

Effets du trempage de graines et de farines de céréales et de légumineuses sur leur teneur en phytates et leurs rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn

**Lestienne* Isabelle, Icard-Vernière Christèle,
Picq Christian, Trèche Serge**

UR 106 «Nutrition, Alimentation, Sociétés», IRD, BP 64501, F34394 Montpellier Cedex 5, France.

*Auteur correspondant: lestienn@mpl.ird.fr

- Résumé -

Les effets du trempage (procédé utilisé pour la préparation de farines infantiles) sur les teneurs en fer (Fe), zinc (Zn) et phytates (Phy) de graines de céréales (maïs, mil, riz, sorgho) et de légumineuses (ambérique, niébé, soja), ainsi que les perspectives d'amélioration de ces effets par combinaison avec des procédés mécaniques sur les graines de mil et de soja, ont été étudiés en vue d'évaluer l'intérêt du trempage pour l'amélioration de la biodisponibilité des minéraux.

Les teneurs en phytates (IP6) dosées par HPIC dans les différents types de graines étaient comprises entre 236 et 1084 mg / 100 g MS. Dans les graines de céréales, excepté le mil, les rapports molaires Phy/Fe étaient supérieurs à 14 et les rapports Phy/Zn supérieurs à 20. En raison de teneurs en minéraux plus fortes et de teneurs en phytates plus faibles, ceux des graines de légumineuses en revanche étaient inférieurs (sauf pour le mil) et le plus souvent inférieurs aux valeurs limites à partir desquelles une faible biodisponibilité des minéraux est généralement observée. Un trempage de 24 h des graines entières a entraîné une diffusion importante dans l'eau du fer et, dans une moindre mesure, du zinc, et conduit à une réduction significative ($p \leq 0,05$) de la teneur en phytates des graines de riz (17%), maïs (21%), soja (23%) et mil (28%). Les rapports molaires Phy/Fe n'ont pas été améliorés et les rapports molaires Phy/Zn n'ont été que légèrement diminués.

La combinaison du trempage avec le décorticage ou le broyage des graines de mil et de soja a permis d'obtenir des dégradations en phytates plus fortes (38% après 24 h de trempage de graines de mil décortiquées et 44% après 8h de trempage de la farine de soja). Cependant, la diffusion des minéraux étant facilitée par les traitements mécaniques subis par les graines, les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn n'ont pas pu être diminués en proportion. Les plus fortes diminutions des rapports molaires ont été observées pour le trempage de 8 h de la farine de mil (de 10,8 à 7,6 pour Phy/Fe et de 20,2 à 15,0 pour Phy/Zn) et le trempage de 24 h des graines entières de soja (de 10,4 à 9,4 pour Phy/Fe et de 23,8 à 19,6 pour Phy/Zn).

Mots-clés: Trempage – Phytates - Fer – Zinc – Biodisponibilité.

- Abstract -

Effects of soaking of cereal and legume seeds and flours on phytate content and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

Introduction: Phytate (Phy) is known as the main factor responsible of the low bioavailability of iron (Fe) and zinc (Zn) in foods. Previous studies have shown that molar ratios of Phy/Fe and Phy/Zn higher than 10-14 and 15-20 respectively are good indicators of these low bioavailabilities. Soaking is a process commonly used to prepare infant flours and its effects on Fe, Zn and Phy contents of seeds (whole, dehulled or milled into flour) of cereals (maize, millet, rice, sorghum) and legumes (mung bean, cowpea, soybean) have hence been studied in order to investigate its interest for the improvement of mineral bioavailability.

Methods: Phytate contents were estimated by determination of *myo*-inositol-hexaphosphate (IP6) by HPIC Dionex. Mineral contents were determined by atomic absorption spectrometer.

