

ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences Alimentaires

Formation doctorale : Sciences Alimentaires

Ecole Doctorale : Agriculture - Alimentation - Biologie - Environnement - Santé

Par

NGUYEN Thi Thanh Thuy

**ÉTUDE DE LA FERMENTATION DE MÉLANGES DE RIZ ET SOJA PAR DES BACTÉRIES
LACTIQUES AMYLOLYTIQUES EN COMBINAISON AVEC DIFFÉRENTS PROCÉDÉS :
NOUVELLES VOIES D'ÉLABORATION D'ALIMENTS DE COMPLÉMENT DU JEUNE ENFANT**

Soutenue le 15 Décembre 2005 devant le jury composé de :

Prof. Joseph Pierre GUIRAUD	Université Montpellier II	Président du jury
M. Didier MONTET	CIRAD Montpellier	Rapporteur
Prof. Jean François GRONGNET	Agro Campus de Rennes	Rapporteur
M. Jean Pierre GUYOT	IRD Montpellier	Directeur de thèse
M. Gérard LOISEAU	ENSIA-SIARC	Invité

Remerciements

Avant tout, je voudrais exprimer ma reconnaissance à M. Jean-Pierre GUYOT, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche à l'IRD et fait l'honneur d'accepter d'être mon Directeur de Thèse. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, ses précieux conseils qu'il m'a prodigué au cours de ces trois années.

J'exprime ma gratitude à M. Gérard LOISEAU, Maître de Conférences de l'ENSLA-SIARC pour avoir bien voulu participer à l'encadrement de cette thèse, un grand merci pour ses conseils judicieux, pour tout le soutien qu'il m'a apporté depuis longtemps, un grand merci aussi pour les matériels et les remarques constructives apportés à ce travail.

Ma gratitude s'adresse aussi à Madame Christèle VERNIERE qui a co-encadré ce travail et lui a apporté un soutien méthodologique très important.

Je tiens également à exprimer ma connaissance aux rapporteurs et membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Il s'agit de M. le Professeur Joseph Pierre GUIRAUD (président), M. le professeur Jean-François GRONGNET (rapporteur) et M. Didier MONTET (rapporteur).

La réalisation de l'ensemble des travaux de la présente thèse a été rendue possible grâce à l'appui financier du Gouvernement français, de l'IRD (Département Soutien et Formation) et du CIRAD (direction des échanges scientifiques internationaux) qui m'ont permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude aux membres du Département Science des Aliment et Technologie de l'ENSA N°1 de Hanoi pour leur aide, leur soutiens et leur sympathie.

Je voudrais remercier M. Francis DELPEUCH pour m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je tiens à exprimer mes remerciements à M. Serge TRECHE (UR 106-IRD) pour ses conseils judicieux et tout le soutien qu'il m'a apporté.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Jacques BERGER, représentant de l'IRD au Vietnam pour sa gentillesse et ses encouragements.

Je voudrais remercier très sincèrement toute l'équipe du laboratoire de Nutrition de l'UR 106 du centre IRD de Montpellier. Un grand merci à Mlle Isabelle ROCHETTE, M. Christian PICQ pour leur aide généreuse et chaleureuse.

Je voudrais également remercier M. Olivier GIBERT et M. Daniel DIJOUX de m'avoir aidée dans mon travail de laboratoire au CIRAD de Montpellier.

MM. Henri FERRER et Jean-Yves LAURENT du laboratoire des sols de l'IRD sont vivement remerciés pour leur collaboration pour l'analyse granulométrique des farines.

Je tiens à remercier vivement à M. CAO Van Rang et M. TON THAT Thang pour leur aide, leur amitié, leur gentillesse et leur soutien constant tout au long de mes séjours à Montpellier.

Je remercie également tous mes amis du laboratoire pour leur participation active, leurs conseils, leur sympathie ou leur bonne humeur : Andréina, Mourad, Isabelle, Araceli, Laurencia, Tahirou, Séverine, Hassan, Fabienne, Hélène, Youna, Rat, Sandra, Gaukha, Hoan, Duy....

Je remercie aussi tous ceux qui ont de près comme de loin contribué à la réalisation de ce travail de thèse et qui ont apporté une grande richesse à ma vie personnelle.

Những thành quả đạt được như ngày hôm nay của em là nhờ sự sẻ chia và hy sinh lớn lao của anh và con, gửi tới anh và con tất cả tình yêu thương và lòng biết ơn sâu sắc.

Cảm ơn cha mẹ và tất cả anh chị em trong gia đình, tình cảm âm áp và sự động viên không ngừng của mọi người dành cho con là động lực to lớn đã giúp con vượt qua được mọi khó khăn, thử thách.

Cảm ơn tất cả các bạn Hương, Giang, Dương, Hạnh, Hằng, Thuý, Minh, Phương ... về sự giúp đỡ nhiệt tình và những tình cảm chân thành, gần bó các bạn đã dành cho tôi.

Cảm ơn tất cả

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I :	
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1. MATIÈRES PREMIÈRES	7
1.1. STRUCTURE DU GRAIN DE RIZ	7
1.2. GRAIN D'AMIDON - CONSÉQUENCES PHYSICO-CHIMIQUES DES TRAITEMENTS HYDROTHERMIQUES ET MÉCANIQUES	8
1.3. VALEUR NUTRITIONNELLE DU RIZ.....	11
1.4. FACTEURS ANTINUTRITIONNELS ET LEUR ÉLIMINATION.....	13
1.5. PROBLÈMES NUTRITIONNELS DANS LES PAYS CONSOMMATEURS DU RIZ.....	14
1.6. AMÉLIORATION LA QUALITÉ DU RIZ PAR LA FERMENTATION	14
1.7. COMPOSITION CHIMIQUE ET VALEUR NUTRITIONNELLE	18
1.8. FACTEURS ANTINUTRITIONNELS ET LEUR ÉLIMINATION.....	20
1.9. TRAITEMENT THERMIQUE DE LA GRAINE DE SOJA	22
1.10. LES ALIMENTS À BASE DE SOJA	24
2. LES ALIMENTS DE COMPLÈMENT DU JEUNE ENFANT DANS LES PAYS EN DÉVELOPPEMENT.....	27
3. LES BACTÉRIES LACTIQUES	33
3.1. VOIE D'EMBDEN-MEYERHOFF-PARNAS (EMP)	36
3.2. VOIE DE LA PENTOSE-PHOSPHOCÉTOLASE (PPC).....	36
3.3. VOIE DE LA F6P-PHOSPHOCÉTOLASE	38
CHAPITRE 2 :	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	40
1. MATÉRIELS	41
1.1. LES MATIÈRES PREMIÈRES	41
1.2. MICROORGANISMES UTILISÉS	41
1.3. MILIEUX DE CULTURE	42
1.4. CONDITIONS DE CULTURE	43
1.5. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUE DE CROISSANCE.....	45
1.6. PROCÉDÉS DE TRANSFORMATION.....	45
2. ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES	49
2.1. PRÉLÈVEMENTS ET TRAITEMENTS DES ÉCHANTILLONS	49
2.2. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN MATIÈRE SÈCHE	50
2.3. ANALYSE D'ENTHALPIE DIFFÉRENTIELLE	50
2.4. MESURE DE LA GRANULOMÉTRIE.....	51
2.5. MESURE DE LA VISCOSITÉ.....	52
2.6. MESURE DE L'ÉCOULEMENT	52
2.7. DOSAGE DES OSES PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE HAUTE PRESSION (HPIC)	53
2.8. DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES, DE L'ÉTHANOL PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION (CLHP).....	54
2.9. DOSAGE DE L'AMIDON.....	54
2.10. DOSAGE DE L'AZOTE PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL.....	55
2.11. DOSAGE DES LIPIDES.....	56
2.12. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CENDRES	56
2.13. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN FIBRES INSOLUBLES ADF	56
2.14. DOSAGE DES INHIBITEURS TRYPSIQUES	56
2.15. DÉTERMINATION DE LA VALEUR ÉNERGÉTIQUE	57
3. ANALYSES STATISTIQUES.....	57

CHAPITRE 3 :

CARACTÉRISATION DES MATIÈRES PREMIÈRES ET ESSAIS PRÉLIMINAIRES	58
INTRODUCTION	59
1. CARACTÉRISATION DES MATIÈRES PREMIÈRES	59
1.1. COMPOSITION GLOBALE DES MATIÈRES PREMIÈRES	59
1.2. ANALYSE GRANULOMÉTRIQUE DES FARINES.....	60
1.3. DÉTERMINATION DE L'ENTHALPIE DIFFÉRENTIELLE DES FARINES UTILISÉES	61
2. ESSAIS PRÉLIMINAIRES.....	62
2.1. FERMENTATION DES SUSPENSIONS DE FARINES DE RIZ SEULES OU EN COMBINAISON AVEC DU SOJA PAR LA SOUCHE LB. PLANTARUM A6	62
2.2. FERMENTATION DES SUSPENSIONS DE MÉLANGE DE FARINES GÉLATINISÉES	63

CHAPITRE 4 :

EFFECT OF FERMENTATION BY AMYLOLYTIC LACTIC ACID BACTERIA, IN PROCESS COMBINATIONS, ON CHARACTERISTICS OF RICE/SOYBEAN SLURRIES: A NEW METHOD FOR PREPARING HIGH ENERGY DENSITY COMPLEMENTARY FOODS FOR YOUNG CHILDREN.....	65
INTRODUCTION	66

CHAPITRE 5 :

FERMENTATION BY <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> A6 OF RICE/SOYBEAN SLURRIES PRE- TREATED BY HIGH PRESSURE HOMOGENISATION TO PREPARE HIGH ENERGY DENSITY COMPLEMENTARY FOOD.....	82
INTRODUCTION	83

CHAPITRE 6 :

SIMULTANEOUS HYDROLYSIS OF STARCH AND REMOVAL OF ALPHA- GALACTOOLIGOSACCHARIDES (ALPHA-GOS) BY CO-CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA: A COMPARATIVE STUDY IN A MODEL GROWTH MEDIUM AND IN A RICE/SOYBEAN SLURRY	96
INTRODUCTION	97
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	107
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111

FIGURES

CHAPITRE 1. Étude bibliographique

Figure 1.1. Influence du traitement hydrothermique sur l'état de l'amidon	8
Figure 1.2. Catabolisme du glucose par les bactéries	37

CHAPITRE 2. Matériels et méthodes

Photo 2.1. Préparation de la farine de soja	41
Photo 2.2. Fermenteurs de 200 mL (a), fermenteur de 10 L(b).....	44
Figure 2.1. Diagrammes de fabrication des bouillies infantiles fermentées d'une suspension d'un mélange de farines soja/riz	46
Photo 2.3. Marmite de cuisson basculante	46
Figure 2.2. Schéma de l'homogénéisateur à haute pression type APV	47
Figure 2.3. Schéma du sécheur atomiseur	48
Figure 2.4. Schéma de préparation des échantillons à forte viscosité en vue des analyses physicochimiques et des dénombrements bactériens	49
Photo 2.4. Consistomètre modèle Polyvisc pour la mesure de l'écoulement des produits	53

CHAPITRE 3. Caractérisation des matières premières et essais préliminaires

Figure 3.1. Courbes de distribution et de cumul de granulométrie des farines	61
Figure 3.2. Cinétiques d'acidification d'un produit à base de farine de riz seule ou en mélange avec de la farine de soja à 22% de matière sèche par la souche <i>Lb. plantarum</i> A6	62
Figure 3.3. Cinétique d'acidification d'un mélange de farines gélatinisé à 22% de MS par la souche de <i>Lb. plantarum</i> A6	64

CHAPITRE 4. Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children

Figure 4.1. Experimental design showing the different process combinations tested to produce fermented gruels or flour from a rice/soybeanslurry	69
Figure 4.2. Growth of strains <i>Lactobacillus plantarum</i> A6 and Lacto Labo in gelatinised rice/soybean slurries	72

Figure 4.3. Changes in pH during fermentation by strains <i>Lactobacillus plantarum</i> A6 and Lacto Labo at different dry matter content.....	73
Figure 4.4. Organic acid production during fermentation by strains <i>Lactobacillus plantarum</i> A6 and Lacto Labo at low (12.7%) and high (23.4%) dry matter content.....	74
Figure 4.5. Sugar changes during fermentation of slurries by strains <i>Lactobacillus plantarum</i> A6 and Lacto Labo at low (12.7%) and high (23.4%) dry matter content.....	75
Figure 4.6. Effect of fermentation by strains <i>Lb. plantarum</i> A6 and Lacto Labo on the viscosity and Bostwick flow of the rice/soybean slurry.....	77

CHAPITRE 5. Fermentation by *Lactobacillus plantarum* A6 of rice/soybean slurries pre-treated by high pressure homogenisation to prepare high energy density complementary food

Figure 5.1. Flow chart showing the different process combinations tested to produce fermented gruels from rice/soybean slurry.....	86
Figure 5.2. Particle size distribution of slurries.....	89
Figure 5.3. Growth of <i>Lactobacillus plantarum</i> A6 in rice/soybean HPH slurries.....	90
Figure 5.4. Kinetics of fermentation of rice/soybean.....	91

CHAPITRE 6. Simultaneous hydrolysis of starch and removal of α -galactosaccharides by co-cultures of lactic acid bacteria: a comparative study in a model growth medium and in a rice/soybean slurry

Figure 6.1. Sugar changes during mixed substrate fermentation by pure cultures the co-cultures of lactic acid bacteria on modified MRS medium.....	101
Figure 6.2. Sugar evolution during the fermentation by <i>Lb. plantarum</i> A6 of a gelatinised rice/soybean slurries prepared at 12.7% DM	102
Figure 6.3. Sugar evolution during the fermentation by pure culture of <i>Lactobacillus</i> spp. strain 4.4 and <i>Lactobacillus fermentum</i> Ogi E1 of a gelatinized rice/soybean slurries prepared at 12.7% DM	102
Figure 6.4. Sugar evolution during the fermentation by co-cultures of a gelatinised rice/soybean slurries prepared at 12.7% DM	103
Figure 6.5. Changes in apparent viscosity during the fermentation of gruels prepared with rice/soybean at 12.7% DM.....	104

TABLEAUX

CHAPITRE 1. Étude bibliographique

Tableau 1.1. Composition approximative du riz paddy et de ses fractions d'usinage à 14% d'humidité	12
Tableau 1.2. Teneur en vitamines et minéraux du riz paddy et de ses fractions d'usinage à 14% d'humidité	12
Tableau 1.3. Composition approximative du soja.....	18
Tableau 1.4. Liste des substances biologiquement actives et des composés responsables de la saveur/odeur des graines de soja, propriétés biologiques et procédés d'élimination.....	21
Tableau 1.5. Composition de quelques aliments typiques à base de soja	25
Tableau 1.6. Besoins quantitatifs des apports alimentaires du jeune enfant.....	29
Tableau 1.7. Quantités de bouillies à consommer en fonction de leur densité énergétique	29
Tableau 1.8. Les principaux genres de bactéries lactiques	33

CHAPITRE 2. Matériels et méthodes

Tableau 2.1. Composition des milieux M.R.S. en grammes qsp/l	43
---	----

CHAPITRE 3. Caractérisation des matières premières et essais préliminaires

Tableau 3.1. Composition chimique des matières premières	59
Tableau 3.2. Teneurs en oses solubles des matières premières	60
Tableau 3.3. Pourcentage de particules des farine de taille inférieure à 106 et à 180 µm	60
Tableau 3.4. Mesure du taux d'amidon endommagé en fonction de la durée de cuisson à ébullition des suspensions de farines	63

CHAPITRE 4. Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children

Tableau 4.1. Chemical analysis of the rice-soybean flour and fermented gruels	76
--	----

CHAPITRE 5. Fermentation by *Lactobacillus plantarum* A6 of rice/soybean slurries pre-treated by high pressure homogenisation to prepare high energy density complementary food

Tableau 5.1. Damaged starch rate, soluble matter, apparent viscosity and Bostwick flow of slurries	92
---	----

Introduction

Dans les pays en développement, les bouillies destinées à l'alimentation complémentaire du jeune enfant ne répondent pas souvent aux critères de qualité nutritionnelle et sanitaire, tels que recommandés par les organisations internationales (Trèche and Mbome 1999 ; FAO/WHO Codex, 1994). En particulier, l'insuffisance de leur densité énergétique et leur mauvais équilibre en nutriments et en micronutriments sont des causes majeures de malnutrition protéino-énergétique, ayant des implications négatives à long terme sur la santé et le développement de l'enfant (Michaelson and Friss, 1998), avec les prévalences les plus fortes en Asie du Sud-est et en Afrique sub-saharienne (UNICEF, 1997). De surcroît, des aliments préparés dans de mauvaises conditions hygiéniques sont responsables de diarrhées aiguës. Pour proposer des solutions technologiques qui tiennent compte des exigences particulières des jeunes enfants et des contextes socioculturels, différentes voies alimentaires d'amélioration nutritionnelle des bouillies infantiles sont étudiées dans le cadre de l'UR 106 "Nutrition, Alimentation, Sociétés".

La transformation par voie fermentaire de matières premières amylacées, en vue d'élaborer des bouillies infantiles de qualité, est actuellement étudiée par l'IRD et ses partenaires dans le contexte burkinabé (modèle "petit mil") et mexicain (modèle "maïs"). Ces études s'intéressent aux pratiques traditionnelles et visent à améliorer des procédés déjà existants. Dans d'autres contextes, d'autres modes de transformation sont envisageables. Ainsi, en Asie du Sud-est, tel qu'au Vietnam, la production par voie non fermentaire de farines à base de riz destinées à la préparation de bouillies est l'objet d'un programme de développement impliquant l'IRD et le GRET, alors que la voie fermentaire n'a pas encore été explorée. Bien que la technologie de la cuisson-extrusion utilisée dans le cadre du programme cité permette de préparer une farine de bonne qualité sanitaire, la mise au point de farines fermentées ou de produits de consistance semi liquide et de haute valeur nutritionnelle par la voie de la fermentation lactique est une alternative que nous nous proposons d'explorer dans le cadre de cette thèse. Il est admis par les organisations internationales que la fermentation lactique permet de conférer aux aliments une bonne qualité sanitaire et nutritionnelle (FAO/WHO, 1995). La mise au point de nouveaux produits pourrait permettre de diversifier l'offre de produits destinés à l'alimentation complémentaire, de créer de nouveaux débouchés pour les ressources locales et aussi des perspectives de création d'activités économiques.

La mise au point d'un nouvel aliment de complément pourra se baser sur les ressources locales en Asie du Sud-est telles que le riz pour l'amidon et le soja pour son apport en

protéines. Le choix de ces matières premières est motivé par leur disponibilité et leur grande acceptation par les consommateurs locaux. Concernant le soja, il faudra prendre en considération la présence d' α -galactosides (raffinose, stachyose) responsables de désordres intestinaux (flatulence) qui sont susceptibles d'être hydrolysés par les bactéries lactiques.

Enfin, les connaissances fondamentales développées par l'IRD dans le domaine des fermentations lactiques traditionnelles, et plus particulièrement sur les bactéries lactiques amylolytiques (Rodriguez-Sanoja *et al.*, 2000) permettent d'envisager des études à vocations plus finalisées et appliquées. Les bactéries lactiques amylolytiques, ont ainsi fait l'objet de nombreuses études à l'IRD qui ont récemment donné lieu à la soutenance de deux thèses (Rodriguez-Sanoja, 2001 ; Calderon, 2001) et au dépôt de trois brevets (Loiseau *et al.*, 2000 ; Raimbault *et al.*, 2000 ; Guyot *et al.*, 2000).

Cette thèse portera sur l'étude des conditions qui permettent d'aboutir aux meilleures combinaisons matières premières/souches fermentaires/procédés, en vue d'élaborer des bouillies infantiles à haute valeur nutritionnelle. Elle se situe dans un contexte qui dépasse largement celui du Vietnam, et répond à une problématique de développement dans le domaine de la nutrition publique, se fondant sur les recommandations de l'OMS et de la FAO. Les résultats de cette recherche pourront ensuite faire l'objet d'étapes ultérieures de développement (amélioration de la formulation par fortification en micronutriments, étude de la résilience des produits aux contaminations par des microorganismes, production pilote, adaptabilité du procédé aux conditions locales, conditionnement et acceptabilité du produit, *etc.*) pour porter le concept au stade de la réalisation.

Objectif général :

Déterminer les conditions d'utilisation des bactéries lactiques amylolytiques combinées à différents procédés technologiques pour proposer de nouvelles voies d'élaboration d'aliments à haute densité énergétique à base de mélange de riz et de soja pour l'alimentation complémentaire du jeune enfant.

Objectifs particuliers :

Etude de la capacité naturelle des bactéries lactiques amylolytiques à hydrolyser et à fermenter les farines de riz seules ou en combinaison avec du soja.

Etude des conditions qui permettent de favoriser l'hydrolyse de l'amidon du mélange étudié.

Elaboration d'une ou de plusieurs voies biotechnologiques d'obtention d'une bouillie de forte densité énergétique pour l'alimentation complémentaire du jeune enfant.

Hypothèses

- La première hypothèse de travail repose sur la capacité de bactéries lactiques amylolytiques (BLA) à hydrolyser les amidons de matières premières amylacées.
- La seconde hypothèse repose sur le postulat que la capacité limitée d'hydrolyse des amidons natifs par les BLA ne peut être qu'utilisée à des fins utiles pour élaborer des bouillies à forte teneur en matière sèche et de haute densité énergétique, qu'à la condition de mettre en œuvre en amont et/ou en aval de la fermentation des procédés complémentaires, couramment utilisés en industrie agroalimentaire et pouvant être transférables dans les conditions de travail de certains pays en développement. Quatre types de procédés seront explorés selon différents types de combinaisons : cuisson (gélatinisation), homogénéisation à haute pression, atomisation, lyophilisation.

La présentation de ce travail est divisée en 6 chapitres :

Le chapitre 1 est une introduction bibliographique dont les objectifs sont de décrire l'importance du riz, du soja, ainsi que ses produits dérivés, ses facteurs antinutritionnels et leur élimination ; de rappeler les aliments de complément du jeune enfant dans les pays en développement ; de rappeler l'importance des bactéries lactiques et de la fermentation lactique en nutrition humaine et enfin de détailler les causes et les modalités d'amélioration de la densité énergétique des bouillies pour les jeunes enfants.

Le chapitre 2 résume les matériels, le plan d'expérience et les méthodes analytiques utilisés dans le cadre de ce travail.

Le chapitre 3 présente les caractéristiques des matières premières utilisées et les essais préliminaires.

Le chapitre 4 porte sur l'étude de l'effet de la gélatinisation sur la fermentation des bouillies. Pour cela, nous avons utilisé deux souches de *Lactobacillus plantarum* pour fermenter des bouillies à différentes teneurs en matière sèche.

Le chapitre 5 porte sur l'étude de l'effet de l'homogénéisation à haute pression sur la capacité de *Lactobacillus plantarum* A6 à fermenter le mélange riz/soja.

Dans le chapitre 6, au vu des résultats des deux chapitres précédents, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la réduction de la concentration en α -galactosides par l'utilisation de co-cultures de bactéries lactiques.

La dernière partie de ce mémoire a pour but de synthétiser, sous forme de conclusion générale, les différents résultats obtenus au cours de ce travail afin d'en extraire, d'une part, des lignes directrices pour l'élaboration d'une stratégie d'amélioration de la densité énergétique dans les aliment de complément pour les jeunes enfants à base de riz et de soja et, d'autre part, les perspectives de recherche restant à mener.

CHAPITRE 1

Étude bibliographique

1. Matières premières

Le riz et sa place dans l'alimentation

Le riz (*Oryza sativa* L.) est la céréale la plus consommée au monde après le blé. Il constitue la denrée alimentaire de base pour plus de la moitié de la population du globe (Juliano, 1994). Il occupe une place si importante en Asie que cela se répercute dans la langue. En chinois classique, le même terme sert à la fois pour désigner "riz" et "agriculture". Dans plusieurs langues officielles et dialectes locaux, le mot "manger" signifie "manger du riz". Enfin dans la sémantique orientale, les mots "riz" et "nourriture" sont équivalents.

En Asie, le riz fournit de 35 à 59% de l'énergie consommée par 2,7 milliards de personnes. En moyenne, 8% de l'énergie alimentaire proviennent du riz pour 1 milliard de personnes en Afrique et en Amérique latine. D'après les statistiques de la FAO (2004), les disponibilités de riz usiné par personne dans différents pays d'Asie représentent de 22 à plus de 73% de la fourniture totale d'énergie alimentaire.

1.1. Structure du grain de riz

Le grain de riz (riz paille ou paddy) comporte une enveloppe protectrice appelée la balle et un caryopse ou fruit (riz brun, riz cargo ou riz décortiqué) (Juliano and Bechtel, 1985). La balle constitue environ 20% du poids du paddy, les valeurs varient de 16 à 28%.

Le riz cargo comprend de l'extérieur vers l'intérieur : les couches externes du péricarpe, le tégument et le nucelle, ainsi que le germe ou embryon (tissu maternel) et l'albumen (l'endosperme). L'albumen comprend la couche de cellules à aleurone, l'albumen proprement dit étant composé de la couche subaleurone et de la substance interne amylacée. La couche d'aleurone recouvre l'embryon. La pigmentation se limite au péricarpe (Juliano et Bechtel, 1985).

Le poids se répartit ainsi dans le riz cargo : péricarpe (1-2%) ; aleurone plus nucelle et tégument (4-6%) ; germe (1%) ; scutellum (2%) ; albumen (90-91%) (Juliano, 1972).

Les polysaccharides non amylacés (fibres et polyholosides hydrosolubles) des membranes cellulaires jouent un rôle important dans l'intégrité du grain d'amidon lors de l'usinage, mais aussi lors de la cuisson lorsqu'ils n'ont pas été complètement éliminés après usinage du riz (Juliano, 1985a). La couche subaleurone est riche en protéines et lipides. Les cellules de l'albumen amylacé, avec une membrane mince mais riche en cellulose (Evers et Millar, 2002) sont essentiellement constituées d'amyloplast, contenant des grains d'amidon et des corps protéiques.

1.2. Grain d'amidon - conséquences physico-chimiques des traitements hydrothermiques et mécaniques

• Grain d'amidon

L'amidon est le principal composé du riz usiné représentant environ 90% de matière sèche. Il se présente sous forme de granules polyédriques dont la taille varie de 3 à 8 microns (Duprat *et al.*, 1980). C'est un polymère du D glucose à liaison α -(1-4) et il se compose habituellement d'une fraction essentiellement linéaire : l'amylose, et d'une fraction ramifiée : l'amylopectine. Les points de ramification sont des liaisons α -(1-6).

Sur la base de normes colorimétriques d'absorption des complexes iode-amidon de 590 à 620 nm, le riz usiné est classé selon sa teneur en amylose apparente comme suit : cireux (1 à 2%), amylose très basse (2 à 12%), amylose basse (12 à 20%), amylose intermédiaire (20 à 25%) et amylose élevée (25 à 33%) (Juliano, 1985b).

• Conséquences physico-chimiques des traitements hydrothermiques

Du fait de sa structure chimique fortement hydrophile, l'amidon présente un comportement intimement lié à sa teneur en eau. A température ambiante, les grains d'amidon natif sont insolubles dans l'eau. Ceci est dû à sa nature cristalline et globulaire. Après dispersion dans l'eau froide, les grains présentent un faible gonflement dû à l'absorption d'eau dans les parties amorphes. A des températures supérieures à 55-60°C, en présence d'un excès d'eau, apparaît le phénomène irréversible de la gélatinisation dû à la rupture des liaisons hydrogènes inter-chaînes. Puis, au fur et à mesure que la température s'élève, le grain se disperse, l'amylose et l'amylopectine passent en solution colloïdale. Lors du refroidissement, il y a gélification puis rétrogradation soit une cristallisation partielle du réseau macromoléculaire (figure 1.1).

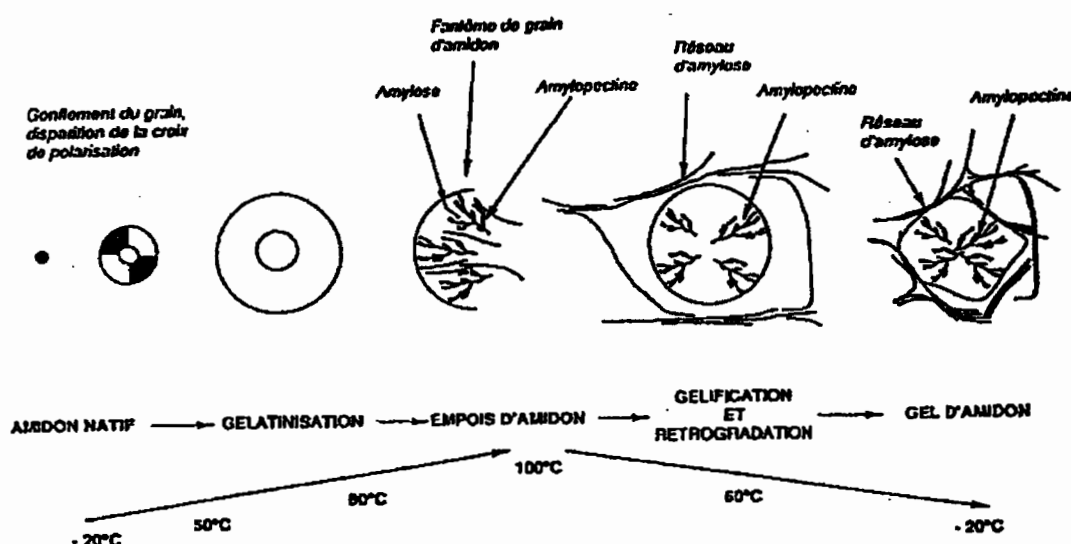


Figure 1.1. Influence du traitement hydrothermique sur l'état de l'amidon

❖ *Gélatinisation*

Lorsque la température d'une dispersion de grains d'amidon dans un large excès d'eau tend vers 60°C, l'eau pénètre dans les zones amorphes puis cristallines du grain, du fait de son absorption sur les groupements hydroxyles, provoquant ainsi le gonflement du grain d'amidon. L'analyse du phénomène peut s'effectuer en observant la dépolarisation des grains en fonction de la température. Soumis à un chauffage en présence d'excès d'eau, l'amidon perd sa structure cristalline (disparition de la croix de biréfringence en lumière polarisée et du spectre de diffraction des rayons X, apparition d'un endotherme de fusion des cristallites en analyse enthalpique différentielle) (Colonna et Champ, 1990) : cette phase est appelée gélatinisation (ou empesage) de l'amidon (figure 1.1). La température de gélatinisation dépend des types d'amidon et de la taille des grains. Les petits grains commencent à gonfler à une température supérieure à celle des gros grains.

Au-delà de la température de fin de dépolarisation, le grain continue à gonfler. Ce gonflement, tangentiel, est tellement rapide et violent que le centre du grain forme une bulle. Lorsque les zones périphériques se relâchent cette bulle éclate et le gonflement continue de façon dissymétrique et hétérogène. Alors commence la dispersion et ce sont d'abord les molécules d'amylose de faible poids moléculaire qui diffusent hors du grain.

La température de gonflement n'est pas affectée par le rapport amylose/amylopectine. Pour des températures voisines de 100°C, le gonflement est régulier et la masse glucidique "solubilisée" s'accroît. Dans tous les cas, une dispersion complète de l'amidon granulaire ne s'obtient qu'après un autoclavage vers 120-130°C durant plusieurs heures, et même après un tel traitement certains amidons peuvent encore rester intacts (amidon de pois ridé, riche en amylose) (Duprat *et al.*, 1980).

Si l'amidon est chauffé en présence d'une quantité d'eau limitée (environ 100% w/w), l'attaque hydrothermique se résume à une décristallisation, le grain gonfle de façon limitée et la masse solubilisée reste faible. On obtient un milieu pâteux. Au-dessous de 70% d'hydratation, la décristallisation ne s'opère plus (Duprat *et al.*, 1980).

❖ *Gélification et rétrogradation*

Lorsque la gélatinisation est totale et qu'il ne reste plus de traces de l'organisation granulaire, l'amylose et l'amylopectine forment une dispersion colloïdale.

Le refroidissement d'un empois d'amidon conduit à l'apparition d'un "gel viscoélastique"

dans lequel les granules gonflés riches en amylopectine consolident la matrice gélifiée d'amylose. Il se forme alors un gel constitué de deux phases, une phase continue et l'autre discontinue. La phase continue correspond au réseau tridimensionnel formé par les chaînes amylopectinées et la phase discontinue est constituée d'eau et de "fantômes" de grains d'amidon enrichis en amylopectine. La rétrogradation se déroule en deux temps : formation d'un gel opaque, souple d'abord, puis rigide et rétracté par élimination de l'eau et réorganisation des chaînes sous forme cristallisée (Godon, 1990). Ce phénomène augmente d'ailleurs avec le temps et avec la diminution de la température. La rétrogradation est plus rapide vers +4°C et conduit à une cristallisation partielle des chaînes en cristaux de type "B" (Duprat *et al.*, 1980).

Cette recristallisation induit :

- une diminution de la susceptibilité aux hydrolyses enzymatiques par les amylases (Kainuma *et al.*, 1981),
- une baisse du gonflement et de la solubilité des granules d'amidon,
- l'apparition d'un nouvel endotherme de gélatinisation de l'amidon rétrogradé.

De nombreux paramètres influencent la cinétique de rétrogradation de l'amidon :

- l'origine botanique de l'amidon,
- l'intensité du traitement thermique : plus le traitement est intense, plus la rétrogradation sera rapide et importante,
- la température de stockage du gel : la vitesse et l'intensité de la rétrogradation présentent un optimum aux environs de 0°C,
- la teneur en eau : un maximum de cristallisation est obtenu pour des teneurs en matières sèches du gel de 30 à 60%,
- les lipides : l'adjonction de lipides ralentit le phénomène de rétrogradation, phénomène qui n'est pas seulement lié à la complexation de l'amylose dans la mesure où les triglycérides comme les mono glycérides ralentissent la rigidification d'un gel.

- Conséquences physico-chimiques des traitements mécaniques

Douzals *et al.*, (1996, 1998) affirment que l'homogénéisation haute pression induit la gélatinisation de l'amidon. Le mécanisme comprend deux étapes semblables à la gélatinisation par traitement hydrothermique. Dans la première étape, les zones amorphes sont hydratées causant un gonflement des granules et une déformation des zones cristallines. Dans la deuxième étape, les zones cristallines sont devenues plus accessibles à l'eau.

A d'autres égards, la gélatinisation induite par la pression et la gélatinisation par voie hydrothermique sont différentes. Pendant la gélatinisation par traitement hydrothermique, beaucoup de changements interviennent simultanément ou successivement, incluant le gonflement de granule, la perte de la croix de biréfringence, l'augmentation de la viscosité et la fragmentation du granule. Typiquement, la gélatinisation de l'amidon induite par la pression limite le gonflement des granules (Stute *et al.*, 1996). La pressurisation permet de gélatiniser l'amidon sans rétrogradation (Ezaki and Hayashi, 1992 ; Stute *et al.*, 1996 ; Douzals *et al.*, 1998).

La gamme de pression dans laquelle la gélatinisation est observée dépend des types d'amidon (Stute *et al.*, 1996). L'eau joue un rôle important dans la gélatinisation induite par la pression (Hibi, Matsumoto et Hagiwara, 1993 ; Snauwaert et Heremans, 1999). D'autres paramètres hormis la teneur en eau et le type d'amidon influençant la gélatinisation sont la pression, la température, et le temps de traitement. Travaillant avec environ 5% d'amidon de blé, de tapioca et de pomme de terre, Bauer et Knorr (2005) observent que le degré de gélatinisation augmente avec l'augmentation de la pression. Selon Bauer et Knorr (2005), à 39°C, la gélatinisation induite par la pression n'a pas différé considérablement de celle mesurée à 29°C. À 48°C et plus particulièrement à 57°C, l'effet de la température était beaucoup plus marqué avec la gélatinisation intervenant sur une gamme de pression plus faible. Néanmoins, l'effet de la pression était apparent à des températures élevées mais inférieures à la température de gélatinisation.

1.3. Valeur nutritionnelle du riz

Avant consommation, le riz est décortiqué (séparation de la balle du caryopse). Il peut ensuite être usiné pour ôter les couches externes de l'albumen et du germe. Suivant le degré d'usinage du riz, les proportions de fibres, lipides, protéines et minéraux varient (tableau 1.1).

Le tableau 1.2 indique que le riz contient une quantité non négligeable de thiamine, riboflavine, niacine, vitamine E et autres nutriments. Le riz ne contient pas de vitamine C, D ou A. En raison de la quantité consommée, c'est la principale source d'énergie, de protéines, de fer, de calcium, de thiamine, de riboflavine et de niacine dans le régime alimentaire en Asie.

Tableau 1.1. Composition approximative du riz paddy et de ses fractions d'usinage à 14% d'humidité.

Fractions du riz	Protéines brutes (gNx5,95)	Lipides bruts (g)	Fibres brutes (g)	Principaux minéraux bruts (g)	Glucides digestibles (g)	Fibres détergentes neutres (g)	Teneur en énergie		Densité	Densité volumétrique (g/ml)
							(kJ)	(kcal)		
Paddy	5,8-7,7	1,5-2,3	7,2-10,4	2,9-5,2	64-73	16,4-19,2	1580	378	1,17-1,23	0,56-0,64
Riz cargo	7,1-8,3	1,6-2,8	0,6-1,0	1,0-1,5	73-87	2,9-3,9	1520-1610	363-385	1,31	0,68
Riz usiné	6,3-7,1	0,3-0,5	0,2-0,5	0,3-0,8	77-89	0,7-2,3	1460-1560	349-373	1,44-1,46	0,78-0,85
Son de riz	11,3-14,9	5,0-19,7	7,0-11,4	6,6-9,9	34-62	24-29	1670-1990	399-476	1,16-1,29	0,20-0,40
Balle de riz	2,1-2,8	0,3-0,8	34,5-45,9	13,2-21,0	22-34	66-74	1110-1390	265-332	0,67-0,74	0,10-0,16

Sources : Eggum, Juliano et Maniñgat, 1982 ; Pedersen et Eggum, 1983 ; Juliano, 1985b

Tableau 1.2. Teneurs en vitamines et en minéraux du riz paddy et de ses fractions d'usinage à 14% d'humidité.

