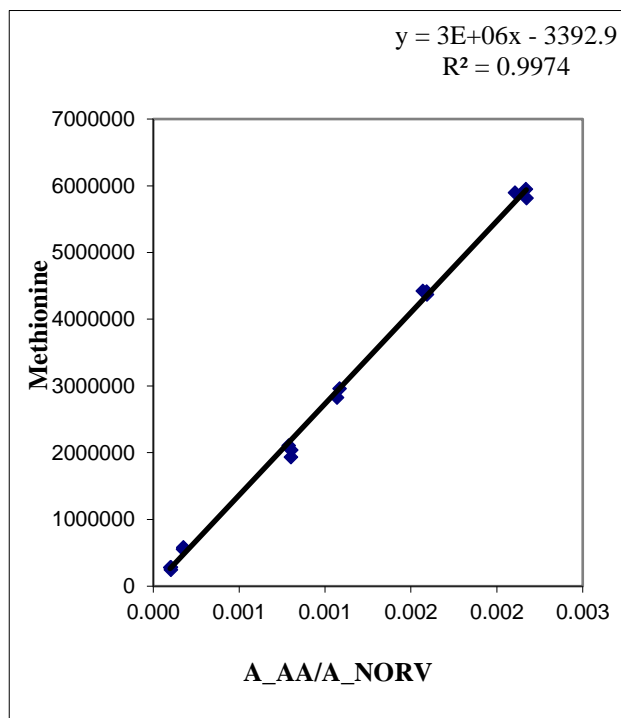


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de Méthionine

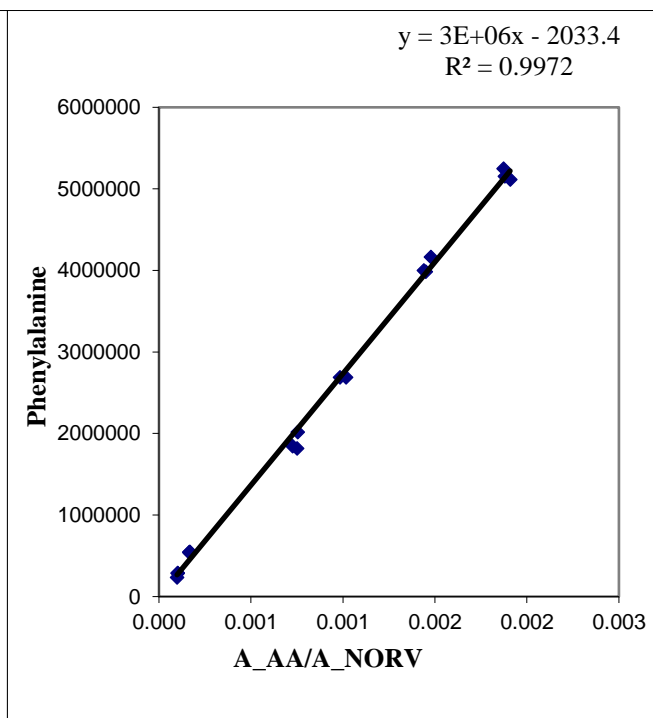


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de Phénylalanine

Annexes

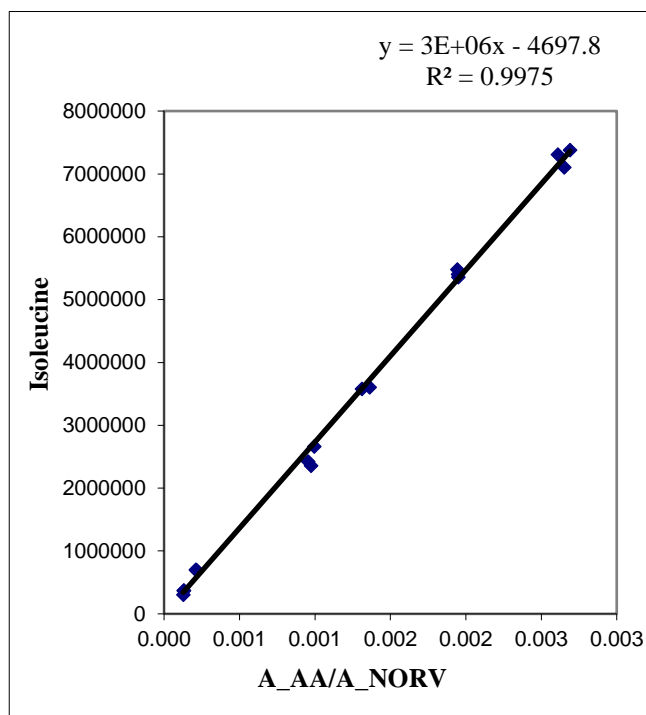


Figure 18 : courbe d'étalonnage d'Isoleucine

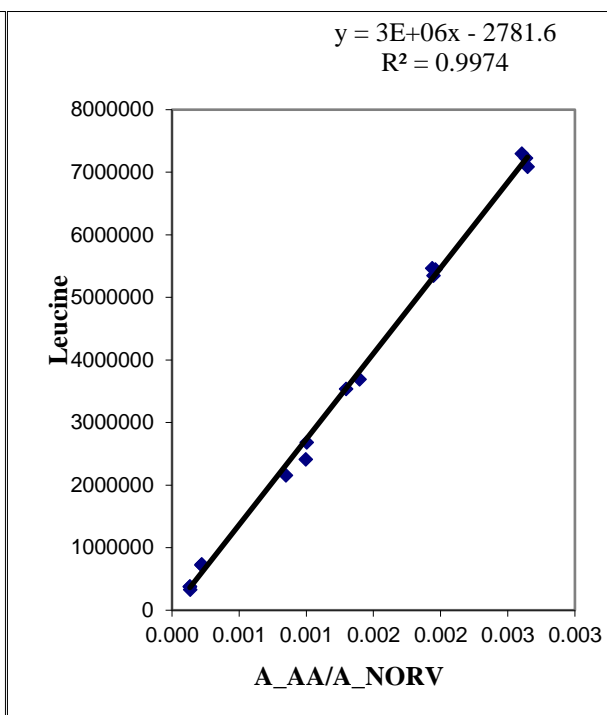


Figure 19 : courbe d'étalonnage de Leucine

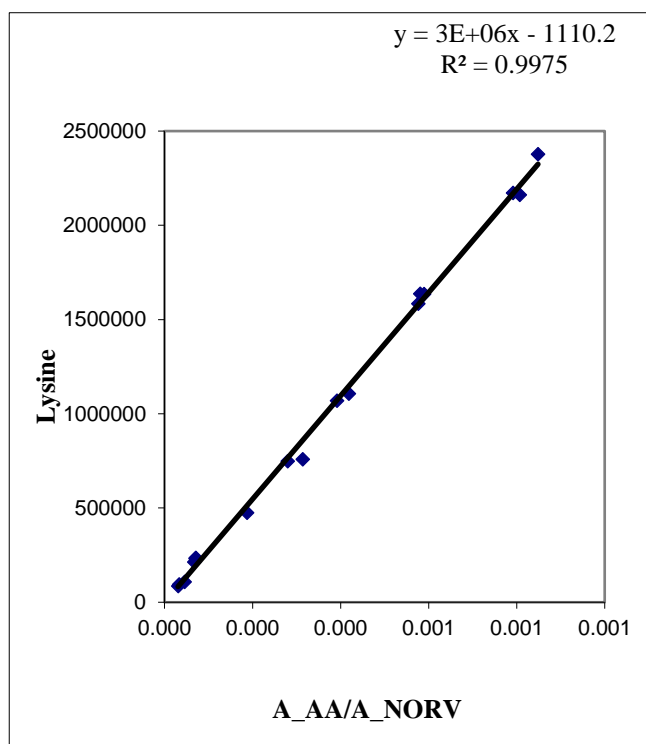


Figure 20 : courbe d'étalonnage de Lysine

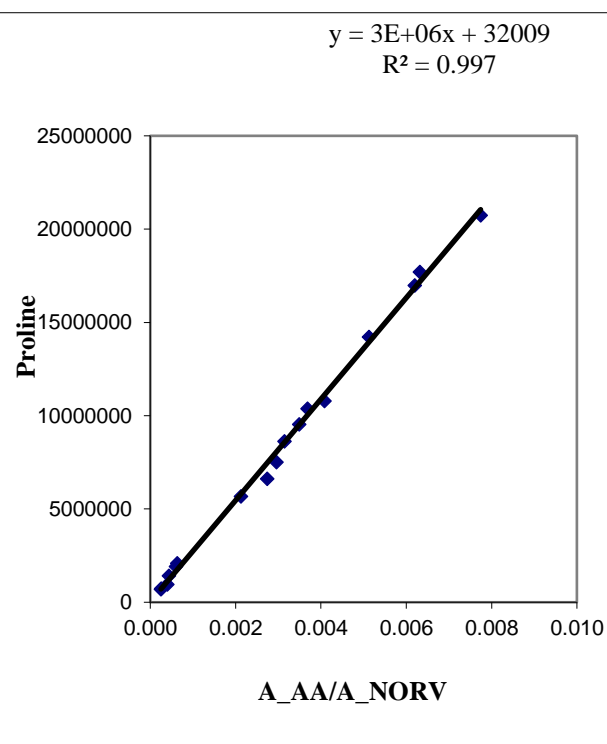


Figure 21 : courbe d'étalonnage de Proline

Annexes

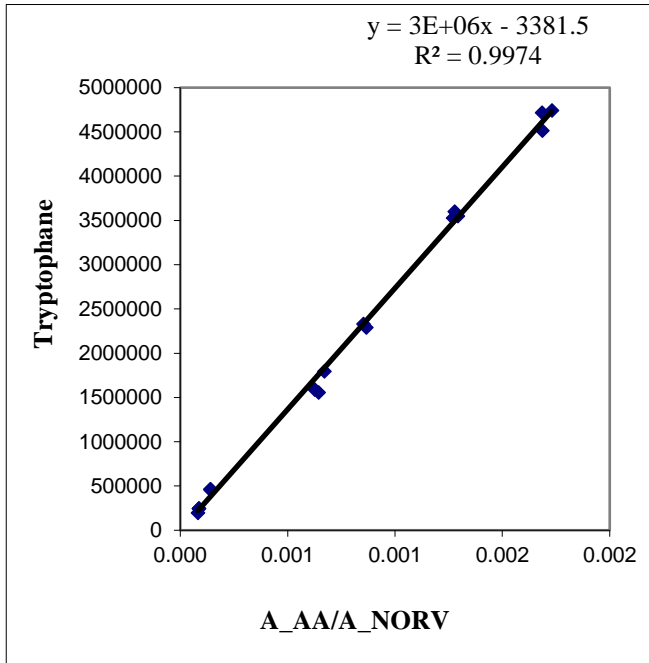


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de Tryptophane

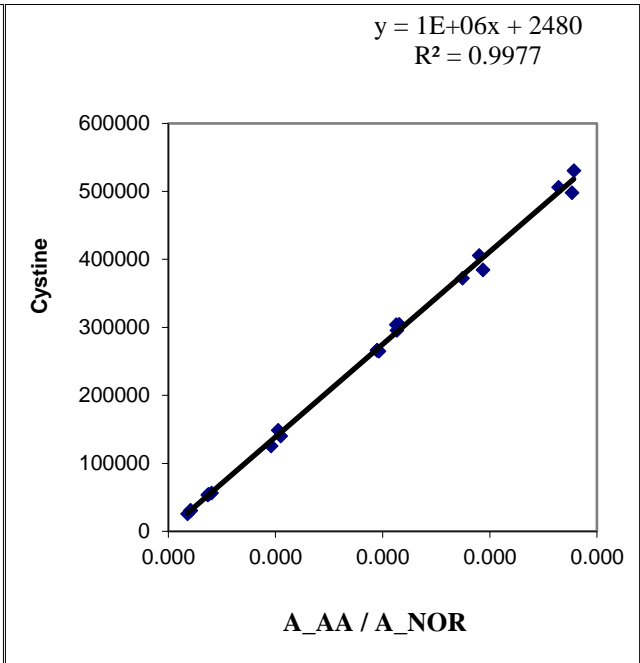


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de Cystine

Annexe 5

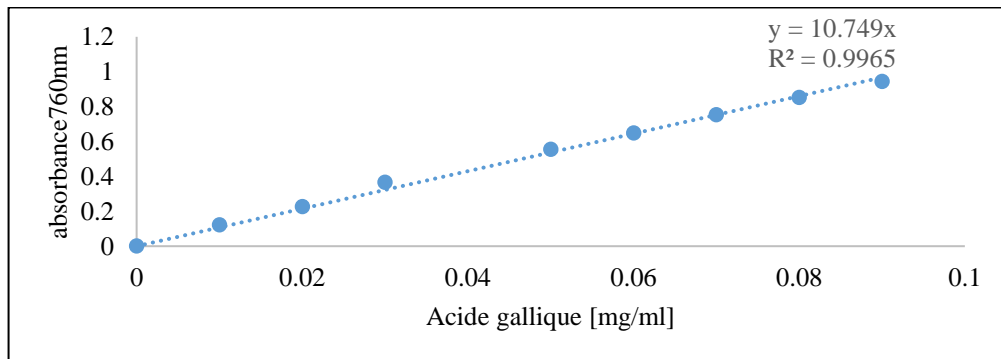


Figure 24 : Dosage des phenols totaux solubles

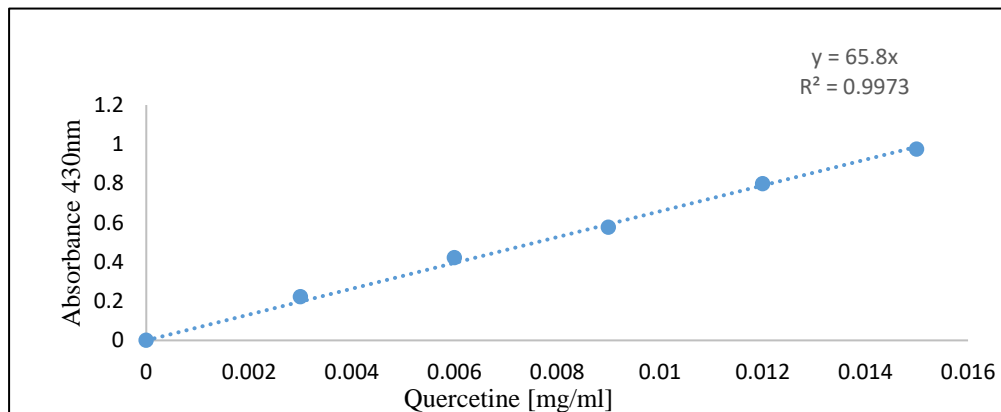


Figure 25 : Dosage des Flavonoïdes

Annexes

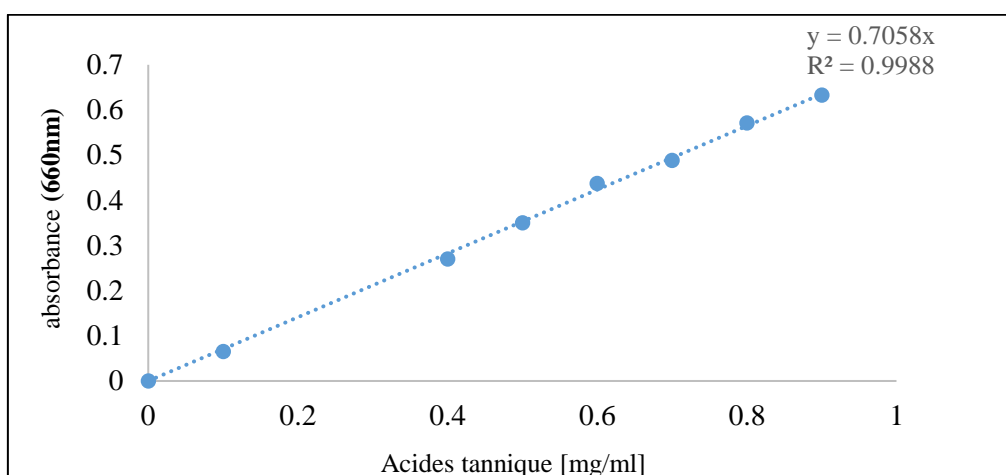


Figure 26 : Dosage des tannins hydrolysables.

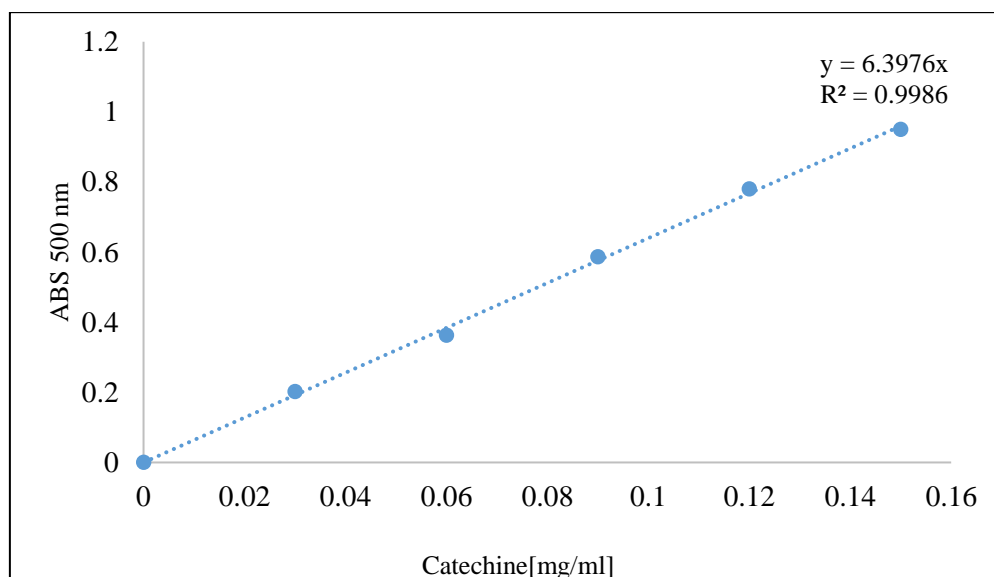


Figure 27 : Dosage des tannins condensés.

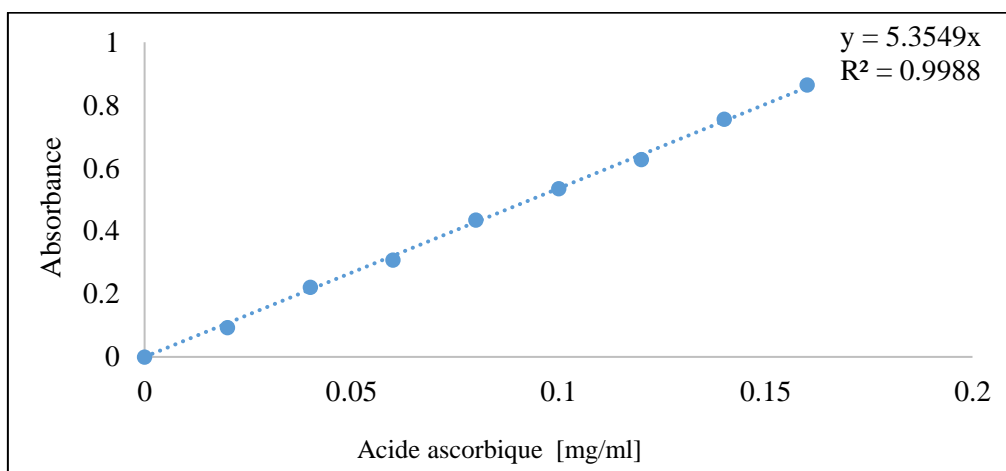


Figure 28 : Dosage de l'acide ascorbique.

Annexes

Annexe 6

Tableau V : préparation des fluides de digestion *in vitro* pour un volume de 400ml d'eau d' distillée.

Salt solution added	Stock concentrations		SSF (pH 7)		SGF (pH 3)		SIF (pH 7)	