Results: Phytate contents were 762, 908, 925 and 1084 mg/100gDM in grains of millet, maize, sorghum and rice and 236, 559 and 878 mg/100gDM in seeds of mung bean, cowpea and soybean, respectively. In cereal grains, with the exception of millet (Phy/Fe=5 and Phy/Zn=19), molar ratios of Phy/Fe were more than 14 (sorghum, 23; maize, 34; rice, 56) whereas Phy/Zn molar ratios were more than 20 (rice, 36; maize, 41; sorghum, 63). Owing to higher mineral contents and lower phytate contents, the molar ratios of legume seeds (for Phy/Fe and Phy/Zn, respectively, 3 and 8 for mungbean; 8 and 16 for cowpea; 10 and 24 for soybean) were lower than those of cereals (except for millet) and mostly lower than the limit values above which a low bioavailability of minerals is generally observed. Soaking of whole seeds for 24h has induced an important leaching of iron into the soaking water and, at a lower degree, of zinc, and led to a significant reduction ($p<0.05$; Duncan's test) of phytate content of rice (17%), maize (21%), soybean (23%) and millet (28%). The molar ratios of Phy/Fe have not been improved and those of Phy/Zn have just been slightly decreased. For millet and soybean, the combination of soaking with husking or milling of seeds allowed obtaining higher phytate degradation rates (38% after soaking of dehulled millet grains for 24h and 44% after soaking of soybean flour for 8h). However, the leaching of minerals is facilitated by mechanical treatments undergone by seeds, so the Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios could not be notably decreased.

Conclusion: Soaking of seeds (whole, dehulled or milled into flour) has limited effects on phytate contents and on molar ratios of Phy/Fe and Phy/Zn of cereal and legume seeds. The combination of soaking with other treatments, as fermentation or germination, hence seems to be necessary to significantly improve the bioavailabilities of iron and zinc in flours used to prepare gruels for infants.

Key words: Soaking – Phytate – Iron – Zinc – Bioavailability.

INTRODUCTION

Dans les pays en développement, les besoins en fer et en zinc des personnes à risques (femmes et jeunes enfants) ne sont souvent pas couverts en raison de la faible biodisponibilité de ces minéraux dans des régimes majoritairement composés de céréales et de légumineuses¹. Ce manque de diversité concernant les matières premières alimentaires est une des causes importantes de déficiences en fer et en zinc, notamment pour les enfants en période d'alimentation complémentaire qui passent de l'allaitement exclusif au régime alimentaire familial.

En effet, bien que constituant des sources potentielles de minéraux, les céréales et les légumineuses sont souvent riches en facteurs antinutritionnels qui réduisent leur biodisponibilité². Ainsi, le fer stocké principalement sous une forme inorganique (non-hémique) dans les tissus végétaux a un taux d'absorption de 1 à 10%, tandis que 20 à 40% du zinc est absorbable³. De nombreuses études ont montré que l'acide phytique, *myo*-inositol hexaphosphate (IP6) est le principal agent chélateur réduisant la biodisponibilité des cations divalents⁴. De ce fait et grâce à des corrélations effectuées avec des études *in vivo*, les biodisponibilités du fer et du zinc peuvent être estimées par leurs rapports molaires avec les phytates. Davies et Olpin⁵ ont montré que des rapports molaires phytates sur zinc (Phy/Zn) supérieurs à 10-15 inhibaient progressivement l'absorption du zinc chez des rats nourris avec des régimes à base d'albumen d'œuf additionnés de phytates ou de zinc. De la même façon, Saha et al.⁶ ont montré que l'absorption de fer radioactif chez le rat diminuait significativement quand les rapports molaires phytate sur fer (Phy/Fe) étaient supérieurs à 10-14 dans des régimes à base de farine de blé contenant entre 0,19 et 1,85 g de phytates / 100 g MS. Un moyen d'améliorer les biodisponibilités en fer et en zinc est donc de réduire ces rapports molaires (Phy/Zn < 15-20 et Phy/Fe < 10/14) en réduisant les teneurs en phytates, ce que certains traitements biologiques comme la fermentation⁷ ou la germination⁸ par exemple permettent de faire en dégradant jusqu'à 80% des phytates. L'application de ces traitements reste cependant limitée en raison du travail supplémentaire qu'ils nécessitent ou des propriétés organoleptiques particulières qu'ils induisent. Le trempage, en revanche, qui peut être utilisé comme étape préliminaire à ces procédés, ne présente pas ces inconvénients et permet de débiter la réduction des teneurs en phytates^{9,10}.