Fractions du riz	Thiamine (mg)	Riboflavine (mg)	Niacine (mg)	Tocophérol alpha (mg)	Calcium (mg)	Phosphore (g)	Phytine P (g)	Fer (mg)	Zinc (mg)
Paddy	0,26-0,33	0,06-0,11	2,9-5,6	0,90-2,00	10-80	0,17-0,39	0,18-0,21	1,4-6,0	1,7-3,1
Riz cargo	0,29-0,61	0,04-0,14	3,5-5,3	0,90-2,50	10-50	0,17-0,43	0,13-0,27	0,2-5,2	0,6-2,8
Riz usiné	0,02-0,11	0,02-0,06	1,3-2,4	tr-0,30	10-30	0,08-0,15	0,02-0,07	0,2-2,8	0,6-2,3
Son de riz	1,20-2,40	0,18-0,43	26,7-49,9	2,60-13,3	30-120	1,1-2,5	0,9-2,2	8,6-43,0	4,3-25,8
Balle de riz	0,09-0,21	0,05-0,07	1,6-4,2	0	60-130	0,03-0,07	0	3,9-9,5	0,9-4,0

Sources : Pedersen et Eggum, 1983 ; Juliano, 1985b . tr = traces.

1.4. Facteurs antinutritionnels et leur élimination

Les facteurs antinutritionnels du grain de riz sont concentrés dans la fraction constituant le son (l'embryon et la couche de cellules à aleurone). Ils comprennent la phytine (phytate), l'inhibiteur de la trypsine, l'oryzacystatine et l'hémagglutinine-lectine. Tous, à l'exception de l'oryzacystatine, ont déjà été passés en revue (Juliano, 1985b).

La phytine (phytate) se trouve en globoïdes de 1 à 3 μm dans l'aleurone et les corps protéiques de l'embryon sous forme de sel de potassium ou de magnésium. Ses groupes phosphates peuvent aisément provoquer la chélation avec des cations tels que le calcium, le zinc, le fer ainsi qu'avec des protéines. La phytine est thermostable et est à l'origine du bilan médiocre en minéraux observé chez les sujets nourris de riz cargo, par rapport à celui de sujets nourris de riz usiné (Miyoshi *et al.*, 1987a, 1987b).

Un inhibiteur de la trypsine a également été isolé et caractérisé à partir du son de riz (Juliano, 1985b). L'inhibiteur partiellement purifié est stable à pH acide ou neutre et il conserve plus de 50% de son activité après 30 minutes d'incubation à 90°C à pH 2 et 7. Le passage à la vapeur du son de riz pendant six minutes à 100°C inactive l'inhibiteur de la trypsine, mais le séchage à sec à 100°C pendant un maximum de 30 min n'est pas aussi efficace. L'inhibiteur est localisé à raison de 85 à 95% dans l'embryon et de 5 à 10% dans le son exempt de germe, il est absent dans le riz usiné.

Les hémagglutinines (lectines) sont des globulines qui agglutinent les hématies des mammifères et précipitent les glycoconjugués ou les polysides. La toxicité des lectines est due à leur aptitude à se lier à des sites de récepteurs de glucides spécifiques sur les cellules de la muqueuse intestinale et à perturber l'absorption des nutriments à travers la paroi intestinale. La lectine du son de riz se lie d'une manière spécifique au 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (Poola, 1989). Elle est stable pendant deux heures à 75°C mais perd rapidement son activité après 30 minutes à 80°C ou 2 minutes à 100°C (Ory, Bog-Hansen et Mod, 1981). La lectine du riz agglutine les hématies humaines des groupes A, B et O. Elle est située dans l'embryon, mais elle a des récepteurs aussi bien dans l'embryon du riz que dans l'albumen (Miao et Tang, 1986).

L'oryzacystatine est un inhibiteur (cystatine) de la protéinase à cystéine (globuline) provenant de la semence du riz, et c'est probablement le premier membre bien défini de la famille des cystatines d'origine végétale (Kondo, Abe et Arai, 1989). L'incubation à pH 7 pendant 30 minutes à 100°C n'a aucun effet sur son activité, mais l'inhibition tombe à 15% à 110°C et à 45% à 120°C. L'oryzacystatine réalise effectivement l'inhibition des protéinases à cystéine telles que la papaïne, la ficine, la chymopapaïne et la cathepsine C. Elle n'a aucun

effet sur les protéinases à sérine (trypsine, chymotrypsine et subtilisine) ni sur la protéinase carboxyle (pepsine).

Une protéine allergène du grain de riz, qui provoque au Japon un eczéma constitutionnel associé à la consommation de riz, est une alpha-globuline et accuse une immunoréactivité stable (60%) même après avoir été portée à 100°C pendant 60 minutes (Matsuda *et al.*, 1988). Cette protéine est présente surtout dans le riz usiné plutôt que dans le son. On peut préparer des grains de riz hypo allergènes en laissant incuber le riz usiné dans de l'actinase pour hydrolyser les globulines en présence d'un tensioactif à pH alcalin (Watanabe *et al.*, 1990a) puis en effectuant un lavage. La couleur du grain traité est améliorée par un traitement à l'acide chlorhydrique à 0,5 N et par un lavage à l'eau (Watanabe *et al.*, 1990b).

1.5. Problèmes nutritionnels dans les pays consommateurs du riz

La situation nutritionnelle dans les pays consommateurs de riz varie en fonction de facteurs interdépendants touchant les conditions socio-économiques, le milieu culturel, l'environnement et le régime alimentaire.

Parmi les principaux problèmes nutritionnels qui se posent dans les pays consommateurs de riz, le plus important est un apport alimentaire insuffisant et déséquilibré. Associé à d'autres facteurs défavorables, il conduit à une prévalence très répandue de malnutrition protéino-énergétique (MPE), d'anémie nutritionnelle, en particulier d'anémie ferriprive, d'avitaminose A et de troubles dus à une carence en iode (Chong, 1979 ; Khor, Tee et Kandiah, 1990 ; FAO, 2004). En outre, une carence du régime alimentaire en thiamine, riboflavine, calcium, vitamine C et zinc est répandue dans de nombreuses régions, mais souvent elle ne se manifeste pas sous la forme d'un syndrome clinique patent.

Ces problèmes nutritionnels n'ont aucune relation directe de cause à effet avec la consommation de riz, mais ils reflètent l'impact global de plusieurs conditions analogues à celles que l'on rencontre dans d'autres pays en développement où le riz n'est pas une denrée alimentaire de base.

1.6. Amélioration de la qualité du riz par la fermentation

Dans de nombreux pays, des études sont menées soit pour diversifier les produits obtenus à partir du riz en vue d'améliorer leurs qualités nutritives et organoleptiques, soit pour améliorer la qualité des produits traditionnels. Beaucoup de ces produits traditionnels sont obtenus après fermentation du riz.

Certains sont des aliments solides comme l'*idli*, les *dosas*, l'*appams*, l'*arroz fermentado*, d'autres sont des boissons (bières de riz, vins de riz) ou des additifs (*angkak*).

Les produits fermentés à base de riz sont largement consommés en Asie, car ils appartiennent à la cuisine traditionnelle. Leur fabrication est le plus souvent familiale voire artisanale, les procédés utilisés sont empiriques, simples et peu coûteux en énergie.

En plus des modifications de texture, de couleur, de goût et d'odeur, la fermentation du riz présente un intérêt nutritionnel évident : taux élevé de protéines, disparition de facteurs antinutritionnels.

Les aliments fermentés

C'est en Inde que l'on prépare deux des aliments fermentés à base de riz les plus savoureux et les plus intéressants du point de vue nutritionnel : l'*idli* et les *dosas*. L'*idli* se présente sous la forme de petits pains légers, mangés chauds avec un chutney. L'*idli* et les *dosas* sont faits avec la même pâte, un mélange de riz et de haricots mung (ou de pois chiches) trempés, écrasés, puis fermentés pendant une douzaine d'heures.

Dans la région de Madras, ce sont des *appams* que l'on sert au premier repas de la journée. Ils ressemblent à l'*idli*, mais sont faits uniquement avec du riz. Ils sont cuits dans les *chatties*, récipients spéciaux faits de deux plats en terre placés l'un sur l'autre.

Le riz est cultivé dans le monde entier, mais les techniques de fermentation sont les plus souvent utilisées par les peuples asiatiques. Cependant en Equateur, on consomme l'*arroz fermentado*. L'*arroz fermentado* est du riz fermenté pendant une huitaine de jours puis séché, le riz prend une coloration jaune caractéristique. L'*arroz fermentado* sert à la préparation du riz "sec", dont les grains se détachent parfaitement alors que le riz non fermenté est plus collant. Le "riz sec" est normalement présent à chaque repas. Le fait que la fermentation réduise le temps de cuisson est un avantage particulièrement appréciable en Equateur où, en raison de l'altitude, la température d'ébullition de l'eau est inférieure à 100°C (Aubert, 1985).

Le *tapé* et l'*amassaké* sont deux aliments fermentés, préparés l'un en Indonésie et l'autre au Japon. En deux jours, sous l'action d'un levain préparé préalablement, le riz est transformé en un aliment à la fois sucré et légèrement acidulé. Consommés à ce stade, le *tapé* et l'*amassaké* sont d'excellents desserts, particulièrement sains puisque constitués exclusivement de riz. Si on prolonge la fermentation, une partie des oses fermentescibles obtenues à partir de l'amidon se transforme en éthanol, le *tapé* et l'*amassaké* sont les premiers stades de la fabrication du *tapuy* et du *saké*, deux boissons à base de riz (vin de riz).

Des produits similaires sont préparés dans d'autres pays d'Asie, tel le *lao-chao* chinois, qui a la réputation de redonner de la force aux femmes qui viennent d'accoucher (Aubert, 1985, Sanchez *et al.*, 1989).

Les bières et vins de riz asiatiques

La bière de riz a subi, au Japon, la même évolution que la bière d'orge en Europe. Au départ, c'était une boisson familiale ou du moins artisanale, nutritive et faiblement alcoolisée. Elle était trouble et contenait des particules de riz. Le *saké* a été peu à peu transformé pour devenir une boisson fortement alcoolisée (15 à 16% d'alcool). Il a perdu une grande partie de sa valeur nutritive. L'*amassaké* est plus proche des bières de céréales traditionnelles que le saké proprement dit.

Les bières de riz indiennes - *pachwai*, *madhu* et *ruhi* - (acides et faiblement alcoolisées) s'apparentent aux bières de sorgho ou de maïs. Le *madhu*, fabriqué par les populations tribales de l'Est de l'Inde, est souvent consommé au petit déjeuner.

Dans chaque pays d'Asie, on trouve une ou plusieurs bières de riz : le *topai* en Malaisie, le *topuy* aux Philippines, le *yakju* et le *takju* en Corée, la bière *thai* en Thaïlande, etc. Ces bières ressemblent aux bières de riz indiennes (Aubert, 1985).

Le "vin" de riz le plus connu en Europe est le *saké* japonais (Yoshizawa et Kishi., 1985). La principale caractéristique réside dans l'utilisation d'un levain appelé *koji* (une culture d'*Aspergillus oryzae* sur de l'amidon de riz). L'action du *koji* est comparable à celle du maltage en brasserie. Pour le *saké* la fermentation et l'hydrolyse de l'amidon et des autres substances se font simultanément. Le produit final ainsi obtenu (*moromi*) peut titrer jusqu'à 16% v/v d'éthanol.

Le condiment à base de riz- (*angkak*)

Le riz rouge fermenté - appelé "*angkak*" à Taiwan, aux Philippines et à Singapour, «riz rouge» en Chine, *beni-koji* au Japon- est un produit obtenu en ensemençant du riz avec un champignon du genre *Monascus* (Leistner, 1994).

Ce produit est plus un condiment qu'un aliment. Après la fermentation, le riz est séché, puis broyé en farine et utilisé pour colorer en rouge d'autres aliments (produits carnés, fromages, etc.)

Autres produits fermentés à base de riz

Le "lait" de riz a été utilisé comme succédané du lait liquide et du lait en poudre d'origine animale (Lin, Shao et Chiang, 1988). Le lait de riz contient 87,7% d'humidité, 10,4% de glucides, 0,8% de protéines, 0,8% de lipides, 0,1% de fibres brutes et 0,1% de principes minéraux et, la teneur totale en matières sèches est de 11% et la viscosité est de moins de 3 poises. L'emploi d'amylases bactériennes pour hydrolyser l'amidon peut accroître la teneur du lait en matières sèches sans en augmenter indûment la viscosité (Mitchell *et al.*, 1988).

Le vinaigre de riz résulte de l'achèvement de la fermentation de l'amidon de riz, et c'est un produit japonais et chinois traditionnel (Iwasaki, 1987). La fermentation acétique s'effectue pendant un à trois mois après mélange de vinaigre de fruits et du vin de riz. Le produit est mûré, filtré, pasteurisé et embouteillé (Lai, Chang et Luh, 1980). Son acidité totale est de 4 à 5% (sous forme principalement d'acide acétique, auquel s'ajoutent un peu d'acide lactique et d'acide succinique). La production de vinaigre de riz était de 40 000 kL au Japon en 1983 (Tani, 1985) et de 52 000 kL en 1986 (Sagara, 1988).

Le soja

Le soja, *Glycine max* (L.) Merrill, est cultivé et consommé depuis presque 5 000 ans, d'abord en Chine, puis il s'est répandu dans les pays d'Extrême Orient (Smith et Circle 1972 ; Horan 1974). Les graines de soja sont riches en protéines et constituent un produit de substitution à faible coût des produits d'origine animale et des poissons, comme source de protéines dans l'alimentation. La teneur en lipides du soja est plus élevée que celle des graines de céréales et de la plupart des autres légumineuses, le soja est par conséquent, une bonne source d'énergie. Au 20^{ème} siècle, la culture du soja s'est largement répandue avec de nombreuses utilisations. Aujourd'hui, le grain de soja constitue bien plus de la moitié de la production mondiale de grains oléagineux. Les premiers producteurs sont les Etats-Unis suivis du Brésil, de l'Argentine et de la Chine.

Les bienfaits potentiels du soja pour la santé sont devenus un sujet de plus en plus populaire dans les revues de santé et les grands médias. Les consommateurs font face à un barrage d'allégations selon lesquelles un régime alimentaire riche en soja et en produits à base de soja réduit le risque de développer une myriade de maladies - cancers hormonodépendants, maladies cardiovasculaires, ostéoporose, etc.

1.7. Composition chimique et valeur nutritionnelle

Les constituants d'intérêt majeur du soja (tableau 1.3), sont les lipides et les protéines qui constituent environ 55% de la matière sèche du grain et des glucides pour 25%, dont des polyholosides comme le saccharose (5%), le stachyose (3,8%) et le raffinose (1,1%).

L'huile de soja est intéressante pour l'alimentation humaine. Elle offre la plus haute teneur en acides gras poly-insaturés, en acides linoléiques et en acide linoléique. Sa haute teneur ($\approx 7\%$) en acide linoléique (acide gras essentiel) donne à huile de soja une valeur nutritive supérieure à celle des autres huiles végétales.

Tableau 1.3. Composition approximative du soja (pour 100 g)

Nutriments	Unités	Soja cru	Soja cuit
Eau	g	8,54	62,55
Energie	kcal	416	173
Protéines	g	36,49	16,64
Lipides totaux	g	19,94	8,97
Glucides	g	30,16	9,92
Fibres totales	g	9,31	6
Minéraux			
Calcium	mg	277	102
Fer	mg	15,10	5,14
Magnésium	mg	280	86
Phosphore	mg	704	245
Potassium	mg	1797	515
Sodium	mg	2	1
Zinc	mg	4,89	1,15
Cuivre	mg	1,66	0,41
Manganèse	mg	2,52	0,82
Sélénium	µg	17,8	7,3
Vitamines			
C	mg	6	1,7
B-1 (thiamine)	mg	0,87	0,16
B-2 (riboflavine)	mg	0,87	0,29
B-3 (niacine)	mg	1,62	0,40
B-5 (acide pantothénique)	mg	0,79	0,18
B-6 (pyridoxine)	mg	0,38	0,23
Acide folique	µg	375	54
B-12	µg	0	0
A	I.U	24	9
A	µg	2	1
E	µg	1,95	1,95
Lipides			
Acides gras saturés	g	2,88	1,30
Acides gras mono insaturés	g	4,40	1,98
Acides gras poly insaturés	g	11,26	5,06
Acide linoléique (18 : 2)	g	9,93	4,47
Acide alpha linoléique (18 : 3)	g	1,33	0,60
Cholestérol	mg	0	0

Source : USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (November 1999)

En effet, cet acide présente l'avantage de réduire la cholestérolémie (Anderson *et al.*, 1995; Erdman, 1995 ; Simon, 1995 ; Wong *et al.*, 1998), diminuant ainsi le risque de maladies cardio-vasculaires (WHO 1990 ; Messink et Katan 1992). Cette haute teneur en acides gras poly insaturés rends cette l'huile plus sensible à l'oxydation (Asiedu, 1991).

La graine de soja constitue une excellente source de protéines hautement digestibles (92-100%) (FAO/WHO, 1991 ; Liu, 1999). Les protéines de la graine de soja contiennent tous les acides aminés essentiels avec une teneur en méthionine relativement faible mais sont une bonne source de lysine (Liu, 1999). Le soja convient aux enfants et aux adultes et fournit une source de protéines alternative pour les personnes souffrant d'allergies alimentaires telles que l'allergie au lait de vache ou l'allergie aux œufs mais certaines personnes peuvent également développer une allergie au soja.

Le soja est également une source de composés biologiquement actifs appelés isoflavones dont on pense que, associés à la protéine de soja, ils jouent un rôle dans la prévention des maladies cardiaques (Anthony, 1996 ; Crouse, 1999).

Les isoflavones pourraient également jouer un rôle protecteur contre certains cancers (Lee *et al* 1991 ; Messina et Barne, 1991 ; Messina *et al.*, 1994 ; Liu, 1999) et être utiles dans le traitement des affections rénales et des diabètes (Dwyer, 1993 ; Anderson *et al.*, 1998 ; Liu, 1999).

Il a également été démontré que les isoflavones peuvent contribuer à diminuer le risque d'ostéoporose (Potter *et al*, 1998 ; Liu, 1999 ; Messina, 1999) et à soulager les symptômes de la ménopause chez certaines femmes (Liu, 1999 ; Messina, 1999).

Parmi les glucides non solubles de la graine de soja, les fibres de soja possèdent également des propriétés avantageuses et il a été démontré qu'elles réduisaient la cholestérolémie, ainsi que la glycémie chez les patients diabétiques. Les fibres de soja peuvent aussi contribuer à aider les patients souffrant de maladies diverticulaires et du cancer du colon (Lo *et al.*, 1986 ; Lo, 1990 ; Slavin, 1991 ; Liu, 1999).

Les graines de soja constituent une bonne source de phosphate, de magnésium, de cuivre, de vitamines B et d'acide folique. Elles sont également riches en calcium, en fer et en zinc. La biodisponibilité du calcium et du zinc dans les aliments à base de soja est relativement bonne (Messina, 1999). Lorsque le soja est intégré à un régime varié, l'état des minéraux n'est pas un problème.

1.8. Facteurs antinutritionnels et leur élimination

La valeur nutritive de la graine de soja brute ou insuffisamment cuite est faible en raison de la présence d'un certain nombre de facteurs antinutritionnels. Certaines des substances ont été identifiées. On peut citer des inhibiteurs de trypsine, des hémagglutinines, de l'uréase, des saponines, les composants à activité oestrogénique et la lipoxigénase (responsable du goût de haricot des produits dérivés du soja) (Asiedu, 1991). La liste des substances actives et des composés responsables de la saveur/odeur des graines de soja, leurs propriétés biologiques et les méthodes d'élimination sont présentés dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4. Liste des substances biologiquement actives et des composés responsables de la saveur/odeur
des graines de soja, propriétés biologiques et procédés d'élimination

Substances	Propriétés biologiques	Procédés d'élimination	Références
Inhibiteurs de trypsine	Synthèse et sécrétion accrues d'enzymes pancréatiques, hypertrophie pancréatique et inhibition de croissance	Traitement par la chaleur humide ; addition de protéases (Protéases à sérine)	Rackis <i>et al.</i> , 1979 Barbi, 1996, Gundel and Matrai, 1996
Uréase	Libération accrue d'ammoniaque ; intoxication	Dénaturation thermique par cuisson	Yin <i>et al.</i> , 1993
Hémagglutinines	Agglutination des globules rouges	Traitement par la chaleur humide ; digestion de pepsine	Lis <i>et al.</i> , 1966
Goitrogène	Hypertrophie de la glande thyroïde	Sterilisation à l'autoclave, complémentation en iode	Turner and Liener, 1975
Oestrogènes	Inhibition de croissance ; masse utérine accrue	Extraction par éthanol aqueux	Konijn <i>et al.</i> , 1973
Raffinose et stachyose	Flatulences	Trempage, germination ou fermentation	Perlman, 1965 ; Cristofaro <i>et al.</i> , 1974 ; Rackis., 1976
Phosphatidylcholine oxydée	Saveur Aigre	Traitement par la chaleur humide. Trempage.	Wolff, 1982
Acide linoléique et linolénique oxydés	Saveur aigre	Traitement thermique à 80°C des graines humides broyées , chauffage à sec des grains broyées puis cuisson par extrusion ; blanchiment des graines intactes ; trempage des graines dans l'alcool aqueux.	Sugimoto and Van Buren, 1970 ; Mital and Steinkraus, 1975, Kouzeh-Kanani <i>et al.</i> , 1982

1.9. Traitement thermique de la graine de soja

Le traitement thermique est la méthode la plus couramment utilisée pour réduire la quantité de facteurs antinutritionnels présents dans la graine de soja crue et dans les autres légumineuses. Lorsqu'une source de protéines est exposée à une chaleur excessive, la disponibilité de ses acides aminés et en particulier de la lysine, diminue. En outre, l'application d'un traitement inadéquat réduit la stabilité oxydative de la graisse contenue dans le grain (Kouzeh-Kanani *et al.*, 1981). Le contrôle des conditions de traitement préalablement à l'utilisation des graines dans les aliments devient nécessaire.

Les technologies existantes partagent un objectif commun : obtenir un produit homogène présentant une teneur résiduelle minimale en facteurs antinutritionnels, une qualité optimale de la protéine et une disponibilité élevée d'huile. Les procédés diffèrent quant aux variables appliquées (temps, température, pression, eau, superficie du grain exposé, taille des particules et type d'énergie utilisée).

Le traitement du grain présente un avantage supplémentaire dans le sens où il améliore la palatabilité du produit final. L'exposition à la chaleur développe des odeurs et des saveurs bénéfiques qui accroissent la consommation d'aliments. Cette amélioration peut être partiellement due à l'inactivation des lipoxygénases présentes dans le grain, ce qui favorise la qualité et la conservation du produit final (Kouzeh-Kanani *et al.*, 1982).

Les trois procédés les plus couramment utilisés pour le traitement de la graine de soja sont : i) l'autoclavage, ii) la torréfaction, sur des tambours rotatifs (Trommel), de lit fluidisé, à chambres en cascade, de micronisation, de jet-sploding et par micro-ondes et iii) l'extrusion à sec ou par voie humide.

Autoclavage

Kratzer *et al.* (1990) ont étudié l'effet de couples temps/température lors de l'autoclavage de la farine de soja sur la destruction des facteurs antinutritionnels et la solubilité des protéines. Les meilleurs résultats ont été obtenus à une température de 121°C pendant 24 minutes.

Herkelman *et al.* (1991) ont moulu des graines de soja pour les autoclaver à une température de 121°C pendant 0, 10, 20, 30, 40, 60 et 90 minutes dans des plateaux d'une épaisseur de 25 mm. Les auteurs indiquent que 30 minutes sont nécessaires pour réduire fortement l'activité uréasique (<0,20 unités de pH) et les inhibiteurs de trypsine (< 5 mg/g).

Anderson-Hafermann *et al.* (1992) ont procédé à l'autoclavage de graines de soja à 121°C jusqu'à 18 minutes, par paliers de 3 minutes. Une durée d'autoclavage de 15 minutes a suffi pour obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec de la farine de soja.

Yin *et al.* (1993) ont étudié au laboratoire la durée optimale d'autoclavage à 125°C et 0,1 MPa de pression. 5 minutes de traitement ont suffi pour faire disparaître l'activité uréasique et réduire les inhibiteurs de trypsine de 20 à 2,1 mg/g. En allongeant le temps de traitement jusqu'à 25 minutes, les teneurs en facteurs anti-trypsiques ont continué à diminuer (1,5 mg/g) mais la disponibilité de la lysine a baissé.

Torréfaction

Les procédés de torréfaction sont divers, ils utilisent soit la chaleur sèche, soit la chaleur humide avec ou non un laminage ou une expansion ultérieure.

Ordóñez & Palencia (1998) ont traité des graines de soja à sec au moyen d'un torréfacteur (Termal Processori Mario Tovar & Arturo Watemberg, Barranquilla, Colombie) à 113, 120, 130, 135 et 150°C. Avec cet équipement, le temps de séjour peut être ajusté en modifiant l'inclinaison du cylindre en fonction de la température souhaitée. Les temps de séjour étaient respectivement de 3,0 ; 4,5 ; 6,5 ; 7,0 et 9,5 minutes. L'activité inhibitrice de la trypsine a diminué, de 56300 unités/g pour des graines crues jusqu'à 8 850 unités/g pour des graines chauffées à sec à 113°C et inférieure à 5 000 unités/g pour les autres traitements. De la même manière, la solubilité des protéines dans la potasse a diminué de 94% pour les graines crues et jusqu'à 79% pour les graines chauffées à 135°C. Un traitement de 150°C pendant 9,5 minutes a réduit la solubilité à 69%. Les auteurs conseillent de ne pas dépasser une température de 130°C pendant 6,5 minutes.

Les technologies de torréfaction les plus modernes utilisent le système de "lit fluidisé", basé sur l'application contrôlée (temps et température) d'air surchauffé et pressurisé qui passe entre les graines. La principale différence par rapport au tambour rotatif réside dans l'absence de contact entre les graines et des zones très chaudes. Le traitement permet de travailler avec des grains moulus, réduisant la température appliquée de près de 6°C par rapport aux traitements classiques, améliorant ainsi la qualité du produit (Bates, 1994).

Osella *et al.* (1997) ont étudié les effets du taux d'humidité initial, de la durée et de la température de l'air utilisé sur l'activité anti-trypsique des graines. Ils n'ont constaté aucune réduction des facteurs anti-trypsiques avec des températures de 100 à 110°C à humidité ambiante. Cependant, lorsque l'humidité augmentait à 17,5 ou 23,5% et la température à 120-140°C, l'inactivation était satisfaisante, sans que l'on ne détecte de pertes au niveau de la disponibilité de la lysine.

Le jet-sploding est une technique à chaleur sèche dans laquelle les grains circulent à travers un courant d'air préchauffé (140 à 315°C) plutôt que d'être exposés directement à la chaleur.

Dans ces conditions, la graine chauffe de l'intérieur vers l'extérieur, atteignant à l'intérieur des températures de 90 à 95°C (de Schutter et Morris, 1990). Les graines gonflent et explosent, produisant ainsi le «popping» caractéristique (type pop-corn dans le cas du maïs). Le temps d'exposition dépend de la température de l'air et peut aller de seulement 26 secondes pour de l'air à 316°C (Thomason, 1987) et jusqu'à 60 à 80 secondes pour des températures inférieures. A la sortie de la machine, on atteint une température de 150 à 165°C. Après ce traitement thermique les graines sont broyées dans un moulin à rouleaux (Marty et Chavez, 1993).

Extrusion

Il existe deux types d'extrudeurs sur le marché pour l'extrusion à sec et pour l'extrusion par voie humide.

Myer et Froseth (1983) ont comparé l'extrusion à sec à une température de 135°C avec un temps de séjour de 16 secondes à l'extrusion par voie humide avec adjonction de 2-8% d'eau dans la chambre. Ils ont constaté que l'extrusion par voie humide réduisait les facteurs antitrypsiques plus efficacement que l'extrusion à sec (3 vs 26 unités/mg protéine). Dans cette étude, réalisée il y a plus de 20 ans, des résultats équivoques obtenus après extrusion à sec retiennent notre attention : dans un premier test, le traitement avait réduit les facteurs antitrypsiques de 261 à 26 unités/mg de protéines tandis que, dans un second test, la diminution avait été beaucoup moins marquée (193 à 53 unités). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'activité des hémagglutinines.

De nombreux paramètres influencent la qualité du produit final comme le diamètre de la graine, la vitesse d'alimentation de l'extrudeur, le temps de rétention, le temps de séjour, la quantité d'eau ajoutée, la température atteinte dans le corps de l'extrudeur, température et vitesse de l'air dans le séchoir, etc. La plupart de ces paramètres sont liés entre eux et le seul moyen d'obtenir un produit de qualité est de trouver les combinaisons adéquates (Serrano et Villalbí, 1999).

1.10. Les aliments à base de soja

Le soja non traité ne joue pas un rôle important dans l'alimentation humaine. A l'opposé du soja traité et transformé qui présente des qualités nutritionnelles certaines. Les produits à base de soja sont soit fermentés, soit non fermentés.

Le groupe des produits non fermentés inclut plusieurs méthodes de traitement des grains entiers tels que la cuisson dans l'eau, le toastage, la germination et le broyage/toastage. Cependant, la méthode la plus répandue est l'extraction à l'eau des composants de la graine.

L'extrait liquide produit (lait de soja) peut être consommé comme tel, ou bien coagulé pour former du soja caillé (tofu). Ce dernier est soit consommé directement, soit inclus dans d'autres plats cuits ou frits.

Les produits fermentés à base de soja les plus connus sont la sauce de soja, le *miso*, le *tempeh*, le *sufu*. Le tableau 1.5 indique la composition des principaux aliments non fermentés et fermentés à base de soja.

Tableau 1.5. Composition de quelques aliments typiques à base de soja
(pour 100 g de produit consommable)

Aliments	Energie (joules)	Humidité (%)	Protéines (g)	MG (g)	Glucides totaux (g)	Fibres (g)	Cendres (g)
<i>Non fermentés :</i>							
- Graines de soja mûres	1675	10,2	35,1	17,7	32	4,2	5,0
- Farine de soja grillée	1796	6,0	29,8	19,5	39,9	3,8	4,8
- Germes	259	81,5	7,7	1,8	8,0	0,7	1,0
- Lait de soja	155	91,4	2,8	1,5	3,6	0,1	0,7
- Tofu (caillebotté)	473	76,0	13,3	6,5	3,1	0,2	1,1
<i>Fermentés :</i>							
- Sauce de soja	163	75,5	5,3	1,3	2,5	0	15,4
- Miso salé, noir	653	50,0	14,0	5,0	16,2	1,9	14,8
- Hamanatto	661	52,7	14,7	8,3	9,3	1,5	15,0
- Sufu	331	74,9	67,8	5,0	2,5	11,2	9,8
- Tempeh	624	64,0	18,3	4,0	12,7	-	1,0
- Natto	1779	7,4	31,1	17,9	34,3	4,7	4,0

MG : matière grasse

Source : Wu Leung et al., 1972 ; Aubert, 1985 ; Garreau, 1996

La microflore mise en œuvre pour la fermentation du soja appartient aux genres *Aspergillus* (*oryzae*, *sojae*), *Rhizopus* (*oligosporus*, *oryzae*, *stolonifer*, *chinensis*), *Actinomucor* (*elegans*), *Mucor* (*hiemalis*, *silvaticus*, *prainii*), *Penicillium*. Les *Aspergillus* n'ont été retenus que pour leurs aptitudes hydrolytiques pour la fabrication du *miso* et de la sauce de soja en raison des risques de production de mycotoxines.

Les microorganismes halophiles présents sont essentiellement *Pediococcus halophilus* (bactérie lactique), *Saccharomyces rouxii* et certaines souches de *Torulopsis* (*versatilis*, *etchellsii*, ...) qui produisent de l'acide lactique, de l'éthanol, des alkyl-phénols ou d'autres alcools aromatiques. En fin de fermentation, seule l'espèce *Saccharomyces rouxii* résiste aux concentrations azotées élevées et complète l'arôme par la synthèse de composés phénoliques (Rocheman, 1986 ; Uchida, 1988).

Les produits du métabolisme des *Rhizopus* comprennent un anti-oxydant (6,7,4-trihydroxyisoflavone). C'est aussi un composé anti-bactérien qui contribue à assainir le

produit. Il est de nature glycopeptidique et très actif contre les bactéries gram + (*Clostridium botulinum* et *sporogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) (Gauthier, 1990). Les *Rhizopus* peuvent hydrolyser les aflatoxines éventuellement produites par *Aspergillus flavus* et *parasiticus*, contaminants possibles des graines conservées humides à des températures trop élevées (Jarvis, 1971).

Des souches de *Streptococcus thermophilus* se développent si des *Bifidobacterium* ont préalablement hydrolysé les composés α 1-2 fructo-oligosaccharidiques (Modler et Mc Kellar, 1990, Roy *et al.*, 1990). Les souches d'*Aspergillus* sont connues pour pouvoir hydrolyser les protéines (Mittal, 1992) ; certaines, tel *A. awamori*, possèdent une activité α -galactosidase leur permettant de dégrader les oligosaccharides du soja (Mc Ghee *et al.*, 1977).

La fabrication de lait fermenté de soja de type yaourt est plus délicate à réaliser qu'avec du lait de vache, bien qu'elle soit conduite par les mêmes bactéries. La texture du produit final dépend de la teneur en matière sèche du produit, du pH, du traitement d'homogénéisation effectué et du (ou des) microorganismes utilisés.

Le choix des souches lactiques utilisées est fondamental pour la texture, la flaveur et l'arôme du produit qui résultent du métabolisme des divers microorganismes (Murti *et al.*, 1992).

Les souches de *Lactobacillus bulgaricus* ou *helveticus* sont le plus souvent incapables d'utiliser le saccharose comme source de carbone (Shelef *et al.*, 1988) et jamais ni le raffinose, ni le stachyose. Ceci entraîne une chute de pH insuffisante (6,2 au lieu de 4,3 ou 4,9 pour le lait de vache) et une texture fluide due à leur faible développement et au pH éloigné du point isoélectrique des protéines (Cerning *et al.*, 1986, Cheng *et al.*, 1990).

Les souches de *L. acidophilus* ou de *L. casei* sont plus capables d'utiliser les glucides solubles du soja comme source de carbone. Ces bactéries abaissent fortement le pH (respectivement à 4,7 et 4,3) et les protéines sont plus hydrolysées. L'acétaldéhyde, résultant du métabolisme de la thréonine, est un composé fondamental de l'arôme final (Law, 1981).

Les souches de *L. salivarius* présentent une bonne aptitude à utiliser les glucides du soja pour la production d'acide lactique (Montelongo *et al.*, 1993). Cette production est fortement stimulée par des extraits de levure. Elle est comparable à celle observée par Bibal *et al.* (1988) pour des souches de *Lactococcus cremoris*.

Les souches de *Bifidobacterium sp.*, difficiles à cultiver sur lait de vache, trouvent dans le soja un substrat adapté. Dans ces conditions, ces souches synthétisent des exo polysaccharides qui, associés à une production importante d'acide lactique, augmentent la viscosité du produit tout

comme les souches de *L. bulgaricus* le font dans le lait de vache. L'utilisation des bifidobactéries permet de créer des produits agréables (Murti *et al.*, 1992).

Pour améliorer la production d'acide lactique donc l'acidification et celle des composés aromatiques, le lait de soja peut être suppléментé par :

- des oses purs (1% de glucose, par exemple), des extraits de levures (Cheng *et al.*, 1990).
- des produits laitiers (Joarder *et al.*, 1978; Abou-Donia *et al.*, 1980) qui améliorent la vitesse d'acidification (Dupuy *et al.*, 1994). En outre, le mélange lait de vache/lait de soja est nutritionnellement intéressant. Le lait de vache apportant des acides aminés soufrés, et le lait de soja, la lysine. Si le lait de soja ne se substitue que partiellement au lait de mammifère dans la composition du produit, la fermentation est peu affectée, mais la saveur de fève liée au soja peut entraîner des difficultés d'acceptation du produit par les consommateurs (Mc Bride et Stetchmeyer, 1981, Tratnik et Jadsic, 1982).

2. Les aliments de complément du jeune enfant dans les pays en développement

Les aliments de complément se définissent comme des aliments qui sont consommés en complément au lait maternel pendant la période de sevrage, afin d'assurer à l'enfant un développement physique et mental correct et une bonne santé. Ces aliments doivent de ce fait, et en tout premier lieu, être exempts de micro-organismes pathogènes et de toute nocivité. Il faut détruire ou au mieux réduire les teneurs en facteurs anti-nutritionnels dans ces aliments de complément (Mouquet *et al.*, 1998). Les enfants âgés de six mois à deux ans dans les pays en développement passent du lait maternel à une alimentation plus diversifiée préparée à base de céréales ou de racines et de tubercules. Dans la plupart des cas, les enfants traversent un cycle de diarrhées et de malnutrition (déficiences en micro nutriments, essentiellement l'iode, le fer et la vitamine A) avec des conséquences importantes dans leur développement, notamment des retards de croissance et des troubles psychomoteurs (Tomkins *et al.*, 1988 ; de Benoist, 1999). Ce problème est plus courant dans les régions où les aliments de bases ne sont pas facilement disponibles, soit parce qu'ils sont très coûteux, soit parce qu'ils n'existent pas sur les marchés.