			Milliliters of stock added to prepare 0.4 L (1.25×)	Final salt concentration in SSF	Milliliters of stock added to prepare 0.4 L (1.25×)	Final salt concentration in SGF	Milliliters of stock added to prepare 0.4 L (1.25×)	Final salt concentration in SIF
	(g/L)	(M)	(mL)	(mM)	(mL)	(mM)	(mL)	(mM)
KCl	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH ₂ PO ₄	68	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO ₃ ^a	84	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.12	1.1	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃ ^a	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
HCl		6	0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ ^b	44.1	0.3	0.025	1.5	0.005	0.15	0.04	0.6

Annexe 7

Tableau VI : Facteurs et niveaux des variables du CCD, données expérimentales de l'extraction enzymatique de protéines (en mg) de *Moringa* (a) par RSM.

run	Temperature	Time	[Visc L]	response (mg protein)
1	40.00	0.90	40.00	18.03
2	43.41	0.60	50.00	24.50
3	35.00	0.60	33.18	22.23
4	26.59	0.60	50.00	30.80
5	40.00	0.30	40.00	24.50
6	40.00	0.30	60.00	27.65
7	30.00	0.30	40.00	30.98
8	30.00	0.30	60.00	34.65
9	35.00	0.60	50.00	24.85
10	35.00	0.60	50.00	25.55
11	40.00	0.90	60.00	25.90
12	35.00	0.095	50.00	33.08
13	35.00	0.60	50.00	26.25
14	35.00	1.105	50.00	24.85
15	30.00	0.90	60.00	27.30
16	35.00	0.60	50.00	25.20
17	35.00	0.60	50.00	24.33

Annexes

18	35.00	0.60	66.82	27.83
19	30.00	0.90	40.00	24.68

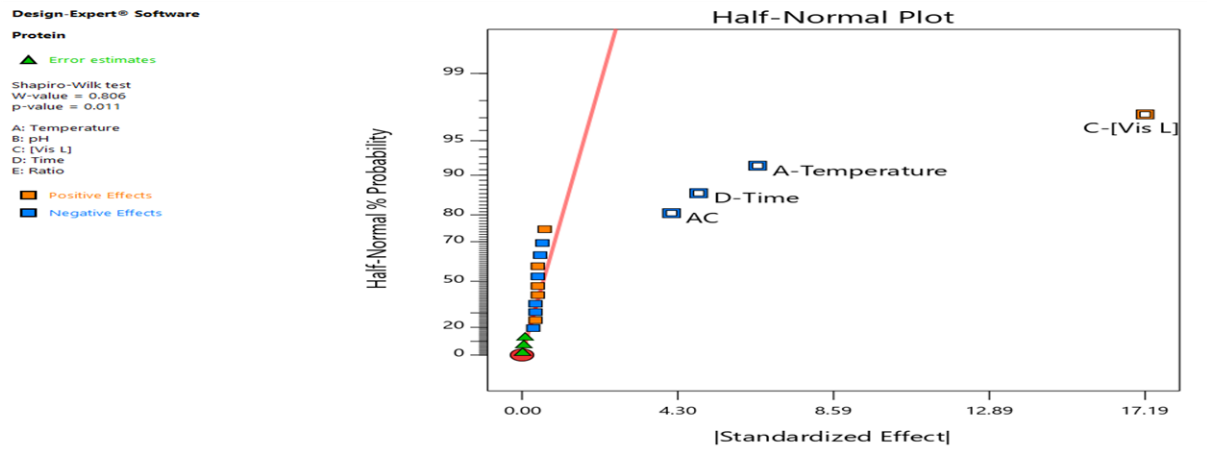


Figure 30 : sélection des probabilités des paramètres d’Optimisation des conditions d’extraction de protéines suivant un Factorial Design-Expert software version 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