Les objectifs de cette étude étaient, d'une part, de caractériser les effets du trempage sur les teneurs en phytates et les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn de graines de céréales et de légumineuses et, d'autre part, d'évaluer si une combinaison du trempage avec d'autres procédés simples permettait d'améliorer ces effets. Les effets du trempage (dans des conditions applicables au niveau des ménages) ont été évalués sur 4 espèces de céréales et 3 espèces de légumineuses couramment utilisées dans la préparation d'aliments de complément dans les pays du sud. Les combinaisons de procédés, en revanche, ont été testées sur une seule espèce de céréale (mil) et une seule espèce de légumineuse (soja) choisies pour leurs intérêts nutritionnels et leur forte consommation et consistaient à faire subir aux graines un traitement mécanique (applicables dans les petites unités de production de farines) avant trempage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nature et origine des graines étudiées

Les graines de céréales provenaient du Burkina Faso (mil, *Pennisetum glaucum*; sorgho, *Sorghum bicolor*) et de France (maïs, *Zea mays*; riz, *Oryza sativa*), et celles de légumineuses de Chine (soja, *Glycine hispida max*), du Sénégal (niébé, *Vigna unguiculata*) et de Madagascar (ambérique, *Vigna radiata*).

Traitements appliqués

- Décorticage et broyage: Les graines décortiquées de mil et de soja et leur farine (de granulométrie correspondant à celle des farines locales) ont été obtenues à l'aide d'un décortiqueur (SATAKE TM 050, 750-1450 rpm). et d'un broyeur de laboratoire (PERTEN Falling number type 3303, 2800 rpm).
- Trempage des graines: 100 g de graines sèches entières ou décortiquées sont mises à tremper dans 300 ml d'eau minérale (Evian) pour les céréales et dans 500 ml pour les légumineuses. Les graines sont trempées pendant 24 h à 30°C sous agitation douce (60 rpm) dans un incubateur. Après égouttage et congélation, les graines sont lyophilisées et broyées afin d'obtenir des particules de farine de granulométrie inférieure à 500 µm. Chaque trempage a été réalisé en double.
- Trempage des farines: La proportion farine/eau (90 g / 300 ml) a été calculée pour permettre ensuite la préparation de bouillies de mil de consistance et de densité énergétique acceptables pour les enfants¹¹. La durée de trempage a été limitée à 8 h afin d'éviter un début de fermentation.

Méthodes analytiques

Les quantités de phytates ont été estimées par détermination des teneurs en IP6 par séparation HPLC sur colonne échangeuse d'anions Dionex selon la méthode de Talamond et al.¹² avec de légères modifications (centrifugation après extraction à 4500g, 4°C pendant 20 min et dilution du résidu avant injection dans 2 ml d'eau milliQ). Les teneurs en fer et en zinc ont été déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique après minéralisation à 530°C pendant 2h.

Chaque détermination a été réalisée en triple.

RÉSULTATS

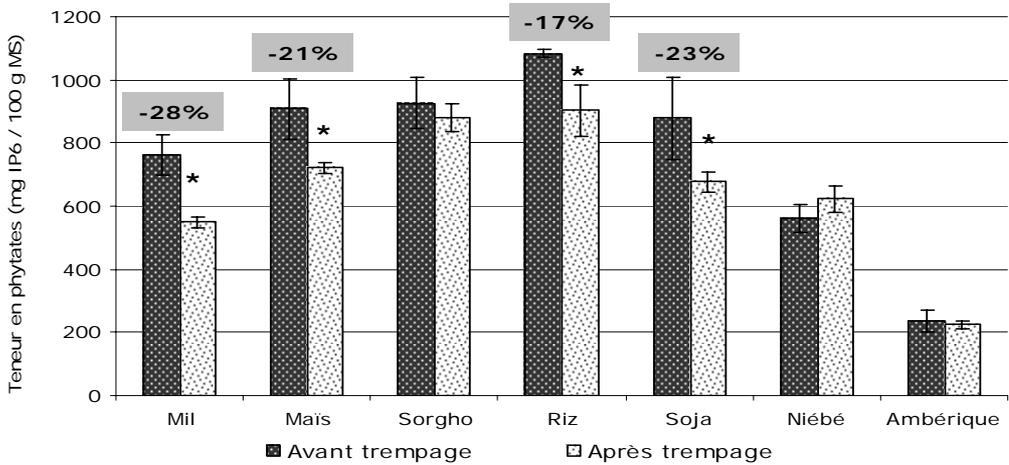
Effet du trempage sur la biodisponibilité du fer et du zinc de différentes espèces de céréales et de légumineuses