Dans la plupart des pays en développement, les mères utilisent des bouillies comme premier aliment de complément. Seule une faible minorité d'entre elles ont les moyens financiers

d'acheter des farines fabriquées industriellement, qui permettent de préparer des bouillies de bonne valeur nutritionnelle. Très souvent les mères utilisent des farines locales n'ayant subi aucun traitement spécifique et qui se révèlent généralement de très faible valeur nutritionnelle (Trèche, 1998). Ces bouillies locales sont d'une consistance très épaisse due à la forte teneur en amidon contenu dans les céréales utilisées pour sa préparation, cette consistance rend la bouillie difficile à avaler pour les enfants et donc les mères ont tendance à les diluer pour obtenir une bouillie de consistance liquide. Mais en même temps elles en diminuent la densité énergétique et en nutriments. Les enfants ne peuvent pas manger autant de bouillie qu'il serait nécessaire pour satisfaire leurs besoins nutritionnels journaliers.

Critères pour le choix des constituants.

Ces critères énoncés par WHO/NUT (1998) pour développer les aliments de complément pour les jeunes enfants dans le pays en voie de développement sont :

- Les aliments doivent être produits sur place par l'agriculture locale : ils doivent être fabriqués à partir de plantes tropicales, ils ne doivent pas être importés.
- Ils doivent être accessibles à la fraction de la population qui en a le plus besoin : le produit doit être de fabrication aisée et peu coûteuse, son prix d'achat peu élevé, et il doit être produit en masse.
- Ils doivent pouvoir être transportés et stockés dans les conditions climatiques existantes dans les régions subtropicales. Le produit doit être le plus stable possible.
- Ils doivent être dépourvus de toxines, ou de facteurs anti-nutritionnels.
- Ils doivent être bien acceptés par les consommateurs.
- Ils doivent être digestibles, bien tolérés par l'organisme (pas de réactions allergiques...). Ceci inclut aussi la dimension culturelle de l'aliment. Il existe dans tous les pays des habitudes alimentaires à respecter. Il sera bon d'envisager, plutôt que d'introduire des aliments nouveaux, de maintenir et d'améliorer les aliments traditionnels. Ceci présente également un intérêt économique, notamment pour la création de micro entreprises.
- Leur valeur nutritionnelle doit être élevée.

Besoins nutritionnels et énergétique du jeune enfant et apports recommandés.

L'enfant, tout comme l'adulte, a besoin d'un apport alimentaire équilibré, suffisant sans être excessif, pour sa croissance, pour la fourniture d'énergie, l'élimination des déchets, l'équilibre des différents métabolismes et leur régulation. Pour cela, l'alimentation doit lui fournir des

protéines, des lipides, des glucides, de l'eau, des sels minéraux, des vitamines et de la cellulose, dans des proportions précises (tableau 1.6).

Les besoins en énergie du jeune enfant sont consignés dans le tableau 1.7. Ces besoins sont essentiellement couverts par l'apport du lait maternel et des aliments de complément consommés sous forme de bouillies. Il apparaît, dans le tableau 1.7, que l'apport en énergie des bouillies par repas est d'autant plus grand que la densité énergétique des bouillies consommées est élevée. Le jeune enfant pourrait alors couvrir ses besoins énergétiques avec une moyenne de deux repas par jour en complément du lait maternel.

Tableau 1.6. Besoins quantitatifs des apports alimentaires du jeune enfant

Besoins	Nourrisson → 24 mois	Enfant
Energétiques et de croissance		
Calories	125-100 kcal / kg / j (523-418 kJ / kg / j)	100-75 (418-314)
Protéines	2-3 g / kg / j 7 à 12% de la ration énergétique	1,5-2,5 10 à 12% de la ration énergétique
Glucides	8-12 g / kg / j 30-50% de ration énergétique	≅ 12 40-50%
Lipides	2-4 g / kg / j 45-55% de la ration énergétique	4-5 ≅ 40%
Hydriques, minéraux et vitaminiques		
Eau	180-120ml / kg / j	70-120
Sodium	25-50 mg / kg / j	100-150
Calcium	50-100 mg / kg / j	≅ 50
Phosphore	Même ordre de grandeur que pour le calcium	
Fer	2-10 mg / j	10-15 mg / j
Vitamine D	80-1200 UI / j	

Source : Rambaud (1995).

Tableau 1.7. Quantités de bouillies à consommer en fonction de leur densité énergétique

Tranches d'âge (mois)	Besoins énergétiques (kcal/j) ¹	Énergie à fournir à partir des aliments de complément (kcal/j) ²	Quantité de farine infantile à consommer (gMS/j) ³	Bouillie basse densité énergétique (48 kcal/100g)		Bouillie haute densité énergétique (120 kcal/100g)	
				Quantité de bouillie à consommer (ml/j)	Nombre de repas nécessaires ⁴	Quantité de bouillie à consommer (ml/j)	Nombre de repas nécessaires ⁴
4-5	547	233	59	490	3	200	1
5-6	595	281	71	590	3	240	1 à 2
6-7	648	431	108	900	4	360	2
7-8	685	468	117	980	4	390	2
8-9	722	505	127	1060	4	423	2
9-10	805	648	162	1350	5	540	2
10-11	835	678	170	1420	5	567	2
11-12	863	706	177	1480	5	590	2
12-23	1092	1002	250	2090	6	830	2 à 3

¹ D'après Butte, 1996 ; ² En soustrayant aux besoins les apports du lait maternel (WHO/NUT., 1998) ; ³ En considérant que les farines infantiles ont un contenu énergétique de l'ordre de 4 kcal/g de matière sèche (MS) ; ⁴ En considérant que la capacité gastrique des enfants est en moyenne de 30 ml/kg ; gMS/j= gramme de matière sèche par jour ; kcal/j= kilocalories par jour. Source : Mouquet et al., 1998. Bulletin du réseau Technologie et Partenariat en Agro-alimentaire.

La valeur nutritionnelle d'une bouillie dépend de sa densité énergétique, de sa composition en nutriments et de la biodisponibilité des nutriments essentiels. La consistance des aliments de complément joue un grand rôle dans leur acceptabilité et elle est un élément essentiel de leurs caractéristiques organoleptiques. Selon Nout (1993), les bouillies infantiles doivent avoir une consistance semi liquide pour être facilement avalées par l'enfant.

La consistance peut s'apprécier par la mesure de la viscosité ou par celle de l'écoulement. La mesure de la viscosité est la méthode la plus utilisée pour évaluer la consistance des bouillies (Mouquet, 1998). C'est un facteur important maintenant largement reconnu comme influant sur le niveau d'ingéré énergétique (WHO/NUT, 1998 ; Trèche, 1999). Bien que l'on trouve dans la littérature de nombreuses valeurs de viscosité pour les bouillies, les différences existant au niveau de leurs conditions de mesure ne permettent pas de disposer de valeurs seuils universelles. Dans les conditions de mesures décrites par Mouquet et Trèche (2001), il a été établi que le domaine d'acceptabilité d'une bouillie est de 1 à 3 Pas. La mesure de la vitesse d'écoulement est un autre moyen d'évaluer la consistance d'une bouillie même s'il est encore peu utilisé dans la littérature. La vitesse d'écoulement varie en fonction de la concentration des bouillies et inversement à la viscosité, mais la relation entre viscosité et écoulement dépend du type de bouillie (Trèche, 1999). Les valeurs acceptables dépendent des habitudes alimentaires de chaque pays et de la perception des bouillies par les mères : les vitesses d'écoulement généralement observées sont de 50 à 90 mm/30s au Vietnam et de 100 à 140 mm/30s en Afrique sahélienne (Trèche, communication personnelle).

Amélioration de la densité énergétique

L'augmentation de la densité énergétique apparaît comme une solution possible pour améliorer les apports alimentaires, en particulier pour la tranche d'âge de 6 à 12 mois. En effet, l'augmentation de la fréquence des repas, autre possibilité envisageable, est difficilement réalisable, les mères ne pouvant guère consacrer plus de temps à leur enfant, compte tenu des contraintes matérielles et socioculturelles auxquelles elles sont soumises. Quant à l'augmentation de la quantité de bouillie fournie au cours de chaque repas, elle est impossible du fait du volume stomacal limité de l'enfant. Au-delà de 12 mois, la transition progressive de la bouillie vers le plat familial peut contribuer à l'amélioration de la densité énergétique de la ration.

En deçà, c'est sur des aliments fluides que les efforts doivent porter :

- *L'apport de lipides* pendant la préparation de la bouillie permet une amélioration de sa densité énergétique en réduisant, par ailleurs, sa viscosité : les mono et diglycérides induisent une réticulation de l'amylose et limitent ainsi son hydratation pendant la cuisson, donc son gonflement. Ils améliorent, en outre, la palatabilité de la bouillie et apportent beaucoup d'énergie sous un faible volume.
- *L'apport de sucre* ne réduit pas sensiblement la viscosité mais améliore la teneur en énergie. Cependant, ces deux possibilités (huile, sucre) sont difficilement accessibles aux ménages les plus vulnérables. Le coût de l'énergie apportée par de l'huile ou du sucre est, en général, nettement supérieur à celui de l'aliment de base. Par ailleurs, il s'agit de calories "vides", c'est-à-dire n'apportant pas d'autres nutriments hormis les acides gras essentiels dans le cas des lipides.
- La seule possibilité envisageable reste *l'augmentation de la concentration des bouillies* préparées à partir de céréales ou de tubercules, avec comme contrainte d'en limiter la viscosité à un niveau acceptable pour l'enfant. En accroissant leur teneur en matières sèches, on contribue à améliorer non seulement leur densité énergétique mais aussi leur densité nutritionnelle.

La plupart de travaux de recherche pour réduire la viscosité des aliments des jeunes enfants et permettre d'accroître leur teneur en matière sèche ont été menés jusqu'à maintenant sur les aspects suivants :

- Traitement hydrothermique drastique comme la cuisson-extrusion ou le séchage en tambour, qui provoque l'éclatement des granules d'amidon et la perte de sa structure (Jansen *et al.*, 1981 ; Champ et Faisant, 1992 ; Colona et Buléon, 1994).
- Utilisation de graines de céréales germées. La viscosité de la bouillie diminue notablement grâce à la teneur en enzymes amylolytiques contenues dans les céréales germées. Les enzymes hydrolysent les liaisons α -(1-4) de l'amidon en produisant des oligoholosides et des dextrines (Desikachar, 1980 ; Mosha et Svanberg, 1983 ; Svanberg, 1987 ; Golpadas *et al.*, 1988, 1989 ; Ashworth et Draper, 1992 ; Lorri et Svanberg, 1993 ; de Benoist *et al.*, 1999 ; Trèche, 1999).
- Incorporation dans les farines infantiles d' α -amylases commerciales produites industriellement (Trèche, 1999).
- Fermentation des céréales par des bactéries lactiques (Lorri et Svanberg, 1993 ; Adeyemi, 1988).

Effet de la fermentation lactique sur les aliments de complément à base de céréales

La fermentation est un processus catabolique où des molécules simples ou complexes, sont transformées en un ou plusieurs produits finaux caractéristiques de la fermentation (fermentation lactique, fermentation alcoolique, *etc.*). La fermentation des bouillies par des bactéries lactiques entraîne la formation d'acide lactique et, donc, leur acidification. Leur consommation par des enfants pendant la période de sevrage est rapportée dans plusieurs pays : *uji* au Kenya et en Tanzanie ; *ogi* au Nigeria ; *obusera* en Ouganda, *gari* et *foufou* répandus dans l'Ouest africain (Adeyemi, 1988).

La fermentation lactique entraîne une baisse du pH et des modifications du goût et de la valeur nutritionnelle de la bouillie due à :

- une meilleure digestibilité des protéines et une meilleure disponibilité des minéraux liées à l'hydrolyse partielle des phytates et des oligosaccharides,
- une légère hausse de la teneur en certaines vitamines, riboflavine en particulier (Lorri et Svanberg, 1995).

La fermentation lactique permet d'inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes comme *Shigella sp.* et *Escherichia coli* (Weaver, 1994) et limite donc les risques de contamination microbienne des bouillies. Bien que les bactéries pathogènes responsables de diarrhées soient inhibées par les basses valeurs du pH des bouillies (Mensah *et al.*, 1991; Svanberg *et al.*, 1992), l'effet possible de la consommation de bouillies fermentées pour le traitement de la diarrhée est, quant à lui, encore sujet à controverse (Lorri et Svanberg, 1995). Outre ces aspects, les bouillies fermentées peuvent être plus appétissantes pour les enfants. Par ailleurs, la fermentation réduit légèrement, mais insuffisamment, la viscosité des bouillies à teneur en matière sèche moyenne ou basse (Trèche, 1999). Lorri et Svanberg (1993) ont constaté qu'une bouillie de maïs non fermentée préparée avec une consistance semi liquide (viscosité de 3000 cP) avait une teneur en matière sèche comprise entre 10 et 14%. Après fermentation lactique conduite par une culture starter de lactobacilles, la teneur en matière sèche de la bouillie pouvait être augmentée à 14-17% en conservant la même viscosité, selon Adeyemi (1988) cela est dû à l'acidification du milieu.

Depuis quelques années, les chercheurs de l'IRD étudient les bactéries lactiques amylolytiques présentes dans les aliments fermentés traditionnels à base de matières premières amylacées. Ces bactéries produisent des α -amylases qui ont la capacité d'hydrolyser avec plus ou moins d'efficacité l'amidon cru des céréales (Rodriguez-Sanoja *et al.*, 2000), toutefois, bien que naturellement présentes dans de nombreux aliments fermentés traditionnels, ceux-ci, après cuisson, n'ont pas les caractéristiques requises en termes de densité énergétique et de viscosité

pour satisfaire les besoins du jeune enfant. L'amélioration des conditions d'hydrolyse des amidons par les bactéries lactiques amylolytiques pour permettre de diminuer la viscosité des bouillies est une alternative qui n'a cependant pas encore été explorée. Une telle approche permettrait de combiner en une seule étape l'action des α -amylases produites *in situ*, et l'acidification de la bouillie.

3. Les bactéries lactiques

Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes procaryotes, hétérotrophes, chimio-organotrophes. (Roissart et Luquet, 1994). L'expression "bactéries lactiques", malgré la communauté de certains traits physiologiques et biochimiques, n'a aucune valeur taxonomique et il en existe deux catégories phylogénétiquement distinctes.

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des bactéries à Gram-positif et plus particulièrement pour la majorité d'entre elles à la subdivision "*Clostridium* et apparentés" qui regroupe les bactéries de bas GC% ($\leq 50\%$), alors que les bifidobactéries sont rattachées à la subdivision des "Actinomycètes et apparentés" qui comprend les bactéries Gram positif à GC% élevé (Stackebrandt *et al.*, 1983 ; Kandler et Weiss, 1986b ; Stackebrandt et Teuber, 1988). Elles sont généralement immobiles, asporulées, de type anaérobie mais aërotolérantes et produisent principalement de l'acide lactique à partir de la fermentation des glucides. Elles possèdent des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, et les acides gras (Dellagio *et al.*, 1994). La fermentation des glucides peut-être de type homofermentaire (homolactique) ou de type hétérofermentaire (hétérolactique), les bifidobactéries se distinguent par une voie particulière dite "voie des bifidobactéries". Les caractéristiques générales des principaux genres fréquemment rencontrés dans les aliments fermentés traditionnels sont regroupées dans le tableau 1.8.

Tableau 1.8. Les principaux genres de bactéries lactiques

Noms	Aspect microscopique		Type de fermentation	GC%
	Forme	Arrangement		
<i>Lactococcus</i>	coque	paires ou chaînes	homolactique	34-43 (a)
<i>Streptococcus</i>	coque	chaînes	homolactique	34-46 (a)
<i>Leuconostoc</i>	coque	chaînes	hétérolactique	36-43 (b)
<i>Weissella</i>	variée	varié	hétérolactique	
<i>Pediococcus</i>	coque	tétrades	homolactique	34-42 (a)
<i>Lactobacillus</i>	bacille	chaînes	homolactique	32-53 (c)
<i>Bifidobacterium</i>	variée	varié	hétérolactique	55-67 (d)

GC% : pourcentage molaire de l'AND en bases G et C

(a) : Schleifer, 1986 ; (b) Farrow *et al.*, 1989 ; (c) Kandler and Weiss, 1986a,b ; (d) Scardovi, 1986.

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Nous insisterons plus particulièrement car ce genre est représenté par de nombreuses espèces qui interviennent dans de multiples transformations, en particulier celles de produits laitiers et végétaux. Certaines souches rencontrées dans des aliments sont considérées comme des micro-organismes d'altération.

Il s'agit de bacilles souvent allongés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles, ils sont catalase (-), (certains ont une pseudo catalase) et anaérobies. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant de l'acide lactique, de l'éthanol parfois en mélange avec de l'acide acétique et du dioxyde de carbone (Guiraud, 1988).

Les lactobacilles se répartissent dans trois groupes métaboliques : le Groupe I qui regroupe les lactobacilles homolactiques *sensus stricto* (e.g. *Lc. cremoris*), le Groupe II qui regroupe les lactobacilles dits hétérofermentaires facultatifs présentant un métabolisme homolactique en présence de glucose et un métabolisme hétérolactique en présence de pentoses tel *Lb. plantarum* ; et les lactobacilles du groupe III qui sont strictement hétérolactiques tel que *Lb. fermentum* (Gasser *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques amylolytiques

Les bactéries qui produisent de l'acide lactique à partir de l'amidon ont été décrites pour la première fois par Sherman (1937), elles sont désignées comme des bactéries lactiques amylolytiques. Comme les bactéries lactiques en général, les bactéries lactiques amylolytiques peuvent être utilisées dans la transformation des nombreux aliments fermentés grâce à leur caractère GRAS (Generally Recognized As Safe) (Teuber, 1987). Ces espèces produisent des amylases qui peuvent être extracellulaires, intracellulaires ou bien être liées à la paroi cellulaire. Par conséquent elles peuvent agir préférentiellement sur les matières premières végétales contenant de l'amidon (Castillo-Pompeyo *et al.*, 1993).

L'existence de nombreuses fermentations traditionnelles à base de céréales ou de manioc à travers le monde a motivé la recherche de bactéries lactiques amylolytiques. Différentes espèces de bactéries lactiques amylolytiques ont été isolées à partir de sources diverses, comme la nouvelle espèce *Lactobacillus manihotivorans* isolée du procédé de fabrication d'amidon aigre de manioc en Colombie (Morlon-Guyot *et al.*, 1998), des souches amylolytiques de *Lb. plantarum* isolées de racines de manioc fermentées (Nwankwo *et al.*, 1989) ou le riz fermenté aux Philippines (Olympia *et al.*, 1995), *Leuconostoc sp.* isolé d'un ensilage à base de poisson et de farine de blé en Suède (Lindgren et Refai, 1984), *Lb*

amylophilus ou *Lb. amylovorus* isolé des déchets de la fermentation du maïs aux Etats-Unis (Nakamura, 1981), et *Lb. fermentum* Ogi E1 isolé d'une pâte de maïs fermentée (l'Ogi) du Bénin (Agati *et al.*, 1998).

L'importance quantitative de la microflore lactique amylolytique par rapport à la population totale des bactéries lactiques dans les fermentations traditionnelles est encore peu connue à l'heure actuelle. En général, les bactéries lactiques amylolytiques se situent dans un ordre de grandeur de 10% de la population totale (Johansson *et al.*, 1995), ce qui représente une proportion qui est loin d'être négligeable. Ben Omar *et al.* (2000) ont montré que *Lb. manihotivorans* était l'espèce dominante avec des souches non-amylolytiques de *Lb. plantarum* lors de la fermentation du manioc en Colombie dans la fabrication de l'amidon aigre.

Les α -amylases produites par les *Bacillus* et les champignons ont été étudiées de manière exhaustive (Takasaki *et al.*, 1994 ; Carlsen *et al.*, 1995 ; Mørkeberg *et al.*, 1995 ; Pedersen *et al.*, 2000 ; Sarikaya *et al.*, 2000 ; Sumitani *et al.*, 2000), mais les α -amylases des bactéries lactiques ont été peu étudiées bien que leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire soit très envisageable en raison du caractère GRAS des bactéries lactiques (Teuber, 1987). Quelques α -amylases produites par des souches de bactéries lactiques amylolytiques ont été purifiées et caractérisées, par exemple celles de *Lb. amylovorus* et *Lb. amylophilus* (Imam *et al.*, 1991 ; Castillo-Pompeyo *et al.*, 1993 ; Rodriguez-Sanoja *et al.*, 2001), *Lb. plantarum* A6 (Giraud, 1993 ; Giraud *et al.*, 1994 ; Rodriguez-Sanoja, 2001), *Lb. manihotivorans* (Aguilar *et al.*, 2000 ; Rodriguez-Sanoja, 2001). Les études réalisées sur les amylases des bactéries lactiques montrent que celles-ci sont de haut poids moléculaire (>100 kD) par rapport à celles produites par les autres microorganismes (50-60 kD).

L'hydrolyse de l'amidon par les enzymes bactériennes permet de réduire la viscosité d'un "lait" d'amidon. Ainsi, sur lait de manioc (4%), Billard (1997) a observé une baisse significative de la viscosité : de 60 cP à 0 après 10h, lors de la fermentation par *Lb. plantarum*.

Métabolisme énergétique lié à la dégradation des sucres

La fermentation lactique s'effectue selon un enchaînement de réactions couplées d'oxydoréduction qui font intervenir un donneur initial (e.g. glucose) un accepteur final (le pyruvate ou/et l'acétyl-CoA) et des intermédiaires de transport d'électrons (NAD^+/NADH , H^+) associés à des hydrogénases. L'énergie libérée dans les réactions de déshydrogénation ou par

les activités des liases est couplée à la phosphorylation du substrat et elle est utilisée pour la synthèse de l'ATP. D'autre part, le PEP (phosphoénolpyruvate), intervient avec l'ATP comme source énergétique dans le transport de différents substrats et dans l'anabolisme ou biosynthèse des macromolécules entrant dans la composition des structures essentielles des cellules bactériennes.

Chez les bactéries lactiques, selon l'espèce et les conditions de culture, le catabolisme du glucose peut suivre la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), la voie de la pentose-phosphocétolase (PPC) ou la voie de la F6P-phosphocétolase.

3.1. Voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)

Les bactéries lactiques homofermentaires convertissent par la voie EMP une mole de glucose *via* la formation de deux pyruvates et deux NADH, H^+ , en deux moles d'acide lactique en générant deux ATP .



Chez les bactéries lactiques homofermentaires, il existe un transport et une phosphorylation simultanés du glucose par l'intermédiaire du système PEP-PTS, le glucose-6-phosphate accumulé est ensuite fermenté en acide lactique. La fructose-1,6-diphosphate aldolase (EC 4.1.2.13), indispensable au fonctionnement de la voie EMP, est présente dans toutes les espèces homofermentaires (Thompson et Gentry-Weeks, 1994) (Figure 1.2).

Streptococcus (*Sc. mutans*, *Sc. thermophilus*), *Enterococcus* (*Ec. faecalis*), *Lactococcus* (*Lc. lactis* ssp. *lactis*), les *Pediococcus* (*Pc. pentosaceus*, *Pc. halophilus*) et les lactobacilles homofermentaires (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*) sont des exemples pour ce type de métabolisme.

3.2. Voie de la pentose-phosphocétolase (PPC)

Les bactéries lactiques hétérofermentaires convertissent le glucose par la voie PPC (ou encore voie des pentoses phosphate) en une molécule de lactate, une molécule de CO_2 et une molécule d'éthanol ou d'acétate, et génère une mole d'ATP avec réoxydation du NADH_2 en NAD.



Le glucose est accumulé par un transport actif, puis phosphorylé intracellulairement en G6P par une glucokinase ATP dépendante. L'enzyme clef de cette voie, commune aux bactéries lactiques hétérofermentaires est la D-xylulose-5P phosphocétolase (EC 4.1.2.9). Les bactéries hétérofermentaires strictes ne contiennent pas de fructose-diP aldolase.

Il convient toutefois de noter que dans certaines conditions, le métabolisme d'une souche réputée homofermentaire peut devenir de type hétérofermentaire (Borch *et al.*, 1991 ; Murphy *et al.*, 1985).

Les principales bactéries présentant ce type de métabolisme sont des *Leuconostoc* tel *Ln. mesenteroides* (Adler-Nissen et Demain, 1994 ; Erten, 1998) et certains lactobacilles dont *Lb. brevis*, *Lb. pontis*, *Lb. sanfranciscensis* et *Lb. fermentum* (Benito de Cardenas *et al.*, 1991 ; *et al.*, 1994; Gobbetti *et al.*, 1995; Warriner et Morris, 1995; Hammes *et al.*, 1996 ; Agati *et al.*, 1998 ; Gänzle *et al.*, 1998).

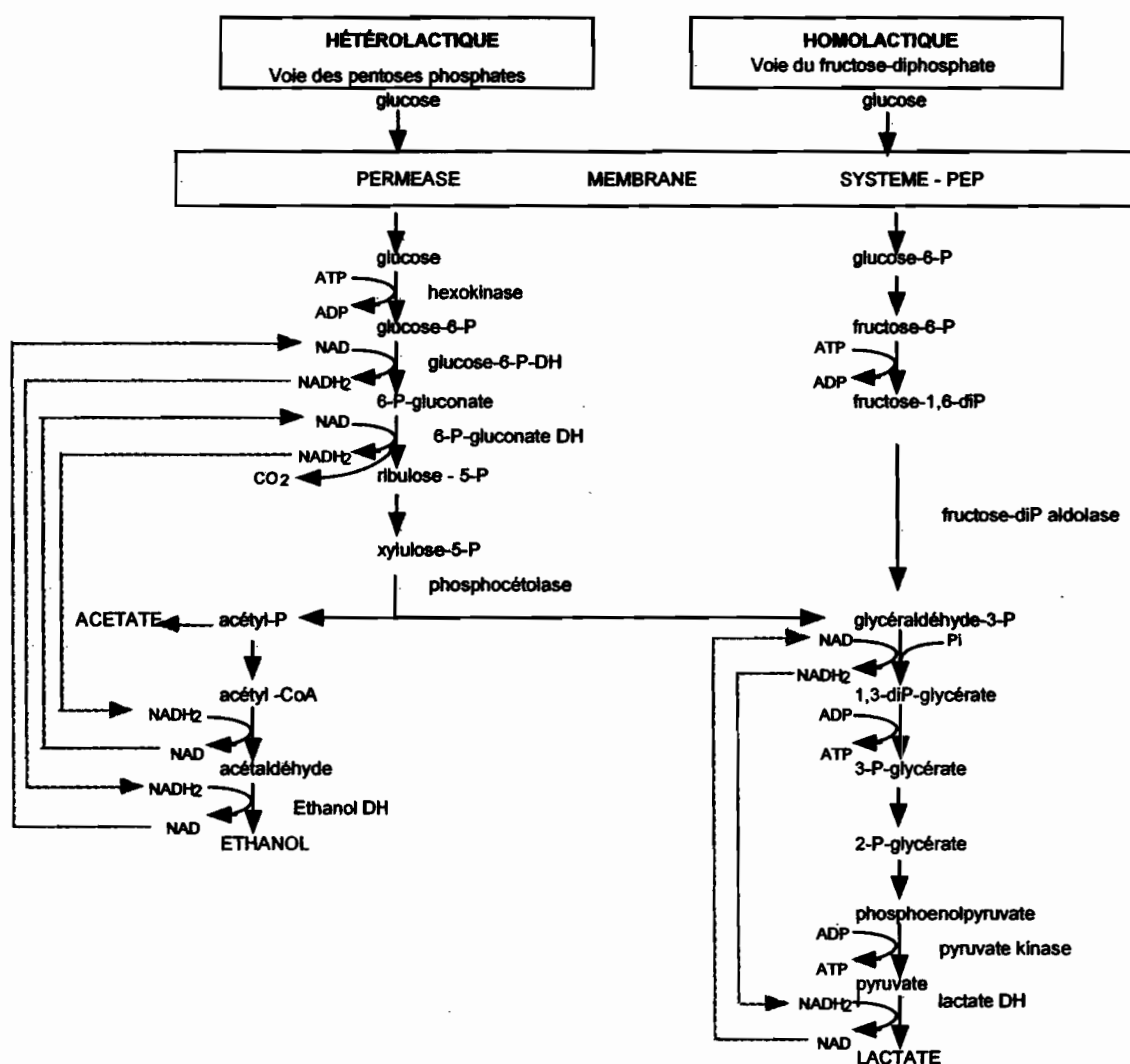


Figure 1.2. Catabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et Roissart, 1994)

3.3. Voie de la F6P-phosphocétolase

La voie de la F6P-phosphocétolase ou voie des bifidobactéries permet de transformer une mole de glucose en 1 mole de lactate, 1,5 mole d'acétate, mais aucune molécule de CO₂ n'est formée au cours de la fermentation. C'est en raison des proportions respectives de ces acides organiques, de l'absence de l'aldolase et du faible taux de phosphofructokinase, que cette voie a été considérée comme indépendante des voies homo et hétérofermentaires. L'enzyme clef de cette voie est la fructose 6-phosphate phosphocétolase (EC 4.1.2.22). Cette voie produit un bilan net de 2,5 moles d'ATP par mole de glucose (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

Les principales bactéries présentant ce type de métabolisme sont *Bf. bifidum*, *Bf. breve*, *Bf. infantis*, *Bf. longum*...

Rôles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont largement utilisées comme ferment dans l'industrie agro-alimentaire pour l'élaboration de très nombreux produits laitiers (yoghourt, fromage...), carnés (maturation de la viande, salaison...) et végétaux (choucroute, ensilage, "pickles etc.) (Montet *et al.*, 1999, 2004). Elles permettent la conservation prolongée de ces aliments en abaissant le pH par la production d'acide lactique et contribuent de plus à leur conférer des propriétés organoleptiques par la synthèse d'agents texturants (polysaccharides), et aromatiques (acides organiques, aldéhydes, cétones...).

Les aliments fermentés sont en général plus nutritifs et plus assimilables que les matières premières dont ils proviennent. Les principaux intérêts nutritionnels rapportés dans la littérature sont les suivants :

- la digestibilité des amidons est augmentée,
- la teneur et la disponibilité des acides aminés (de la lysine, de la méthionine, du tryptophane) sont élevées,
- les vitamines du groupe B et parfois vitamine C sont synthétisées,
- les antioxydants sont synthétisés par les microorganismes lors de certaines fermentations (ex : dans la transformation du soja en tempeh). Ils assurent une bonne conservation des vitamines sensibles à l'oxydation (vit. A et C) (Steinkraus, 1983),
- la teneur en composés cyanogéniques contenus dans le manioc est réduite,
- les mycotoxines tels les aflatoxines, la patuline sont partiellement ou totalement décomposées (Van Veen *et al.*, 1968 ; Chu *et al.*, 1975. Nip *et al.*, 1975; Scott *et al.*, 1977 ; Steinkraus, 1983).

- les inhibiteurs de protéases (facteur inhibiteur de la trypsine) sont éliminés,
- la teneur en phytates (substances diminuant la biodisponibilité des minéraux tels le fer, le zinc, le calcium, *etc.*) est diminuée,
- les produits antinutritionnels tels les α -galactosides (stachyose et raffinose responsables de flatulences) sont éliminés. L' α -galactosidase fongique peut réduire les oligosaccharides non digestibles dans la farine et le lait de soja (Sugimoto et Van Buren, 1970 ; Kotwal *et al.*, 1998 ; LeBlanc *et al.*, 2004). Les α -galactosidases des bifidobactéries et des lactobacilles ont été précédemment caractérisées (Garro *et al.*, 1993, 1994, 1996).

Les bactéries lactiques et les produits fermentés lactiques présentent aussi des intérêts pour la santé. Les micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels sont dits probiotiques. Cette définition est proposée par l'ILSI (International Life Sciences Institute) et est actuellement acceptée par le milieu scientifique (FAO/WHO, 2001)

Certaines bactéries lactiques ont été sélectionnées sur la base de leurs propriétés en santé humaine. L'ingestion de ferments lactiques peut contrer les effets d'une prolifération de certaines souches pathogènes d'*Escherichia coli* ou autres microorganismes, en particulier, outre différents mécanismes liés à la production de composés antimicrobiens, certaines bactéries lactiques permettent de stimuler la réponse immunitaire.

Les bactéries lactiques peuvent abaisser les quantités de certaines enzymes (β -glucuronidase, azoréductase ou nitroréductase) formées par la flore intestinale. La réduction des activités de ces trois enzymes est intéressante, car elles sont associées à la formation de carcinogènes (Roissart et Luquet, 1994). Différents travaux attestent maintenant de propriétés antitumorales spécifiques des lactobacilles ou des aliments fermentés, et des relations existant entre les problèmes de nutrition et les cancers (Furukawa *et al.*, 1991).

CHAPITRE 2

Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Les matières premières

Le riz (*Oryza sativa* L.) et le soja (*Glycine max* L) Merrill proviennent du nord Vietnam.

La farine de soja est préparée selon la méthode de Kratzer *et al.* (1990) pour obtenir une farine non déshuilée. Les graines de soja sont trempées dans l'eau pendant 2 h puis rincées et stérilisées à 121°C pendant 15 minutes. Elles sont ensuite séchées à l'étuve à 65°C ± 2 pour atteindre une humidité autour de 8%. Les graines séchées sont depelliculées et broyées par un broyeur mixte (fabriqué au Vietnam), possédant une unité de depelliculage (à droite photo 2.1 b) et une unité de broyage à marteaux (à gauche photo 2.1 b). Le broyeur à marteaux est équipé d'un tamis de maille de 150 µm. La farine de riz est produite à partir de grains décortiqués broyés dans les mêmes conditions. Les farines sont conservées à 4°C.

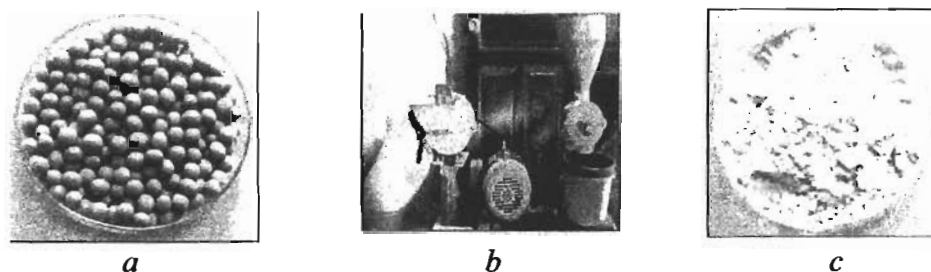


Photo 2.1. Préparation de la farine de soja (a) : graines de soja ; (b) : broyeur mixte ; (c) : farine de soja (source T.T.T. Nguyen)

Pour calculer la formulation du mélange de farines, le logiciel ALICOM version 3.0 mis au point par les nutritionnistes de l'IRD (non commercialisé) a été utilisé. Ce logiciel permet d'élaborer, à partir d'une liste de produits alimentaires bruts ou semi transformés disponibles dans un contexte donné, des formules répondant à des objectifs nutritionnels préalablement définis. Les proportions de 80% de farine de riz et 20% de farine de soja ont été calculées pour la composition de la base ajoutée à de l'eau pour obtenir des produits de différentes teneur en matière sèche utilisés pour cette étude.

1.2. Microorganismes utilisés

Lactobacillus plantarum A6 (LMG 18053, BCCMTM/LMG) est une souche de bactérie homolactique facultative amylolytique isolée du manioc roui au Congo (*Manihot esculenta*).

Lb. plantarum A6 est un bacille plus ou moins court, seul ou groupé par deux ou par trois.

L'activité amylolytique de la souche A6 est due à une α -amylase extracellulaire (Giraud *et al.*, 1994). Cette enzyme coupe au hasard les liaisons α 1,4 de l'amylose et de l'amylopectine, provoquant une baisse rapide de la viscosité des empois d'amidon, libérant du glucose, du maltose et des oligosaccharides (Giraud *et al.*, 1991).

Lactobacillus plantarum Lacto Labo (Dangé, Saint Romain) est une souche de bactérie lactique non amylolytique. Cette souche est conservée dans la collection de l'UR 106 de l'IRD.

Lactobacillus fermentum Ogi E1 (I-2028, CMCN, Institut Pasteur) est une souche de bactérie lactique hétérolactique isolée de l'Ogi, une pâte de maïs fermentée consommée au Bénin (Agati *et al.*, 1998). Ce sont des bacilles qui se trouvent isolés, par paire ou formant de courtes chaînettes. Cette souche est capable d'utiliser le D-raffinose.

Lactobacillus pentosus 4.4 (UR 106, IRD) est une souche de bactérie lactique hétérolactique isolée du Ben Saalga, une bouillie de mil fermentée traditionnelle du Burkina Faso. Cette souche possède une activité alpha galactosidase et phytasique.

Les souches bactériennes sont conservées à -80°C dans du milieu MRS modifié glycérolé à 40% (v/v), soit du MRS amidon pour les souches amylolytiques, soit du MRS glucose pour les souches non amylolytiques.

1.3. Milieux de culture

Deux milieux MRS ont été utilisés, soit le milieu MRS avec glucose (de Man *et al.*, 1960) (Merck, Référence : 1.10661) pour les souches non amylolytiques ; soit le milieu MRS-amidon modifié sans Tween 80 et dont le substrat carboné est l'amidon à raison de 20 g/l pour les souches amylolytiques. Les milieux sont utilisés pour réactiver les souches et pour les pré-cultures. Ils sont stérilisés par autoclavage 15 minutes à 120°C. Pour la conservation des souches sur gélose en pente ou pour les dénombrements en milieu solide, ces milieux sont additionnés d'agar-agar à 2% (w/v).

Tableau 2.1. Composition des milieux M.R.S. en grammes qsp/l

Constituants	Milieu MRS	Milieu MRS modifié
Peptone pancréatique de caséine (casitone, Difco, Detroit, USA)	10	10
Extrait de viande (Difco, Detroit, Etats-Unis).	8	10
Extrait de levure (Difco, Detroit, Etats-Unis).	4	5
Hydrogène citrate de diammonium - $\text{HOCCOOH}(\text{CH}_2\text{COONH}_4)_2$	2	2,17
Acétate de sodium anhydre - CH_3COONa	5	5
Sulfate de magnésium heptahydraté- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,207
Sulfate de manganèse monohydraté - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,04	0,056
Hydrogène phosphate de dipotassium - K_2HPO_4	2	2,62
Tween 80	1	
D(+) Glucose	20	
Amidon soluble (Prolabo-Merck Eurolab, Lyon, France)		20

Valeur du pH après autoclavage : 6,5

1.4. Conditions de culture

1.4.1. Conservation des souches

1 ml de mélange (50%-50%) d'une culture de 24h à 30°C dans du bouillon MRS et de glycérol à 80% (v/v) stérile, est déposé dans des cryotubes qui sont stockés à -80°C pendant plusieurs mois.