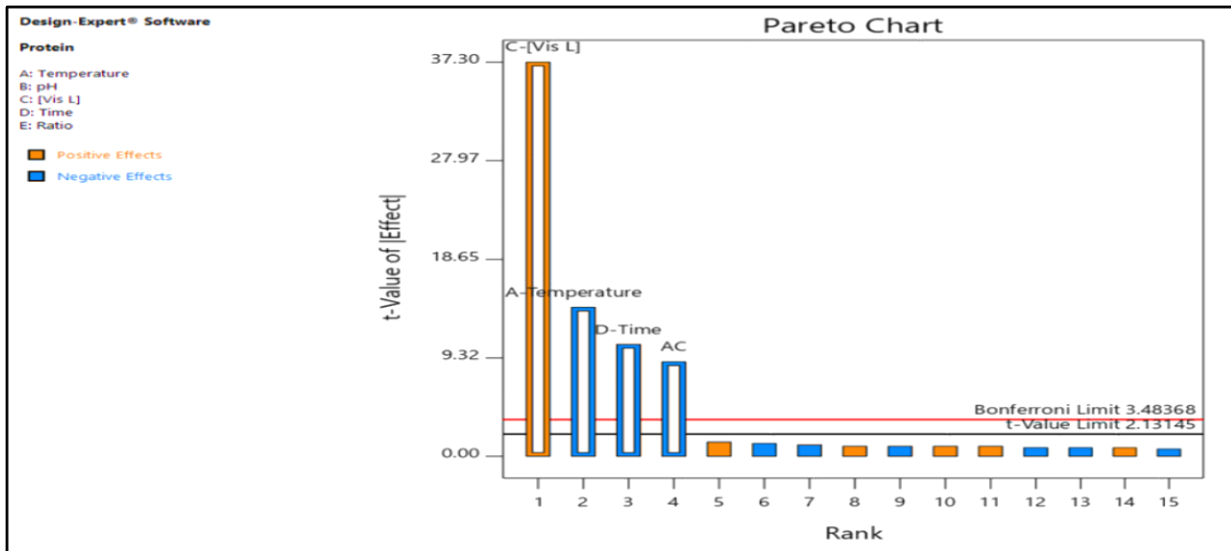


Figure 31 : effets des probabilités des paramètres d’Optimisation des conditions d’extraction de protéines suivant un Factorial Design-Expert software version 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

Annexes

Tableau VII : données expérimentales et valeurs prédites du RSM pour les conditions optimales d'extraction des protéines de feuilles de *Moringa Oleifera*.

Solution1 Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	SE Mean	95% CI low for Mean	95% CI high for mean	95% TI low for 99% Pop	95% TI high for 99% Pop
Protein (mg/g)	34.6574	34.6574		0.55072	0.450712	33.6378	35.677	35.677	37.8175

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES



Nutritional quality of protein concentrates from *Moringa Oleifera* leaves and *in vitro* digestibility

Tassadit Benhammouche^{a,b}, Armindo Melo^{c,d}, Zita Martins^b, Miguel A. Faria^b, Susana C. M. Pinho^{b,e}, Isabel M.L.P.V.O. Ferreira^{b,*}, Farid Zaidi^a

^a Département des Sciences Alimentaires, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria

^b LAQV/REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Food Science Laboratory and Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal

^c National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, Department of Environmental Health, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Portugal

^d LAQV/REQUIMTE, University of Porto, Portugal

^e LAQV, REQUIMTE, Institute for the Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

Moringa oleifera defatted leaves
RSM
Protein concentrate
Amino acids
In vitro digestibility
Protein quality

ABSTRACT

The nutritional value and digestibility of leaf proteins is still a major issue. Therefore, the goal of this work was to optimize the production of a protein concentrate (PC) from *Moringa Oleifera* defatted leaves (MODL) by enzymatic extraction using Viscozyme L and evaluate its nutritional quality and digestibility. Protein extraction conditions were screened using a factorial design. Enzyme/Substrate ratio and pH had no significant effect, whereas, the significant variables, temperature (°C), enzyme concentration and incubation time (h) were optimized by central composite design (CCD). PC contained 55.7% of proteins with a balanced amino acid profile when compared with MODL and higher content of essential amino acids (EAAs) (488.6–402.9 mg/g of protein respectively). Improvement on protein digestibility was observed for MODL compared to PC (64.75–99.86% respectively) and higher protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) (62.10–91.41% respectively). PC meets FAO protein quality expectations.

1. Introduction

The increase of protein demand worldwide creates a great challenge to find sustainable alternative protein sources that present high biological value (McCarty, Barroso-Aranda, & Contreras, 2009). Green plants and leaves have a huge potential for production of protein concentrates (Mune, Nyobe, Bassogog, & Minka, 2016). However, their use has been limited, so far, due to their low content of sulphur amino acids, the interaction with non-protein components, referred as secondary metabolites (phenols, flavonoids, tannins) and dietary fibres, which can build irreversible complexes with proteins, thus, affecting their solubility (Zhang, Sanders, Xiao, & Bruins, 2015). Moreover, the presence of antiphenological proteins (protease inhibitors, lectins) and their compact structure, makes plant proteins less susceptible to *in vivo* digestion compared with animal proteins (Wang, Tai, & Chen, 2008).

Several studies highlight the extraction of plant proteins under the concept of biorefinery to meet environmental, economical, nutritional, and functional concerns (Espinosa-Pardo, Savoie, Subra-Paternault, & Harscoat-Schiavo, 2020; Görgüç, Bircan, & Yilmaz, 2019; Mune et al.,

2016) but their application as new protein food ingredients is still scarce. In fact, huge efforts were made to achieve separation, isolation, and concentration of leaf proteins by using alkaline extraction (Zhang, Sanders, & Bruins, 2014), pre-treatment with organic solvents and/or enzymes (Garcia, Avidan, Troncoso, Sarmiento, & Lavee, 2000; Zhang, van Krimpen, Sanders, & Bruins, 2016), extreme extraction conditions (Görgüç et al., 2019; Vergara-Barberán, Lerma-García, Herrero-Martínez, & Simó-Alfonso, 2015). Nevertheless, these processes are still limited due to their lack of environmental sustainability, low digestibility and nutritional value (Zhang et al., 2014).

Carbohydrases are a gainfully approach for fast and environmentally friendly plant protein extraction, in order to promote the disintegration of cell wall polysaccharides, rendering the intracellular components more accessible, namely, the proteins (Zhang et al., 2016). Several studies are focused on improving the effectiveness of Viscozyme® L, a multicomponent carbohydrase that includes arabanases, cellulase, hemicellulase and xylanase (Ansharullah, Hourigan, & Chesterman, 1997; Guan & Yao, 2008; Rosset, Acquaro Junior, & Beléia, 2014) and also their use in a biorefinery concept for leaves biomass (Zhang et al., 2016).

* Corresponding author.

E-mail address: isabel.ferreira@ff.up.pt (I.M.L.P.V.O. Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128858>

Received 19 June 2020; Received in revised form 12 November 2020; Accepted 7 December 2020

Available online 24 December 2020

0308-8146/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Nevertheless, the extracted proteins must be studied for their integrity and amino acid profile, particularly their essential amino acid scores, which is mainly associated to the nutritional value, digestibility and bioaccessibility.

Moringa Oleifera L. (fam. Moringaceae) is a foliated tree widely cultivated at tropical latitudes, which presents high adaptability to climatic conditions and dry soils (Okuda, Baes, Nishijima, & Okada, 2001). Virtually, every part of the plant, from the leaves to the roots has been reported as presenting nutritional, therapeutic or industrial benefits (Aderinola et al., 2020; Fahey, 2005; Nouman et al., 2016; Saini, Manoj, Shetty, Srinivasan, & Giridhar, 2014). Furthermore, *Moringa* crops can produce approximately 580 t/ha of fresh shoot biomass annually (Nouman et al. (2016)). The leaves are a good protein source, containing between 22.2% and 34.4% of proteins (Ijarotimi, Adeoti, & Ariyo, 2013; Mune et al., 2016; Sánchez-Machado, Núñez-Gastélum, Reyes-Moreno, Ramírez-Wong, & López-Cervantes, 2010). Nevertheless, research concerning *Moringa Oleifera* has been mainly focused on bioactive compounds and anti-nutritional factors (Devisetti, Sreerama, & Bhattacharya, 2016; Teixeira, Carvalho, Neves, Silva, & Arantes-Pereira, 2014). The recovery of proteins from leaves, while preserving their nutritional quality as well as *in vitro* digestibility is still a challenging issue. To the best of our knowledge, few studies have explored protein extraction from *Moringa Oleifera* leaves. Therefore, the goal of this work was to optimize the production of a protein concentrate (PC) from *Moringa Oleifera* leaves that presents high nutritional value and increased digestibility. To achieve this goal, response surface methodology was applied in order to optimize extraction with Viscozyme L. and the amino acid profile of raw leaves and protein concentrate was evaluated and compared with the recommended amino acid scores. Moreover, simulated *in vitro* digestion of the raw leaves and protein concentrate was carried out to assess and compare with their digestibility.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and sample preparation

A composite sample of 5 kg of *Moringa Oleifera* leaves was prepared in June 2017, by collecting leaves from twenty-four different trees from farms located in the northeast of Algerian sahara, El Oued province. The collected biomass was carefully selected to confirm the absence of foreign materials, washed with water and air-dried in a well ventilated laboratory to constant weight, grounded and sieved (Retsch Analytical sieve shaker AS 200) by passing through a 500 μ m sieve. The obtained flour was defatted with hexane in the ratio 1:3 (w/v) using a soxhlet extractor, to obtain *Moringa Oleifera* defatted leaves (MODL) used to produce protein concentrates. MODL was stored at room temperature during the experimental period of this study (around six months).

2.2. Reagents

Porcine α -amylase, pepsin, bile extract, and pancreatin were from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide (NaOH), sodium bicarbonate (NaHCO₃), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), and potassium chloride (KCl) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Magnesium sulphate (MgSO₄), magnesium chloride (MgCl₂), ammonium carbonate ((NH₄)₂CO₃) and calcium chloride (CaCl₂) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc) and O-phthalaldehyde (OPA) and different amino acids were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Hexane, methanol and acetonitrile solvents, SupraSolv grade were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

Viscozyme® L (multienzyme complex containing a wide range of carbohydrases, including arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase and xylanase) purchased from Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA. The activity of Viscozyme L was 100 Fungal Beta-Glucanase Units (FBG).