Les teneurs en phytates des différentes espèces de céréales et de légumineuses avant et après trempage sont représentées sur la figure 1.

Les valeurs obtenues pour les graines brutes (mil: 762, maïs: 908, sorgho: 925, riz: 1084, soja: 878, niébé: 559, ambérique: 236 mg IP6 / 100 g MS) sont proches de celles reportées par Reddy¹³ excepté pour le soja et l'ambérique qui sont plus faibles (1000 à 2200 mg / 100 g MS pour le soja et 590 à 1100 mg / 100 g MS pour l'ambérique dans la littérature).

Des réductions des teneurs en phytates, plus ou moins fortes selon l'origine de la graine, ont été obtenues après trempage des graines entières. Deux groupes peuvent être distingués: riz, maïs, soja et mil, groupe pour lequel on observe des réductions significatives ($p \leq 0,05$) des teneurs en phytates (respectivement 17, 21, 23 et 28%) et

ambérique, sorgho et niébé, groupe pour lequel les réductions ne sont pas significatives.



Moyennes de 3 déterminations avant trempage et de 6 déterminations après trempage, les barres verticales représentant les écart-types des moyennes.
*Moyennes significativement différentes au niveau 5% (test de Duncan¹⁶).

Figure 1: Variation des teneurs en phytates (mg IP6 / 100 g MS) des différentes espèces de céréales et de légumineuses après trempage des graines entières pendant 24 h.

Les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn des différentes espèces de céréales et de légumineuses avant et après trempage sont représentés sur la figure 2.

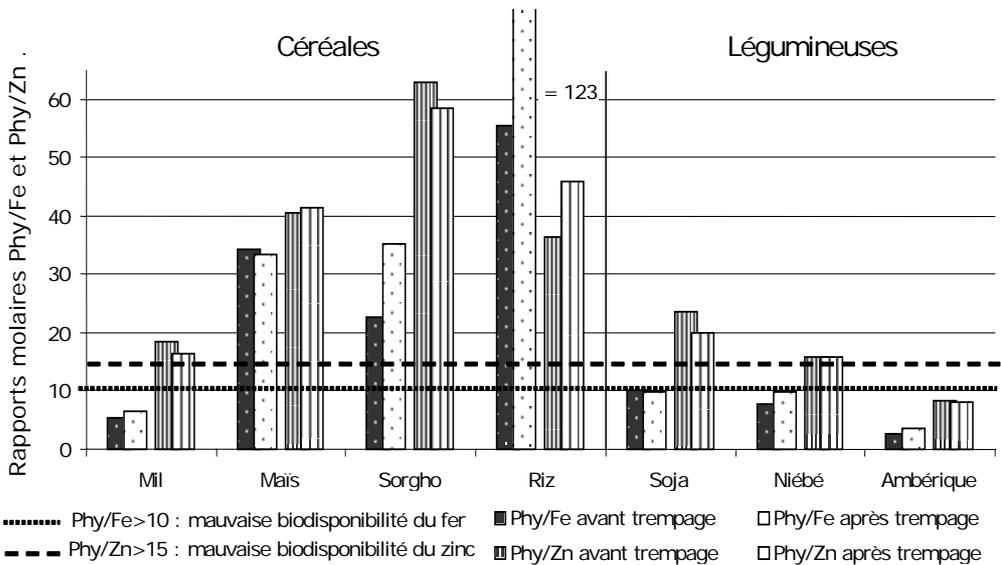


Figure 2: Effet d'un trempage de 24 h des graines entières des différentes espèces de céréales et de légumineuses sur leurs rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn.