Après décongélation et réactivation, puis ensemencement en stries sur des milieux MRS ou MRS amidon solides en pente suivi d'une culture de 24 h à 30°C, les souches sont conservées à 4°C pendant un mois.

1.4.2. Réactivation et préparation des précultures pour ensemer les farines seules ou en mélange

1 ml de culture stockée dans des cryotubes à -80°C est réactivé après inoculation dans 10 ml de milieu MRS-amidon incubé 24 h à 30°C. Cette culture liquide est repiquée deux fois successivement dans le même milieu pour éliminer le glycérol.

10% du volume du dernier bouillon de culture des souches réactivées sont utilisés pour ensemer un volume de milieu MRS-amidon ou MRS correspondant à 10% du volume de mélange eau-farine à fermenter. Cette préculture est incubée 12 à 16 h à 30°C puis centrifugée à 14 000 g durant 10 min à 20°C. Le culot bactérien est lavé 2 fois avec du NaCl 0, 9% (w/v) avant d'être utilisé pour ensemer les suspensions de farines.

1.4.3. Mesure de la population bactérienne

Par turbidimétrie

Cette méthode est utilisée pour suivre l'évolution de la croissance des bactéries dans les bouillons MRS et MRS amidon. L'absorbance est mesurée à $\alpha=600$ nm (Koch, 1981) par un spectrophotomètre (Spectronic 401, Milton Roy, Paris, France) sous 1 cm de trajet optique. Quand la valeur de l'absorbance devient supérieure à 0,4, les cultures sont diluées avec du milieu stérile pour avoir une absorbance inférieure à 0,4 de manière à rester dans la zone de linéarité.

Par dénombrement sur milieu solide

9g d'échantillon sont prélevés stérilement et dilués au $1/10^6$ (w/v) avec de l'eau physiologique (9g/l de NaCl) stérile. Après homogénéisation à l'aide de billes de verre stériles au Vortex, la suspension est diluée en cascade (dilutions décimales) avec de l'eau physiologique stérile. Puis 0,1 ml des suspensions diluées (10^4 à 10^7) est étalé à la surface de boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu MRS ou MRS amidon gélosé. Chaque dilution est étalée sur deux boîtes de Pétri.

Pour le dénombrement des souches de bactéries lactiques amylolytiques, une solution de bleu d'aniline à 1% autoclavée à 120°C pendant 15 minutes est ajoutée au milieu MRS amidon stérile à raison de 3 ml/l. Après incubation des boîtes de Pétri de 48 à 72h à 30°C , les bactéries amylolytiques forment des colonies bleues.

Les résultats des dénombrements sont calculés selon la norme XP V 08-102 (2004) et exprimés en unités formant colonies (UFC) pour 1 g de produit frais.

1.4.4. Les fermentations

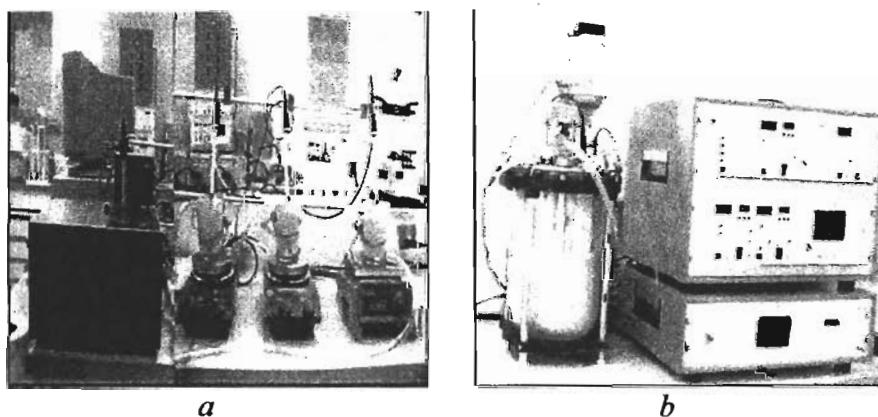


Photo 2.2. Fermenteurs de 200 ml (a) et fermenteur de 10 l (b)

Les essais de fermentation en petit volume ont été réalisés dans des fermenteurs en Pyrex de 200 ml de volume utile thermostatés par une double enveloppe alimentée par circuit d'eau relié à un bain-marie à circulation externe. Le contenu de chaque fermenteur est agité par des barreaux magnétiques. Les fermenteurs sont tous équipés d'une électrode de pH préalablement étalonnée et stérilisée 20 minutes à 120°C. Les données recueillies par les électrodes de pH sont enregistrées en continu *via* une carte d'acquisition Advantech Génie qui les transmet à un ordinateur. Ainsi il est possible de suivre l'évolution du pH dans chaque fermenteur en continu (photo 2.2 a). Les fermentations durent 24h.

La fermentation de 8 litres a été réalisée dans un fermenteur de 10 litres Biolaffitte (France). Avant utilisation la cuve amovible du fermenteur et l'électrode de pH (Ingold France) sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. La température et l'agitation sont contrôlées par un module externe (photo 2.2 b). Le pH est mesuré sans être enregistré. Les fermentations durent 24h.

Lors des différents essais de fermentations, les suspensions de farines à fermenter ne sont pas stérilisées avant introduction dans les fermenteurs. Les seuls traitements thermiques qu'elles subissent sont en relation avec les différents procédés de fabrication testés.

1.5. Détermination des paramètres cinétique de croissance

Le taux maximum de croissance ($\mu_{\max}$ en h^{-1}) est calculé à partir de la pente de la droite de régression linéaire entre le $\ln A$ (absorbance à $\lambda=600$ nm) et le temps, au cours de la phase exponentielle de croissance.

1.6. Procédés de transformation

1.6.1. Gélatinisation

Des quantités de farine de mélange (riz/soja) et d'eau sont calculées en fonction de la teneur en matière sèche pour obtenir 450 g de mélange. La suspension est mise dans une casserole en acier de 15 cm de diamètre dans laquelle elle est portée à 90-92°C (correspondant à l'apparition des premières bulles), puis maintenue à l'ébullition pendant 15 minutes (chauffage réduit) en remuant. La préparation de grande quantité de mélange de farine gélatinisée a été réalisée dans une marmite de cuisson basculante à double enveloppe en inox de 200 l (marque H.P Auriol S.A, type V.130, France). La double enveloppe est alimentée par un circuit de vapeur (photo 2.3). La température est contrôlée électroniquement par une sonde. Elle est équipée d'un agitateur dont la vitesse est réglable. La suspension du mélange a

été gélatinisée à 93°C correspondant à l'apparition des premières bulles, puis maintenue à l'ébullition pendant 15 minutes avec une agitation de 25 tpm. Le mélange gélatinisé est récolté soit à l'aide d'une vanne de sortie au fond de la marmite, soit en basculant la cuve.

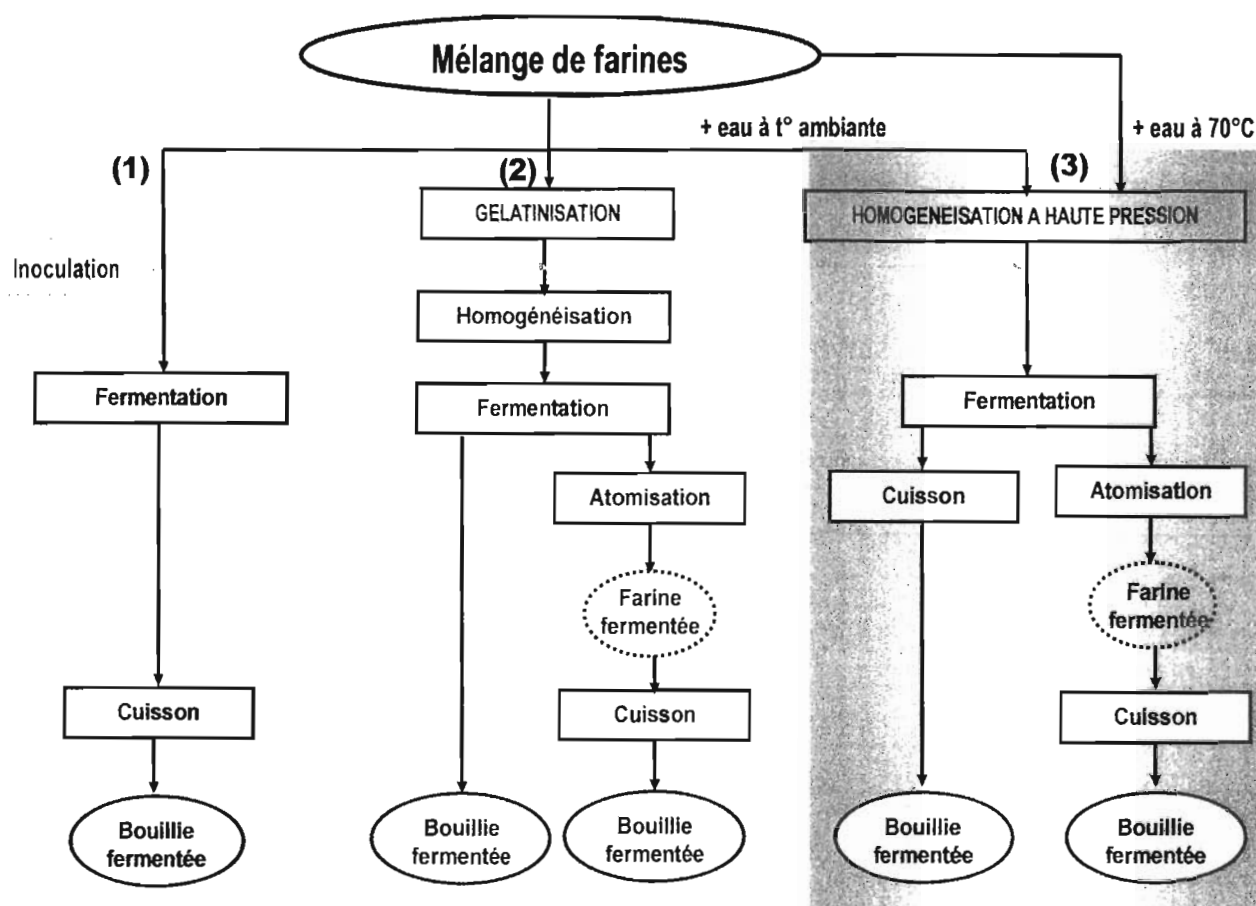


Figure 2.1. Diagrammes de fabrication des bouillies infantiles fermentées d'une suspension d'un mélange de farines soja/riz

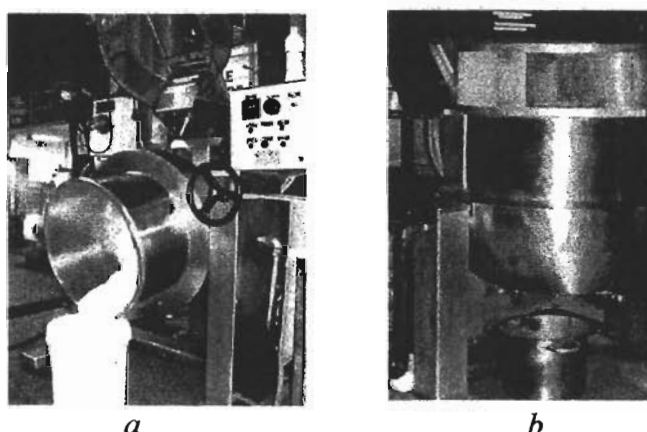


Photo 2.3. Marmite de cuisson basculante
(a) : position horizontale ; (b) : position verticale

Après la gélatinisation, la bouillie est laissée à refroidir jusqu'à 30°C, température à laquelle elle estensemencée pour effectuer la fermentation, les mesures rhéologiques et la détermination de la teneur en matière sèche.

1.6.2. Homogénéisation

Trois procédés d'homogénéisation ont été utilisés :

Ultra-Turrax T8 – IKA Labortechnik : Il s'agit d'un broyeur homogénéisateur rotatif utilisé pour traiter les échantillons à 10 000 tpm pendant 1 minute avant les analyses biochimiques.

Mixeur plongeant Braun 600W (MR 5550 CA) broyeur homogénéisateur à pales. Il est utilisé 1 minute à la vitesse maximale pour homogénéiser l'inoculum bactérien dans les suspensions de farines ensemencées avant la fermentation.

Homogénéisateur à haute pression de marque APV modèle 15M, Baker, Evreux, France (figure 2.2). Cet homogénéisateur en continu est utilisé principalement en laiterie où il permet la réduction du diamètre des globules gras du lait de 5 à 100 μm assurant ainsi une bonne répartition des lipides dans le lait tout en retardant le déphasage. C'est un homogénéisateur à double effet. Le premier effet à haute pression 25 MPa, assure le fractionnement des globules gras qui s'agrègent. Le deuxième effet, à une pression moindre, 5 MPa, permet d'individualiser les globules agrégés. Le débit est voisin de 57 l.h^{-1} .

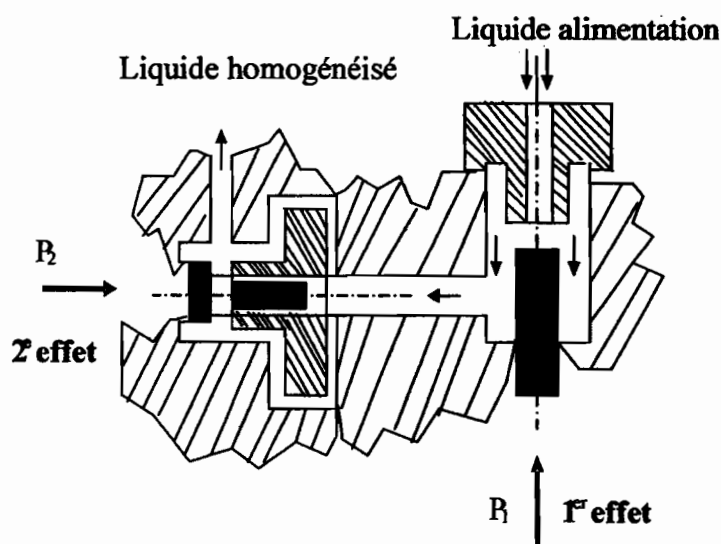
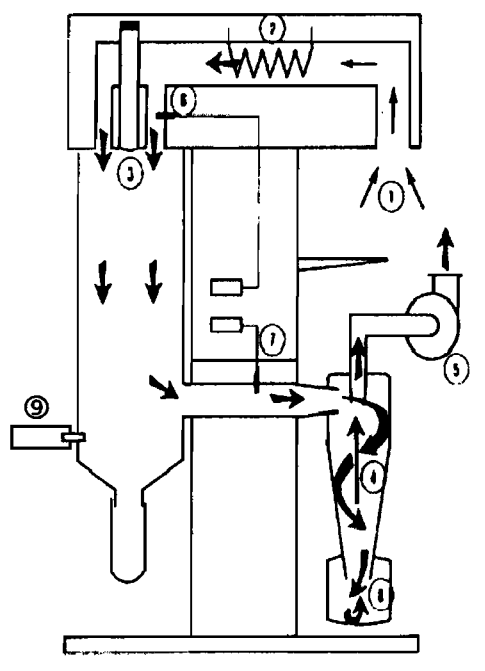


Figure 2.2. : Schéma de l'homogénéisateur à haute pression type APV.

1.6.3. Séchage par atomisation

Le séchage par atomisation consiste en la pulvérisation d'un liquide en un brouillard de gouttelettes et la mise en contact de ces gouttelettes avec l'air de chaud et sec dans une chambre de traitement.

L'évaporation de l'eau des gouttelettes qui s'ensuit a pour conséquence la formation des particules sèches en poudre, récupérées par un cyclone. L'appareil utilisé est un sécheur atomiseur de marque APV, Baker, modèle LAB N°3, Evreux, France (figure 2.3). La capacité d'évaporation est de 5 à 20 l d'eau.h⁻¹. La température d'air maximale est de 300°C. Le débit minimal d'alimentation est de 7,5 l.h⁻¹, et le maximal de 18 l.h⁻¹. Les suspensions préparées sont atomisées avec un débit 8 l.h⁻¹ dans de l'air à 180°C.



1. Orifice d'admission de l'air
2. Résistances pour le chauffage de l'air
3. Admission de l'air chaud par écoulement stabilisé dans la chambre de dessiccation
4. Cyclone, pour entrainer le produit sec
5. Pompe aspirant l'air
6. Sonde de mesure de la température de l'air à l'admission.
7. Sonde de mesure de la température de l'air à la sortie
8. Récipient collecteur du produit séché.
9. Injection du produit à sécher

Figure 2.3. Schéma du sécheur atomiseur APV

1.6.4. Lyophilisation

La lyophilisation, ou séchage à froid utilise le principe de la sublimation, soit le passage d'un élément de l'état solide à l'état gazeux, directement sans passer par l'état liquide.

Les échantillons sont placés dans un récipient en plastique recouvert de papier aluminium et percé de trous d'environ 3 mm de diamètre. Les échantillons sont congelés et sont ensuite séchés à l'aide d'un lyophilisateur Christ® Alpha I.5 (Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les lyophilisats sont conservés à +4°C.

2. Analyses physicochimiques

2.1. Prélèvements et traitements des échantillons

Les échantillons à analyser sont de deux types, soit des produits liquides à faible viscosité, soit des échantillons à très forte viscosité, en fonction de la teneur en matière sèche des suspensions de farines étudiées. La figure 2.4 donne les différentes voies empruntées pour analyser les échantillons à forte viscosité.

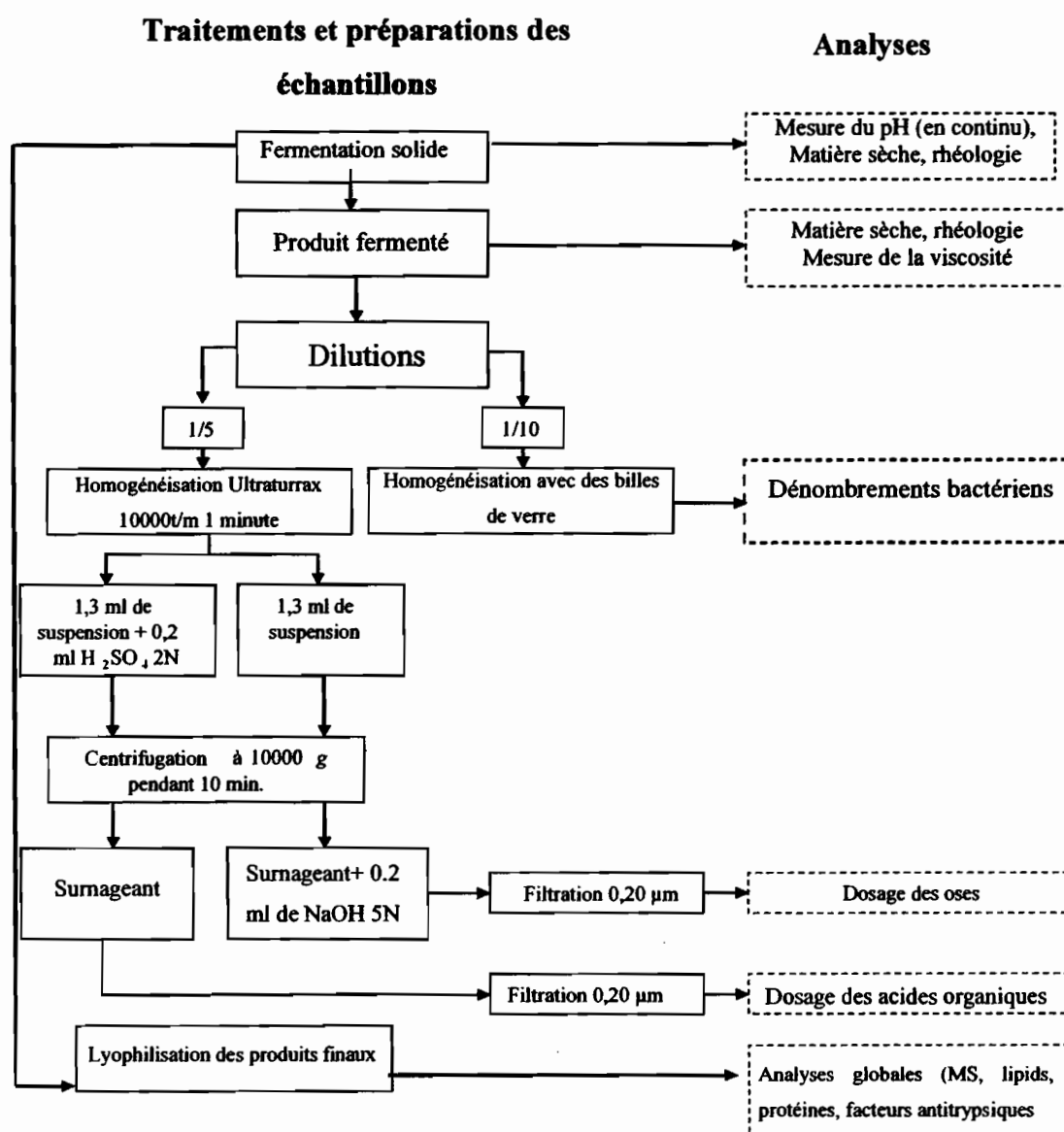


Figure 2.4. Schéma de préparation des échantillons à forte viscosité en vue des analyses physicochimiques et des dénombrements bactériens.

Les échantillons liquides, ou de faible viscosité, ne sont pas dilués.

Avec les échantillons à forte viscosité, 2 g d'échantillon sont dilués (1/5 w/v) pour les analyses biochimiques ultérieures.

Un traitement à l'Ultra-Turrax T8-IKA Labortechnik à 10000 t/mn pendant 1 minute a été choisi pour homogénéiser les échantillons avant l'analyse des oses et des acides organiques.

- Pour le dosage des oses, 1,3 ml de suspension est prélevé et versé dans un tube Eppendorf. Il est ensuite centrifugé 10 minutes à 10 000 g et puis le surnageant est additionné de 0,2 ml de NaOH 5 N pour stopper les activités enzymatiques. Le mélange est ensuite congelé en attente du dosage.
- Pour le dosage des acides organiques, 1,3 ml de milieu est prélevé et versé dans un tube Eppendorf contenant 0,2 ml de H₂SO₄ 2 N pour stopper les activités enzymatiques. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 10 000 g. Le surnageant récupéré est congelé en attente du dosage.
- Pour les analyses globales (protéines, lipides, amidon, facteurs antitrypsiques....), les échantillons sont lyophilisés avant le dosage.

2.2. Détermination de la teneur en matière sèche

1 à 2 g d'échantillon sont placés dans une coupelle en aluminium préalablement séchée dans une étuve à 105°C (étuve multicellulaire EM10 marque Chopin, France) pendant 24 h (temps estimé pour obtenir un poids constant) et tarée avec une balance de précision à $\pm 0,1$ mg (AE modèle 166 Delta Range de Mettler Viroflay, France). La coupelle contenant l'échantillon est pesée après les mêmes conditions de séchage.

2.3. Analyse d'enthalpie différentielle

L'Analyse d'Enthalpie Différentielle (AED) permet de déterminer la teneur en amylose et la température "théorique" de gélatinisation.

Nous avons utilisé un calorimètre de marque Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA), modèle DSC 7. Un échantillon de 10 à 11 mg d'amidon et 50 μ l de lyso-phospholipide à 2% sont placés dans une capsule d'aluminium inox fermée hermétiquement. La mesure est faite par rapport à une capsule de référence contenant 50 μ l d'eau. Le four est programmé pour une cinétique de chauffage linéaire de 10°C/min de 25°C à 160°C, puis maintenu constant à 160°C pendant 2 minutes et enfin refroidi jusqu'à 60°C à 10°C/minute. La variation d'enthalpie (ΔH) et la température de gélatinisation ou "onset temperature" (T_0) sont

déterminées sur le thermogramme. La teneur en amylose est mesurée à partir de la variation d'enthalpie obtenue au cours de la formation du complexe amylose/lyso-phospholipide durant le refroidissement (Mestres *et al.*, 1996).

Les mesures ont été réalisées en double avec deux calibrations sur de l'amylose de "référence" avant et après l'analyse.

2.4. Mesure de la granulométrie

Par granulométrie laser

L'appareil utilisé est un granulomètre laser modèle Mastersizer S de marque Malvern Instruments SA, Orsay France) complété par le logiciel Mastersizer-Sv 2.18. Cet appareil permet de réaliser des mesures de répartition granulométrique dans la gamme de taille de particules de 0,05 à 900 μm . Le principe repose sur la théorie de la diffraction qui établit que lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau de lumière cohérente et monochromatique (laser), il apparaît un motif de diffraction sous forme de franges concentriques alternativement claires et sombres. L'intensité du rayonnement diffracté est fonction du rayon des particules. La granulométrie permet la mesure de la taille des particules, ou plus exactement de leurs rayons, et permet également de déterminer leur fréquence statistique en fonction de leur taille. Pour cet appareil, les particules sont distribuées en 43 classes granulométriques.

Les distributions granulométriques ont été calculées à partir des percentiles.

d_{10} : taille de particule pour laquelle 10% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension.

d_{50} : taille de particule à laquelle 50% de l'échantillon a une taille inférieure et 50% de l'échantillon a une taille supérieure à cette taille. Cette valeur est également connue sous le nom de MMD (Mass Median Diameter). Le diamètre moyen dépend de la grandeur prise en compte : longueur, surface ou volume. Lorsque l'échelle des dimensions est logarithmique, on parle alors de moyenne géométrique ou logarithmique.

Pour une distribution normale, le mode, la moyenne et la médiane coïncident, alors qu'ils diffèrent dans le cas d'une distribution non normale.

d_{90} : taille de particule pour laquelle 90% de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension.

$d_{4,3}$: diamètre moyen (volume).

$d_{3,2}$: diamètre moyen pondéré en surface. Cette valeur est également connue sous le nom de "diamètre de Sauter".

Span : mesure de la largeur de la distribution. Plus cette valeur est faible, plus la distribution est étroite. La largeur se calcule par la formule ci-dessous :

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

Environ 5 g d'échantillon sont dispersés dans 20 ml d'éthanol à 40% pendant 15 minutes. Les résultats obtenus sont les diamètres des sphères équivalentes exprimés en volume.

Mesure de la granulométrie par tamisage

Le principe repose sur un triage aérodynamique des particules. 100 g de farine sont tamisés pendant 3 minutes sur un tamiseur à courant d'air Alpine type 200 LS (Hosokawa Micron Division) couplé à un aspirateur. Deux tamiseurs de mesh de 106 et 180 µm ont été utilisés.

2.5. Mesure de la viscosité

La viscosité des bouillies a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre rotatif HAAKE VISCOTESTER VT550 (Rheo, Champlan, France).

Le mobile SV-DIN a été utilisé avec une vitesse de cisaillement de 83 s⁻¹ et un volume de la prise d'essai de 14 ml. La mesure de la viscosité apparente des bouillies exprimée en Pascals seconde (Pa.s) est effectuée à 30°C dans une enceinte thermostatée. Le logiciel Rheowin 2.64 a été utilisé pour la commande du viscosimètre, l'acquisition et l'analyse des données. La valeur de la viscosité apparente est enregistrée après 10 minutes de rotation (Mouquet et Trèche, 2001).

2.6. Mesure de l'écoulement

On mesure l'écoulement des bouillies avec un consistomètre de type Bostwick semi automatisé ou avec le modèle Polyvisc de marque Kinematica INC, Newark, USA (Bookwalter, Peplinski and Pfeifer, 1968) (photo 2.4). L'appareil comprend deux compartiments : le premier reçoit environ 100 g du produit à analyser et le deuxième est le compartiment d'écoulement séparé du premier par une cloison amovible. A t = 0, la bouillie est libérée et le paramètre de consistance retenu correspond à la distance parcourue par le front de bouillie après 30 secondes d'écoulement qui s'affiche sur l'écran du Polyvisc. L'écoulement est mesuré avec la bouillie à 30°C.



Photo 2.4. Consistomètre modèle Polyvisc pour la mesure de l'écoulement des produits

2.7. Dosage des oses par Chromatographie Ionique Haute Pression (HPIC)

Les matériels utilisés sont de marque Dionex S.A (Jouy-en-Josas, France) soit : une pompe avec un dégazeur *in situ* Modèle GP 40, un injecteur automatique Modèle AS 50, un détecteur ampérométrique Modèle ED 40 (le détecteur consiste en une électrode en or et en une cellule de référence argent/chlorure d'argent immergée dans une solution saturée de chlorure de potassium) et une colonne d'échanges d'ioniques (CarboPac PA1) (10 μ m). Le contrôle des différents éléments, l'acquisition des données et l'intégration sont pilotés par le logiciel Dionex Chromatography Management System Version 6.20.

Les paramètres opératoires utilisés pour l'analyse des oses sont les suivants :

Phases mobiles : NaOH 105 mM

Température : 35°C - Débit : 1,0 ml/min

Pression : 1980 psi - Volume injecté : 25 μ l

Les échantillons à analyser, quand il s'agit de surnageant de culture bactérienne, sont dilués pour avoir une teneur de chaque ose comprise entre 1 et 50 mg/l puis filtrés sur membrane de 0,2 μ m de porosité.

Pour le dosage des oses dans les farines il faut réaliser une triple extraction à l'éthanol. Pour cela les échantillons sont lyophilisés, puis 80 mg de la farine lyophilisée sont resuspendus dans 3 ml d'éthanol à 80%. Les suspensions alcooliques sont placées au bain-marie à 90°C durant 30 minutes, puis centrifugées à 5 000 g à 4°C durant 10 minutes et le culot subit deux nouvelles extractions.

Les surnageants rassemblés sont évaporés au speedvac (RC 10-10, Jouan SA, Herblain, France) à température ambiante durant une nuit. Les résidus solides sont resuspendus dans 2 ml d'eau, et dilués pour avoir une teneur en chaque ose comprise entre 1 et 50 mg/l puis filtrés à 0,2 μ m pour être injectés. L'identification et le dosage des différents oses sont réalisés par étalonnage externe.

2.8. Dosage des acides organiques de l'éthanol par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)

Le dosage de l'acide lactique, l'acide acétique et de l'éthanol a été réalisé par l'utilisation d'une colonne Animex HPX87H (Biorad Co, Marne la Coquette, France). Cette colonne permet la séparation des acides organiques et de l'éthanol par échange d'ions, de tamisage moléculaire et d'interactions hydrophobes. La résine est un copolymère de styrène et de sulfonate de divinyl benzène. La charge sur la résine assure les interactions ioniques alors que le squelette de polystyrène favorise les interactions de type hydrophobe. Avant le passage dans la colonne, les échantillons sont filtrés sur membrane de 0,2 µm de porosité afin d'éliminer toutes les particules évitant ainsi le colmatage de la colonne. Un étalonnage externe est utilisé.

Caractéristiques du dispositif CLHP (Biorad, Yvry-sur Seine, France)

- Pompe : Waters Modèle 515 HPLC pump
- Injecteur : Waters Modèle 717 plus autosampler
- Four : Waters Modèle 038040
- Colonne : Aminex HPX-87H, 300x7,8 mm
- Détecteur : réfractomètre Waters Modèle 2410 réfractive index detector.
- Logiciel Millennium 2010, Chromatography manager. Utilisé pour le contrôle de la chromatographie, l'acquisition de données et l'intégration.

Les conditions de chromatographie utilisées pour le dosage des acides organiques et de l'éthanol sont les suivantes :

- Phase mobile : H₂SO₄ 6 mM, filtrée (0,45 µm) et dégazée sous hélium.
- Température : 65°C
- Débit : 0,8 ml/min
- Pression : 1000 psi
- Volume injecté 10 µl

2.9. Dosage de l'amidon

Dosage de l'amidon total

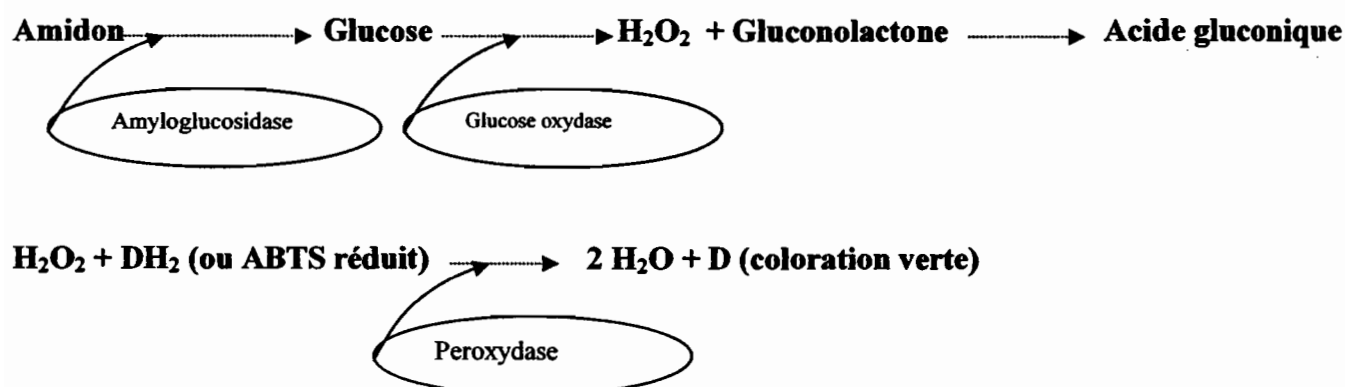
Il repose sur la méthode décrite par Batey (1982) et Holmes *et al.* (1986) qui comprend l'hydrolyse enzymatique de l'amidon natif successivement par une alpha-amylase (EC 3.2.1.1) (Termamyl 120L, Novozym, Bagsvaerd, Denmark) puis par une

amyloglucosidase fongique (EC 2328722) (Fluka 10115). La concentration en glucose de l'hydrolysats est déterminée par colorimétrie à $\lambda=560$ nm avec un facteur de conversion de 0,9. Compte tenu de la faible teneur en oligosaccharides et en dextrines des farines n'ayant pas subi de traitement susceptible de dégrader l'amidon, les résultats de cette détermination peuvent être assimilés à des teneurs en amidon total.

Dosage de l'amidon endommagé ou détermination du taux de gélatinisation

L'amidon est dit endommagé lorsque le grain d'amidon a perdu son intégrité, devenant ainsi sensible à l'action des amylases. L'amidon endommagé est plus facilement hydrolysé par l'amyloglucosidase (endo-amylase hydrolysant les liaisons α -1-4) pour donner du glucose. Après libération du glucose, le reste de la réaction se poursuit de la même manière que pour la détermination de la teneur en amidon total.

Le glucose libéré par l'hydrolyse enzymatique est dosé par colorimétrie au glucose oxydase-peroxydase-ABTS (Chiang et Jonhson, 1977).



2.10. Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl

Les protéines ont été dosées par la méthode de Kjeldahl (norme NF V03-050, 1975) qui consiste à doser l'azote organique après minéralisation de l'échantillon. Le sulfate d'ammonium contenu dans la solution minéralisée libère, après alcalinisation, de l'ammoniaque qui est entraîné par distillation à la vapeur, recueilli et fixé par une solution d'acide borique 4%, puis titré par une solution d'acide sulfurique 0,04 N.

Dans les conditions opératoires, 1 ml d'H₂SO₄ 0,04 N est équivalent à 0,56 mg d'azote. Pour obtenir la teneur en protéines nous avons utilisé le coefficient de conversion de l'azote en protéines du soja soit $k = 6,25$.

2.11. Dosage des lipides

Les échantillons sont traités à l'acide chlorhydrique 8 N, puis les lipides extraits à l'éther de pétrole par le système HT Soxtec de Tecator (note application n° 3144). Le solvant est ensuite évaporé sur une plaque chauffante qui équipe le système. La teneur en lipide est ensuite déterminée par gravimétrie en utilisant une balance de précision à $\pm 0,1$ mg (AE modèle 166 Delta Range de Mettler Viroflay, France).

2.12. Détermination de la teneur en cendres

Les cendres sont dosées selon la norme NF 03-720 (1971). Le principe de cette méthode est le maintien de la prise d'essais dans une atmosphère oxydante à une température de 550°C jusqu'à masse constante, en assurant la combustion intégrale de toutes les matières organiques. La teneur en cendre des échantillons est obtenue en calcinant 2 g d'échantillon à 530°C dans une capsule en silice pendant 3 h.

2.13. Détermination de la teneur en fibres insolubles ADF

Les fibres insolubles ont été dosées par la méthode de Van Soest (1963). Les fibres ADF correspondent approximativement à la cellulose et à la lignine. Un gramme d'échantillon subit une dégradation de l'amidon puis une incubation avec le réactif ADF. La teneur en fibres est déterminée par gravimétrie, après soustraction des quantités de protéines et de cendres présentes dans les résidus. Ces déterminations ont été réalisées à l'aide d'un Dosi-fiber (Selecta, Barcelone, Espagne). Lorsque la teneur en lipides est supérieure à 5%, les échantillons doivent préalablement être délipidés à l'éther de pétrole.

2.14. Dosage des inhibiteurs trypsiques

Les inhibiteurs trypsiques sont dosés selon la norme NF-XP V18-202 (1997) modifiée. Une prise d'essai de 0,1 g est finement broyée ($<500 \mu\text{m}$) puis mise en suspension dans de l'acide chlorhydrique 0,0025 N. Des volumes croissants de cette suspension sont ensuite mis en contact avec la solution BAPNA ($\text{N}\alpha$ -Benzoyl-L-arginine-4-nitroalanilide hydrochloride) (réf. B 4875). Après blocage de la réaction par de l'acide acétique, la coloration, due à la formation de p-nitroalanine (complexe trypsines-BAPNA), est mesurée au spectrophotomètre à $\lambda=410 \text{ nm}$.