2.3. Chemical composition analysis

Moisture was assayed by infrared drying at 105 °C (Scaltec SMO 01, Heiligenstadt, Germany) until constant weight and expressed as g of moisture per 100 g of sample. Ash contents were analysed according to the standard methods developed by the Association of official Analytical chemists (AOAC) (AOAC, 2000). Crude protein content was analysed by Kjeldahl following AOAC (AOAC, 2000), using a nitrogen to protein conversion factor of 6.25. Total dietary fibre (TDF) and insoluble dietary fibre (IDF) contents were determined using commercially available Kits (K-TDFR Megazyme, crok, Ireland), based on the method of Prosky et al. (1985). Soluble dietary fibre (SDF) content was determined as a difference between TDF and IDF values. Carbohydrates content was calculated by difference with all other macronutrients.

2.4. Optimization of protein extraction from *Moringa Oleifera* defatted leaves

In order to optimize the variables that affect the protein extraction from *Moringa Oleifera* defatted leaves, a two-level (2^{k-1}) factorial design was performed to screen these key variables in a multivariable system. The five experimental variables under study (X_1 : temperature; X_2 : pH values; X_3 : enzyme concentration; X_4 : incubation times; X_5 : enzyme/substrate (E/S) ratio) were evaluated through a two-level fractional factorial (2^{5-1}) design, the experimental design was obtained with 20 combinations of those five variables at different levels. The range of each variable was selected taking in consideration acceptable levels for enzyme activity and extraction time, while the evaluated response was extracted protein amount (for more details see Supplementary Table 1). The significance of these five variables was evaluated, and, afterwards, the key variables (significant $p < 0.050$) were optimized through the use of Central Composite Design (CCD) (Table 1).

Three significant variables used for CCD were temperature (X_1), time (X_2) and enzyme concentration (X_3). These variables were explored at five different levels, ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) to perform a full factorial design (2^3) as cubic points, with six axial points at a distance of $\alpha = 1.682$ from the design centre and five centre points. In order to optimize conditions for protein extraction from MODL the CCD generated 19 experiments, including five replicates of the centre point and the evaluated response was extracted protein amount.

Subsequent to the enzymatic extraction the pH was adjusted to 11 with 2 N NaOH (in order to solubilise the extracted proteins), wherein the extracts were shaken at 25 °C and 50 rpm for 60 min using an orbital agitation, followed by centrifugation (2,500g at 4 °C for 10 min) to separate the soluble fraction from the residual one. After that, an isoelectric precipitation of the extracted solubilized proteins was done by adjusting the pH to 4.5 by addition of 2 N HCl overnight at 4 °C. The extracts were centrifuged at 2,500g for 30 min at 4 °C and the precipitated protein concentrate was separated from the supernatant. The protein concentrate was freeze dried and the protein contents were determined by Kjeldahl method (AOAC, 2000). The yield of the extracted protein was calculated as:

Table 1

Coded variables in the different levels used in CCD design matrix for optimization extraction procedure.

Variables	$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
Temperature (X_1)	26.6	30	35	40	43.4
Time (X_2)	0.1	0.3	0.6	0.9	1.1
Enzyme Concentration (X_3)	33.2	40	50	60	66.8

$\pm\alpha$: axial points at distance of $\pm\alpha = 1.682$ from the centre point; -1 : low level; 0 : centre point; $+1$: high level.

$$\text{Extracted protein yield(\%)} = \frac{\text{amount of extracted protein (mg/g)}}{\text{amount of protein in MODL (mg/g)}} \times 100 \quad (1)$$

This was also the response used in all experimental designs.

2.5. Amino acids composition

About 50 mg of sample (*Moringa Oleifera* defatted leaves or protein concentrate) was weighed in glass crimp vial. 10 ml of hydrochloric acid solution HCl (6 M) containing 0.5% (w/v) phenol were added, sealed under vacuum by passing nitrogen gas into the vials. Acid hydrolysis was performed at 110 °C for 24 h according to the reference hydrolysis method AOAC 982.30 (AOAC, 2000). 1 ml from the resulting hydrolysate was taken and neutralized with NaOH 6 N and the final volume was adjusted with borate buffer (0.1 M) to 10 ml. Undissolved particles were removed by filtration using a 0.2 µm cellulose filter. Derivatization of amino acids (AAs) was performed with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) and O-phthalaldehyde (OPA). Briefly, 32 µl of sample was mixed with 8 µl of internal standard 250 µM (Norvaline), to the mixture was added 40 µl OPA and 20 µl FMOC. Tryptophan was determined separately, using alkaline hydrolysis with 4.2 N NaOH for 18 h in an oven at 110 °C AOAC official method 988.15. The resulting derivatization of AAs were then subjected to HPLC analysis, which was carried out in an analytical HPLC unit (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with Jasco PU-2080 HPLC pumps, an FP-920 fluorescence detector, a AS-950

$$\text{Bioaccessible protein(mg/g)} = \text{initial protein content} - \text{undigested protein content in pellet} \quad (2)$$

sampler injector, and a column heater (model 7981; Jones Chromatography, Hengoed, UK). The column used was a Zorbax Eclipse Plus C18 (5 µm; 250 mm length; 4.6 mm ID) and Borwin PDA Controller Software (JMBS Developments, Le Fontanil, France) as controlling system.

Chromatographic separation was performed using a mixture of two eluents: a mobile phase A consisted of 10 mM sodium hydrogen phosphate, 10 mM sodium tetraborate, and 5 mM sodium azide at pH 8.2 and a mobile phase B consisted of acetonitrile, methanol and ultrapure water in 45:45:10 ratios. Elution was performed at flow rate of 1 ml/min, using the gradient elution that starts with 4% from 0 to 2 min, following an increase from 4% to 10% between 2 and 15 min, from 15 to 18 min hold 10%, that gives rise to an increase to 47% at 61 min and a new increase to 100% until 66 min, between 66 and 71 min the concentration was hold at 100%, then it is performed the column rinse and reequilibration, the presented percentage is the concentration of mobile phase B in A. AAs calibration curves were constructed using the least squares linear regression model, plotting the peak area ratios of the different AAs and respective internal standard versus the concentration of each analyte under study. Standard calibration curves were prepared using six calibration points for AAs (with a range from 5 to 100 µM of each analyte). Each test was performed at least in five independent experiments. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the calibration curve parameters, where the LOD was equal to the calculated intercept of the linear regression (a) plus three times the Sy/x and for LOQ ten times this value. Finally, the AAs composition was reported as mg of amino acid/g protein.

2.6. In vitro digestion

The *in vitro* digestion procedure was performed according to the internationally standardized method described by Minekus et al. (2014). The procedure consisted of three sequential steps: an initial digestion with α-amylase to stimulate the oral phase, followed by a digestion with pepsin/ HCl to stimulate the gastric phase and a digestion with bile

salts/pancreatin to stimulate intestinal digestion. Briefly 1 g of each sample MODL and PC was mixed with 4 ml of simulated salivary fluid (SSF), 0.5 ml of α-amylase solution at 1500 U/ml in SSF, 25 µl of 0.3 M CaCl₂ and 475 µl of ultrapure water. After 2 min of incubation, the mixture (10 ml) was mixed with 8 ml of simulated gastric fluid (SGF), 5 µl 0.3 M CaCl₂, at pH 3 adjusted using 1 M HCl/ultrapure water, for a total added volume of 1.395 ml, before adding 0.5 ml of pepsin solution (25,000 U/ml in SGF) The gastric mixture was then incubated for 2 h in a water bath at 37 °C with sufficient mixing. After incubation, 20 ml of gastric mixture was mixed with 85 ml of simulated intestinal fluid (SIF) electrolyte stock solution, 40 µl 0.3 M CaCl₂, with an adjusted pH to 7 using 1 M NaOH / ultrapure water, for a total added volume of 3.76 ml, before adding 5 ml of pancreatin solution (800U/ ml in SIF based on trypsin activity), 2.5 ml of bile solution (160 Mm). The intestinal mixture was also incubated at 37 °C. All digestions were run in triplicate; parallel assay was performed for each sample to determine the amount of acid or base necessary to adjust the digests pH. Blanks were performed just with enzymes and all samples were blank corrected. After the simulated gastrointestinal digestion, the samples were cooled by immersion in an ice bath and then centrifuged at 5000 g for 10 min at 4 °C to separate the soluble bioaccessible fraction from the residual fraction. Supernatants from the bioaccessible fraction were subsequently frozen at -20 °C. until analysis. Samples were taken to amino acids analysis, and the bioaccessibility was calculated as follows:

$$\text{Invitro Protein Digestibility(\%)} = \frac{\text{bioaccessible protein (mg g}^{-1}\text{)}}{\text{initial protein content (mg g}^{-1}\text{)}} \times 100 \quad (3)$$

2.7. Estimation of nutritional protein quality

Protein nutritional quality of MODL and PC was determined on the basis of their essential amino acid profile (EAA). The EAA scores (EAAS) and EAA index (EAAI) were calculated using the following equations respectively (Friedman, 1996):

$$\text{EAAS} = \frac{a_p}{a_s} \quad (4)$$

$$\text{EAAI(\%)} = \sqrt[n]{\frac{\text{Lys}_{1p} \times \text{Tyr}_{2p} \times \dots \times \text{Hist}_{np}}{\text{Lys}_{1s} \times \text{Tyr}_{2s} \times \dots \times \text{Hist}_{ns}}} \times 100 \quad (5)$$

where *a* is an EAA, *p* is the test protein, *s* is the reference protein, and *n* is the number of amino acids included into the calculation. The reference protein used was the FAO/WHO EAAS pattern from the FAO/WHO/UNU (2007).

The protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) (FAO/WHO/UNU, 2007) was calculated as:

$$\text{PDCAAS} = \text{Lowest uncorrected amino acid score} \times \text{IVPD} \quad (6)$$

where IVPD is the *in vitro* protein digestibility (%).

2.8. Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicate. Data obtained from amino acid composition and *in vitro* digestion for MODL and PC were tested for distribution of the residuals with Shapiro-Wilk's test. Since normal

distribution of the residuals was confirmed, mean comparison between MODL and PC was studied using a Student's T-test. These analyses were conducted with the XLSTAT for Windows version 2014.5 (Addinsoft, Paris, France) at 5% significance level.

Optimization of experimental designs of fractional factorial (2^{5-1}) and RSM was performed using Design-Expert software version 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition of *Moringa Oleifera* defatted leaves

The process to obtain a protein concentrate (PC) from moringa leaves began with leaves defatting with hexane to obtain MODL. This step reduces the presence of non-polar compounds that may bind to the hydrocarbon chains of some amino acid residues of proteins making difficult protein separation (Mao & Hua, 2012), additionally, it increases the protein content (Teh, Bekhit, Carne, & Birch, 2014).

The chemical composition of MODL is summarized in Table 2. For comparison purposes the composition of Moringa leaves is also presented. *t*-Test points significant differences in the composition of MODL and Moringa leaves. The protein content surpassed that recorded for *Moringa Oleifera* leaves from the south of Algeria (22.8%) (Ziani et al., 2019), from Mexico (22.4%) (Sánchez-Machado et al., 2010) or from Pakistan (22.2%) (Nouman et al., 2016), but was lower than that reported by Teixeira et al. (2014) (28.7%), Devisetti et al. (2016) (28.9%), Moyo, Masika, Hugo, and Muchenje (2011) (30.3%) and Nouman et al. (2016) (31.4%). Other studies have reported variable protein contents in *Moringa Oleifera* leaves ranging between 22.2 and 33.8% (Gidamis, Panga, Sarwatt, Chove, & Shayo, 2003; Nouala et al., 2006; Nouman et al., 2016), 10.74% to 11.48% (Gebregiorgis Amabye, 2015) or lower 9.4% (Sohaimy, Hamad, Mohamed, Amar, and Al-Hind (2015). When compared with leaves from other plant material previously used for protein extraction, such as olive leaves whose protein content ranged from 7 to 12.9% (Garcia et al., 2000; Vergara-Barberán et al., 2015; Wang et al., 2003), or tea leaves residues that contain around 17 to 19% of protein (Zhang et al., 2016), MODL can be considered a promising protein source.