Les rapports Phy/Fe des graines brutes sont globalement en accord avec ceux reportés par Allen et Ahluwalia¹⁴. Ils sont inférieurs ou égaux à 10 pour le mil (5,3), le

soja (10,1), le niébé (7,8) et l'ambérique (2,8) qui doivent donc présenter une biodisponibilité du fer acceptable. Les rapports Phy/Zn du riz (36,3), du maïs (40,6) et du sorgho (62,8) sont très supérieurs à la valeur limite (15-20) correspondant à une biodisponibilité acceptable et en sont proches pour le mil (18,5) et le soja (23,5).

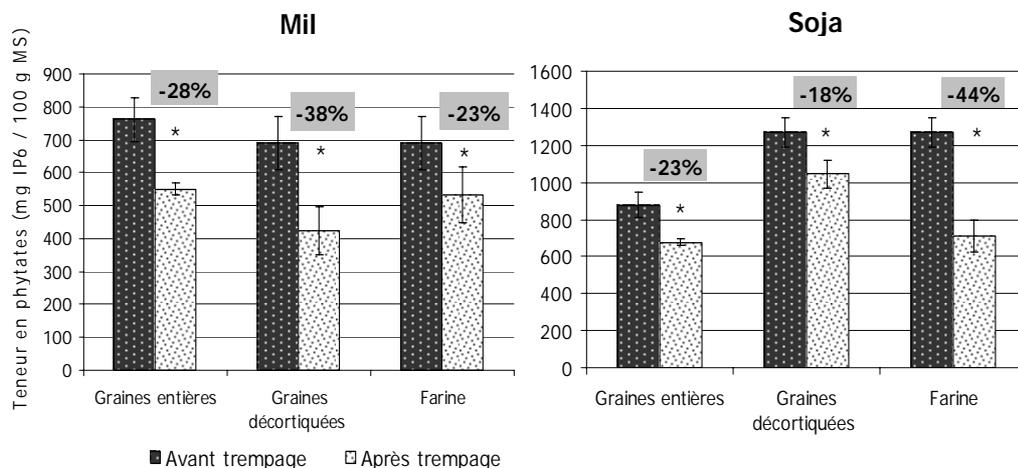
Le trempage des graines entières ne permet pas de diminuer les rapports molaires Phy/Fe qui restent supérieurs à 10 pour le maïs, le sorgho et le riz. Ces rapports molaires augmentent même après trempage, particulièrement ceux du sorgho (35) et du riz (123), en raison d'une diminution des teneurs en fer. Concernant les rapports Phy/Zn, on observe une légère diminution pour la plupart des espèces, mais ils restent supérieurs (41, 46, et 58 respectivement pour le maïs, le riz et le sorgho) à la valeur au-dessus de laquelle l'absorption du zinc est généralement plus faible.

Effet de combinaison de procédés sur la biodisponibilité du fer et du zinc dans les graines de mil et de soja

Les variations des teneurs en phytates après application des différents traitements sont représentées en figure 3.

Concernant le mil, le décortiquage ne provoque pas de variation significative de la teneur en phytates. Comme vu précédemment, le trempage 24 h des graines entières entraîne une dégradation de 28% des phytates ($p \leq 0,05$). L'ajout d'une étape de décortiquage avant trempage entraîne une dégradation supplémentaire de 10%. En revanche, le trempage pendant 8 h des graines décortiquées et broyées ne permet pas d'augmenter encore cette dégradation (23%), certainement en raison de la plus courte durée de trempage adoptée.

Pour le soja, les résultats observés sont très différents. Le décortiquage entraîne une forte augmentation de la teneur en IP6 (+45%) ce qui confirme les résultats reportés par Reddy¹³ comme quoi les phytates des légumineuses se trouvent en quasi-totalité dans l'endosperme de la graine. Le trempage 24 h des graines entières permet de dégrader 23% des phytates ($p \leq 0,05$), tandis que celui des graines décortiquées ne conduit qu'à 18% de dégradation. En revanche, on obtient 44% de dégradation avec un trempage de 8 h de la farine.