Les résultats sont exprimés en unités de trypsine inhibée par mg de matière sèche de l'échantillon (TUI/mg de MS) sachant qu'une unité de trypsine est arbitrairement définie

comme la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une augmentation de 0,01 unité d'absorption à 410 nm pour 10 ml de mélange réactionnel dans les conditions définies ci-dessus.

2.15. Détermination de la valeur énergétique

La valeur énergétique des aliments est calculée selon le FAO (2003). Le pouvoir calorifique des différents nutriments a été mesuré expérimentalement dans les meilleures conditions. A partir de ces valeurs expérimentales, des valeurs moyennes ont été fixées pour chaque nutriment.

Valeurs caloriques moyennes

Protéines : 4 kcal/g (17 kJ) ; Lipides : 9 kcal/g (38 kJ) ; Glucides (oses assimilables) : 4 kcal/g (17 kJ) ; Alcool : 7 kcal/g (30 kJ) ; Polyols (sucres alcools) : 2,4 kcal/g (10 kJ) ; Acides organiques : 3 kcal/l (13 kJ) ; Polydextrose (maltodextrines, hydrolysats d'amidon) : 1 kcal/g (4 kJ). La valeur calorique des vitamines est négligeable.

3. Analyses statistiques

Sauf indication contraire, les dosages ont été réalisés en triple et les données présentées sont les moyennes de ces trois déterminations $\pm$ écart-type.

CHAPITRE 3

Caractérisation des matières premières et essais préliminaires

Introduction

Les matières premières utilisées au cours de notre travail sont la farine de riz et la farine de soja. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons caractérisé les matières premières. Dans la deuxième partie, nous avons étudié la capacité naturelle de *Lactobacillus plantarum* A6 (bactérie lactique amylolytique) à fermenter les suspensions de farines de riz seules ou en combinaison avec du soja à forte teneur en matière sèche (22%).

1. Caractérisation des matières premières

1.1. Composition globale des matières premières

La composition globale des matières premières est analysée selon des méthodes déjà décrites au chapitre 2. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.1 et 3.2. Toutes les analyses sont faites en triple, l'analyse du facteur antitrypsique est faite en double.

Tableau 3.1. Composition chimique des matières premières (% de MS)

	Amidon (%)	Protéines (%)	Lipides (%)	Cendres (%)	Fibres ADF (%)	Facteur antitrypsique (TUI/mg MS)
F.R.	89,92 ±0,60	7,82±0,08	0,88±0,01	0,30±0,01	1,16±0,09	0,57
F.S.	-	42,39±0,42	22,14±0,36	4,66±0,15	2,70±0,11	0,73
F.M.	69,18±1,38	14,34±0,01	5,43±0,03	1,27±0,01	1,55±0,18	0,69

*F.R : Farine de riz F.S : Farine de soja F.M : Farine de mélange MS:matière sèche
TUI : Trypsine Unité Inhibiteur.*

Les résultats d'analyse montrent que les teneurs en amidon, protéines, lipides, cendres et fibres dans la farine de riz et la farine de soja sont du même ordre de grandeur que celles décrites généralement dans la littérature.

La teneur en facteur antitrypsique des farines utilisées est négligeable. Pour la farine de soja, cette teneur a diminué notablement au cours du traitement du grain. Elle est de 450 TUI/mg MS dans le grain entier, puis 260 TUI/mg MS dans le grain décortiqué et de 0,73 TUI/mg MS dans la farine de soja.

Les teneurs en oses solubles sont très faibles dans la farine de riz contrairement à la farine de soja pour laquelle ils représentent 14% de la matière sèche, principalement sous forme de saccharose et de stachyose. Les autres oses détectés en quantités mesurables sont le raffinose, le fructose, le glucose et le maltose (tableau 3.2).

Tableau 3.2. Teneurs en oses solubles des farines (% MS)

Farines	Glucose (%)	Fructose (%)	Saccharose (%)	Maltose (%)	Raffinose (%)	Stachyose (%)	Verbascose (%)
F.R.	0,31	-	0,09	-	-	-	-
F.S.	0,03	0,05	6,79	0,03	0,80	4,90	0,14
F.M	0,28	0,03	1,92	0,05	0,20	1,02	0,03

F.R : Farine de riz F.S. : Farine de soja F.M : Farine de mélange

Les α -galactosides comme le raffinose, le stachyose et le verbascose sont des facteurs antinutritionnels qui engendrent des flatulences et des douleurs abdominales. Ces trois sucres ne sont pas totalement éliminés lors des traitements thermiques mais le trempage, la germination ou la fermentation peuvent conduire à une diminution de leurs teneurs (Obob *et al.*, 2000 ; Silvestroni *et al.*, 2002). Les essais de dégradation des α -galactosides seront présentés dans le chapitre 6.

1.2. Analyse granulométrique des farines

La taille des particules influence l'effet de la température, le degré de gélatinisation et la capacité d'hydrolyse de l'amidon par les bactéries lactiques amylolytiques. Deux méthodes de mesure de la taille des particules sont utilisées : le tamisage et la granulométrie laser. Les valeurs obtenues par tamisage sont inférieures à celles déterminées par granulométrie laser. Le pourcentage de farine tamisée avec la maille à 106 μm pour la farine de riz, de soja et de mélange sont respectivement de 80,14, 56,82 et 77,16%. Le pourcentage cumulé des particules de diamètre égal ou inférieur à 106 μm (calculé d'après l'analyse granulométrie laser) est respectivement de 95, 53; 89, 27 et 89,88% (tableau 3.3).

Tableau 3.3. Pourcentage de particules des farine de taille inférieure à 106 et à 180 μm .

Farines	Taux de farine tamisée (%)			
	106 μm		180 μm	
	Tamisage	Laser	Tamisage	Laser
Farine de riz	80,14	95,53	96,35	98,88
Farine de soja	56,82	89,27	92,55	95,32
Farine de mélange	77,16	89,88	95,27	95,78

Les différences sont observées entre les résultats obtenus avec les deux méthodes surtout pour les particules de taille inférieure à 106 μm , et surtout pour la farine de soja. Les particules obtenues après le broyage ont tendance à adhérer entre elles surtout pour la farine de soja (probablement en raison de la forte teneur en lipides) et ne sont pas séparées par les systèmes

de ventilation et d'aspiration du tamiseur qui ne sont pas totalement efficaces contrairement à la granulométrie laser qui dispose de systèmes de mélange et de sonde ultrason plus efficaces.

Les courbes de fréquence de distribution et de cumul des diamètres des particules par granulométrie laser sont présentées dans la figure 3.1.

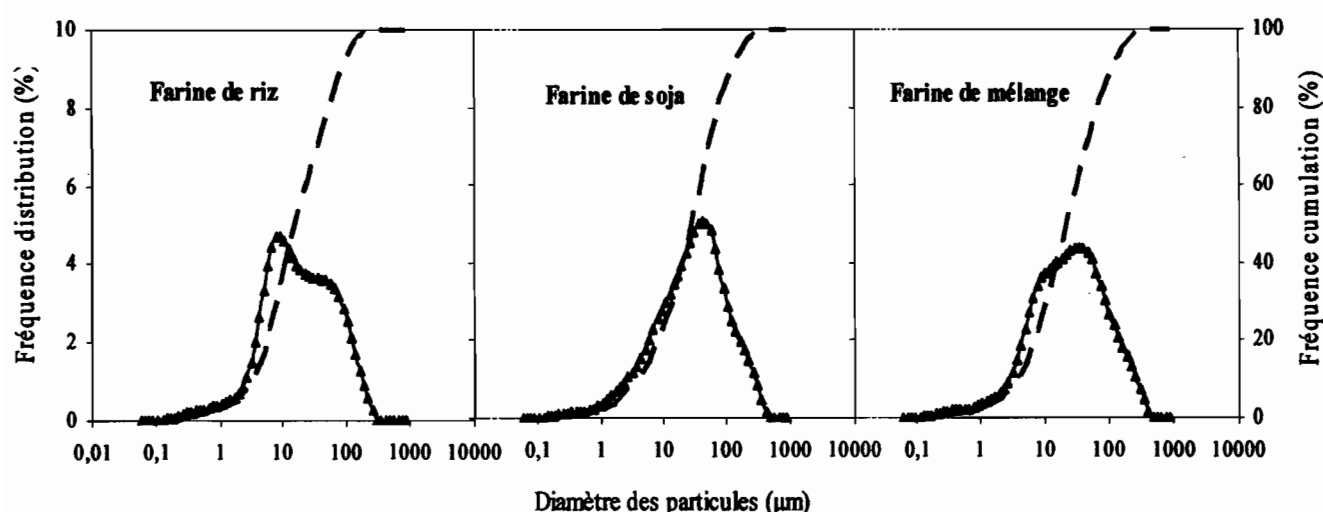


Figure 3.1. Courbes de distribution et de cumul de granulométrie des farines
Symboles : $\blacktriangle$: fréquence distribution ; —. — : fréquence cumulation

La courbe de distribution de la taille des particules pour la farine de riz est bimodale, tandis que pour la farine de soja la distribution est normale. La distribution de taille des particules observée pour le mélange des deux farines semble être la résultante du mélange des particules de la farine de soja et de la farine de riz.

1.3. Détermination de l'enthalpie différentielle des farines utilisées

Pour la farine de riz, la détermination de la teneur en amylose, la température de gélatinisation, la température de pic et l'enthalpie de gélatinisation ont été mesurées par analyse enthalpique différentielle (DSC) (Mestres *et al.*, 1996). La teneur en amylose de la farine de riz est de 22,6%. C'est une valeur intermédiaire comparativement à celles décrites par Juliano et Villareal en 1991. La température de début de gélatinisation est de 62,6°C et la température du pic de gélatinisation est de 71,2°C. Ces valeurs sont les moyennes de deux mesures.

2. Essais préliminaires

2.1. Fermentation des suspensions de farines de riz seules ou en combinaison avec du soja par la souche *Lb. plantarum* A6

Notre premier objectif est d'étudier la capacité naturelle des souches de bactéries lactiques amylolytiques à hydrolyser la farine de riz seule ou en mélange avec du soja. Il est entendu que l'ajout de farine de soja non seulement permet une complémentation en protéines pour l'alimentation humaine, mais aussi une source d'acides aminés pour les bactéries lactiques.

La farine de riz seule et le mélange de farines (riz/soja) ont été utilisés pour formuler des produits à 22% en matière sèche qui ont été fermentés par la souche *Lb. plantarum* A6 à 30°C dans des fermenteurs de 200 ml pendant 24 h sous agitation à 100 rpm.

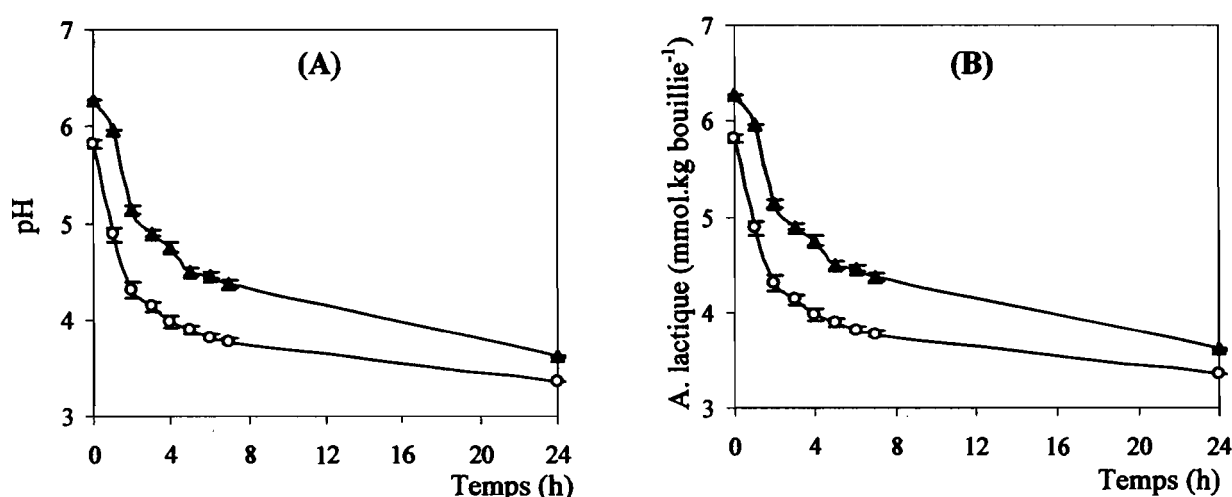


Figure 3.2. Cinétiques d'acidification par *Lb. plantarum* A6 d'un produit à base de farine de riz seule ou en mélange avec de la farine de soja à 22% de matière sèche.

(A) : Variation du pH au cours de la fermentation ; (B) : Production d'acide lactique.

Symboles : o ; Farine de riz ; ▲ : Mélange de farines

Les résultats obtenus montrent que la souche *Lb. plantarum* A6 présente une bonne croissance dans les deux produits testés. La valeur du pH après 24 h de fermentation est de 3,4 pour la suspension de farine de riz et de 3,6 pour le mélange des deux farines. Pour le mélange de farines, la production d'acide lactique est la plus importante (89,4 mmol.kg bouillie⁻¹) alors qu'elle est seulement de 40,4 mmol.kg bouillie⁻¹ pour la farine de riz seule (figure 3.2).

Ces résultats confirment le choix de travailler sur un mélange de farines riz/soja. En plus de cette faible acidification, l'utilisation de la farine de riz brute conduit à des suspensions qui déphasent rapidement et donne des produits de viscosité et de consistance élevées après cuisson. Enfin, ces résultats confirment que la souche *Lb. plantarum* A6 est incapable

d'hydrolyser efficacement l'amidon cru du riz indiquant la nécessité de prétraiter le mélange de farines pour favoriser l'hydrolyse de l'amidon par cette souche amymolytique.

2.2. Fermentation des suspensions de mélange de farines gélatinisées

Pour améliorer la capacité d'hydrolyse des amidons par la souche *Lb. plantarum* A6, la suspension de farine doit être gélatinisée car l'amidon gélatinisé est plus sensible à l'activité des amylases que sous forme native (Bornet, 1992). Le temps de gélatinisation (cuisson) est déterminé en fonction du taux d'endommagement de l'amidon. Un taux d'endommagement élevé favorise l'action des amylases (Ranhotra *et al.*, 1993). Dans cette étude préliminaire, une cuisson à ébullition (~94°C) pendant 10, 15 et 20 minutes est appliquée aux suspensions des farines à 10, 12 et 22% matière sèche (tableau 3.4). Cette opération nécessite une agitation vigoureuse pour homogénéiser le produit (absence de grumeaux) et éviter l'adhérence du gel formé aux parois du récipient.

Tableau 3.4. Mesure du taux d'amidon endommagé en fonction de la durée de cuisson à ébullition des suspensions de farines.

Durée de cuisson (min)	Taux d'endommagement de l'amidon (% de MS)		
	10%	12%	22%
10	78,84	77,03	75,47
15	84,56	83,22	80,67
20	86,72	84,36	81,54

Une cuisson à ébullition pendant 15 minutes provoque un taux d'endommagement de l'amidon supérieur à 80%, valeur qui n'est pas sensiblement augmentée par un allongement de la durée de cuisson à 20 minutes. Compte tenu de ces résultats nous avons choisi de réaliser la gélatinisation de nos produits à ébullition pendant 15minutes.

La suspension de mélange de farines gélatinisée, refroidie estensemencée avec une culture liquide de la souche *Lb. plantarum* A6 puis homogénéisée pour bien répartir les souches microbiennes dans les produits plus ou moins pâteux.

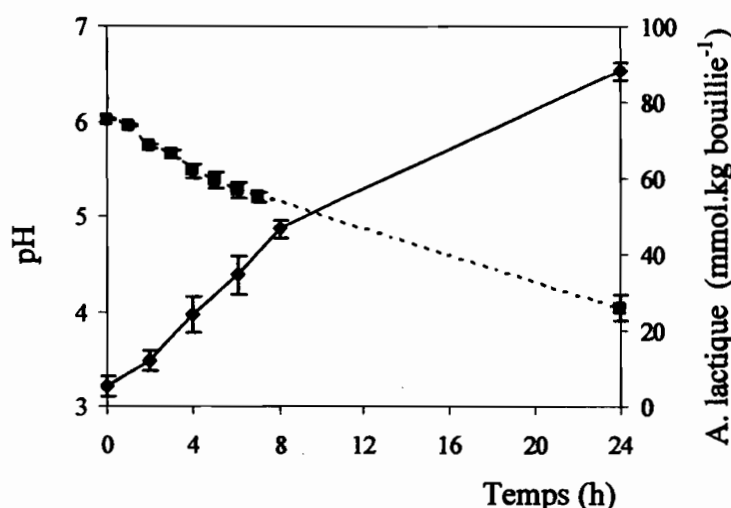


Figure 3.3. Cinétique d'acidification d'un mélange de farines gélatinisé à 22% de MS par la souche *Lb. plantarum* A6 . Symboles : ■ : pH ; ♦ : acide lactique.

Les résultats obtenus (figure 3.3) confirment la capacité de la souche *Lb. plantarum* A6 à fermenter la suspension de mélange de farines gélatinisée à 22% de MS. L'acidification est rapide et conséquente, ainsi la valeur du pH est de 4,0 après 24 h de fermentation pour une concentration finale d'acide lactique de 88,3 mmol.kg bouillie. La production d'acide lactique est du même ordre de grandeur que celle mesurée lors de la fermentation de la suspension de mélange de farines non gélatinisée. Par contre, on observe une diminution importante de la viscosité du produit après la fermentation lactique. Avant fermentation (T_0), la viscosité de la bouillie n'est pas mesurable à la vitesse de cisaillement de 83 s^{-1} ($> 10 \text{ Pas}$) alors qu'après la fermentation, la viscosité mesurée est de 2,5 Pas.

Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer que la fermentation par la souche *Lactobacillus plantarum* A6 de la suspension d'un mélange riz/soja non gélatinisée permet de produire plus d'acide lactique qu'avec la suspension de farine de riz seule. Par contre la fermentation des suspensions non gélatinisées n'a pas d'effet sur la viscosité des produits.

La gélatinisation préalable des suspensions de farines en mélange, avant la fermentation lactique crée les conditions favorables pour l'action de l' α -amylase produite par la souche de *Lactobacillus plantarum* A6 qui entraîne une diminution importante de la viscosité des bouillies fermentées obtenues.

CHAPITRE 4

**Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries:
A new method for preparing high energy density complementary foods
for young children**

Introduction

La fermentation par *Lb. plantarum* A6 de mélanges riz/soja non gélatinisés ne permet pas d'atteindre les objectifs nutritionnels fixés, à savoir une hydrolyse partielle de l'amidon qui permette de préparer des bouillies de consistance liquide à forte teneur en matière sèche et forte densité énergétique. Cependant, le couplage en une seule étape de l'hydrolyse de l'amidon et de la fermentation par l'utilisation d'une telle bactérie lactique amylolytique offre une piste séduisante à explorer.

Le prétraitement par gélatinisation du mélange riz/soja préparé à différentes teneurs en matière sèche, suivi d'une étape de fermentation par la souche A6 couplée ou non à une étape de déshydratation par atomisation ou par lyophilisation, a été étudié en vue de développer de nouvelles combinaisons permettant de préparer des bouillies fermentées riches en énergie.

Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue "*Food Chemistry*".



Available online at www.sciencedirect.com



Food Chemistry xxx (2005) xxx–xxx

Food
Chemistry

www.elsevier.com/locate/foodchem

Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children

Thi Thanh Thuy Nguyen ^a, Gérard Loiseau ^b, Christèle Icard-Vernière ^c,
Isabelle Rochette ^c, Serge Trèche ^c, Jean-Pierre Guyot ^{c,*}

^a Faculty of Food Science and Technology, Hanoi Agricultural University, Gia Lam, Hanoi, Vietnam

^b CIRAD-AMIS, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

^c Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité R 106, Nutrition, Alimentation, Sociétés, BP 64501, 91 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 05, France

Received 4 July 2005; received in revised form 30 September 2005; accepted 30 September 2005

*Corresponding author: jpguyot@mpl.ird.fr

ABSTRACT

The use of amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) in new methods to prepare high energy density complementary foods for young children was investigated. Using gelatinised slurry composed of a mixture of rice with soybean, fermentation kinetics by the ALAB *Lactobacillus plantarum* A6, and chemical and rheological changes were studied at different dry matter (DM) contents. At high DM content (23%), it was possible to obtain a semi-liquid fermented gruel presenting the necessary characteristics to fulfil the energy requirement of young children. Furthermore, combination with spray drying as a post-treatment after fermentation by strain A6 had the additional advantage of enabling the use of pray dried fermented flour to prepare gruels with higher DM content (30–33%) corresponding to 128–140 kcal/100g of gruel.

Keywords: Gruel, rice, soybean, energy density, amylolytic lactic acid bacteria.

1. Introduction

In many developing countries, cereal-based gruels are used as complementary foods for young children. To obtain gruels with a semi-liquid consistency after cooking, suitable for feeding young children, the starchy flour is traditionally diluted with a large quantity of water. At a low flour content (5–10 g dry

matter/100 ml), the gruel has a free flowing consistency and is easy to swallow but its energy density (20–40 kcal/100 g) is lower than the minimum value of 84 kcal/100 g of gruel recommended for children aged 9 to 11 months fed at a rate of 2 meals/day in addition to average breast milk intake (Dewey and Brown, 2003). At higher dry matter content, the gruel

is stiff, due to starch gelatinisation and is thus unsuitable for feeding young children.

Several methods based on partial starch hydrolysis are used to prepare high energy density (HED) gruels with suitable consistency at high dry matter content. They generally include hydro-thermic treatments, such as drum drying or extrusion cooking (Mouquet *et al.* 2003), or enzymatic starch hydrolysis which can be performed after gelatinisation by adding either germinated cereal flour ("power flour") combined or not with lactic acid fermentation (Lorri and Svanberg, 1993; de Benoist, 1999) or industrial amylases (Trèche, 1995). A limited decrease in the viscosity of cereal gruels has also been observed after natural lactic acid fermentation of amylaceous raw material but additional treatments are needed to prepare HED gruels (Lorri and Svanberg, 1993). Amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) have repeatedly been isolated from traditional cereal or cassava-based fermented foods (Johansson *et al.*, 1995; Nwankwo *et al.*, 1989; Morlon-Guyot *et al.*, 1998; Olympia *et al.*, 1995; Sanni *et al.*, 2001). Due to the ability of their α -amylases to partially hydrolyse raw starch (Rodriguez-Sanoja *et al.*, 2000), ALAB can ferment different types of amylaceous raw material such as corn (Nakamura, 1981), potato (Chatterjee *et al.*, 1997), cassava (Giraud and Cuny, 1994). However, under natural fermentation conditions, with limited hydrolysis of raw starch granules, ALAB are not efficient enough to enable the preparation of HED gruels. Nevertheless, the use of selected ALAB as starter cultures could facilitate the development of new biotechnological methods for the preparation of HED fermented gruels, provided the starchy fraction of the raw material receives appropriate pre-treatment. In addition to starch hydrolysis, an additional benefit of lactic acid fermentation would be improving the nutritional and sanitary quality of the food (Holzapfel, 2002; Motarjemi, 2002), in contexts where the nutritional and health status of the consumers (e.g. young children) and local production conditions may be unsatisfactory, which is often the case in many developing countries.

In Asia, given the availability of rice and soybean as well as the traditional consumption

of fermented foods, it would be of interest to investigate the ability of ALAB to ferment rice-soybean mixtures prepared at high dry matter content to obtain new functional foods such as HED-fermented complementary foods. For this reason, the present work investigates the effect of combining gelatinisation and lactic acid fermentation by ALAB or non-amylolytic LAB on the characteristics of rice/soybean slurry as a basis for developing a new (bio-) technological process to produce HED fermented gruels. *Lactobacillus plantarum* A6, a strain isolated from cassava retting in Congo (Giraud *et al.*, 1991a) was selected because of its ability to efficiently hydrolyse starch and also because it is a well-documented strain for which molecular and physiological studies are available (Giraud *et al.*, 1994; Giraud *et al.*, 1997; Florencio *et al.*, 2000). For the sake of comparison, a non-amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum* was used as negative control.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of raw material

Rice (*Oryza sativa* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) were purchased at a market in Hanoi, Vietnam.

Rice was dehulled and milled in a hammer mill with a 150 μ m pore mesh.

Soybeans were processed into fullfat soy flour. The beans were first soaked for 15 min and then sterilized at 121°C for 15 min after the water had been drained from the beans (Kratzer *et al.*, 1990). They were dried in a hot air oven at 65°C to a final moisture content of about 8%. The dried beans were dehulled and then milled with the same hammer mill.

The flour was stored at 4°C.

A blend of 80% rice flour and 20% fullfat soy flour was used throughout this study. This formulation, which corresponds to the energy and macronutrient requirements of young children, was developed using the Alicom non-commercial software created by IRD.

2.2. Experimental design

Gelatinised/homogenised blends prepared at 12, 16, 18 20 and 22% DM were fermented (Fig. 1). Particular attention was paid to the fermented slurries obtained from blends with 12% DM (low energy density) and 22% DM (high energy density). The blend with 22%

DM was used to prepare HED fermented gruels without any further treatment after fermentation (Fig. 1). The blend with 12% DM enabled investigation of an alternative pathway consisting in preparing fermented flours from the fermented slurry either by spray drying or freeze-drying; these "pre-treated" flours were subsequently used to prepare HED gruels by cooking in water (Fig. 1). The characteristics of HED gruels prepared either directly or through the use of fermented flours were compared.

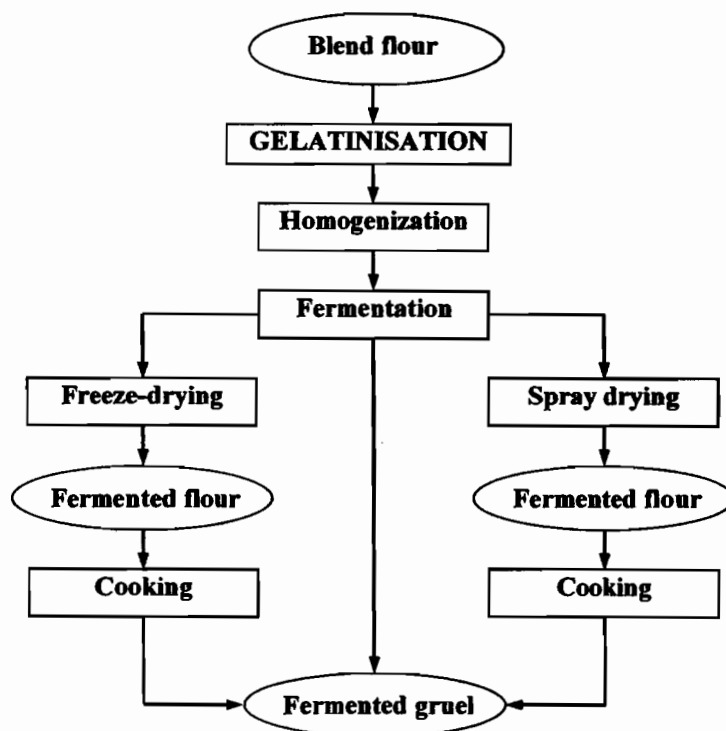


Figure 4.1. Experimental design showing the different process combinations tested to produce fermented gruels or flour from a rice/soybean slurry.

2.3. Pre-treatment of the rice/soybean blend

Gelatinisation

450 ml of slurry was heated until it started to bubble (~ 94°C), gentle boiling was maintained for 15 min under stirring.

After gelatinization, the gruel was cooled to 30°C, bacterial cells (either *Lb. plantarum* A6 or *Lb. plantarum* Lacto Labo) were inoculated, then the preparation was homogenized with a Braun 600W mixer (MR 5550 CA) at maximum speed for 1 min.

2.4 Microorganisms and cultivation methods

The amylolytic strain *Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053, BCCM, Gent, Belgium) was isolated during the process of cassava retting in Congo (Giraud *et al.*, 1991a). *Lactobacillus plantarum* Lacto Labo (France) is a non-amylolytic strain used in a previous study (Giraud *et al.*, 1991b). Both strains are maintained in the stock culture collection of the laboratory and kept in 40% glycerol at -80°C. The cells are routinely propagated by 10% (v/v) inoculation in sterile MRS broth (de Man *et al.*, 1960) and incubated at 30°C overnight. For inoculation in the experiments made with the rice/soybean slurry, the absorbance at 600 nm wavelength (A_{600}) of the overnight culture was measured. Calibration curves (A_{600} vs. CFU/ml) enabled measurement of the cell concentration of the inoculum from the absorbance values; initial concentrations are presented in figures. After determining A_{600} of the inoculum, the cells were harvested by centrifugation at 14,000 g for 10 min. Cell pellets were washed once in physiological sterile solution (0.9%, w/v saline) and then centrifuged once more before being suspended in the physiological sterile solution and used for inoculation.

A_{600} was measured with a Spectronic 401 spectrophotometer (Milton Roy, Paris, France). Before measurement, cell cultures were appropriately diluted in sterile medium to an A_{600} of less than 0.4 for

appropriate readings in the linear range of the relation [A_{600} vs. cell concentration].

Microbial growth during fermentation was measured by plate-count on MRS agar after serial decimal dilutions from an initial suspension containing 10 g of sample homogenized in 90 ml of physiological sterile solution. Incubation was at 30°C for 24 h.

2.5 Fermentation conditions

Fermentation of the gelatinised slurries was performed in batches using 200 ml sterile fermenters filled to 170 ml. Temperature was maintained constant at 30°C. pH was continuously recorded on line using steam sterilizable pH combination electrodes (Broadley James Corporation, California) connected to a TR20A pH transmitter (Demca, France). The rate of pH decrease was calculated as the first derivative of $pH=f(\text{time})$ allowing the maximum rate $(-dpH/dt)_{\max}$ to be determined graphically.

Inoculation was performed with washed cells and the initial cell concentration was estimated as described above.

Samples were regularly taken from the fermentor for microbiological, chemical and physical analysis. All experiments were performed in triplicate.

2.6 Analytical methods

2.6.1. Proximate analysis of raw material and gruels

Crude protein content was determined according to the NF V03-050 standard method (1975) (nitrogen content determination by the Kjeldahl method) with a conversion factor of 6.25.

Crude lipid content was determined by HT6 Soxtec system (Tecator, Höganäs, Sweden) following the instructions in Tecator N° 3144.

Ash content was determined according to the NF 03-720 standard method (1971).

Acid detergent fibre content (ADF), (cellulose and lignin), was determined according to the gravimetric method of

Van Soest (1963) using a Dosi-fiber (Selecta, Barcelona, Spain).

Total starch content was estimated by measuring the glucose concentration using a colorimetric method (560 nm) after enzymatic degradation of starch with α -amylase (EC 3.2.1.1) (Termamyl 120L, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) followed by amyloglucosidase (EC 2328722) (Fluka 10115; Rankonkoma, NY, USA) according to Batey (1982) and Holmes *et al.* (1986) and using a conversion factor of 0.9. The results obtained also included mono- and disaccharides which were disregarded because they were only present in small quantities in raw cereal grains.

Damaged starch was determined by a method based on the evaluation of susceptibility to amyloglucosidase hydrolysis (Chiang and Johnson, 1977; Kainuma *et al.*, 1981). The damage rate is the ratio of the starch fraction susceptible to amyloglucosidase hydrolysis to total starch. Analyses of crude protein, crude lipid and ADF fibres were made in triplicate. Analyses of total starch and damaged starch were made in duplicate.

The **dry matter** content of gruels was determined by oven-drying at 105°C to constant weight.

Data were assessed by analysis of variance (ANOVA).

2.6.2. Chemical analysis

2 g of gruel sample were added to 8 ml of sterile water and homogenised with an ultra turrax-T8 (IKA, Staufen, Germany) at 10,000 rpm for 1 min. 1.3 ml of this suspension was mixed with either 0.2 ml H₂SO₄ 2N in microtubes (for lactic acid analysis) or 0.2 ml NaOH 5N (for sugar analysis) and centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant was frozen at -20°C until analysis.

Lactic and acetic acid concentrations were determined by HPLC using an Aminex HPX-87H column (Biorad, Yvry-sur-Seine, France) and sugars were analysed by HPIC

using a Dionex Carbopac PA1 column as previously described (Calderon *et al.*, 2001).

2.6.3. Rheological properties

Apparent viscosity measurements were performed on gruels at 30 ± 0.5°C with a Haake viscometer VT550 with SV-DIN coaxial cylinders driven by a PC computer with the Rheowin 2.67 software. The shear rate and the shear time were 83 s⁻¹ and 10 min respectively (Mouquet and Trèche, 2001).

The consistency of the gruels was assessed by measurement in a Bostwick consistometer (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, Virginia, USA) (Bookwalter *et al.*, 1968). Measurements were made at 30°C and the Bostwick flow was expressed in mm/30 sec.

2.6.4. Energy density

The energy values were calculated with 16.7 kJ/g (4kcal/g) for protein, 37.4 kJ/g (9kcal/g) for fat and 16.7 kJ/g (4kcal/g) for carbohydrates (FAO, 2003).

3. Results

3.1 Fermentation kinetics of gelatinised rice/soybean slurries prepared with different dry matter contents

3.1.1. Growth of the amylolytic and non amylolytic *Lactobacillus plantarum* strains in gelatinised rice/soybean slurries

The ability of the amylolytic and non amylolytic *Lactobacillus plantarum* strains A6 and Lacto Labo, respectively, to grow on gelatinised mixtures of rice and soybean flours was investigated by inoculating the slurries at low and high DM content (12.7 and 23.4% DM).

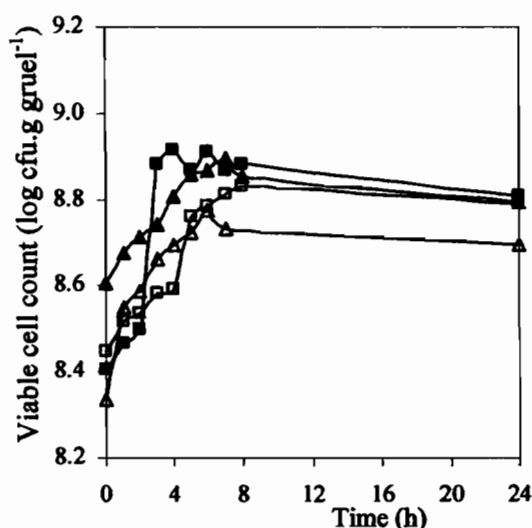


Figure 4.2. Growth of strains *Lactobacillus plantarum* A6 and Lacto Labo in gelatinised rice/soybean slurries. Symbols: (Δ): 12.7% (A6); (□): 12.7% (Lacto Labo); (▲): 23.4% (A6); (■): 23.4% (Lacto Labo).

As shown in Fig. 2, the slurries were able to support a limited growth of the two strains which reached a maximum population concentration of 8.7-8.9 log cfu.g⁻¹ in less than 6 h. It was difficult to distinguish a clear single logarithmic phase during growth, and consequently the specific growth rate was not calculated.

3.1.2. Kinetics of pH decrease, organic acid formation and sugar changes during fermentation

pH decrease is an important parameter to assess how fast the process will reach conditions (pH lower than 4.5) which can hinder or inhibit the growth of food-borne pathogens. pH was recorded during fermentation by the strain A6 of slurries prepared at DM contents ranging from 12.7 to 23.4%. For the strain Lacto Labo used as negative control, the pH decrease was only recorded during fermentation of the slurries prepared at 12.7 (low DM content) and 23.4% DM (high DM content). The kinetics of organic acid formation was investigated at low and high DM content for both strains

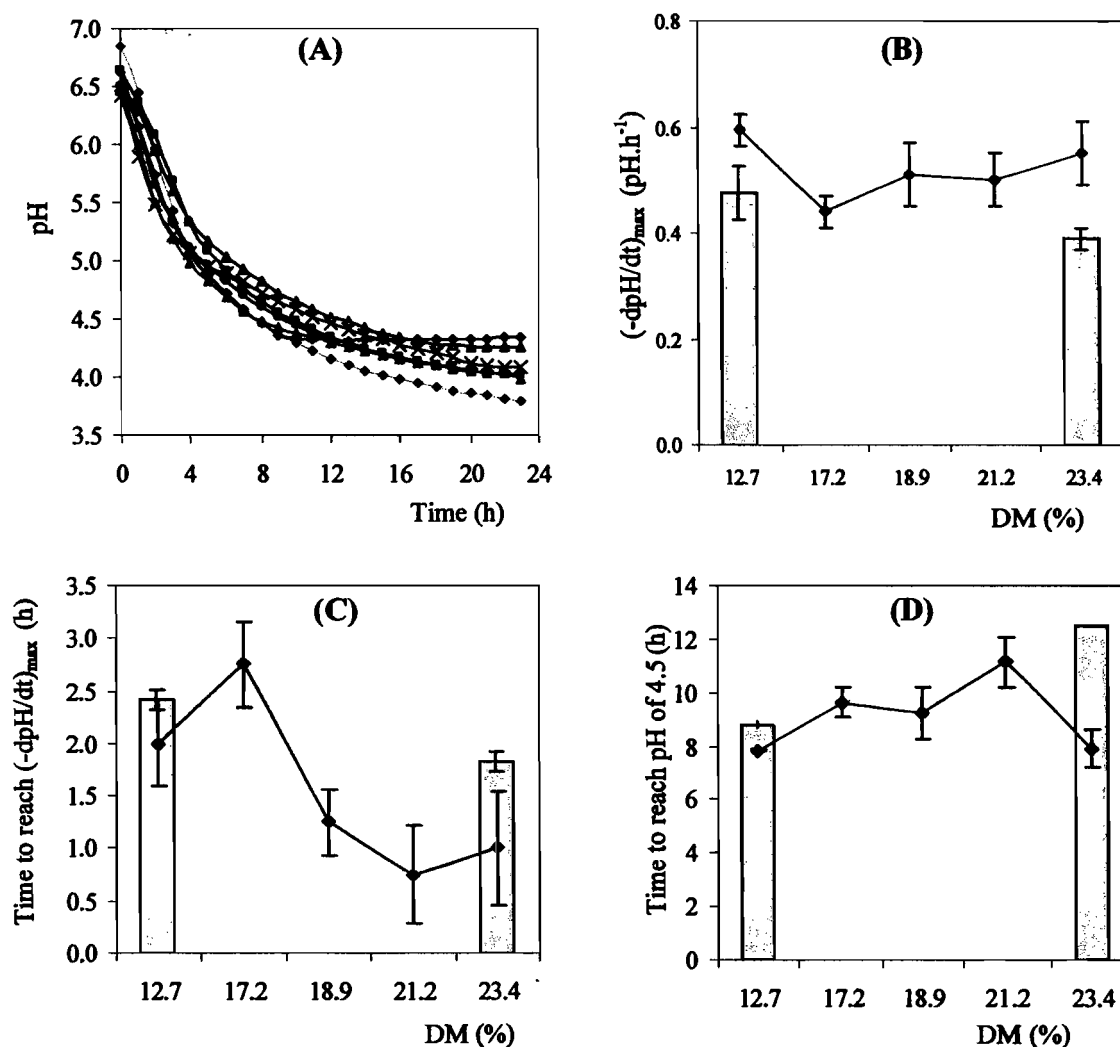


Figure 4.3. Changes in pH during fermentation by strains *Lactobacillus plantarum* A6 and Lacto Labo at different dry matter content. (A): Kinetics of pH decrease during fermentation of the slurries. Symbols: (♦): 12.7% (A6); (■): 17.2% (A6); (●): 18.9% (A6); (X): 21.2% (A6); (▲): 23.4% (A6); (◇): 12.7% (Lacto Labo); (△): 23.4% (Lacto Labo). (B): Maximum rate of pH decrease; (C): Time to reach $(-dpH/dt)_{max}$; (D): Time to reach pH 4.5. Symbols: (♦): A6; (grey bars): Lacto Labo.