3.2. Optimization of protein extraction from *Moringa Oleifera* defatted leaves

Preliminary studies concerning the extraction of proteins from MODL were done by alkaline extraction, adding 2 N NaOH up to pH 11 at 25 °C and using orbital agitation (50 rpm for 30 min), followed by centrifugation at 2,500 g, 4 °C for 10 min. However, the yield of protein extraction was lower than 5%, while enzymatic extraction with Viscozyme L (1:20 for E/S ratio and 5.5 for pH) previous to alkaline extraction provided increased protein yield (>10%). In order to improve protein extraction, five experimental variables (X_1 : temperature; X_2 : pH values; X_3 : enzyme concentration; X_4 : incubation time and X_5 : E/S ratio) that affect plant protein extraction by enzymatic hydrolysis with Viscozyme® L were studied (Ansharullah et al., 1997; Görgüç et al., 2019;

Guan & Yao, 2008; Vergara-Barberán et al., 2015). These variables were first screened through a two-level fractional factorial (2^{5-1}) to achieve the key parameters for further optimization. The results obtained for this experimental design pointed that temperature (X_1), enzyme concentration (X_3) and incubation time (X_4) were statistically significant variables (Pareto chart presented in Supplementary Fig. 1). Therefore, the initial variables were reduced to those key variables in the next step of optimization. The pH and E/S ratio variables had no significant effect on the extraction of protein, and thus, they were fixed for further experiments at 1:20 for E/S ratio and 5.5 for pH. The 5.5 pH was chosen by indication of supplier's technical data as being in the range of best conditions for Viscozyme® L. The 1:20 E/S ratio was selected in order to have a liquid fraction allowing the extraction of intracellular protein and avoid the total absorption of liquid fraction from moringa powder as reported in some studies that applied viscozyme for protein extraction (Rosset et al., 2014; Zhang et al., 2016).

The three effective independent variables (temperature (X_1), incubation time (X_2) and enzyme concentration (X_3)) for extraction of proteins from *Moringa Oleifera* defatted leaves were optimized using Central Composite Design (CCD), in order to find an optimum set of experimental conditions. The CCD experiment was performed in a random manner at different combinations of these parameters using statistically designed experiments, with the range parameters shown in Table 1.

Regression analysis was performed to fit the response function, and the final model was obtained. The model presented a good fitness with values of R^2 pred and R^2 adj attained were 0.9604 and 0.9735, respectively. Thus, the quadratic response surface model was adequate and significant. The analysis of variance (ANOVA) by means of Fisher's F-test was used to evaluate the adequacy and significance of the quadratic model (Supplementary Table 2).

Adequacy and significance of the quadratic models were evaluated by analysis of variance (ANOVA) by means of Fisher's F-test, with F-values of 74.40, which indicates a high significance of the model with only 0.01% possibility that a large model F values could occur due to noise. The significant model terms of CCD experimental design were X_1 , X_2 , X_3 , as independent variables, X_1X_2 , as interaction variables and X_1^2 , X_2^2 as quadratic terms, which implies a significant effect of these variables on the response ($p < 0.05$) for protein extraction. The model presented a good fitness for quadratic interaction. Thus, the quadratic response was chosen for the studied interval. The "lack of fit value" for response was also evaluated, and a Prob > F were 0.9272 indicating a non-significant lack of fit ($p > 0.05$) to the pure error, which means that the model is valid for the present study.

Response surfaces curves from experimental design (Fig. 1) were analysed and allowed the prediction of response function (protein extraction) of the variables. The surface response curve (Fig. 1a) for interaction between temperature (X_1) and incubation time (X_2) (keeping enzyme concentration constant at high level (60 FBG)) shown that the higher extraction of protein was achieved with the lower temperatures and lower incubation times used in the experimental design. At similar conditions Vergara-Barberán et al. (2015) reported that higher temperature led to decreased enzymatic protein extraction using a carbohydrase (cellulase L) from olive leaves. Additionally, long incubation

Table 2
Chemical composition of *Moringa Oleifera* leaves and defatted leaves (MODL) (%).

Sample	Moisture	Protein	Ash	Fat	Total Dietary Fibre	Insoluble Dietary Fibre	Soluble Dietary Fibre*	Carbohydrates**
Moringa leaves	9.1 ± 0.2 ^b	23.6 ± 0.1 ^b	7.2 ± 0.2	6.8 ± 0.5 ^a	24.9 ± 0.3	20.8 ± 4.9	4.1	28.4
MODL	9.8 ± 0.1 ^a	24.1 ± 0.1 ^a	7.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0 ^b	24.3 ± 0.1	20.3 ± 0.3	4.0	34.0
<i>p</i>	0.010	0.010	ns	<0.001	ns	ns	–	–

Values presented as mean ± standard deviation (n = 3).

ns, not significant.

In each column, different letter point the statistically significant differences ($p < 0.05$) using Student's *t*-test.

* Estimated by difference using mean values (Total Dietary Fibre – Insoluble Dietary Fibre).

** Estimated by difference using mean values (100 – Moisture + Protein + Ash + Total Dietary Fibre).

times are not suggested, due to the risk of microbial growth, whereas, severe conditions could cause chemical and/or thermal protein degradation, thus reducing the nutritive value of protein, and enzyme activity (Görgüç et al., 2019). Therefore, the proposed approach could be integrated in an environmentally suitable safe and fast process. Analyses of response surfaces also indicate higher protein extraction for higher enzyme concentration (Fig. 1b and c).

The criteria to maximize the response (protein extraction), while keeping the other parameters in the range was established. The desirability indices were built, and the optimum combination of factors that provided the maximum protein extraction from *Moringa Oleifera* defatted leaves were 30 °C for incubation temperature, 30 min for incubation temperature and 60 FBG for enzyme concentration. The confirmatory experiments were then conducted using the parameters suggested by the experimental model, six different runs were performed. The experimental protein extraction amounts were 34.30 ± 0.49 mg/g, while the predicted protein extraction amounts were 34.66 ± 1.02 mg/g. Response function (protein extraction amounts) is adequately explained by the model equation. The protein extraction yield was 14.2% and the protein content of PC was 55.7%. According to the literature *Moringa Oleifera* leaves contain 3.1% albumin, 0.3% globulins, 2.2% prolamin, 3.5% glutelin and 70.1% insoluble proteins (Teixeira et al., 2014). Non-protein nitrogen is also described.

3.3. Amino acid composition

AAs calibration curves presented good linearity with coefficients of determination (r^2) higher than 0.9990. The LODs were lower than 4.39 μ M, whereas the LOQs were lower than 14.63 μ M (Supplementary Table 3). The amino acid composition of MODL and PC is shown in Table 3. A total of 18 amino acids were identified in MODL, which slightly differ from the findings of Sánchez-Machado et al. (2010), Moyo

et al. (2011) and Okereke and Akaninwor (2013), who reported 16, 17 and 19 amino acids respectively. Arg was the amino acid with the highest concentration (143.3 mg/g of protein), followed by Asp, Glu, Lys, Leu, Cys and Phe with 92.2, 71.3, 58.2, 56.6 and 49.9 mg/g of protein respectively, which is comparable to the obtained results reported by Olaofe, Adeyeye, and Ojugbo (2013) that had Arg as a second highest amino acid in *Moringa Oleifera* leaves. While Ala was the amino acid with the lowest concentration (10.5 mg/g of protein). Other studies do not support our data (Mune et al., 2016; Okereke & Akaninwor, 2013) and describe Glu as presenting the highest amino acid concentration within the profile of *Moringa Oleifera* leaves, whereas Sohaimy et al. (2015) and (Moyo et al., 2011) attributed to Leu and Ala the highest concentrations, respectively. Also, Okereke and Akaninwor (2013), Olaofe et al. (2013) and Sohaimy et al. (2015) reported Met as the amino acid with the lowest concentration, while Mune et al. (2016) reported it for Cys concentrations. These variations in the amino acid profile of *Moringa Oleifera* could be due to the genetic background and geographic diversity (Moyo et al., 2011), which could influence protein amino acid profile (Sánchez-Machado et al., 2010).

Overall, the enzymatic protein extraction process from MODL to obtain the PC had an impact on the amino acids profile, with significant differences ($p < 0.05$) for all amino acids, except His and Leu (see Table 3). Therefore, this process resulted in a PC with significantly higher concentration of almost all amino acids.

The quality of a dietary protein can be assessed by comparison with FAO/WHO/UNU (2007) recommended pattern of essential amino acids (EAAs). MODL and PC values of all EAAs were within or above the (FAO/WHO/UNU, 2007) reference pattern (Table 3). These results indicated a good balance of amino acids in both MODL and PC, which could be used as a good source of essential amino acids.

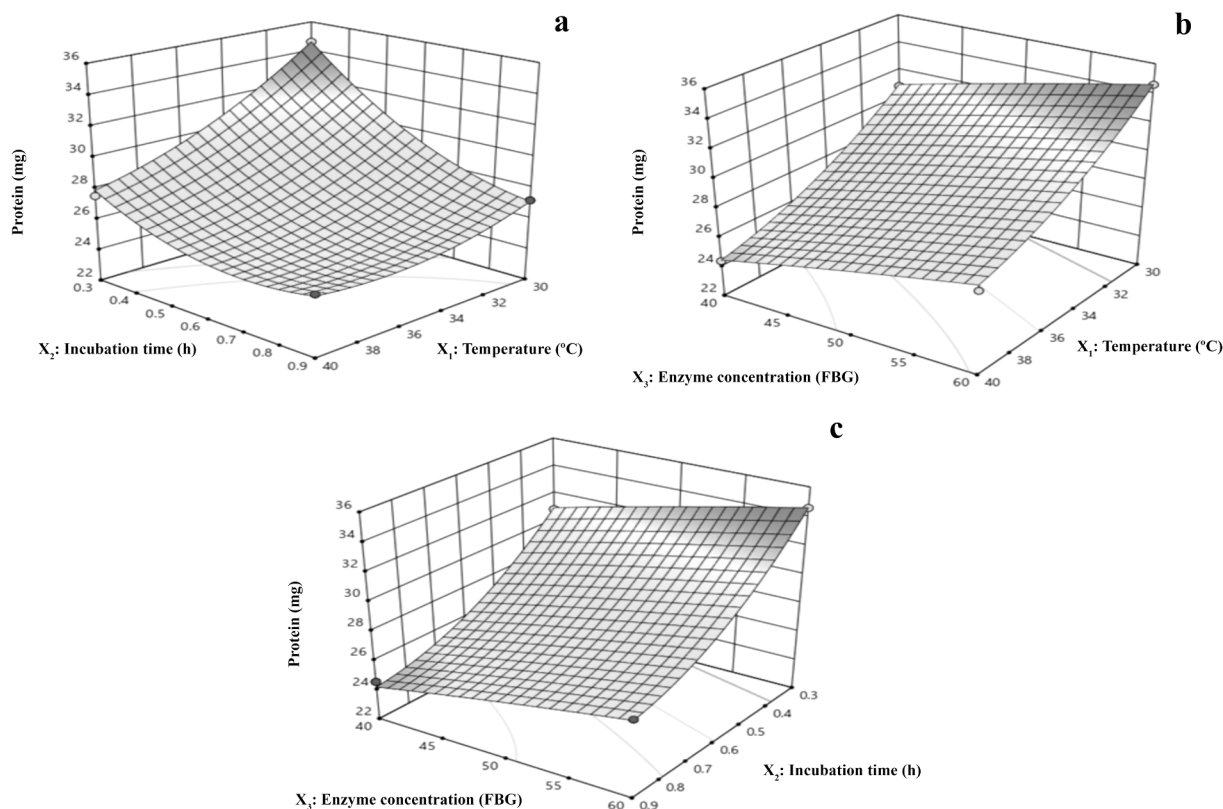


Fig. 1. Response surface for the effects on protein extraction from *Moringa oleifera* defatted leaves: a: incubation time and temperature; b: enzyme concentration and temperature; c: enzyme concentration and incubation time. The variable not included in the response surface curve in each case is kept at the maximum response value.