Moyennes de 3 déterminations pour le matériel avant trempage et de 6 déterminations pour le matériel après trempage, les barres verticales représentant les écart-types des moyennes. Les pourcentages de perte en IP6 sont calculés par rapport à la teneur dans le matériel mis à tremper.

*Moyennes significativement différentes au niveau 5% (test de Duncan)¹⁶.

Figure 3: Variation des teneurs en phytates (mg IP6 / 100 g MS) après différents traitements appliqués aux graines de mil et de soja.

Concernant les rapports molaires (figure 4), il y a une augmentation des rapports Phy/Fe après décortiquage en raison de la localisation majoritaire du fer dans les enveloppes et le rapport Phy/Zn du soja augmente également en raison de la plus forte teneur en IP6 dans les graines décortiquées. Le trempage conduit à une réduction des teneurs en minéraux (notamment du fer) qui diffusent dans le milieu de trempage¹⁵.

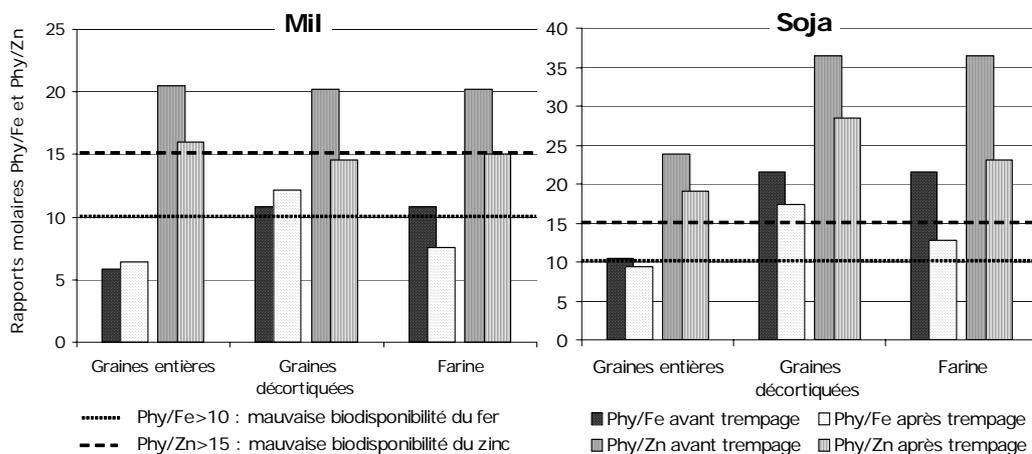


Figure 4: Effet de différents traitements appliqués aux graines de mil et de soja sur leurs rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn.

Pour le mil, bien que le trempage des graines décortiquées permette d'obtenir le taux de dégradation en phytates le plus fort, il s'agit du traitement le moins efficace en terme d'amélioration du rapport molaire Phy/Fe qui augmente de 10,8 à 12,2 en raison d'une diffusion du fer proportionnellement supérieure à la dégradation des IP6, tandis que le rapport Phy/Zn diminue de 20,2 à 14,6. En revanche, le trempage de la farine de mil permet d'améliorer les deux rapports qui passent de 10,8 à 7,6 pour Phy/Fe et de 20,2 à 15,0 pour Phy/Zn.

Pour le soja, malgré la forte dégradation des phytates obtenue avec le trempage de la farine, les plus importantes diminutions des rapports molaires sont observées avec le trempage des graines entières (de 10,4 à 9,4 pour Phy/Fe et de 23,8 à 19,1 pour Phy/Zn). En effet, pour les autres traitements les rapports sont fortement augmentés en raison de la forte teneur en IP6 des graines décortiquées.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude relative à des procédés de transformation des aliments utilisables aux niveaux des ménages et des communautés susceptibles de modifier la biodisponibilité des minéraux permettent de proposer quelques améliorations concernant l'étape de trempage intervenant dans le procédé de préparation de farines utilisables comme aliment de complément.