In all assays, pH decrease was observed without any lag from the beginning of fermentation. With the strain A6 pH dropped from an initial value of 6.40 to final values of 3.79 and 4.01 at 12.7% and 23.4% DM content, respectively, whereas final pH was higher with the Lacto Labo strain (Fig. 3A). As for the maximum rate of pH decrease $(-dpH/dt)_{max}$, whereas no major variations were observed at the different DM contents (Fig. 3B), the time to reach the maximum rate of pH decrease varied from 1 to 2.5 h (Fig. 3C). Shorter times were obtained at higher DM contents (between 18.9 to 23.4%) for both strains. The time required to reach a pH of 4.5

below which inhibition of food-borne pathogens could be expected was 8-11 h for the A6 strain at different DM content. For the Lacto Labo strain a longer time (12 h) was observed at 23.4% DM content (Fig. 3D).

For both strains, lactic and acetic acids were the only end products detected during fermentation (Fig. 4), acetic acid being produced in small amounts as expected from the metabolic characteristics of the *Lb. plantarum* strains, variations in pH were consequently mainly due to lactic acid which is a stronger organic acid than acetic acid. A higher rate of metabolite production was

obtained at high DM contents than at low DM contents. At high DM contents, lactic acid was produced at higher concentrations with the amylolytic strain A6 than with the non-amylolytic strain Lacto Labo. At low DM content, lactic acid production started to level off early with the strain Lacto Labo whereas it continued to increase strongly with the strain A6 (Fig. 4) suggesting the implication of an additional carbon source.

Continued production of acetic acid at an extremely low concentration by strain Lacto Labo at the same time as a progressive levelling off of lactic acid production is consistent with the ability of *Lb. plantarum* species to convert some lactic acid into acetic acid (Pintado *et al.* 2005).

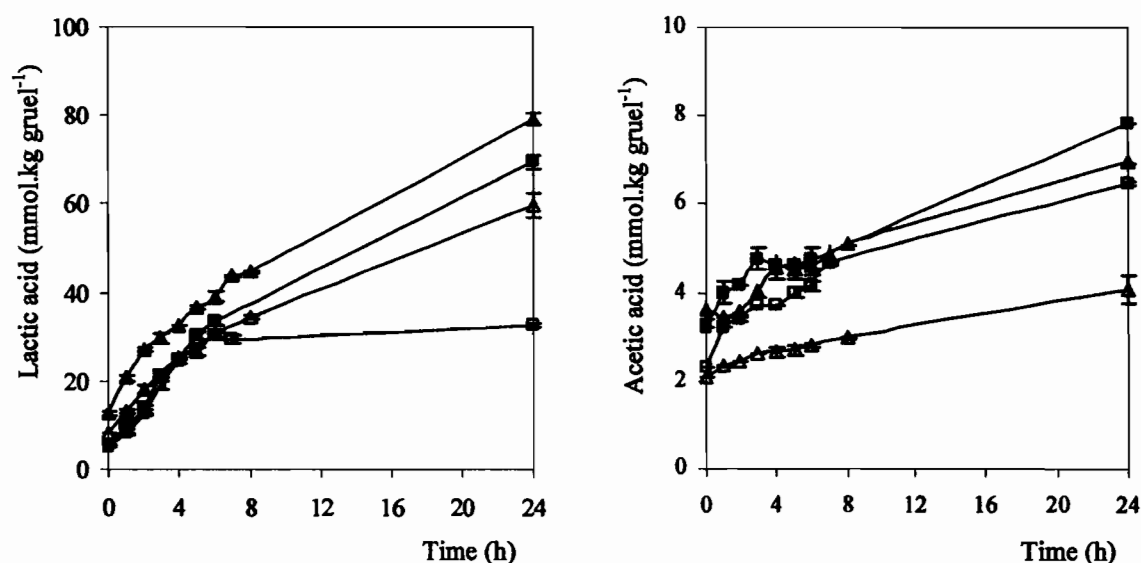


Figure 4.4. Organic acid production during fermentation by strains *Lactobacillus plantarum* A6 and Lacto Labo at low (12.7%) and high (23.4%) dry matter content. (A): Lactic acid; (B): Acetic acid.

Symbols: (Δ): 12.7% (A6); (□): 12.7% (Lacto Labo); (▲): 23.4% (A6); (■): 23.4% (Lacto Labo).

Concerning sugar changes during fermentation (Fig. 5) at low DM content, acid formation by the strain A6 cannot be explained by the consumption of mono and disaccharides since sucrose was not consumed and glucose concentration increased, strongly suggesting that starch is the extra-carbon source responsible for lactic acid production. In the strain Lacto Labo sucrose was the only sugar which decreased. In contrast, at high DM content, while the strain Lacto Labo still

presented the same pattern of substrate consumption, sucrose was fermented by strain A6 and maltose and glucose were produced at low concentrations. As for the α -galactosides (raffinose, stachyose and verbascose), neither strain was able to ferment any of these antinutritional factors (Fig. 5).

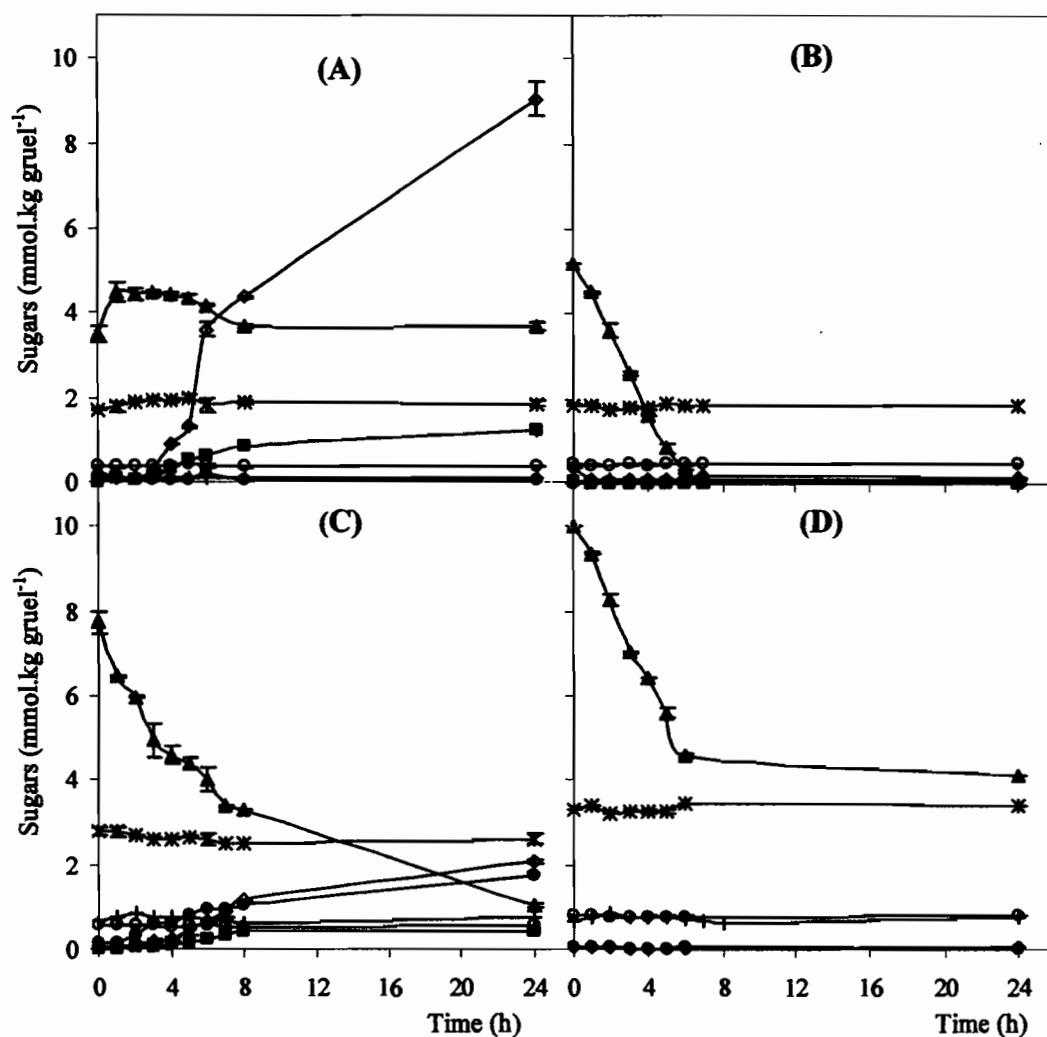


Figure 4.5. Sugar changes during fermentation of slurries by strains *Lactobacillus plantarum* A6 and Lacto Labo at low (12.7%) and high (23.4%) dry matter content. (A): 12.7% (A6); (B): 12.7% (Lacto Labo); (C): 23.4% (A6); (D): 23.4% (Lacto Labo).

Symbols: (◇): glucose; (■): fructose; (▲): sucrose; (●): maltose; (○): raffinose; (*): stachyose; (+): verbascose

In addition, as shown in Table 1, no major change in the global composition of the gruel was observed due to the fermentation, suggesting that at least the gross estimate of the nutritional value of gruels, based on the initial blend composition, is not affected by the fermentation process.

The initial rate of damaged starch in the blend flour was 12%. These rates in gelatinised gruels before fermentation were 83 and 81% at 12.7 and 23.4% DM, respectively, and did not vary to a great extent in either strain after fermentation.

Table 4.1.: Chemical analysis of the rice-soybean flour and fermented gruels (% DM $\pm$ SD*)

	Crude proteins (%)	Crude lipids (%)	Ash (%)	Fiber (%)	Damaged starch rate (%)
Rice/soybean flour	15.68 $\pm$ 0.4 5	5.54 $\pm$ 0.08	1.29 $\pm$ 0.0 3	1.87 $\pm$ 0.0 3	25.01
Fermented gruel at 12.7% DM-by A6	14.63 $\pm$ 0.0 7	5.05 $\pm$ 0.03	1.54 $\pm$ 0.0 2	1.47 $\pm$ 0.0 0	85.50
Fermented gruel at 12.7% DM-by Lacto Labo	14.52 $\pm$ 0.0 9	4.63 $\pm$ 0.05	1.48 $\pm$ 0.0 1	1.73 $\pm$ 0.0 7	84.05
Fermented gruel at 23.4% DM by A6	13.09 $\pm$ 0.2 6	4.78 $\pm$ 0.16	1.47 $\pm$ 0.0 3	1.91 $\pm$ 0.11	82.03
Fermented gruel at 23.4% DM by Lacto Labo	16.20 $\pm$ 0.1 4	5.01 $\pm$ 0.03	1.42 $\pm$ 0.0 0	2.20 $\pm$ 0.1 4	81.45

*SD: standard deviation

3.1.3 Rheological changes due to fermentation

Apparent viscosity and Bostwick flow were determined after gelatinisation of the slurry just before inoculation, thereafter at time 0 just after the inoculation and homogenization steps and during fermentation.

After gelatinisation, when homogenization was not performed, viscosity could not be measured in the mixtures prepared at different DM contents because of their solid consistency. Measurements were made possible once the gelatinised mixtures were homogenized after inoculation and viscosities at this stage were between 2 and 5 Pa.s (Fig. 6) depending on the % DM of the blend. During fermentation by strain A6 of the gruels with different DM contents, viscosity decreased gradually and after 24 h fermentation values of

0.05 Pa.s and 0.5-0.6 Pa.s were obtained for the gruels prepared with 12.7% and between 17.2-23.4% DM, respectively. At the end of fermentation, the Bostwick flow was higher than 200 mm for a few seconds in the gruel with 12.7% DM and 68 mm/30s in the gruel with 23.4% DM (Fig. 6). In the gelatinised blend prepared with 12.7% DM, which was fermented by the strain Lacto Labo, a lower decrease in viscosity was observed with a final value at 24 h of 1.15 Pa.s and a Bostwick flow of 26 mm/30s. Furthermore, in contrast with the experiments performed with strain A6, it was impossible to measure the gruel with 23.4% DM fermented by strain Lacto Labo because it remained very thick

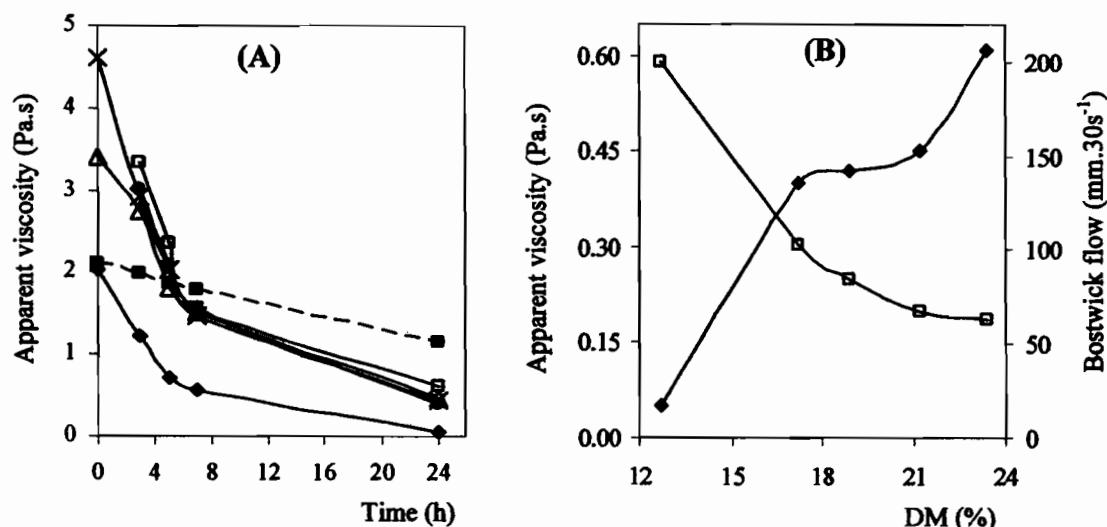


Figure 4.6. Effect of fermentation by strains *Lb. plantarum* A6 and Lacto Labo on the viscosity and Bostwick flow of the rice/soybean slurry.

(A): Kinetics of viscosity changes during fermentation of the Gruel. Symbols: (♦): 12.7% (A6); (△): 17.2% (A6); (X): 18.9% (A6); (●): 21.2% (A6); (□): 23.4% (A6); (■): 12.7% (Lacto Labo).

(B): Final viscosity and Bostwick flow of fermented Gruels at different dry matter content. Symbols: (♦): apparent viscosity; (□): Bostwick flow.

3.2. Rheological comparison of Gruels prepared from sour flours obtained by either freeze-drying or spray drying of fermented gelatinised blends

As an alternative to direct processing of the blends into a fermented Gruel with high DM content, investigations were undertaken to see if HED fermented Gruels could also be prepared from flours obtained from dehydrated fermented slurries with low DM content. Flours were prepared by either freeze-drying or spray drying of gelatinised blends with low DM content fermented by strain A6. Subsequently, rheological measurements were made on Gruels prepared with flours with different DM contents.

Rheological characteristics of Gruel prepared at different DM contents from freeze-dried flours were similar to those obtained with the gelatinized suspensions fermented by strain A6. In particular, at 12.7% DM and 23.4% DM the viscosity of the Gruels was 0.05 Pa.s and 0.5 Pa.s, the Bostwick flow was more than 200 mm/30s for a few seconds and 80 mm/30s, respectively. After freeze-drying, the number of viable cells of strain A6 in the sour flours was $3.2 \cdot 10^4$ cfu/g DM.

The Gruels prepared at different DM contents from fermented flours obtained by atomization gave very interesting results: at 32% DM, the

viscosity of Gruel prepared with the atomized flour was 1.02 Pa.s and the Bostwick flow was 65 mm/30s. From 12 to 24% DM the viscosity of the resulting Gruels was between 0.01-0.1 Pa.s, and for a few seconds, the Bostwick flow was higher than 200 mm. In addition to these results, it is interesting to note that atomization did not drastically affect the viability of strain A6 since high counts (2×10^6 cfu/g DM of sour flour) were obtained after the treatment.

4. Discussion

Poor growth of both strains on the gelatinised mixture suggests limitations in some nutrients or growth factors for LAB. It is also possible that heat-sensitive growth factors were destroyed during cooking. Furthermore, the fact that it was not possible to clearly identify a single logarithmic growth phase could be a consequence of the complex mixture of nutrients and growth factors which comprised the blend. Consequently, in such conditions, such a growth pattern is more realistic than a classical smooth "S-shape" logarithmic growth curve, since simultaneous or successive depletion of nutrients could have been responsible for the non-homogeneous growth behaviour during the fermentation process.

Preliminary experiments showed that the amylolytic strain A6 was incapable of efficient starch fermentation in the raw rice/soybean

mixture (data not shown) making it necessary to gelatinise it. After gelatinisation, results at low DM contents strongly suggest that the formation of end-products by strain A6, as opposed to strain Lacto Labo used as negative control, was due to the use of starch. It has previously been reported that sucrose at a high concentration can negatively affect amylase production and consequently starch fermentation (Giraud *et al.*, 1991a). The tuning of starch fermentation by sucrose concentration is clearly illustrated here. At a low DM content corresponding to a low sucrose concentration, starch fermentation was not affected, as indicated by glucose and maltose production right from the onset of the fermentation, and competition between substrates facilitated the use of products of starch hydrolysis. However, at a high DM content, due to the higher availability of sucrose, in agreement with a previous report by Giraud *et al.* (1991a), starch fermentation by strain A6 was hindered until sucrose decreased to a concentration which enabled starch fermentation, indicated by late maltose and glucose production.

Sucrose is a very common natural sugar in plants; and, in addition, other sugars, such as α -galactosides present in soybean, are antinutritional factors (ANF). Fermentation kinetics showed that unfortunately strain A6 was not able to ferment raffinose, stachyose and verbascose. Recently, LeBlanc *et al.* (2004) showed that complete removal of raffinose and stachyose in a commercial soymilk could be obtained by using a single culture of *Lb. fermentum* strain CRL 722. Such a result, together with the results presented here should facilitate the development of a mixed culture starter to address nutritional problems linked both to low energy density and to the α -galactoside content of the rice/soybean gruel.

As for ways to increase energy density by increasing DM content, direct evidence of starch hydrolysis by strain A6 was provided by changes in viscosity and in Bostwick flow, since fermentation by this strain induced a much bigger decrease in viscosity than that observed when strain Lacto Labo was used. The limited decrease in viscosity during fermentation of the slurry by the non-amylolytic strain Lacto Labo is not surprising since it has been reported that a pH below 4.0 (Svanberg, 1995) decreased the viscosity of the

paste in cereal starch gruels. Wanink *et al.* (1994) with maize-sorghum-soy porridges showed that viscosity decreased when the pH was 5.0-5.5, but that at a lower pH, the viscosity of the porridge increased. These apparently contradictory results could be due to the composition of the different mixtures used; that is, mixing soybean with cereals might induce different rheological behaviour to that observed in fermented gruels prepared from a single cereal. Nevertheless, whatever the effect of pH on viscosity, previous results (Svanberg, 1995; Wanink *et al.*, 1994) showed that fermentation with non amylolytic LAB will not make it possible to prepare HED gruel with a high DM content, unless germinated cereals (power flours) are used as a source of amylase. In contrast, changes due to fermentation by the ALAB strain allowed preparation of fermented gruels with a high DM content without power flour or malt, with a calculated energy density of 98 kcal/100g of gruel at 23% DM, which is higher than the recommended value of 84 kcal/100 g of gruel for children of 9 to 11 months of age at a rate of 2 meals/day, in addition to average breast milk intake (Dewey and Brown, 2003). Furthermore, the fact that flours can be prepared from the fermented gruels, could increase the number of possible ways to prepare such a functional food. In this respect, spray drying as a post-treatment combined with fermentation by ALAB seems more promising than freeze-drying, since spray drying had the additional advantage of enabling use of the resulting flour to prepare gruels with 30-33% DM content, corresponding to 128-140 kcal/100g of gruel. The fact that amylase and lactic acid production can be combined in a single fermentation step would not only provide a way to increase the energy density of gruels but also to improve its safety given that lactic acid fermentation is an efficient way to inhibit food-borne pathogens. However, depending on the context, it might be preferable to prepare flours instead of ready-to use gruels, *e.g.* for handling, packaging and storage. Drying the fermented slurry by spray drying would have the advantage of providing additional protection against spoilage and pathogenic microflora. Lardinois *et al.* (2003) successfully applied spray drying in an African context (Senegal) to a millet-based fermented slurry to produce naturally fermented flours thereby

opening the way for the use of this technology in developing countries. Survival of LAB after this treatment would represent an additional advantage providing the product with some resistance against microbial contamination and opening the way to for the development of a probiotic product in a dry form.

Conclusion

To our knowledge, this is the first time that ALAB have been used in a simple process combination which consists in gelatinisation, homogenisation, fermentation, making it possible to prepare HED fermented gruels. This represents a new alternative to existing biological methods such as the addition of power flour, malt or commercial α -amylases (Onyango *et al.*, 2004; Trèche, 1999; Mouquet *et al.* 2003). This project focused mainly on the increase in energy density of a cereal-soybean gruel, it intentionally did not tackle other nutritional problems which can be addressed by existing methods (e.g. fortification with micronutrients, removal of some antinutritional factors by roasting of soybean, etc.), however investigations are now underway to investigate the biological removal of α -galactosides of soybean by means of co-cultures of ALAB with other LAB which ferment these compounds.

Acknowledgement: TTT Nguyen was the recipient of a grant from IRD and the French government.

References

NF 03-720 (1971). Céréales et produits de mouture, détermination des cendres. *Association française de NORmalisation*.
 NF V03-050 (1975). Agricultural Food Products: General Directions for the Determination of Nitrogen by the Kjeldahl method. *Association française de NORmalisation*.
 Batey, I. L. (1982). Starch analysis using thermostable α -amylase. *Starch*, 4, 125-128.
 Bookwalter, G.N., Peplinski, A.J., and Pfeifer, V.F. (1968). Using a bostwick consistometer to measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today*, 13(11), 407-410.
 Calderon, M., Loiseau, G., and Guyot, J.P. (2001). Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1

during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 508-516.
 Chatterjee, M., Chakrabarty, S. L., Chattopadhyay, B. D., and Mandal, R. K. (1997). Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. *Biotechnology Letters*, 19, 873-874.
 Chiang, C. J., and Johnson, J. A. (1977). Measurement of total and gelatinized starch by glucoamylase and o-toluidine reagent. *Cereal Chemistry*, 54(3), 429-435.
 de Benoist, B. (1999). Complementary feeding: a challenge to both children and mother. In M. C. Dop, D. Benbouzid, S. Trèche, B. de Benoist, A. Verster, F. Delpeuch. *Complementary feeding of young children in Africa and the Middle East*. World Health Organisation. Geneva.
 de Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
 Dewey, K. G., and Brown, K. H. (2003). Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin*, 24 (1), 5-28.
 FAO (2003). Food energy-methods of analysis and conversion factors. Food and nutrition paper, Rome. 77.
 Florencio, J.A., Raimbault, M., Guyot, J.P., Eiras-Stofella, D.R., Soccol, C.R., and Fontana, D. (2000). *Lactobacillus plantarum* amylase acting on crude starch granules: native isoforms and activity changes after limited proteolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 721-730.
 Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B., and Raimbault, M. (1991a). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 379-383.
 Giraud, E., Lelong, B., and Raimbault, M. (1991b). Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 96-99.
 Giraud, E., Champailier, A., and Raimbault, M. (1994). Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*.

Applied and Environmental Microbiology, 60, 4319-4323.

Giraud, E., and Cuny, G. (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggest a common evolutionary origin. *Gene*, 198, 149-158.

Holmes, J., Björck, I., Drews, A. and Asp, N. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch*, 38, 224-226.

Holzappel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 197-212.

Johansson, M.L., Sanni, A., Lonner, C., and Molin, G. (1995). Phenotypically-based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigerian Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 159-168.

Kainuma, K., Matsunaga, F., Itagawa, M., and Kobayashi, S. (1981). New enzyme system β -amylase-pullulanase to determine the degree of gelatinisation and retrogradation of starch or starch products. *Journal of Japanese Society on Starch Science*, 28(4), 235-240.

Kratzer, F.M., Bersch, S., Vohra, P., and Ernst, R.A. (1990). Chemical and biological evaluation of soyabean flakes autoclaved for different durations. *Animal Feed Science and Technology*, 31, 247-259.

Lardinois, M., Totté, A., Tounkara, L., Mbaye, C.T., Beye, C., Thonard, P., Ngom, E. H., and Guiro, A.T. (2003). Conservation of local products by mean of transfer of a drying technology: example of atomization in Senegal. In I. D. Brouwer, A. S. Traoré, S. Trèche, *Proceedings of the 2nd International workshop "Food based approaches for a healthy nutrition in West Africa"*. (pp. 615-621). Burkina Faso, University of Ouagadougou Press.

LeBlanc, J.G., Garro, M.S., Silvestroni, A., Connes, C., Piard, J.C., Sesma, F. and Savoy de Giori, G. (2004). Reduction of α -galactooligosaccharides in soyamilk by *Lactobacillus fermentum* CRL 722: *in vitro* and *in vivo* evaluation of fermented soyamilk.

Journal of Applied Microbiology, 97, 876-881.

Lorri, W., and Svanberg, U., 1993. Lactic acid-fermented cereal gruels: viscosity and flour concentration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 207-213.

Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut, I., and Raimbault, M. (1998). *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1101-1109.

Motarjemi, Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 213-229.

Mouquet, C., and Trèche, S. (2001). Viscosity of gruels for infants: a comparison of measurement procedures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 389-400.

Mouquet, C., Salvignol, B., Van Hoan, N., Monvois, J., and Trèche, S. (2003). Ability of a « very low-cost extruder » to produce instant infant flours at a small scale in Vietnam. *Food Chemistry*, 82, 249-255.

Nakamura, L.K. (1981). *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31, 56-63.

Nwankwo, D., Anadu, E., and Usoro, R. (1989). Cassava-fermenting organisms. *MIRCEN Journal*, 5, 169-179.

Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., and Takano, M. (1995). Characterization of starch-hydrolysing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, « Burong Isda » and its amylolytic enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 124-130.

Onyango, C., Henle, T., Hofmann, T., and Bley, T. (2004). Production of high energy density fermented *uji* using a commercial alpha-amylase or by single-screw extrusion. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 401-407.

Pintado, J., Raimbault, M., and Guyot, J.P. (2005). Influence of polysaccharides on oxygen dependent lactate utilization by an

amylolytic *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 81-88.

Rodriguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, J., and Guyot, J.P. (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3350-3356.

Sanni, A., Morlon-Guyot, J., and Guyot, J.P. (2001). New efficient amylase producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 53-62.

Svanberg, U. (1995). Lactic acid fermented foods for feeding infants. In K. H. Steinkraus, *Handbook of indigenous fermented foods*, pp 310-347. New York: Marcel Dekker.

Trèche, S. (1995). Techniques pour augmenter la densité énergétique des bouillies. In S.Trèche, B. de Benoist, D. Benbouzid, A. Verster, F. Delpeuch, *L'alimentation de complément du jeune enfant*, pp 123-146. Paris, ORSTOM.

Trèche, S. (1999). Technique for increasing the energy density of gruel. In M.C. Dop, D. Benbouzid, S. Trèche, B. de Benoist, A. Verster, and F. Delpeuch. *Complementary feeding of young children in Africa and the Middle East*, pp 101-119. WHO, Geneva.

Van Soest, P.S. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*, 46, 829-835.

Wanink, J.F., Van Viet, T. and Nout, M.J.R. (1994). Effect of roasting and fermentation on viscosity of cereal-legume based food formulas. *Plant Foods for Human Nutrition*, 46, 117-126

Chapitre 5

**Fermentation by *Lactobacillus plantarum* A6
of rice/soybean slurries pre-treated by high
pressure homogenisation to prepare high
energy density complementary food
(*projet d'article*)**

Introduction

La fermentation par *Lb. plantarum* A6 de mélanges riz-soja gélatinisés permet d'atteindre les objectifs nutritionnels fixés, à savoir une hydrolyse partielle de l'amidon qui permette de préparer des bouillies de consistance liquide à forte teneur en matière sèche et forte densité énergétique. Cette combinaison de procédés couplée à une étape de déshydratation par atomisation ou par lyophilisation permet d'envisager le développement des bouillies fermentées riches en énergie.

L'utilisation d'un pré traitement par homogénéisation haute pression, à l'aide d'un appareil couramment utilisé pour l'homogénéisation du lait comme alternative possible à la gélatinisation de mélanges riz/soja à différentes teneurs en matière sèche, couplé à la fermentation mettant en œuvre la souche de *lactobacillus plantarum* A6 amylolytique a été explorée en vue de développer de nouveaux itinéraires technologiques conduisant à l'obtention de bouillies lactofermentées acides riches en énergie.

Effect of high pressure homogenization on the capacity of *Lactobacillus plantarum* A6 to ferment rice /soybean slurries to prepare high energy density complementary food

Thi Thanh Thuy Nguyen¹, Jean-Pierre Guyot², Christèle Icard-Vernière², Isabelle Rochette², Gérard Loiseau^{3*}

¹Faculty of Food Science and Technology, Hanoi Agricultural University, Gia Lam, Hanoi, Vietnam; ²IRD, UR 106, BP 64501, 34394 Cedex 05, Montpellier, France; ³CIRAD-AMIS, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France.

*corresponding author: loiseau@cirad.fr

ABSTRACT :

New bioprocesses to prepare high energy density (HED) gruels for complementary young child feeding are being developed based on the ability of amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) to modify the rheological characteristics of cereal-based slurries, provided appropriate pre-treatment are applied. Gelatinisation is a common pre-treatment which could be implemented to enhance the action of amylases, and has been successfully used in a former study (Nguyen et al., 2006) in combination with ALAB to prepare from a blend of rice/soybean flours semi-liquid fermented HED gruels with a high dry matter (DM) content (23 to 32%). In this study, it is shown that a mild pre-heating treatment which consists in suspending a rice/soybean flour blend in hot water (70°C) combined with high pressure homogenisation (HPH) can substitute gelatinisation before fermentation by the ALAB *Lactobacillus plantarum* A6 to prepare HDE gruels after cooking of the fermented slurry. As an alternative, allowing better condition of handling and storage, spray drying can be applied to such pre-heated HPH treated fermented slurries to obtain fermented flours which can be used further to prepare HDE gruels.

1. Introduction

In many developing countries, gruels used as complementary foods for young children are generally prepared from cereals or are mixed with legumes in water (Trèche and Mbome, 1999). The content of starch in the gruels is the main determinant of their energy density. Unfortunately, the dry matter concentration of traditional gruels prepared by mothers or at small-scale in traditional production units is not generally sufficient to provide the energy and the nutrients necessary to meet the nutritional requirements of young children (WHO/NUT, 1998; Sanni, Onilude and

Ibidapo, 1999). Gruels prepared from starch-based foods have a viscosity that increases very quickly according to their dry matter concentration. Mothers who prepare these gruels are faced with the following dilemma: to increase the concentration of flour and thus obtain gruel of very high viscosity difficult for children to swallow, or to dilute the slurry to obtain gruels of suitable consistency, but of low energy density.

Different methods can be used to prepare high energy density (HED) gruels with suitable consistency, such as drum drying or extrusion cooking (Mouquet *et al.* 2003), or enzymatic starch hydrolysis, which can be performed

after gelatinization by adding either germinated flour (Lorri and Svanberg, 1993; de Benoist, 1999) or industrial amylases (Trèche, 1995). A limited decrease in the viscosity of cereal gruels has also been observed after natural lactic acid fermentation of amylaceous raw material, but additional treatments are needed to prepare HED gruels (Lorri and Svanberg, 1993).

In Asia, given the availability of rice and soy, as well as the traditional consumption of fermented foods, it seemed interesting to develop new bio-processes to produce HED-fermented complementary foods.

Recent studies have shown that the amylolytic lactic acid bacterium (ALAB) *Lactobacillus plantarum* A6 is incapable of efficient starch fermentation in a raw rice/soybean mixture, whereas a gelatinization pre-treatment of the rice/soybean mixture allows the preparation of a fermented gruel with high energy density with suitable rheological properties (Nguyen *et al.* 2006). *Lactobacillus plantarum* A6 was selected because of its ability to hydrolyze starch. It is also a well-documented strain on which molecular and physiological studies are available (Giraud *et al.*, 1994; Giraud and Cuny, 1997; Florencio *et al.*, 2000).

High pressure homogenisation (HPH) is another treatment able to modify starches. HPH has been shown to affect high molecular weight polymers causing denaturation of proteins (Messens *et al.*, 1997) and gelatinization of starch (Douzals *et al.*, 1996, 1998). Rubens *et al.* (1999) proposed a two-step mechanism for pressure-induced starch gelatinization similar to the heat gelatinization process. In the first step, amorphous regions are hydrated causing a swelling of the granules and a distortion of crystalline regions. In the second step, the crystalline regions become more accessible to water. In other respects, pressure-induced gelatinization and heat gelatinization differed. During heat gelatinization of starch, many changes take place simultaneously or successively, including granule swelling, the loss of birefringence, an increase in viscosity and fragmentation of the granule. Limited swelling of the melted granule (up to two-fold in diameter) and the maintenance of the granular character (Stute *et al.*, 1996) are typical of pressure-gelatinized starches.

Each starch has a typical range of pressure in which gelatinisation occurs (Stute *et al.*, 1996). Muhr and Blanshard (1982) showed that induced high pressure gelatinisation of wheat

starch occurred in an excess of water at 450 MPa at ambient temperature. Bauer & Knorr (2005) showed that the rate of damaged starch increased with an increase of pressure for various starches at 5% concentration (potato, wheat, tapioca). At 57°C, the effect of temperature was much more distinct and the pressure-induced gelatinization took place over a far smaller pressure range. High pressure homogenisation (HPH), as reported by Diels *et al.* (2005), is another unit process that essentially consists of forcing a pumpable liquid through a narrow orifice under high pressure. It was first used to create or stabilize emulsion and suspensions of various products including foods, cosmetics..., with pressure ranging from 1 to 50 Mpa. Higher pressure (200-300 Mpa) can be achieved with new high pressure homogenisers (Floury *et al.*, 2004), but their use mainly concern cell extraction processes, bacterial inactivation ... (Diels *et al.*, 2005). No information about the effect of HPH in traditional pressure range (1-50 MPa) on starchy foods has been found.

To investigate an alternative to the gelatinisation treatment described by Nguyen *et al.* (2006) as a pre-treatment in order to disrupt starch granules, this work aims to explore combined effects of high pressure homogenisation and amylolytic acid fermentation by *Lactobacillus plantarum* A6 on the characteristics of low energy density (12% dry matter) and high energy density (22% dry matter) rice/soybean slurries.

2. Materials and methods

2.1. Raw material preparation

Rice (*Oryza sativa* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) were purchased in a market in Hanoi, Vietnam.

Rice was dehulled and milled with a 150 μ m pore mesh.

Soybeans were processed into full fat soy flour. The beans were first soaked for 15 min and then sterilized at 121°C for 15 min after the water had been drained from the beans (Kratzer *et al.*, 1990). They were dried in a hot air oven at 65°C to a final moisture content of about 8%. The dried beans were dehulled and then milled with the same hammer mill.

The flour was stored at 4°C.

A blend of 80% rice flour and 20% full fat soy flour by weight was used throughout this study

to prepare slurries at different dry matter content (DM). This formulation, which corresponds to the energy and macronutrient requirements of young children, was developed

using the Alicom non-commercial software created by IRD, Montpellier, France).