Table 3

Amino acid composition of *Moringa Oleifera* Defatted (MODL) leaves and the Protein Concentrate with respect to provisional scoring pattern of FAO/WHO (amino acids values were in mg/g of protein).

Amino acid	MODL	PC	FAO/WHO/UNU (2007)
Asp	92.2 ^a ± 2.0	121.5 ^b ± 6.5	
Glu	71.3 ^a ± 6.8	108.2 ^b ± 2.3	
Ser	41.8 ^a ± 2.9	59.0 ^b ± 4.8	
His	14.4 ^a ± 0.8	13.7 ^a ± 1.4	15
Gly	20.3 ^a ± 0.9	23.3 ^b ± 1.3	
Thr	39.0 ^a ± 1.1	68.6 ^b ± 3.6	23
Arg	143.3 ^a ± 5.7	94.2 ^b ± 4.3	
Ala	10.5 ^a ± 0.4	22.6 ^b ± 2.6	
Tyr	24.2 ^a ± 0.6	39.4 ^b ± 1.8	
Val	42.8 ^a ± 2.6	53.1 ^b ± 2.8	39
Met	15.4 ^a ± 0.3	14.4 ^b ± 0.5	
Phe	49.9 ^a ± 1.4	50.4 ^b ± 2.0	
Ile	28.8 ^a ± 2.0	36.1 ^b ± 1.7	30
Leu	56.6 ^a ± 2.0	58.9 ^b ± 2.4	59
Lys	58.2 ^a ± 2.9	50.5 ^b ± 3.6	45
Pro	20.0 ^a ± 4.5	27.9 ^b ± 1.5	
Trp	17.6 ^a ± 0.4	22.4 ^b ± 0.5	6
Cys	56.0 ^a ± 7.2	81.2 ^b ± 5.0	
∑AAA ¹	74.1 ^a ± 1.9	89.8 ^b ± 3.7	30
∑SAA ²	71.4 ^a ± 0.3	95.6 ^b ± 0.5	22
∑EAA ³	402.9 ^a ± 0.6	488.6 ^b ± 13.7	
∑NEAA ⁴	399.5 ^a ± 0.5	456.7 ^b ± 14.0	
∑AA ⁵	802.4 ^a ± 0.1	945.4 ^b ± 37.4	

Values represented as mean ± standard deviation.

Different letters in the same column show significant differences ($p < 0.050$) between MODL and PC, from Student's *T*-test.

¹ Aromatic amino acids: Phe + Tyr.

² Sulfur amino acids: Cys + Met.

³ Essential aminoacids: Thr + Cys + Val + Met + Ile + Leu + Tyr + Phe + His + Lys + Trp.

⁴ Non-essential amino acids: Asp + Ser + Glu + Pro + Gly + Ala + Arg.

⁵ Total amino acids.

3.4. Amino acid score (AAS) and essential amino acid index (EAAI) for protein quality evaluation

As a chemical index, AAS is approved to measure the quality of protein in human nutrition, based on the proportion of EAA within the daily requirements provided by FAO/WHO/UNU (2007). When the AAS value is lower than 1, the corresponding EAA is considered as a limiting EAA. Fig. 2 provides a comparative overview of AAS values from MODL and their PC. According to the obtained results, both MODL and PC

showed AAS values within or higher than that suggested by FAO/WHO (AAS ≥ 1) and therefore did not present limiting amino acids. Nonetheless, the PC presented significantly higher AAS for some EAA. It should also be noted that sulphuric amino acids (Cys + Met), which have powerful antioxidants activities presented increased AAS on PC. These results contrast with the ones reported by Mune et al. (2016) indicating lysine and sulfuric amino acids as limiting EAAs in *Moringa Oleifera* leaves from Cameroon, whereas Olaofe et al. (2013) indicated Lys, Leu, Thr and Val as limiting amino acids in *Moringa Oleifera* leaves. PC also presented higher protein quality than the commercial protein supplement from pea protein isolate, which presents as limiting the sulphuric amino acids (Corgneau et al., 2019).

Regarding EAAI, which is considered as an adequate balance of the whole integrity of EAAs, the quality and efficiency of proteins is generally characterized by a high value of EAAI (Yang et al. (2018)). The EAAI values reported for MODL (154.4%) and PC (184.3%) were higher than 100 and showed an increasing trend in parallel with the increasing of protein content, since the PC (55.7% of protein content) exhibited higher EAAI value than the whole leaves of MODL (24.2% of protein content). Moreover, the obtained EAAI from the MODL was higher than the values reported by Olaofe et al. (2013). In this context, the PC obtained from *Moringa Oleifera* leaves may perfectly meet the quality expectations of AAS from FAO/WHO and EAAI, allowing new nutritional interests as well.

3.5. In vitro protein digestibility

According to the *in vitro* protein digestion of the MODL and PC (Table 4), it can be extrapolated that the PC underwent virtually a complete protein digestibility (99.9%) compared to the protein digestibility of MODL (64.7%), which is slightly higher than the reported

Table 4

In vitro protein digestibility of *Moringa Oleifera* defatted leaves (MODL) and their Protein Concentrate (PC).

Sample	Initial protein content (mg/g)	Bioaccessible protein (mg/g)	Protein digestibility (%)
MODL	241.6 ± 1.0 ^a	156.5 ± 2.9 ^a	64.7 ± 1.2 ^a
PC	556.9 ± 16.0 ^b	556.1 ± 0.1 ^b	99.8 ± 0.02 ^b

Values presented as mean ± standard deviation ($n = 3$).

Different letters in the same column show significant differences ($p < 0.050$) between MODL and PC, from Student's *T*-test.

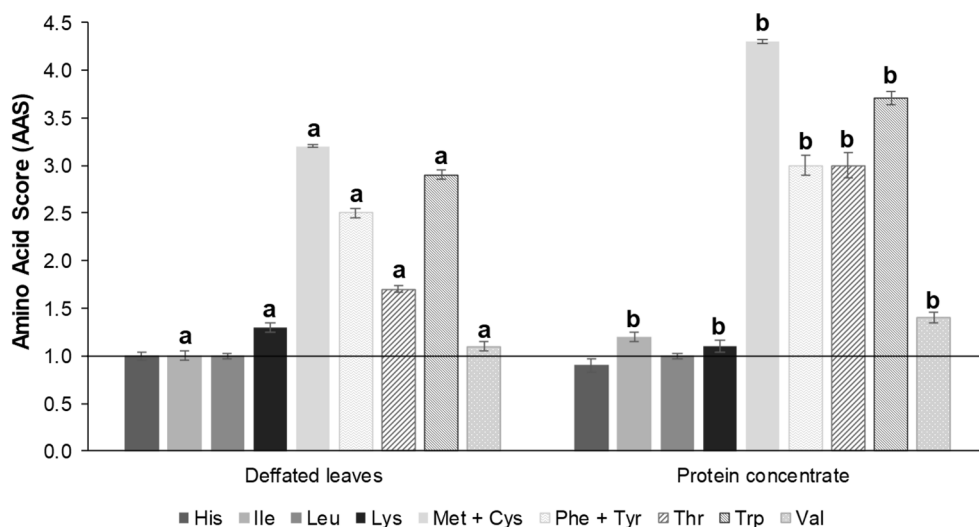


Fig. 2. Amino Acids Scores with respect to provisional amino acid scoring pattern of the FAO/WHO (amino acids values were in mg/g of protein). Different letters for the same amino acid show significant differences ($p < 0.050$) between MODL and PC, from Student's *T*-test.

in vitro digestibility of *Moringa oleifera* leaves flour investigated by (Mune et al., 2016). Indeed, anti-nutritional factors may hinder efficient utilization, absorption and digestion of protein and decrease protein bioavailability and nutritional status (Devisetti et al., 2016). In fact, the removal of antinutritional factors is expected to enhance digestibility. However, the protein extraction and concentration through the optimized enzymatic process may affect the native structure of solubilized proteins and make them more accessible to digestive enzymes. The obtained results were higher than 82.8% reported as the digestibility of *Moringa Oleifera* seed isolate (Aderinola et al., 2020), being as well higher than the digestibility of commercial protein concentrate supplements investigated by (Corgneau et al., 2019).

In order to evaluate the protein quality after *in vitro* digestion, the joint FAO/WHO, 1991 expert concertation highlighted the use of protein digestibility corrected amino acids score (PDCAAS), taking into consideration the lowest amino acid score as well as the digestibility of the protein of interest. The results of our study showed that the PDCAAS from PC was higher than that of MODL, 91.4% to 61.1% respectively, being within the quality evaluation recommended by FAO/WHO.

4. Conclusion

A protein concentrate was obtained from MODL using an enzymatic process optimized by multivariate chemometric techniques. Temperature (°C), viscozyme concentration (FBG units) and incubation time (h) were key variables optimized by RSM (30 °C, 60 FBG units, 0.3 h). This protein concentrate meets the requirements of AAS from FAO/WHO and presents higher digestibility when compared with MODL, therefore, several applications as a protein rich ingredient are foreseen in the food industry, especially for infant, senior or seven sports nutrition.

CRedit authorship contribution statement

Tassadit Benhammouche: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **Armindo Melo:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Zita Martins:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Miguel A. Faria:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Susana C.M. Vinho:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Isabel M.L.P.V.O. Ferreira:** Conceptualization, Resources, Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Farid Zaidi:** Writing - review & editing, Project administration.

Declaration of Competing Interest

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

Acknowledgements

This work received financial support from FEDER funds and National Funds (FCT/MEC, Fundação para a Ciência e Tecnologia and Ministério da Educação e Ciência) project PTDC/OCE-ETA/32567/2017-MOR2020. Tassadit Benhammouche thanks the PhD Grant awarded by the University of Porto under the Erasmus + Program in coordination with University of Bejaia Algeria and dedicates this article to the memory of Professor Rachida Zaidi-Yahiaoui for her inspiration and encouragement on *Moringa oleifera* studies at the university of Bejaia Algeria.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128858>.