Un trempage de 24 h à 30°C de graines entières permet de réduire significativement les teneurs en phytates de certaines espèces de céréales et de légumineuses. Mais, étant donnée la perte par diffusion d'une partie des minéraux, et surtout du fer, pendant le trempage, les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn ne sont pas améliorés en conséquence. En ce qui concerne les combinaisons de procédés applicables aux graines de mil et de soja, elles ont également un effet modéré sur les rapports

molaires Phy/Fe et Phy/Zn, bien que certaines permettent d'augmenter considérablement le taux de dégradation des phytates par rapport à celui obtenu après un trempage seul. Les résultats sont, par ailleurs, différents pour les deux types de graines. Nous retiendrons comme procédés les plus efficaces pour la diminution des rapports molaires, le trempage 8 h de la farine pour le mil et le trempage 24 h des graines entières pour le soja.

Une optimisation des conditions de trempage devrait permettre d'augmenter la dégradation des phytates, cependant le trempage sera toujours insuffisant pour entraîner des taux de dégradation suffisants pour entraîner une réelle amélioration de la biodisponibilité des minéraux et devra donc être couplé avec d'autres traitements, comme la fermentation ou la germination, pour que les farines ainsi obtenues offrent des biodisponibilités en fer et en zinc acceptables.

RÉFÉRENCES

1. Gibson RS. Zinc nutrition in developing countries. *Nutr Res Rev* 1994;7:151-73.
2. Frölich W. Bioavailability of micronutrients in a fibre-rich diet, especially related to minerals. *Eur J Clin Nutr* 1995;49(3):116S-22S.
3. Solomons NW, Ruz M. Zinc and iron interaction: Concepts and perspectives in the developing world. *Nutr Res* 1997;17(1):177-85.
4. Weaver CM, Kannan S. Phytate and mineral bioavailability. In: Reddy NR, Sathe SK, eds. *Food phytates*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002:211-24.
5. Davies NT, Olpin SE. Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *Brit J Nutr* 1979;41(3):590-603.
6. Saha PR, Weaver CM, Mason AC. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *J Agric Food Chem* 1994;42:2531-5.
7. Marfo EK, Simpson BK, Idowu JS, Oke OL. Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *J Agric Food Chem* 1990;38(7):1580-5.
8. Mahgoub SEO, Elhag SA. Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chem* 1998;61:77-80.
9. Vijayakumari K, Siddhuraju P, Pugalenti M, Janardhanan K. Effect of soaking and heat processing on the levels of antinutrients and digestible proteins in seeds of *Vigna aconitifolia* and *Vigna isnensis*. *Food Chem* 1998;63(2):259-64.
10. Duhan A, Khetarpaul N, Bishnoi S. Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chem* 2002;78(1):9-14.
11. WHO. Energy required from complementary foods and factors affecting their intake. In: Report WHO/NUT/98.1. Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge. Geneva, FL:WHO, 1998:45-76.
12. Talamond P, Gallon G, Trèche S. Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *J Chromatogr A* 1998;805:143-7.

13. Reddy NR. Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: Reddy NR, Sathe SK, eds. Food phytates. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002:25-52.
14. Allen LH, Ahluwalia N. Improving iron status through diet. The application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations, OMNI Opportunities for Micronutrients Interventions. Washington, DC: John Snow, Inc./OMNI, 1997.
15. Saharan K, Khetarpaul N, Bishnoi S. HCl-extractability of minerals from ricebean and fababean: influence of domestic processing methods. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2001;2(4):323-5.
16. Duncan DB. Multiple range and Multiple-F tests. Biometrics 1955;11:1-42.

Remerciements: *Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet Cerefer (www.mpl.ird.fr/cerefer/) financé par la Commission Européenne, contrat N° ICA4-CT-2002-10047. Nous remercions I. Rochette pour la prise en charge des analyses de phytates sur HPIC, ainsi que C. Mouquet, J.P. Guyot et S. Chanliau pour leurs conseils.*