2.2 Experimental design

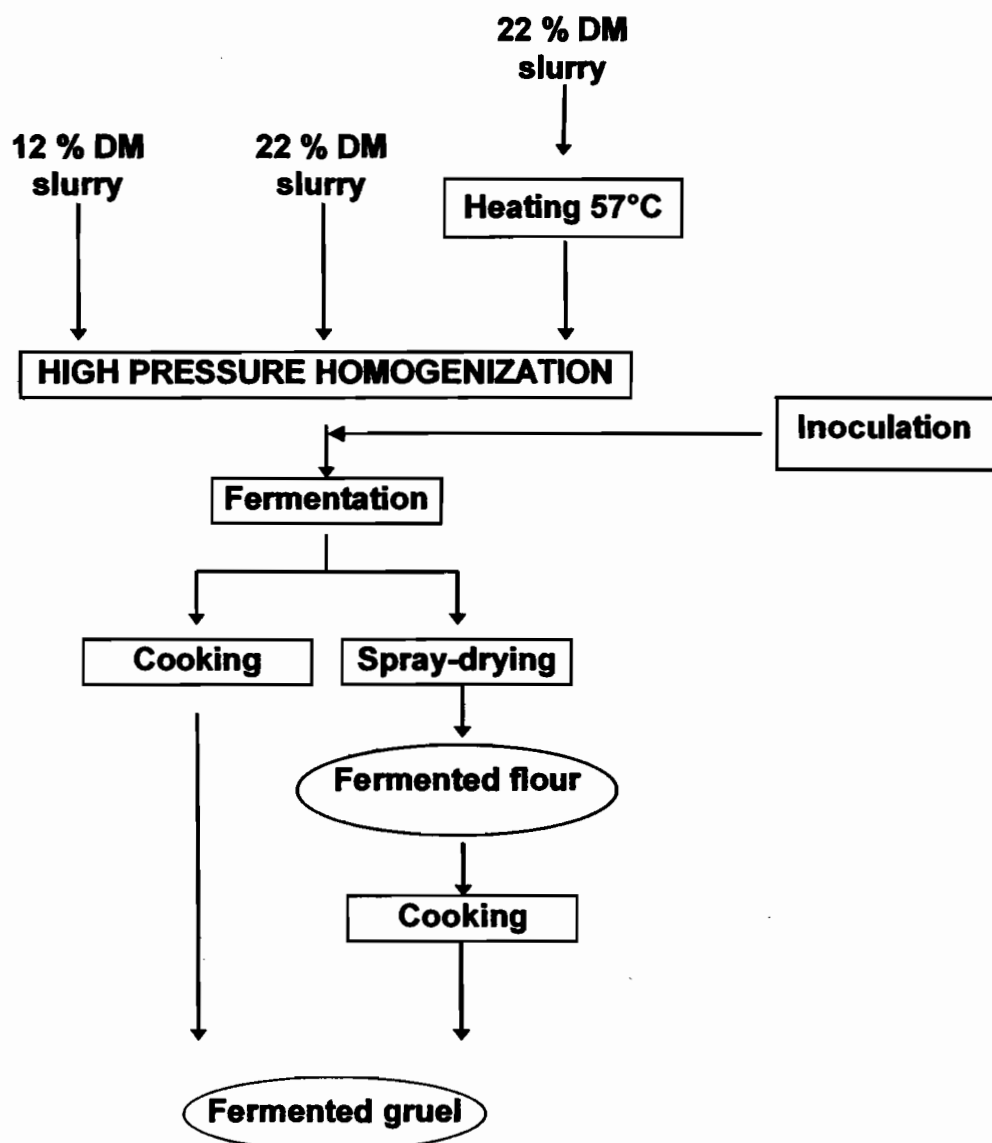


Figure 5.1. Flow chart showing the different process combinations tested to produce fermented gruels from rice/soybean slurry

The different process combinations investigated are summarized in Fig. 1. Homogenized slurries at 12 % DM (low energy density) and 22% DM (high energy density) were fermented. Slurries at 22% DM were homogenized with or without heat treatment. For heat treatment, 5 Kg of rice/soybean (80/20 w/w) blend (room

temperature) was mixed with a suitable volume of water at 70°C, the resulting temperature of the mixture was 57°C. After 10 minutes, the hot slurry was homogenized.

High pressure homogenization (HPH) of the rice/soybean flour mixture was performed with a two stage APV homogenizer (model 15M, Baker, Evreux, France). The apparatus is

commonly used for milk homogenization. The first stage ensures the fractionation of droplets and the second stage disaggregated the droplets. Suspensions of flour blends were treated with a pressure of 25 MPa in the first step and of 5 MPa in the second step. HPH slurries were used to prepare fermented gruels by cooking after fermentation. An alternative pathway consisting in preparing fermented flours, obtained after the spray-drying of the HPH fermented slurries, was investigated. These "pre-treated" flours were then used to prepare HED gruels by cooking in water (Fig. 1)

Fermented slurries were dried in an APV spray-dryer (Baker, model LAB N°3, Evreux, France). A short residence time with the rapid drying of small droplets was enhanced by a high inlet temperature (160-200°C) followed by a low outlet temperature (70-90°C) and with the flow of 8 l.h⁻¹.

2.3 Microorganisms and cultivation methods

The amylolytic strain *Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053, BCCM, Gent, Belgium) was used. This strain was isolated from the process of cassava retting in Congo (Giraud *et al.*, 1991). The cells were routinely propagated by 10% (v/v) inoculation in sterile MRS broth (de Man *et al.*, 1960) and incubated overnight at 30°C. For the inoculation of rice/soybean slurries experiments, the absorbance of the overnight culture was measured at 600 nm wavelength (A₆₀₀). The cells were harvested by centrifugation at 14,000g for 10 min. Cell pellets were washed in physiological sterile NaCl solution (0.9%, w/v) and then centrifuged before being suspended in the physiological sterile NaCl solution to be used for inoculation.

A₆₀₀ was measured with a Spectronic 401 spectrophotometer (Milton Roy, Paris, France). Before measurements, cell cultures were appropriately diluted in sterile medium at an A₆₀₀ inferior to 0.4 for appropriate readings in the linear range of the relation [A₆₀₀ vs. cell concentration].

Microbial growth during fermentation was measured by plate-count on MRS agar after serial decimal dilutions from an initial suspension containing 10 g of sample homogenized in 90 ml of physiological sterile solution. Incubation was at 30°C for 24 h.

2.4 Fermentation conditions

Fermentations were performed in batches using 10 litres fermenters filled to 8 litres. Temperature was maintained constant at 30°C. The pH was recorded on-line using steam sterilisable pH combination electrodes (Broadley James Corporation, California) connected to a TR20A pH transmitter (Demca, France). Inoculation was done with washed cells, the initial cell concentration being estimated as described above.

All experiments were done in triplicate. Samples were regularly taken from the fermenter for chemical and physical analysis.

2.5 Analytical methods

2.5.1. Chemical analysis

Total starch content was estimated by the determination of glucose concentration using a colorimetric method (560 nm) after enzymatic degradation of starch with α -amylase (EC 3.2.1.1) (Termamyl 120L, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) followed by amyloglucosidase (EC 2328722) (Fluka 10115) according to Batey (1982) and Holmes *et al.* (1986) and using a conversion factor of 0.9. The results obtained also included mono and disaccharides, which were disregarded as they are only present in only small quantities in raw cereal grains.

Damaged starch was determined by a method based on the evaluation of the susceptibility to amyloglucosidase hydrolysis (Chiang & Johnson, 1977; Kainuma *et al.*, 1981). The damaged starch rate is the ratio of starch fraction susceptible to amyloglucosidase hydrolysis to the total starch. Total and damaged starches were determined on duplicate samples.

Organic acids and sugar content

2 g of gruel sample were added to 8 ml of sterile water and homogenised with an ultra turrax-T8 (IKA, Staufen, Germany) at 10,000 tpm for 1 min. 1.3 ml of suspension was mixed with either 0.2 ml 2N H₂SO₄ in microtubes (for lactic acid analysis) or 0.2 ml 5N NaOH (for sugar analysis) and centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant was frozen at -20°C until analysis.

Lactic and acetic acid concentrations were determined by HPLC using an Aminex HPX-87H column (Biorad, Ivry-sur-Seine, France),

and sugars by HPIC using a Dionex Carbopac PA1 column as previously described (Calderon *et al.*, 2001).

2.5.2. Rheological properties

Apparent viscosity measurements were performed on gruels at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a Haake viscometer VT550 with SV-DIN coaxial cylinders driven by a PC computer using the Rheowin v.2.67 software. The shear rate and the shear time were 83 s^{-1} and 10 min respectively (Mouquet and Trèche, 2001).

The consistency of the gruels was assessed by measurement in a Bostwick consistometer (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, Virginia, USA) (Bookwalter, Peplinski and Pfeifer, 1968). Measurements were made at 30°C and the Bostwick flow was expressed in $\text{mm} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$.

2.5.3. Particle size analysis

Particle size distributions of the samples were measured by low angle laser light scattering (Mastersizer-S, Malvern Instruments, UK). The scattered light data from ~2000 snapshots of 2 ms were recorded within one measurement and transformed to a distribution of particle-size information according to the Mie theory by the accompanying software Mastersizer-S v2.18. A sample was dispersed in ethanol and was added to the circulating liquid until an obscuration of 15–20% was recorded. The results obtained were diameters of equivalent spheres expressed in volume.

3. Results

3.1. Effects of high pressure homogenization (HPH) on the fermentation of rice/soybean slurries

3.1.1. Pressure homogenisation and particle size

Fig. 2 depicts the effect of HPH on the particle size distribution of slurry suspensions at 12% and 22% DM at ambient temperature, and at 22% DM at 57°C . Measurements were also done after fermentation.

The unimodal particle size distribution before HPH became bimodal after. The HPH treatment of 12% DM and 22% DM slurries at ambient temperature decreased the particle size. Before HPH, the size of 90% of particles was lower than $115 \mu\text{m}$ and after HPH lower than $61 \mu\text{m}$ and $67 \mu\text{m}$ respectively for the 12% DM and 22% DM slurries.

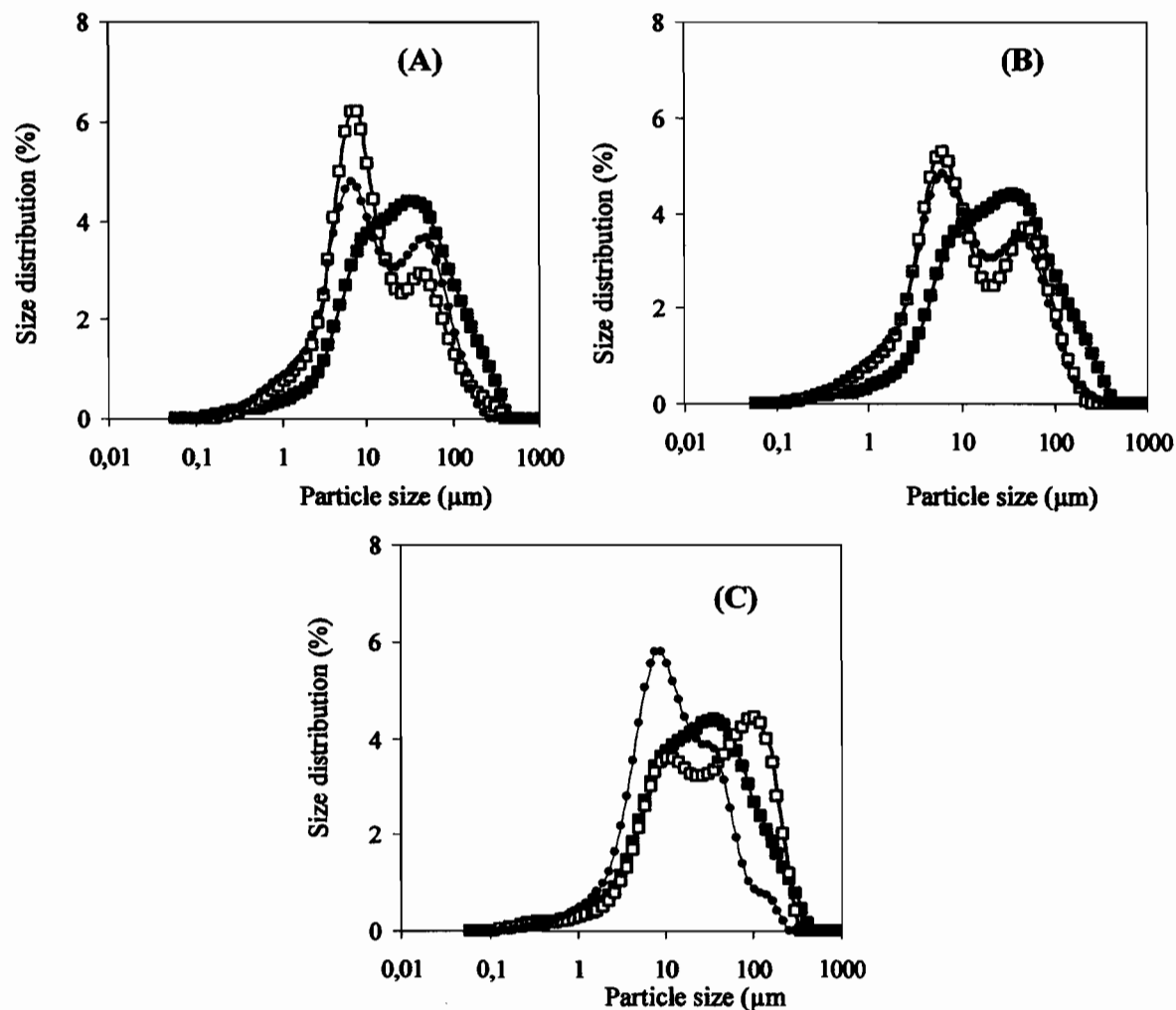


Figure 5.2. Particle size distribution of slurries before HPH (■), after HPH (□) and (•) after HPH and fermentation by *Lb. plantarum* A6. (A) 12% DM slurry ; (B) 22% DM slurry ; (C) 22% DM slurry heated at 57°C.

Heating the slurry at 57°C followed by the HPH treatment of 22% DM slurries modified the size distribution of particles. After HPH, the size had increased to 140 μm.

Fermentation drastically modified the particle size distribution of the heated 22% DM slurry and HPH treated: after 24h of fermentation, the size of 90% of particles was smaller than 49 μm.

3.1.2. Fermentation kinetics of *Lactobacillus plantarum* A6 on rice/soybean HPH slurries

A limited growth of the strain A6 on pressure homogenized rice/soybean slurries. The maximum population concentration of 8.9-9.1 log cfu.g⁻¹ was reached after 5 hours of fermentation for the 12% DM slurry, and 7 hours for the 22% DM slurries. Specific growth rates for HPH treated slurries of 12%, 22% and 22% heated at 57°C DM were 0.16; 0.15 and 0.19 respectively (fig 3).

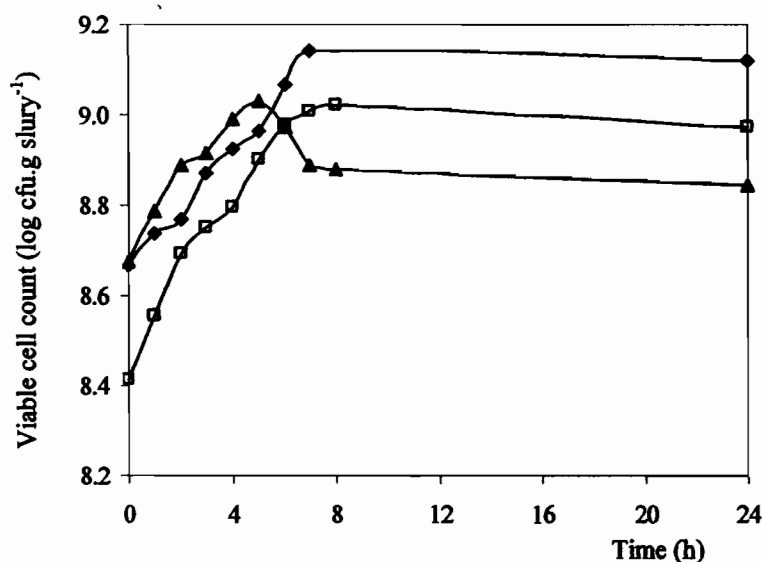


Figure 5.3. Growth of *Lactobacillus plantarum* A6 in rice/soybean (▲) HPH slurry 12% DM; (◆); HPH slurry 22% DM and (□) HPH slurry 22% DM heated at 57°C

In all fermentations, a decrease in pH was observed without any lag from the beginning of the fermentation (Fig. 4). The pH dropped from an initial value of 6.7 to 3.5. The time required to reach a pH of 4.5, below which the inhibition of food-born pathogens could be expected, was 5 hours for 12% DM and 22% DM slurries and 7 hours for the 22% DM slurry heated at 57°C.

Lactic and acetic acid production was detected during the fermentation of all HPH slurries (Fig. 4), acetic acid being produced in small amounts as expected from the metabolic characteristics of the *Lb. plantarum* A6 strain. The decrease in pH was therefore due mainly to lactic acid production. A higher rate of lactic acid production was obtained with 22% DM slurries than with the 12% DM slurry. Lactic acid was produced at higher concentration (150mmol.kg⁻¹) with 22% DM slurry than with 22% DM heated slurry (138mmol.kg⁻¹). The concentration of lactic acid in fermented 12% DM slurry was 100 mmol.kg⁻¹.

During fermentation of the 12% DM slurry, lactic acid formation cannot be explained by

the consumption of sucrose since its concentration was low and remained constant. The small quantity of maltose initially present was consumed quickly at the beginning of fermentation. Glucose and fructose concentrations increased slowly at the beginning of the fermentation and rapidly leveled off whereas lactic acid production continued. Glucose concentration at the end of the fermentation was 38 mmol.kg⁻¹. For the 22% DM slurry, the changes in sugars were similar except for the glucose concentration, which increased quickly during the first eight hours to reach a concentration of 108mmol.kg⁻¹ after 24 h fermentation.

In contrast, during the fermentation of 22% DM slurry heated at 57°C, the fructose did not accumulate and glucose concentration was continuously increasing. A very high glucose production (148 mmol.kg⁻¹) was observed at the end of the fermentation.

No changes in the concentration in stachyose and raffinose during all fermentations were observed.

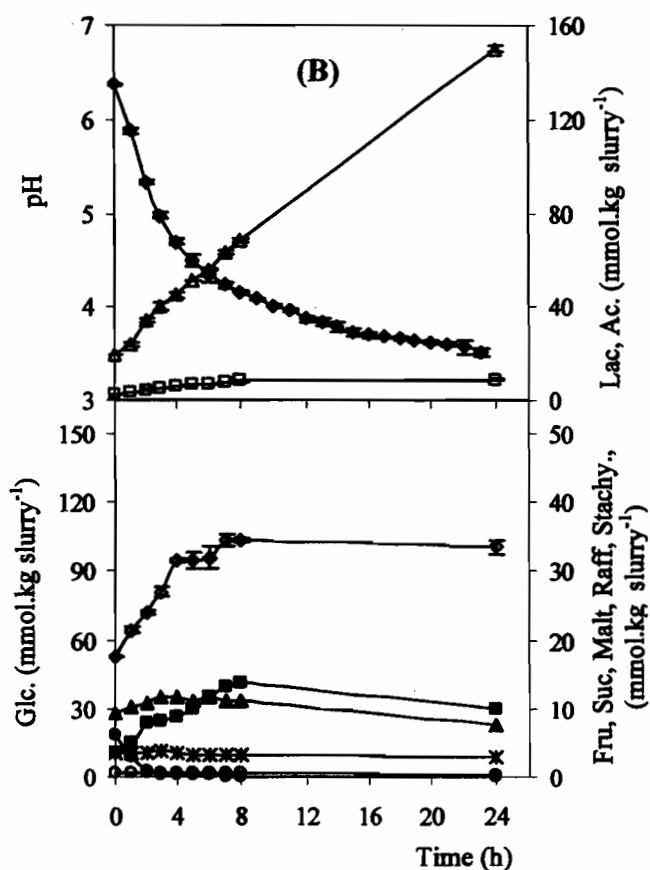
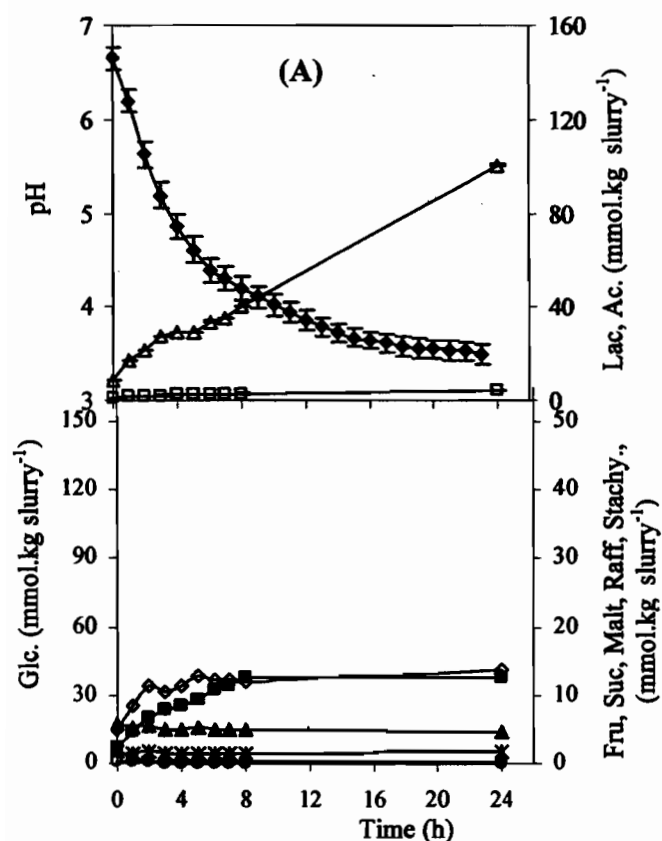
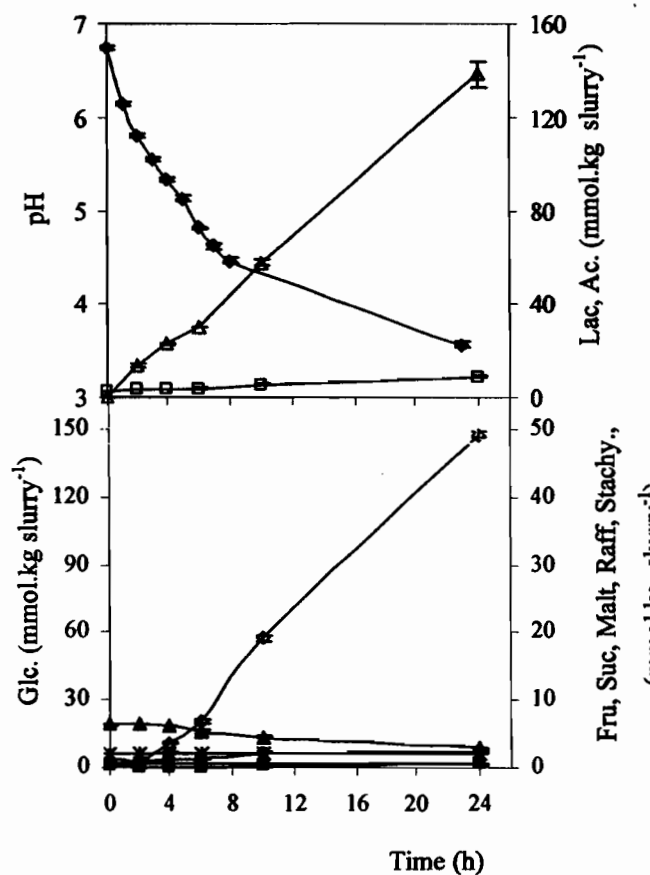


Figure 5.4. Kinetics of fermentation of rice/soybean slurries (A): HPH-12%-DM slurry; (B) HPH-22%-DM slurry; (C): HPH-22%-DM-heated (57°C) slurry
 Symbols: (♦): pH; (△): lactic acid; (□): acetic acid; (◇): glucose; (■): fructose; (▲): sucrose; (●): maltose; (○): raffinose; (*): stachyose



3.1.3. Damaged starch rate and rheological properties

The damaged starch rate in the untreated flour blend was 26% and the soluble matter was 10% (Table 1). Low changes in damaged starch rate and in soluble matter of 12% DM

and non pre-heated 22% DM slurries after HPH and fermentation were observed. In contrast, a dramatic increase in these two parameters was observed after HPH treatment and fermentation for 22% DM slurry heated at 57°C.

Table 5.1. Damaged starch rate, soluble matter, apparent viscosity and Bostwick flow of slurries of 12% DM, 22% DM and 22% DM heated at 57°C after HPH treatment (HPH T0) and after 24h fermentation (HPH-FER T24) by *Lactobacillus plantarum* strain A6.

Products		Damaged starch rate (%)	Soluble matter (%)	Apparent viscosity at 83s ⁻¹ (Pa.s)*	Bostwick flow (mm.30s-1) *
Flour blend		26.1	10	ND(1)	ND(1)
12% DM	HPH T0	30.9	12.0	ND(1)	ND(1)
	HPH-FER T24	32.6	15.3	ND(1)	ND(1)
22% DM	HPH T0	31.4	11.5	ND(1)	ND(1)
	HPH-FER T24	32.7	18.2	ND(1)	ND(1)
22% DM heated at 57°C	After heating at 57°C	37.7	17.6	ND(1)	ND(1)
	HPH T0	82.2	45.2	2.1	25
	HPH-FER T24	84.1	58.1	0.9	108

Measured after cooking for 15 minutes, (1) no measurement was possible because the stiff consistency of the gruel.

12% DM and 22% DM with or without the HPH treatment it was impossible to measure the viscosities of the gruels obtained after cooking which had a stiff consistency.

Measurements were made possible only with the pre-heated slurries. In such a case, HPH treatment and fermentation affects both the viscosity and the Bostwick flow and a low viscosity and fluid gruel was obtained after fermentation by strain A6 (Table 1).

Furthermore, it was observed that HPH increased the physical stability of the slurry since no separation of phases was observed before and after the fermentation.

Rheological comparison of gruels prepared from sour spray-dried flours

As an alternative to the processing of the HPH-fermented slurries into gruels after cooking, the study investigated whether HED-fermented gruels could also be prepared from sour flours obtained from the spray-drying of the HPH-fermented slurries. Rheological measurements

were made on gruels prepared at different DM contents of spray-dried flours.

It was only possible to spray-dry the fermented 12% DM slurry because at 22% DM slurry, a sedimentation of starch happened during the spray-drying process. However, the consistency of gruels prepared from the spray-dried sour slurry was too stiff to be measurable.

In contrast, it was possible to spray-dry the 22%DM slurry heated at 57°C, HPH treated and fermented. The gruels prepared at different DM contents from the resulting fermented flour gave very interesting results. The viscosity of gruels prepared at 12% to 18% DM was between 0.1-0.3 Pa.s and the Bostwick flow was 200 mm.30s⁻¹. For gruels at 22% DM, the viscosity was 0.7 Pa.s and the Bostwick flow was 148 mm.30s⁻¹. At 32% DM, the gruel had a viscosity of 1.2 Pa.s and a Bostwick flow of 108 mm.30s⁻¹.

In addition to these results, it is interesting to note that spray-drying did not affect drastically the viability of the A6 strain, since high counts ($2\text{--}7.10^6$ cfu/g of sour flour) were obtained after treatment.

Discussion

Similarly to previous observations with gelatinised rice/soybean slurries (Nguyen *et al.*, 2006), HPH slurries enabled only a limited bacterial growth, however the expected pattern of lactic acid fermentation by *Lb. plantarum* A6 was obtained, i.e. lactic acid being the dominant end-product formed with very low amount of acetic acid. The fact that the growth stopped after 5h fermentation while lactic acid concentration was continuously increasing over 24h is a clear evidence that uncoupling between growth (anabolism) and energetic pathway (catabolism) occurred. Therefore, the limited growth did not affect the metabolic capacity of the strain and a low final pH value was reached due to a good acidification.

The high pressure homogenization of the flour blend slurry at ambient temperature decreased the particle size of flour blends but this did not result in increasing the sensitivity of the starch to amylase enzymes produced by the *Lb. plantarum* A6 strain. The fact that lactic acid kept increasing whereas mono and disaccharides concentration levelled off, suggests that an extra-carbon source is being used such as starch, however, in spite of the chemical changes indicated by fermentation patterns, there were no measurable physical effects on the consistency of the gruels which remained very stiff. Thus, this process combination failed to substitute to gelatinisation as a pre-treatment to produce HED gruels at 22% DM having the appropriate consistency as obtained by Nguyen *et al.* (2006).

After heating the 22% DM slurry at 57°C, the particle size increased strongly. Swelling of starch granules can explain this phenomenon (Stute *et al.*, 1996; Muhr and Blanshard, 1982). High pressure homogenisation of slurry heated at 57°C increased the starch damage rate in relation to the strong decrease of particle size of the slurry. The strong decrease of the viscosity and increase of the Bostwick flow rate of the gruel obtained after the cooking of the pre-heated HPH-fermented slurry indicate that the treatments applied to the slurry

enabled the amylase from *Lactobacillus plantarum* A6 to efficiently hydrolyze the starch fraction. There is also another major difference in the fermentation pattern compared to that of the fermented HPH slurry which has not been pre-heated : whereas growth behaviour, lactic acid production and pH drop were very similar between both types of slurries, only in the case of the pre-heated slurry a continuous increase in glucose concentration over the 24h fermentation period was observed, more striking, most of the glucose was produced after the growth stopped. This is consistent with an improved accessibility of the food matrix to enzymatic hydrolysis, and suggest also that the amylase produced during the growth phase remained active after the cells entered into the stationary phase and at low pH values (between 4.5 and 3.5).

The change of viscosity due to the ALAB allowed the preparation of fermented gruel with a high dry matter content (22% DM) and a calculated energy density of 94 kcal/100 g of gruel. This value is higher than the recommended value of 84 kcal/100 g of gruel for children of 9-11 months old at a rate of 2 meals/day added to average breast milk intake (Dewey and Brown, 2003).

Spray drying was used successfully to prepare fermented flours from the pre-heated HPH fermented 22% DM slurry. Nguyen *et al.* (2006) showed that the use of spray drying enabled the preparation of flours from gelatinised fermented slurries made of a blend of rice soybean, enabling the preparation of HED gruels with an elevated DM content (up to 32%). In our study it is shown that spray drying can also be applied to the HPH pre-heated slurry. These fermented flours will become easier to handle, to pack and to store. Drying the HPH-fermented slurries provides additional protection against spoilage and pathogenic bacteria (Lardinois *et al.*, 2003). ALAB survival after spray drying confirm previous results (Nguyen *et al.*, 2006) and provide the flour with a microflora which might help in preventing microbial contamination.

CONCLUSION

Pre-heating of the slurry combined to HPH treatment is an alternative to gelatinization to prepare new starch based HED gruels allowing to implement the ability of ALABs to hydrolyze starch. In the future, it would be interesting to investigate if this new bioprocess would allow to preserve the vitamins and improve the bioavailability of mineral micronutrients which could be added to improve the nutritional quality of the gruels.

Acknowledgements: Nguyen T.T.T was the recipient of a grant from IRD and the French Embassy in Vietnam. CIRAD is acknowledged for support. Thanks are given to H. Ferrer and J.Y. Laurent for their help in particle size analysis.

References

- Batey, I. L. (1982). Starch analysis using thermostable α -amylase. *Starch*, 4, 125-128.
- Bauer, B.A., & Knorr, D. (2005). The impact of pressure, temperature and treatment time on starches: pressure-induced starch gelatinisation as pressure time temperature indicator for high hydrostatic pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 68, 329-334.
- Bookwalter, G.N., Peplinski, A.J., Pfeifer V.F. (1968). Using a bostwick consistometer to measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today*, 13(11), 407-410.
- Calderon, M., Loiseau, G. and Guyot, J.P. (2001). Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 508-516.
- Chiang, C. J., & Johnson, J. A. (1977). Measurement of total and gelatinized starch by glucoamylase and o-toluidine reagent. *Cereal Chemistry*, 54(3), 429-435.
- de Benoist, B. (1999). Complementary feeding: a challenge to both children and mother. In M. C. Dop, D. Benbouzid, S. Trèche, B. de Benoist, A. Verster, F. Delpeuch. *Complementary feeding of young children in Africa and the Middle East*. World Health Organisation. Geneva.
- de Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Dewey, K. G. & Brown, K. H. (2003). Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin*, 24 (1), 5-28.
- Diels, A.M.J., De Trayes, J., & Michiels, C.W. (2005). Sensitisation of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 165-175.
- Douzals, J. P., Marechal, P. A., Coquille, J. C., & Gervais, P. (1996). Microscopic study of starch gelatinisation under high hydrostatic pressure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1403-1408.
- Douzals, J. P., Perrier Cornet, J. M., Gervais, P. & Coquille, J. C. (1998). High-pressure gelatinization of wheat starch and properties of pressure-induced gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4824-4829.
- Florencio, J.A., Raimbault, M., Guyot, J.P., Eiras-Stofella, D.R., Soccol, C.R., & Fontana, D. (2000). *Lactobacillus plantarum* amylase acting on crude starch granules: native isoforms and activity changes after limited proteolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 721-730.
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J. & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type a high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59, 843-853.
- Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B., & Raimbault, M. (1991). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 379-383.

- Giraud E., Champailier A., & Raimbault M. (1994). Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4319-4323.
- Giraud, E. & Cuny, G. (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3'end structure with direct tandem repeats and suggest a common evolutionary origin. *Gene*, 198, 149-158.
- Holmes, J., Bjöck, I., Drews, A. Asp.N. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch*, 38, 224-226.
- Kainuma, K., Matsunaga, F., Itagawa, M., & Kobayashi, S. (1981). New enzyme system β -amylase-pullulanase to determine the degree of gelatinization and retrogradation of starch or starch products. *Journal of Japanese Society on Starch Science*, 28 (4), 235-240.
- Kratzer, F.M., Bersch, S., Vohra, P., Ernst, R.A. (1990). Chemical and biological evaluation of soyabean flakes autoclaved for different durations. *Animal Feed Science and Technology*, 31, 247-259.
- Lardinois, M., Totté, A., Tounkara, L., Mbaye, C.T., Beye, C., Thonard, P., Ngom, E. H., and Guiro, A.T. (2003). Conservation of local products by mean of transfer of a drying technology: example of atomization in Senegal. In I. D. Brouwer, A. S.
- Messens, W., Van Camp, J. and Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 107-112.
- Mouquet, C. and Trèche, S. (2001). Viscosity of gruels for infants: a comparison of measurement procedures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 389-400.
- Mouquet, C., Salvignol, B., Van Hoan, N., Monvois, J., and Trèche, S. (2003). Ability of a « very low-cost extruder » to produce instant infant flours at a small scale in Vietnam. *Food Chemistry*, 82, 249-255.
- Muhr, A.H. and Blanshard, J. M. V. (1982). Effect of hydrostatic pressure on starch gelatinisation. *Carbohydrate Polymers*, 2, 61-74.
- Nguyen, T.T.T., Loiseau, G., Icard-Vernière C, Rochette, I, Trèche, S., Guyot, J-P. (2006). Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria in process combinations on characteristics of rice/soybean slurries: a new method to prepare high energy density complementary foods for young children. *Food chemistry*, in press.
- Rubens, P., Snauwaert, J., Heremans, K., & Stute, R. (1999). In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell. *Carbohydrate Polymers*, 39(3), 231-235.
- Sanni, A. I., Onilude, A. A., & Ibidapo, O. T. (1999). Biochemical composition of infant weaning food fabricated from fermented blends of cereal and soybeans. *Food Chemistry*, 65, 35-39.
- Stute, R., Klingler, R. W., Boguslawski, S., Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (1996). Effects of high pressures treatment on starches. *Starch/Stärke*, 48, 399-408.
- Lorri, W., and Svanberg, U., 1993. Lactic acid-fermented cereal gruels: viscosity and flour concentration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 207-213.
- Trèche, S. (1995). Techniques pour augmenter la densité énergétique des bouillies. In S.Trèche, B. de Benoist, D. Benbouzid, A. Verster, F. Delpeuch, L'alimentation de complément du jeune enfant, pp 123-146. Paris, ORSTOM.
- Trèche S. & Mbome I.L., (1999). Viscosity, energy density and osmolality of gruels for infants prepared from locally produced commercial flours in some developing countries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 117-125.
- WHO/NUT., (1998). Complementary feeding of young children in developing countries: A review of current scientific knowledge. Programme of nutrition, family and reproductive. WHO. Geneva

CHAPITRE 6

**Simultaneous hydrolysis of starch and removal
of alpha-galactooligosaccharides (alpha-GOS)
by co-cultures of lactic acid bacteria: a
comparative study in a model growth medium
and in a rice/soybean slurry
(*projet d'article*)**

Introduction

Lors des études précédentes, l'accent a porté sur l'augmentation de la densité énergétique des bouillies à base de riz et de soja. Elles ont démontré la capacité de *Lb. plantarum* A6 à hydrolyser efficacement l'amidon de riz en association avec divers procédés. Cependant, compte tenu de la présence d'alpha galactooligosaccharides tels que le raffinose et le stachyose apportés par le soja et de l'incapacité de la souche A6 à hydrolyser ces composés, le dernier volet de cette thèse a porté sur l'étude du couplage de la souche A6 avec d'autres bactéries lactiques retenues sur la base de leur utilisation du raffinose.

Simultaneous hydrolysis of starch and removal of α -galactosaccharides by co-cultures of lactic acid bacteria: a comparative study in a model growth medium and in a rice/soybean slurry.

Thi Thanh Thuy Nguyen¹, Gérard Loiseau², Christèle Icard-Vernière³, Isabelle Rochette³, Jean-Pierre Guyot^{3*}

¹ Faculty of Food Science and Technology, Hanoi Agricultural University, Gia Lam, Hanoi, Vietnam; ² CIRAD-AMIS, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France; ³ IRD, UR 106, BP 64501, 34394 Cedex 05, Montpellier, France.

*Corresponding author: jpguyot@mpl.ird.fr

1. Introduction

In many developing countries traditional cereal-based gruels are used as complementary foods for young children. These gruels are frequently prepared from a fermented dough or slurry. Unfortunately, they do not present the nutritional characteristics necessary to meet the requirements of young children (Trèche and Mbome, 1999) for energy, micro- and macro nutrients, in addition they also contain antinutritional factors (ANF) depending on the raw material used. To increase the energy density of foods different methods can be used such as drum drying or extrusion cooking (Mouquet *et al.* 2003), or enzymatic starch hydrolysis which can be performed after gelatinisation by adding either germinated cereal flour ("power flour") (Lorri and Svanberg, 1993; de Benoist, 1999) or industrial amylases (Trèche, 1995). Lipids and protein can be increased by complementation with pulses or groundnut. ANF can be removed either biologically (*e.g.* by lactic acid fermentation) or by physical process (*e.g.* toasting). However, when the processes rely on natural fermentation in small scale production units, quality of the products is not constant due to the lack of control and good manufacturing and hygienic practices. Another alternative to the traditional processing is to develop new foods which strictly meet the nutritional requirements of young children and are prepared under conditions which allow a constant quality.