References

- Aderinola, T. A., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., & Aluko, R. E. (2020). In vitro digestibility, structural and functional properties of *Moringa oleifera* seed proteins. *Food Hydrocolloids*, *101*, 105574. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105574>.
- Ansharullah, Hourigan, J. A., & Chesterman, C. F. (1997). Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *74* (2), 141–146. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199706\)74:2<141::AID-JSFA778>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:2<141::AID-JSFA778>3.0.CO;2-5).
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. Association of official analytical chemists (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., Le, D. T. L., & Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(8), 2586–2594. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14170>.
- Devisetti, R., Sreerama, Y. N., & Bhattacharya, S. (2016). Processing effects on bioactive components and functional properties of moringa leaves: Development of a snack and quality evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(1), 649–657. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1962-5>.
- Espinosa-Pardo, F. A., Savoie, R., Subra-Paternault, P., & Harscoat-Schiavo, C. (2020). Oil and protein recovery from corn germ: Extraction yield, composition and protein functionality. *Food and Bioprocess Processing*, *120*, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.002>.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Tree for Life Journal*, *1* (5).
- FAO/WHO/UNU. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: World Health Organization.
- Friedman, Mendel (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *44*(1), 6–29. <https://doi.org/10.1021/jf9400167>.
- Garcia, J. L., Avidan, N., Troncoso, A., Sarmiento, R., & Lavee, S. (2000). Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*, *85*(4), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00123-0).
- Gebregiorgis Amabeber, T. (2015). Chemical compositions and nutritional value of moringa oleifera available in the market of mekelle. *JFNS*, *3*(5), 187. <https://doi.org/10.11648/j.fns.20150305.14>.
- Gidamis, A. B., Panga, J. T., Sarwatt, S. V., Chove, B. E., & Shayo, N. B. (2003). Nutrient and antinutrient contents in raw and cooked young leaves and immature pods of *Moringa oleifera* Lam. *Ecology of Food and Nutrition*, *42*(6), 399–411. <https://doi.org/10.1080/03670240390268857>.
- Görgüç, Ahmet, Bircan, Cavit, & Yılmaz, Fatih Mehmet (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, *283*, 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.077>.
- Guan, Xiao, & Yao, Huiyuan (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, *106*(1), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.041>.
- Ijarotimi, Oluwole S., Adeoti, Oluwole A., & Ariyo, Oluwaseun (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science & Nutrition*, *1* (6), 452–463. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70>.
- Mao, X., & Hua, Y. (2012). Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.). *International journal of molecular sciences*, *13*(2), 1561–1581.
- McCarty, M. F., Barroso-Aranda, J., & Contreras, F. (2009). The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy. *Medical Hypotheses*, *72*(2), 125–128.
- Minikus, M., Alvinger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>.
- Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, *10*(60), 12925–12933.
- Mune, M. A. M., Nyobe, E. C., Bassogog, C., & Minka, S. R. (2016). A comparison on the nutritional quality of proteins from *Moringa oleifera* leaves and seeds. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1).
- Nouala, F., Akinbamijo, O., Adewumi, A., Hoffman, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2006). The influence of *Moringa oleifera* leaves as substitute to conventional concentrate on the *in vitro* gas production and digestibility of groundnut hay. *Livestock Research for Rural Development*, *18*(9).
- Nouman, Wasif, Anwar, Farooq, Gull, Tehseen, Newton, Amaglo, Rosa, Eduardo, & Domínguez-Perles, Raúl (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, *83*, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.032>.
- Okereke, C. J., & Akaninwor, J. O. (2013). The protein quality of raw leaf, seed and root of *Moringa oleifera* grown in Rivers State. *Nigeria Annals of Biological Research*, *4*(11), 34–38.

- Okuda, Tetsuji, Baes, Aloisius U, Nishijima, Wataru, & Okada, Mitsumasa (2001). Isolation and characterization of coagulant extracted from *moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research*, 35(2), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00290-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00290-6).
- Olaofe, O., Adeyeye, E. I., & Ojugbo, S. (2013). Comparative study of proximate, amino acids and fatty acids of *Moringa oleifera* tree. *Elixir Applied Chemistry*, 54, 12543–12554.
- Prosky, L., Asp, N. G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F., & Harland, B. F. (1985). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 68(4), 677–679.
- Rosset, M., Acquaro Junior, V. R., & Beléia, A. D. P. (2014). Protein Extraction from Defatted Soybean Flour with Viscozyme L Pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 784–790.
- Saini, R. K., Manoj, P., Shetty, N. P., Srinivasan, K., & Giridhar, P. (2014). Dietary iron supplements and *Moringa oleifera* leaves influence the liver hepcidin messenger RNA expression and biochemical indices of iron status in rats. *Nutrition Research*, 34(7), 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.003>.
- Sánchez-Machado, Dalia I., Núñez-Gastélum, José A., Reyes-Moreno, Cuauhtémoc, Ramírez-Wong, Benjamin, & López-Cervantes, Jaime (2010). Nutritional Quality of Edible Parts of *Moringa oleifera*. *Food Analytical Methods*, 3(3), 175–180. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9106-z>.
- Sohaimy, S. A. E., Hamad, G. M., Mohamed, S. E., Amar, M. H., & Al-Hind, R. R. (2015). Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 4(4), 188–199.
- Teh, Sue-Siang, Bekhit, Alaa El-Din, Carne, Alan, & Birch, John (2014). Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Food Measure*, 8(2), 92–104. <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9168-x>.
- Teixeira, Estelamar Maria Borges, Carvalho, Maria Regina Barbieri, Neves, Valdir Augusto, Silva, Marafza Apareci, & Arantes-Pereira, Lucas (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food Chemistry*, 169, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.116>.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *ELECTROPHORESIS*, 24(14), 2369–2375.
- Wang, W., Tai, F., & Chen, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science*, 31(11), 2032–2039.
- Yang, Fang, Huang, Xingjian, Zhang, Conglan, Zhang, Mei, Huang, Chao, & Yang, Hao (2018). Amino acid composition and nutritional value evaluation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and its protein subunit. *RSC Advances*, 8(5), 2653–2659. <https://doi.org/10.1039/C7RA13007D>.
- Zhang, C., Sanders, J. P. M., Xiao, T. T., & Bruins, M. E. (2015). How Does Alkali Aid Protein Extraction in Green Tea Leaf Residue: A Basis for Integrated Biorefinery of Leaves. *PLOS ONE*, 10(7), e0133046.
- Zhang, C., van Krimpen, M. M., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2016). Improving yield and composition of protein concentrates from green tea residue in an agri-food supply chain: Effect of pre-treatment. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 92–101.
- Zhang, Chen, Sanders, Johan P. M., & Bruins, Marieke E. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.020>.
- Ziani, B. E. C., Rached, W., Bachari, K., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. & Dur. and *Moringa oleifera* Lamarck. *Journal of Functional Foods*, 53, 237–247.

Résumé

Pour une alimentation durable, il est nécessaire d'identifier des alternatives végétales à qualité nutritionnelle modérée, notamment en terme d'apport protéinique. A travers cette étude nous avons opter à la caractérisation physicochimique de poudre feuilles de *Moringa Oleifera* (PFMO), la détermination de ses métabolites secondaires à pouvoirs antioxydants et l'impact de ces derniers sur de digestibilité *in vitro* de protéines. Suivie de deux axes de valorisations ; dans une première partie, par l'étude de l'effet de la fortification avec différents niveaux (0%,5%, 10% et 15%) de PFMO, sur la qualités nutritionnelles et digestibilité *in vitro* de protéines de pâtes alimentaires. Dans une deuxième partie ; à l'optimisation des conditions d'extraction enzymatique (RSM) de protéines de PFMO, afin d'améliorer la qualité nutritionnelle et la digestibilité *in vitro* de cette fraction. Les résultats obtenus montrent une composition riche de PFMO, notamment en protéines (23,6%), avec un profil équilibré d'acides aminés particulièrement essentielles. La digestibilité *in vitro* de ces protéines réduite (66%), expliquée par la présence de métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes et tannins) avec un potentiel antioxydant qui ont caractérisé tous les extraits de PFMO. L'enrichissement des pâtes par la PFMO, améliore de manière significative ($p < 0.05$) la composition biochimique, notamment l'apport en protéines (de 11.49% pour le contrôle à 14.41% pour les pâtes enrichies avec 15% de PFMO). Le profile en acides aminés montre ainsi une amélioration équilibrée de l'apport en acides aminés essentielles, particulièrement la lysine et thréonine. Cette substitution répond aux paramètres de qualité des protéines de la FAO/OMS. La diminution de la digestibilité *in vivo* de protéines des pâtes enrichies (de 77.86% pour le control, contre 58.50% lors de la substitution à 15%) est expliqué par l'augmentation de la concentration de métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes et tannins), ces derniers qui manifestent un potentiel antioxydant dans les extraits méthanoliques de pâtes enrichies. Le concentré protéique obtenu auprès de PFMO issu d'un processus d'extraction enzymatique, dont les conditions expérimentales de température(°C), concentration de viscozyme (unités d'FBG) et temps d'incubation (h) ont été optimisées par RMS (30 °C, 60 unités FBG, 0,3 h). Le concentré protéique contenait 55.7% de protéines avec un profil équilibré d'acides aminés, présentant une qualité nutritionnelle améliorée en scores protéiques et une amélioration de la digestibilité *in vitro* des protéines (99,86 %). Le concentré protéique répond aux attentes de qualité des protéines de la FAO/OMS. Par conséquent, plusieurs applications en tant qu'ingrédient protéinique digestible sont prévues dans l'industrie agroalimentaire

Mots clés : Feuilles de *Moringa Oleifera*, qualité nutritionnelle, protéines, acides aminés, enrichissement des pâtes alimentaires, RSM, concentré protéique, digestibilité *in vitro*.

Abstract

For a more sustainable diet, it is necessary to identify plant alternatives with enhanced nutritional quality, particularly in terms of protein intake. Through this study we have opted for the physicochemical characterization of *Moringa Oleifera* leaf powder (MOLP), the determination of its secondary metabolites with antioxidant powers and their impact on proteins the *in vitro* digestibility. Followed by two axes of valorizations; in a first part, by studying the effect of fortification with different levels (0%, 5%, 10% and 15%) of MOLP, on the nutritional quality and *in vitro* protein digestibility of pasta. In a second part; by the optimizing the enzymatic extraction conditions (RSM) of MOLP proteins, in order to improve the nutritional quality and *in vitro* digestibility of this fraction. The obtained results show a rich composition of MPLP, especially in proteins (23.6%), with a balanced profile of amino acids, particularly essentials. The reduced *in vitro* digestibility of these proteins (66%) is explained by the presence of secondary metabolites (phenols, flavonoids and tannins) with an antioxidant potential, that characterized all MOLP extracts. The enrichment of pasta with MOLP improves significantly ($p < 0.05$) their biochemical composition, particularly their protein intake (from 11.49% for the control to 14.41% for enriched pasta with 15% of PFMO). The amino acid profile shows a balanced improvement of essential amino acids, particularly lysine and threonine. This substitution meets the FAO/WHO protein quality parameters. The decrease of *in vivo* protein digestibility in enriched pasta (from 77.86% for the control, against 58.50% at 15% of substitution) is explained by the increase in the concentration of secondary metabolites (phenols, flavonoids and tannins), wich shows antioxidant potential in methanolic extracts of enriched pasta. The obtained protein concentrates from PFMO, resulting from an enzymatic extraction process, whose experimental conditions of temperature ($^{\circ}\text{C}$), viscozyme concentration (FBG units) and incubation time (h) were optimized by RMS (30 $^{\circ}\text{C}$, 60 FBG units, 0.3 h). The protein concentrate contained 55.7% of protein with a balanced amino acid profile, showing improved nutritional quality in protein scores and improved *in vitro* protein digestibility (99.86%). The protein concentrate meets FAO/WHO protein quality expectations. Therefore, several applications as a digestible protein ingredient are anticipated in the food industry.

Keywords: *Moringa Oleifera* leaves, nutritional quality, proteins, amino acids, pasta enrichment, RSM, protein concentrate, *in vitro* digestibility.

من أجل اتباع نظام غذائي مستدام، من الضروري تحديد البدائل النباتية ذات جودة غذائية، خاصة من حيث تناول البروتين. من خلال هذه الدراسة اخترنا التوصيف الفيزيائي والكيميائي لمسحوق أوراق المورينجا أوليفيرا (PFMO)، وتحديد مستقبلاته الثانوية ذات القوى المضادة للأوكسدة وتأثير الأخير على هضم البروتينات. تليها مجالين للتقييم، في الجزء الأول، من خلال دراسة تأثير تركيب العجائن بمستويات مختلفة (0، 5، 10، 15٪) من PFMO، على الصفات الغذائية وقابلية الهضم لبروتينات. في جزء ثاني؛ لتحسين ظروف الاستخلاص الأنزيمية (RSM) لبروتينات PFMO، من أجل تحسين الجودة الغذائية وقابلية الهضم لهذا الجزء. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها تركيبة غنية بـ PFMO، خاصة البروتينات (23.6%)، مع صورة متوازنة من الأحماض الأمينية الأساسية بشكل خاص. انخفاض قابلية هضم هذه البروتينات (66٪)، ويفسر ذلك بوجود مستقبلات ثانوية (الفينولات والفلافونويدات و tannins) مع إمكانات مضادة للأوكسدة والتي تميز جميع مستخلصات PFMO. يؤدي تركيب العجائن بـ PFMO إلى تحسين التركيب الكيميائي الحيوي بشكل ملحوظ ($p > 0.05$)، وخاصة البروتين (من 11.49% إلى 14.41% في العجائن المركبة بـ 15% PFMO). وبالتالي يظهر ملف الأحماض الأمينية تحسناً متوازناً في تناول الأحماض الأمينية الأساسية، وخاصة lysine و threonine. يفي هذا الاستبدال بمعايير جودة البروتين لمنظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية. يتم تفسير الانخفاض في قابلية هضم البروتين في العجائن المركبة (77.86٪ مقارنة بـ 58.50٪ في العجائن المضاف إليها 15٪ PFMO) من خلال الزيادة في تركيز المستقبلات الثانوية (الفينولات والفلافونويدات و tannins)، وهذا الأخير يظهر إمكانات مضادة للأوكسدة في المستخلصات الميثانولية من لعجائن المركبة. تركيز البروتين الذي تم الحصول عليه من PFMO من عملية استخلاص إنزيمية، والتي تم تحسين ظروفها التجريبية لدرجة الحرارة ($^{\circ}C$)، وتركيز اللزوجة (وحدات FBG) ووقت الحضانة (h) بواسطة RMS (30 درجة مئوية، 60 وحدة FBG، 0.3 ساعة). يحتوي تركيز البروتين على 55.7% من البروتين مع صورة متوازنة من الأحماض الأمينية، مما يوفر جودة غذائية محسنة في درجات البروتين وتحسين هضم البروتين (99.86%). يلي تركيز البروتين توقعات جودة البروتين لدى منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية. لذلك، من المتوقع استخدام العديد من التطبيقات كمكون بروتيني قابل للهضم في صناعة المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية: أوراق المورينجا أوليفيرا، الجودة الغذائية، البروتينات، الأحماض الأمينية، تركيب العجائن، RSM، تركيز البروتين، الهضم في المختبر.

Pour une alimentation durable, il est nécessaire d'identifier des alternatives végétales à qualité nutritionnelle modérée, notamment en terme d'apport protéinique. A travers cette étude nous avons opter à la caractérisation physicochimique de poudre feuilles de *Moringa Oleifera* (PFMO), la détermination de ses métabolites secondaires à pouvoirs antioxydants et l'impact de ces derniers sur de digestibilité *in vitro* de protéines. Suivie de deux axes de valorisations ; dans une première partie, par l'étude de la fortification avec différents niveaux (0%, 5%, 10% et 15%) de PFMO, sur la qualités nutritionnelles et digestibilité *in vitro* de protéines de pâtes alimentaires. Dans une deuxième partie ; à l'optimisation des conditions d'extraction enzymatique (RSM) de protéines de PFMO, afin d'améliorer la qualité nutritionnelle et la digestibilité *in vitro* de cette fraction. Les résultats obtenus montrent une composition riche de PFMO, notamment en protéines (23,6%), avec un profil équilibré d'acides aminés particulièrement essentielles. La digestibilité *in vitro* de ces protéines réduite (66%), expliquée par la présence de métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes et tannins) avec un potentiel antioxydant qui ont caractérisé tous les extraits de PFMO. L'enrichissement des pâtes par la PFMO, améliore de manière significative ($p < 0.05$) la composition biochimique, notamment l'apport en protéines (de 11.49% pour le contrôle à 14.41% pour les pâtes enrichies avec 15% de PFMO). Le profil en acides aminés montre ainsi une amélioration équilibrée de l'apport en acides aminés essentielles, particulièrement la lysine et thréonine. Cette substitution répond aux paramètres de qualité des protéines de la FAO/OMS. La diminution de la digestibilité *in vivo* de protéines des pâtes enrichies (de 77.86% pour le control, contre 58.50% lors de la substitution à 15%) est expliqué par l'augmentation de la concentration de métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes et tannins), ces derniers qui manifestent un potentiel antioxydant dans les extraits méthanoliques de pâtes enrichies. Le concentré protéique obtenu auprès de PFMO issu d'un processus d'extraction enzymatique, dont les conditions expérimentales de température (°C), concentration de viscozyme (unités d'FBG) et temps d'incubation (h) ont été optimisées par RMS (30 °C, 60 unités FBG, 0,3 h). Le concentré protéique contenait 55.7% de protéines avec un profil équilibré d'acides aminés, présentant une qualité nutritionnelle améliorée en scores protéiques et une amélioration de la digestibilité *in vitro* des protéines (99,86 %). Le concentré protéique répond aux attentes de qualité des protéines de la FAO/OMS. Par conséquent, plusieurs applications en tant qu'ingrédient protéinique digestible sont prévues dans l'industrie agroalimentaire

Mots clés : Feuilles de *Moringa Oleifera*, qualité nutritionnelle, protéines, acides aminés, enrichissement des pâtes alimentaires, RSM, concentré protéique, digestibilité *in vitro*.

Abstract

For a more sustainable diet, it is necessary to identify plant alternatives with enhanced nutritional quality, particularly in terms of protein intake. Through this study we have opted for the physicochemical characterization of *Moringa Oleifera* leaf powder (MOLP), the determination of its secondary metabolites with antioxidant powers and their impact on proteins the *in vitro* digestibility. Followed by two axes of valorizations; in a first part, by studying the effect of fortification with different levels (0%, 5%, 10% and 15%) of MOLP, on the nutritional quality and *in vitro* protein digestibility of pasta. In a second part; by the optimizing the enzymatic extraction conditions (RSM) of MOLP proteins, in order to improve the nutritional quality and *in vitro* digestibility of this fraction. The obtained results show a rich composition of MPLP, especially in proteins (23.6%), with a balanced profile of amino acids, particularly essentials. The reduced *in vitro* digestibility of these proteins (66%) is explained by the presence of secondary metabolites (phenols, flavonoids and tannins) with an antioxidant potential, that characterized all MOLP extracts. The enrichment of pasta with MOLP improves significantly ($p < 0.05$) their biochemical composition, particularly their protein intake (from 11.49% for the control to 14.41% for enriched pasta with 15% of PFMO). The amino acid profile shows a balanced improvement of essential amino acids, particularly lysine and threonine. This substitution meets the FAO/WHO protein quality parameters. The decrease of *in vivo* protein digestibility in enriched pasta (from 77.86% for the control, against 58.50% at 15% of substitution) is explained by the increase in the concentration of secondary metabolites (phenols, flavonoids and tannins), wich shows antioxidant potential in methanolic extracts of enriched pasta. The obtained protein concentrates from PFMO, resulting from an enzymatic extraction process, whose experimental conditions of temperature (°C), viscozyme concentration (FBG units) and incubation time (h) were optimized by RMS (30°C, 60 FBG units, 0.3 h). The protein concentrate contained 55.7% of protein with a balanced amino acid profile, showing improved nutritional quality in protein scores and improved *in vitro* protein digestibility (99.86%). The protein concentrate meets FAO/WHO protein quality expectations. Therefore, several applications as a digestible protein ingredient are anticipated in the food industry.

Keywords: *Moringa Oleifera* leaves, nutritional quality, proteins, amino acids, pasta enrichment, RSM, protein concentrate, *in vitro* digestibility.

ملخص

من أجل اتباع نظام غذائي مستدام، من الضروري تحديد البدائل النباتية ذات جودة غذائية، خاصة من حيث تناول البروتين. من خلال هذه الدراسة اخترنا التوصيف الفيزيائي والكيميائي لمسحوق أوراق المورينجا أوليفيرا (PFMO)، وتحديد مستقلباته الثانوية ذات القوى المضادة للأكسدة وتأثير الأخير على هضم البروتينات. تليها مجالين للتقييم؛ في الجزء الأول، من خلال دراسة تأثير تركيب العجائن بمستويات مختلفة (0، 5، 10، و 15%) من PFMO، على الصفات الغذائية وقابلية الهضم لبروتينات. في جزء ثاني؛ تحسين ظروف الاستخلاص الأنزيمية (RSM) لبروتينات PFMO، من أجل تحسين الجودة الغذائية وقابلية الهضم لهذا الجزء. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها تركيبة غنية بـ PFMO، خاصة البروتينات (23.6%)، مع صورة متوازنة من الأحماض الأمينية الأساسية بشكل خاص. انخفاض قابلية هضم هذه البروتينات (66%)، ويفسر ذلك بوجود مستقلبات ثانوية (الفينولات والفلافونويدات و tannins) مع إمكانات مضادة للأكسدة والتي تميز جميع مستخلصات PFMO. يؤدي تركيب العجائن بـ PFMO إلى تحسين التركيب الكيميائي الحيوي بشكل ملحوظ ($p > 0.05$)، وخاصة البروتين (من 11.49% إلى 14.41% في العجائن المركبة بـ 15% PFMO). وبالتالي يظهر ملف الأحماض الأمينية تحسناً متوازناً في تناول الأحماض الأمينية الأساسية، وخاصة lysine و threonine. يفي هذا الاستبدال بمعايير جودة البروتين لمنظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية. يتم تفسير الانخفاض في قابلية هضم البروتين في العجائن المركبة (77.86% مقارنة بـ 58.50% في العجائن المضاف إليها 15% PFMO) من خلال الزيادة في تركيز المستقلبات الثانوية (الفينولات والفلافونويدات و tannins)، وهذا الأخير يظهر إمكانات مضادة للأكسدة في المستخلصات الميثانولية من لعجائن المركبة. تركيز البروتين الذي تم الحصول عليه من PFMO من عملية استخلاص إنزيمية، والتي تم تحسين ظروفها التجريبية لدرجة الحرارة (°C)، وتركيز اللزوجة (وحدات FBG) ووقت الحضنة (h) بواسطة RMS (30 درجة مئوية، 60 وحدة FBG، 0.3 ساعة). يحتوي تركيز البروتين على 55.7% من البروتين مع صورة متوازنة من الأحماض الأمينية، مما يوفر جودة غذائية محسنة في درجات البروتين وتحسين هضم البروتين (99.86%). يلي تركيز البروتين توقعات جودة البروتين لدى منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية. لذلك، من المتوقع استخدام العديد من التطبيقات كمكون بروتيني قابل للهضم في صناعة المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية: أوراق المورينجا أوليفيرا، الجودة الغذائية، البروتينات، الأحماض الأمينية، تركيب العجائن، RSM، تركيز البروتين، الهضم في المختبر.