The development of new complementary foods for young children has to be based on local resources as recommended by international

organizations (FAO/WHO, 1997). In Asian countries where fermented rice or soybean based foods are popular (*e.g.* Vietnam, Thailand, Japan, Indonesia, *etc.*), novel functional foods for young children could be developed from mixtures of these raw materials. However, complementing the starch source, *i.e.* rice, with soybean flour for proteins will also bring ANF. Some can be removed by heat treatment (*e.g.* trypsin inhibitor) but others require biological treatments. Soybeans as well as other legumes characteristically contain α -galactosaccharides (α -GOS) which are heat resistant (Leske *et al.* 1993). These α -GOS are not degraded by the digestive enzymes of the higher animals due to the absence of α -galactosidase in the small intestinal mucosa. When the α -GOS pass into the small intestine, they are fermented by bacteria. These colic fermentations of the α -GOS are responsible for flatulence and diarrhea (Steggerda *et al.*, 1966) which, in the case of young children, is a problem that deserves a greater attention.

Generally α -galactosidase (α -gal) may hydrolyse a variety of α -GOS (Dey et Pridham, 1972). There are several reports on the use of α -gal from plant and fungal sources for the removal of raffinose family sugars from soybean flour and soymilk (Sugimoto and Bureu, 1970; Kotwal *et al.*, 1998). Some lactic acid bacteria (LAB) have α -galactosidase activity such as strains belonging to the species *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium longum* or *pseudolongum* (Garro *et al.* 1993, 1994; Tsangalis et Shah, 2004). Most of the

investigations using LAB to remove α -GOS focused on soymilk or soy protein isolate, however the development of a functional food from a rice/soybean slurry requires to tackle different problems at the same time, in a single process in order to make it as simple as possible. The two main points to be addressed to improve the nutritional quality of such a mixture are (i) starch hydrolysis to enable to add more starch to increase the energy density and (ii) α -GOS removal (provided adequate heat treatment is applied to remove the other ANF). The use of LAB with particular properties as starter culture would offer a mean to prepare complementary foods by fermentation on a more reliable basis than the traditional way of processing. Starch hydrolysis can be performed by amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) isolated from traditional fermented foods, such as *Lactobacillus plantarum* A6 which has been shown to be particularly efficient (Giraud *et al.*, 1994, 1997; Florencio *et al.*, 2000). However, this strain is not able to use α -GOS and would have to be associated in a co-culture with a LAB having α -gal activity. The capacity of such a mixed culture to ferment rice/soybean mixtures has to be investigated, mainly because of possible antagonistic relations between LAB and also of possible competition between substrates (*e.g.* glucose, sucrose) which are readily fermented and might hamper α -GOS fermentation. In this work, we therefore investigated the biological removal of α -GOS by LAB strains with α -gal activity when they are associated with *L. plantarum* A6. Experiments were performed in a model cultivation medium containing mixed substrates and in a rice/soybean slurry.

2. Material and methods

2.1. Raw material preparation

Rice (*Oryza sativa* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) were obtained from a market in Hanoi, Vietnam.

Rice was dehulled and milled in a hammer mill having a mesh with 150 μ m pores.

Soybeans were processed into fullfat soy flour. The beans were first soaked for 15 min, sterilized at 121°C for 15 min after draining the water from the beans (Kratzer *et al.*, 1990). They were dried in a hot air oven at 65°C to a final moisture content of about 8%. The dried

beans were dehulled and then milled with a hammer mill.

The flours were stored at 4°C.

A 80% rice flour and 20% full-fat soy flour blend has been used throughout this study, the formulation was made in order to meet the energy and macronutrient requirements of young child using the Alicom non-commercial software elaborated by IRD.

2.2. Microorganism and cultivation methods

The strains used in this study are from the IRD's culture collection. *Lactobacillus* spp. Strain 4.4 and *Lactobacillus fermentum* Ogi E1, isolated from fermented cereal-based foods, were selected for their capacity to ferment raffinose in API 50CHL tests, both strains were heterofermentative. *Lactobacillus plantarum* A6, a facultative heterofermentative LAB isolated from retted cassava, was selected for its capacity to ferment starch.

The strains were maintained in 40% glycerol at -80°C. The cells were routinely propagated by 10% (v/v) inoculation in sterile MRS broth (de Man *et al.*, 1960) and overnight incubated at 30°C. For inoculation of experiments made with the rice/soybean slurry, the absorbance at 600 nm wavelength (A_{600}) of the overnight culture was measured. After determining A_{600} of the inoculum, the cells were harvested by centrifugation at 14,000g for 10 min. Cell pellets were washed once in physiological sterile solution (0.9%, w/v saline) and then centrifuged once more before being suspended in the physiological sterile solution for being used for inoculation. Inoculation was made with overnight cultures at 10% (v/v). For co-culture experiments *L. plantarum* A6 was mixed with either *L. pentosus* 4.4 or *L. fermentum* Ogi E1 at a ratio 1:1 and the co-culture was inoculated at 10% (v/v).

2.3. Experimental design

The ability of the strains to ferment a mixture of glucose (8 g.l⁻¹)/raffinose (1 g.l⁻¹)/stachyose (0.6 g.l⁻¹) in pure or co-cultures was first investigated in batch in MRS-medium. The concentration of raffinose was similar to that found in the rice/soybean slurry used in this work.

Thereafter, fermentation of the rice/soybean slurry with the same cultures was investigated. 450 ml of slurry was heated progressively until bubbles appear (~ 94°C) gentle boiling was

maintained for 15 min while stirring. After gelatinization, the gruel was cooled down to 30°C, after inoculation the slurry was homogenized by a mixer (Braun 600W) at maximum speed during 1 min. Dry matter content of the slurry was 12.7%.

Fermentations of the gelatinized slurries were performed at 30°C in batch using 200 ml sterile fermenters filled up to 170 ml. Samples were regularly taken for chemical and physical analysis. All experiments were made in triplicate.

2.4. Chemical analysis

2g of gruel sample were added to 8 ml of sterile water and was homogenised with an ultraturax-T8 (IKA, Staufen, Germany) for 1 min at 10,000 rpm. 1.3 ml of this suspension was mixed with 0.2 ml NaOH 5N and centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant was frozen at -20°C until analysis. Sugars were analysed by HPIC using a Dionex Carbopac PA1 column (Dionex Model ED 40) as previously described (Calderon *et al.*, 2001).

2.5. Rheological properties

Apparent viscosity measurements were performed on gruels at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a Haake viscometer VT550 with SV-DIN coaxial cylinders driven by a PC computer with the Rheowin 2.67 software. The shear rate and the shear time were 83 s^{-1} and 10 min, respectively (Mouquet and Trèche, 2001).

The consistency of the gruels was assessed by measurement in a Bostwick consistometer (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, Virginia, USA) (Bookwalter, Peplinski and Pfeifer, 1968). Measurements were made at 30°C and the Bostwick flow value was expressed in mm/30 sec.

3. Results

3.1. Pattern of mixed substrate consumption by LABs with α -gal activity in pure or co-culture with *L. plantarum* A6 in a model growth liquid medium (modified MRS-medium)

When strains 4.4 or Ogi E1 were cultivated in a modified MRS medium containing a mixture of glucose with alpha-galactooligosaccharides, raffinose was simultaneously consumed with glucose (Fig. 1A and B). However, strain Ogi E1 was unable to consume stachyose, in contrast to strain 4.4 which consumed it at a lower rate than raffinose once glucose was consumed.

When co-cultivated with *Lb. plantarum* A6 under the same conditions (Fig. 1C and D), similar pattern of sugar consumption was obtained, however, raffinose consumption lasted longer in the co-culture of strain A6 with strain Ogi E1, compared to the Ogi E1 pure culture and to the cultures involving strain 4.4.

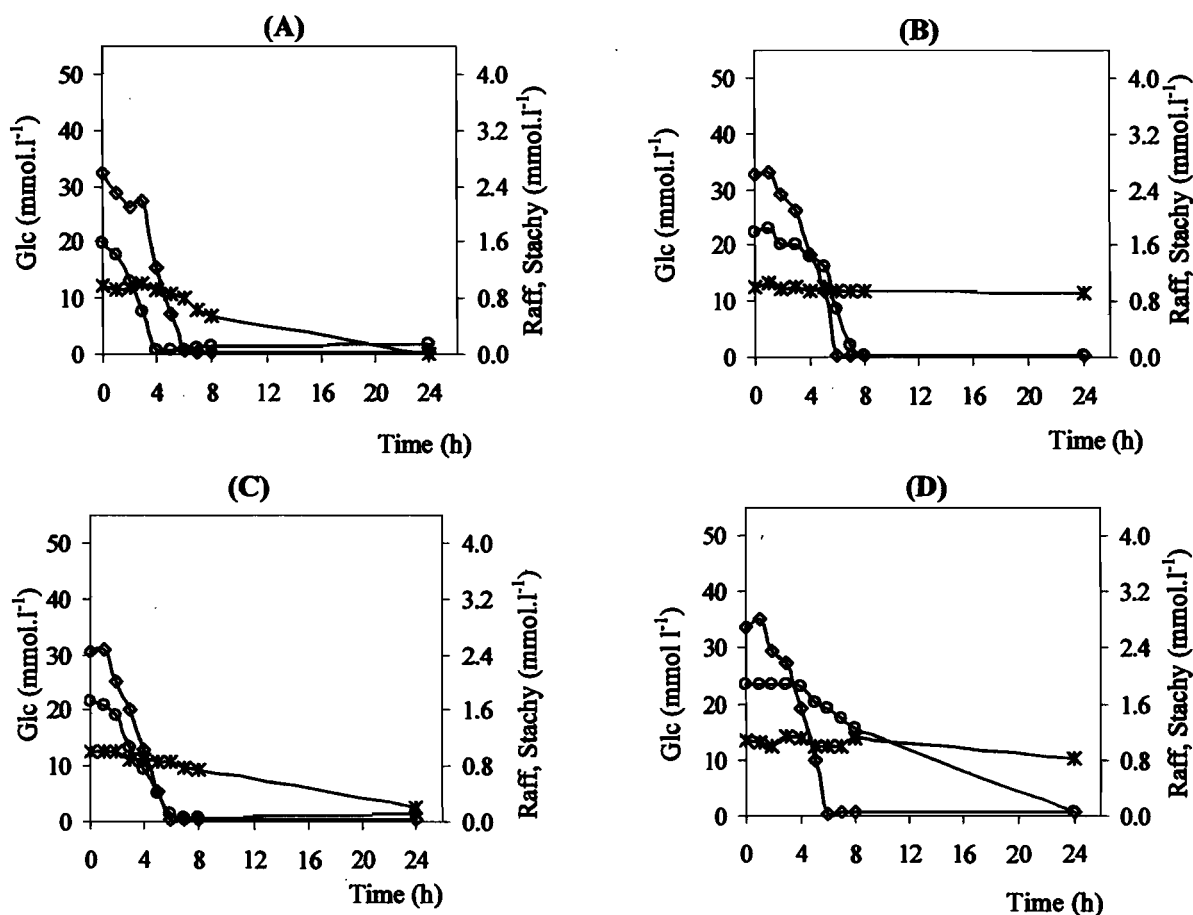


Figure 6.1. Sugar changes during mixed substrate fermentation by pure cultures or co-cultures of lactic acid bacteria on modified MRS medium.

(A): *Lactobacillus* spp. strain 4.4; (B): *Lb. fermentum* Ogi E1; (C): *Lactobacillus* spp. strain 4.4 with *Lb. plantarum* A6; (D): *Lb. fermentum* Ogi E1 with *Lb. plantarum* A6.

Symbols: (◇): glucose; (O): raffinose; (*): stachyose.

3.2. Pattern of mixed substrate consumption by the different LAB strains inoculated in a gelatinised rice-soybean slurry

When cultivated alone on a gelatinised rice-soybean slurry, strain A6 as expected did not consumed any of the α -GOS present in the mixture (Fig. 2) whereas an increase in glucose and maltose concentration was observed, probably due to the strong amylase activity of this strain. In contrast, the strains 4.4 and Ogi E1 did consume sucrose and raffinose but unexpectedly no change in the stachyose concentration was observed (Fig. 3A and B) Sucrose consumption was faster with strain

Ogi E1 than with strain 4.4. but this last strain consumed raffinose in less than 6 hours whereas it took 24 h for strain Ogi E1 to completely consume it. The co-culture of either strain 4.4. or Ogi E1 with the strain A6 resulted in sucrose and raffinose consumption (Fig. 4A and B) with a lower rate for sucrose consumption and a higher rate for raffinose consumption with the co-culture containing strain 4.4. Furthermore, in the co-culture no glucose and maltose accumulation was observed, contrary to the culture with A6 alone.

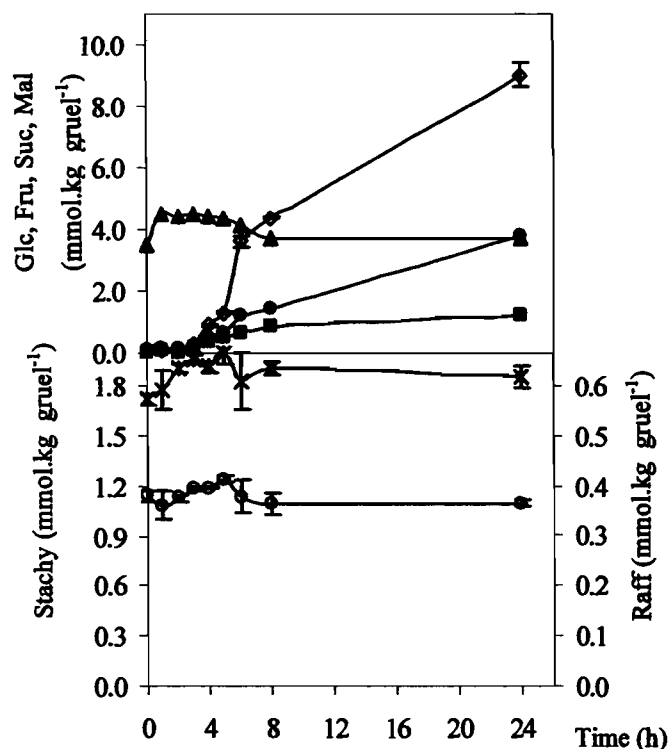


Figure 6.2. Sugars evolution during the fermentation by *Lb. plantarum* A6 of a gelatinised rice/soybean slurries prepared at 12.7% DM.

Symbols: (◇): glucose; (■): fructose; (▲): sucrose; (●): maltose; (○): raffinose; (*): stachyose

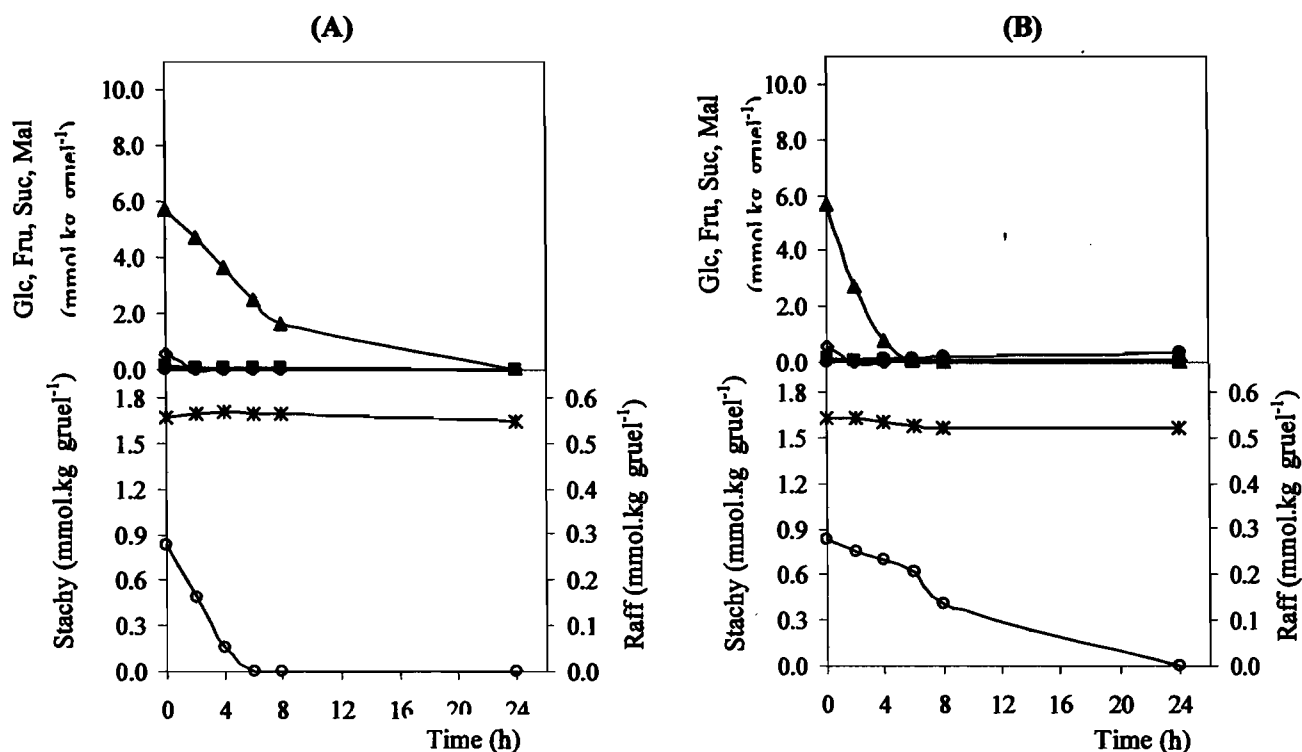


Figure 6.3. Sugars evolution during the fermentation by pure culture of *Lactobacillus* spp. strain 4.4 and *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of a gelatinized rice/soybean slurries prepared at 12.7% DM. (A): *Lactobacillus* spp. strain 4.4 ; (B) : *Lb. fermentum* Ogi E1

Symbols: (◇): glucose; (■): fructose; (▲): sucrose; (●): maltose; (○): raffinose; (*): stachyose.

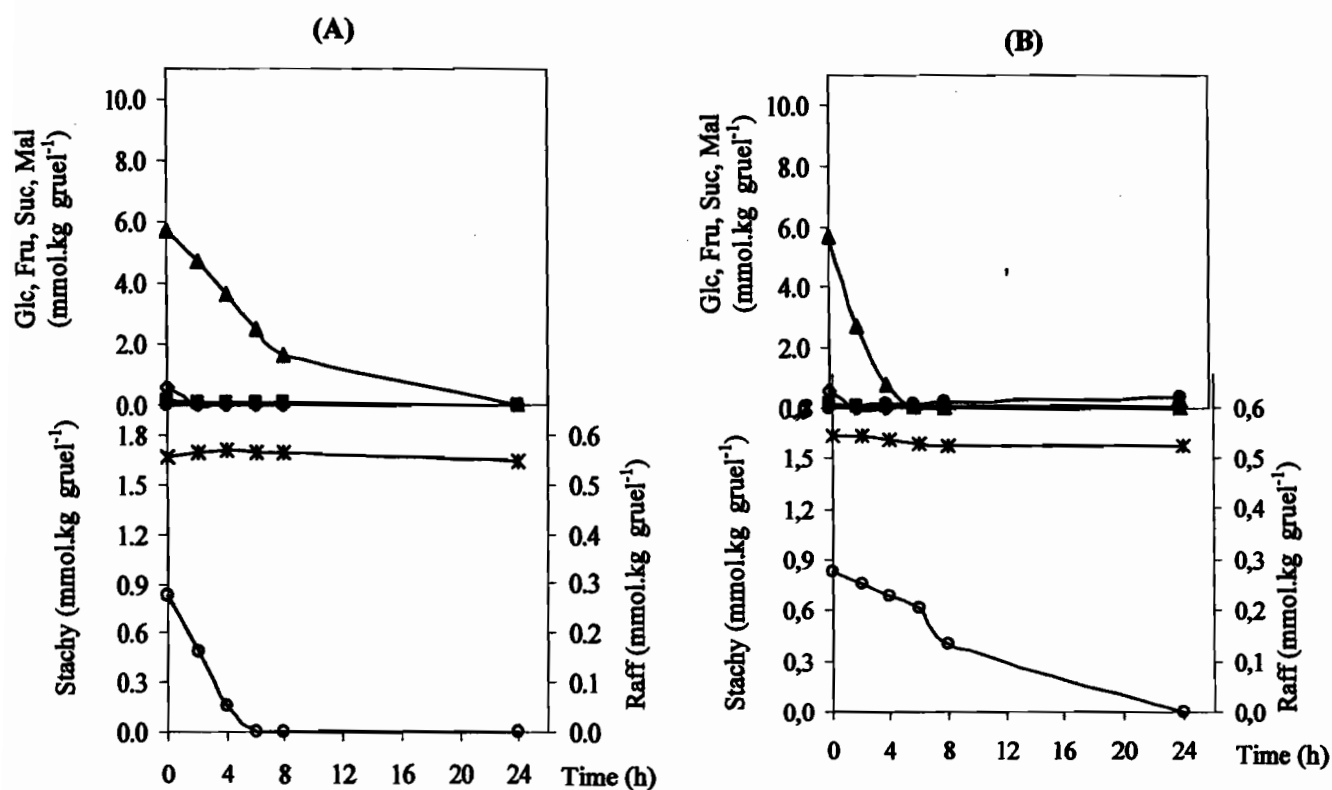


Figure 6.4. Sugar evolution during the fermentation by co-cultures of a gelatinised rice/soybean slurries prepared at 12.7% DM. (A): *Lactobacillus* spp. strain 4.4 with *Lb. plantarum* A6, (B): *Lb. fermentum* Ogi E1 with *Lb. plantarum* A6

Symbols: (◇): glucose; (■): fructose; (▲): sucrose;
(●): maltose; (○): raffinose; (*) : stachyose

Changes in apparent viscosity of the rice-soybean mixture were investigated (Fig. 5). Both the strains 4.4. and Ogi E1 were able to induce a decrease in viscosity from initial values of 1.77 and 1.70 Pa.s, respectively, to final values of 0.31 and 0.21 Pa.s, respectively.

The decrease in viscosity of the slurry was stronger with strain A6 alone (from 2.03 to 0.05 Pa.s) and the co-cultures including either strain 4.4. or Ogi E1 (from 1.88 to 0.07 and from 1.93 to 0.08 Pa.s, respectively).

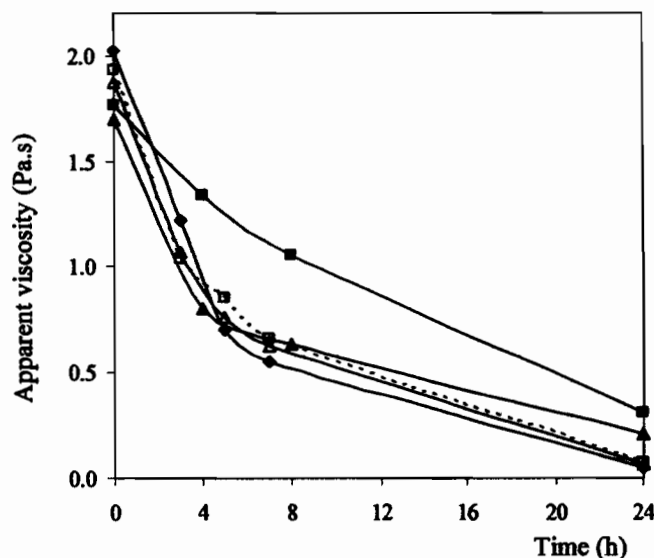


Figure 6.5. Changes in apparent viscosity during the fermentation of gruels prepared with rice/soybean at 12.7% DM.

Symbols: (◆): *Lb. plantarum* A6; (■): *Lactobacillus* spp. strain 4.4; (▲): *Lb. fermentum* Ogi E1; (□): co-culture of 4.4 and A6 strains; (△): co-culture of Ogi E1 and A6 strains

4. Discussion

Strains 4.4. were tested in a modified MRS growth medium for their ability to remove α -GOS in presence of high concentration of glucose and in presence of an efficient amylolytic LAB (strain A6). The ability of strains 4.4. and Ogi E1 to remove raffinose in pure or mixed culture simultaneously to glucose, suggests that the enzymes involved in raffinose catabolism could be constitutive, but in contrast stachyose removal by strain 4.4 was much slower. The pattern of substrate consumption was mainly altered for raffinose when strain Ogi E1 was co-cultivated with strain A6. All these facts lead to the conclusion that strain 4.4 is more efficient than Ogi E1 to remove α -GOS in presence of high glucose concentration and without major antagonistic relation when put in presence of A6.

Notwithstanding, whereas Ogi E1 had an expected pattern of sugar consumption when inoculated to the gelatinised rice-soybean slurry, the fact that strain 4.4 behaved differently for stachyose consumption alone or

in co-culture did contrast with results obtained in the modified MRS-medium. This observation emphasis the difficulty to extrapolate results obtained from classical growth medium and the necessity to perform such tests directly with the food matrix to be studied. Such behaviour is difficult to explain since in the rice-soybean slurry the concentration in other sugars such as sucrose, glucose and maltose is very low compared to the modified MRS-medium used, discarding therefore the hypothesis of competition between substrates; but many other compounds in the mixture, probably from soybean, might have interfered with stachyose consumption. Other hypothesis could be based on the fact that in the rice-soybean slurry stachyose concentration was much lower than in the modified MRS medium used, and that at low concentration either the rate of stachyose removal could be extremely low or it is below a threshold level which does not make it possible its degradation. However, coupling either strain 4.4 or Ogi E1 with A6 prevented

glucose and maltose accumulation, this could be considered as an additional benefit in reducing the risk of post-fermentation contamination due to excessive amount of residual substrate.

The ability of A6 to hydrolyse rice-soybean slurries prepared at different DM content (from 12 to 22%) was demonstrated in a previous work (Nguyen *et al.*, 2005), however this strain was not able to ferment α -GOS. For that reason, strains 4.4. and Ogi E1 were selected on the basis of their capacity in fermenting raffinose, however, like A6, strain Ogi E1 is also a known amylolytic LAB (Agati *et al.*, 1998; Calderon *et al.*, 2001) and decrease in starch viscosity by strain 4.4 indicates that this strain has also an amylase activity. Notwithstanding, the lowest values in final viscosity were obtained when A6 was used alone or in co-cultures, suggesting that A6 is a more efficient amylolytic LAB than the other strains used.

Conclusion

Unexpectedly, the strain 4.4 selected from tests performed in model growth medium (*i.e.* modified MRS medium) failed to remove stachyose when cultivated in the rice-soybean slurry. However, the co-cultures investigated were able to degrade raffinose and to simultaneously reduce the viscosity of gruels to liquid consistency, which opens the way to develop new rice-soybean based fermented beverages as an alternative to other existing fermented beverages prepared from cow milk. Such a beverage could be the vector of fortification strategy to supply micronutrients when needed and could also support the use of probiotic bacteria.

Acknowledgement: Nguyen T.T.T. was the recipient of a grant from IRD and the French Embassy in Vietnam. CIRAD is acknowledged for support.

References

Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. et Hounhouigan, D.J. (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 512-520.

Bookwalter, G.N., Peplinski, A.J., and Pfeifer, V.F. (1968). Using a bostwick consistometer to

measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today*, 13(11), 407-410.

Calderon, M., Loiseau, G. et Guyot, J.P. (2001). Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 508-516.

de Benoist, B. (1999). Complementary feeding: a challenge to both children and mother. In M. C. Dop, D. Benbouzid, S. Trèche, B. de Benoist, A. Verster, F. Delpeuch. *Complementary feeding of young children in Africa and the Middle East*. World Health Organisation. Geneva.

de Man, J.C., Rogosa, M. et Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.

Dey, P.M. et Pridham, J.B. (1972). Biochemistry of α -galactosidase. *Advanced Enzymology*, 36, 91-130.

FAO/WHO. Carbohydrate in human nutrition. *Interim Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*. Rome, Italy, 14 to 18 April 1997.

Florencio, J.A., Raimbault, M., Guyot, J.P., Eiras-Stofella, D.R., Soccol, C.R. et Fontana, D. (2000). *Lactobacillus plantarum* amylase acting on crude starch granules: native isoforms and activity changes after limited proteolysis. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 84 (86), 721-730.

Garro, M.S., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. et Oliver, G. (1993). Characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 485-488.

Garro, M.S., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. et Oliver, G. (1994). α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 16-19.

Giraud, E., Champailier, A. et Raimbault, M. (1994). Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 4319-4323.

Giraud, E. et Cuny, G. (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of

- Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggest a common evolutionary origin. *Gene*, 198, 149-158.
- Kotwal, S.M., Gote, M.M., Sainkar, S.R., Khan, M.I. et Khire, J.M. (1998). Production of α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. In solid-state fermentation and its application in soymilk by hydrolysis. *Process Biochemistry*, 33 (3), 337-343.
- Kratzer, F.M., Bersch, S., Vohra, P., et Ernst, R.A. (1990). Chemical and biological evaluation of soyabean flakes autoclaved for different durations. *Animal Feed Science and Technology*, 31, 247-259.
- Leske, K.L., Jevne, C.J. et Coon, C.N. (1993). Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolisable energy of soy protein concentrate. *Poultry Science*, 72, 664-668.
- Lorri, W., and Svanberg, U. (1993). Lactic acid-fermented cereal gruels: viscosity and flour concentration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 207-213.
- Mouquet, C. et Trèche, S. (2001). Viscosity of gruels for infants: a comparison of measurement procedures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 389-400.
- Mouquet, C., Salvignol, B., Van Hoan, N., Monvois, J. & Trèche, S. (2003). Ability of a «very low-cost extruder» to produce instant infant flours at a small scale in Vietnam. *Food Chemistry*, 82, 249-255.
- Nguyen T.T.T., Loiseau, G; Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S. and Guyot, J.P. (2005). Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria in process combinations on characteristics of rice/soybean slurries: a new method to prepare high energy density complementary foods for young children. *Food chemistry*. In press.
- Steggerda, F.R., Richards, E.A. et Rackis, J.J. (1966). Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. *Proceedings of the Society of experimental Biology and medicine*, 121, 1235.
- Sugimoto, H. et Bureu, J.P.V. (1970). Removal of oligosaccharides from soymilk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*. *Journal of Food Science*, 35, 655-660.
- Trèche, S. (1995). Techniques pour augmenter la densité énergétique des bouillies. In S.Trèche, B. de Benoist, D. Benbouzid, A. Verster, F. Delpeuch, *L'alimentation de complément du jeune enfant*, pp 123-146. Paris, ORSTOM.
- Trèche, S., Mbome, I.L. (1999). Viscosity, energy density and osmolality of gruels for infant prepared from locally produced commercial flours in some developing countries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 117-125.
- Tsangalis, D., Shah, N.P. (2004). Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 541-554.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

L'étude de l'augmentation de la densité énergétique d'aliments de complément du jeune enfant par l'utilisation de combinaisons appropriées de procédés technologiques et biologiques s'inscrit dans la démarche d'amélioration des situations nutritionnelles par les voies alimentaires. Cette démarche est un objectif majeur de nutrition publique concernant de nombreux pays en développement ou émergents et concerne principalement la malnutrition protéino-énergétique du jeune enfant. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier les bases de développement de nouveaux aliments fonctionnels pour les jeunes enfants des pays asiatiques, où la consommation de riz et de soja est traditionnelle.

L'utilisation des bactéries lactiques amylolytiques, telle que nous l'avons développée dans les étapes de fermentation pour l'augmentation de la densité énergétique des bouillies infantiles, est une voie novatrice comparée aux procédés existants.

L'intérêt d'utiliser *Lactobacillus plantarum* A6 réside dans le fait que l' α -amylase que produit cette souche est très performante. L'utilisation de *Lactobacillus plantarum* A6 semble donc être intéressante (i) pour la conversion directe de l'amidon en acide lactique, (ii) pour modifier les propriétés rhéologiques de la matrice et (iii) pour économiser une étape de pré hydrolyse.

Notre étude préliminaire s'est donc orientée vers l'utilisation de la souche A6 sur la suspension à 22% MS de farine de riz seule ou en combinaison avec du soja. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la fermentation par *Lactobacillus plantarum* A6 de la suspension de farine de mélange (riz/soja) non gélatinisée produit une quantité d'acide lactique ($89.4 \text{ mmol.kg bouillie}^{-1}$) plus élevée qu'avec la suspension de farine de riz utilisée seule ($40.4 \text{ mmol.kg bouillie}^{-1}$). Pour cette raison, nous avons choisi de fermenter un mélange de farine de riz et de farine de soja (80/20%) pour les études ultérieures. Cependant avec l'utilisation de *Lactobacillus plantarum* A6, amylolytique, la fermentation du mélange non gélatinisé produit une bouillie encore très pâteuse après cuisson. La souche A6 n'est pas suffisamment efficace pour hydrolyser l'amidon cru, rendant ainsi nécessaire une étape de gélatinisation avant la fermentation.

Le premier procédé technologique appliqué au mélange de farines à différentes teneurs en matière sèche avant la fermentation est la gélatinisation. Cela a permis l'obtention, après fermentation, de bouillies fluides présentant les caractéristiques requises pour atteindre

l'objectif nutritionnel recommandé de 84 kcal/100 g de bouillie pour des enfants de 6 à 12 mois consommant deux repas de bouillies par jour et recevant respectivement des niveaux d'allaitement faibles et moyens (WHO, 1998 ; Dewey et Brown, 2003). En effet, le mélange à 23% de MS conduit à une bouillie dont la densité énergétique est de 98 kcal pour 100g.

Les procédés de déshydratation pour obtenir des farines à partir des bouillies fermentées offrent une voie alternative pour préparer des bouillies à partir d'un produit aisément stockable et conservable, combinant les caractères acide et déshydraté comme facteurs de conservation. A cet égard, le séchage par atomisation en tant que post-traitement après la fermentation par *Lactobacillus plantarum* A6 se révèle plus prometteur que la lyophilisation, puisque le procédé d'atomisation a eu l'avantage additionnel de permettre la préparation de bouillie à des teneurs de 30-33% MS, avec une densité énergétique de 128-140 kcal/100g de bouillie.

En substitution à la gélatinisation avant la fermentation, le deuxième procédé technologique que nous avons appliqué comme prétraitement sur le mélange à faible (12%) et forte (22%) teneur en MS avant la fermentation est l'homogénéisation haute pression (HHP), réalisée avec un homogénéisateur haute pression en continu à double effet avec une pression de 25 MPa pour le premier effet et de 5 MPa pour le second. Cet équipement et les pressions appliquées sont identiques à ceux utilisés dans l'industrie laitière.

L'application de l'HHP au mélange de farines à la température ambiante a diminué la taille des particules et dispersé les granules, en créant une bonne condition pour la fermentation et la production d'acide lactique. Cependant, les paramètres de conduite de l'homogénéisation n'ont pas permis de déstructurer suffisamment le grain d'amidon pour faciliter l'amylolyse par *Lactobacillus plantarum* A6, ce qui a conduit à une bouillie de trop forte viscosité après cuisson.

Par contre, l'application de l'HHP sur le mélange à 22% MS chauffé à 57°C a donné un mélange homogénéisé fluide dont la viscosité est de 0.3 Pa.s, facilitant l'inoculation et la répartition de *Lactobacillus plantarum* A6 dans le produit. La fermentation du mélange chauffé à 57°C et homogénéisé s'est accompagnée d'une production élevée d'acide lactique. La cuisson d'un mélange à 22% MS, chauffé à 57°C, homogénéisé puis fermenté, a conduit à une bouillie à haute densité énergétique (94 kcal/100 g de bouillie fermentée) et de faible viscosité (≈ 1 Pa.s), valeur dans la zone de viscosité acceptable (1-3 Pa.s) pour les jeunes enfants (Mouquet *et al.*, 2001).

L'atomisation des suspensions de farines fermentées obtenues après l'HHP à température ambiante n'a pas permis d'élaborer une bouillie à haute densité énergétique car la viscosité

était encore très élevée après cuisson. Seuls les farines préparées par atomisation de suspensions chauffées à 57°C puis homogénéisées et fermentées ont permis d'obtenir après cuisson des bouillies fluides à 32% MS et une densité énergétique de 137 kcal/100 g.

L'atomisation des bouillies fermentées, seule ou couplée à l'HHP, représente une nouvelle alternative possible de production de farines infantiles fermentées présentant les caractéristiques énergétiques requises. Au-delà de l'objectif nutritionnel qui consistait à augmenter la densité énergétique, il convenait aussi de se pencher sur le problème que représente la présence d' α -galactooligosaccharides comme le stachyose et le raffinose apportés par la farine de soja. L'incapacité de la souche A6 à fermenter ces composés a motivé des essais d'association avec des souches bactériennes présentant des propriétés complémentaires. Bien que les résultats obtenus démontrent la faisabilité de cette démarche, ils ne sont toutefois pas encore satisfaisants, et la mise au point d'un starter combinant des microorganismes plus efficaces que les souches testées, en particulier capables d'éliminer le stachyose, reste une voie à approfondir.

Le travail présenté apporte des bases méthodologiques et techniques au développement de nouveaux produits fermentés à base de riz et de soja. La faisabilité des étapes clés du procédé a été démontrée au laboratoire, la transposition de ce procédé à l'échelle industrielle peut être envisagée avec optimisme. A notre connaissance, la fermentation lactique de substrats amylacés n'a jamais encore été exploitée industriellement; le fait que la souche *Lb. plantarum* A6 dispose d'une bonne activité amylasique et d'une grande tolérance aux faibles pH, devrait rendre cette opération aisée, en utilisant des technologies analogues à celles utilisées pour les productions de yaourts ou de boissons fermentées. Ces procédés par ailleurs pourraient être adaptés à d'autres aliments amylacés complétés par d'autres types de légumineuses. Il demeure donc toute une recherche appliquée à réaliser pour explorer toutes les possibilités offertes par les résultats acquis dans le cadre de nos travaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abou-Donia, S., El-Soda, M. et Mashaly R. (1980). Enrichement of zabadi with soy extract. *Journal of Dairy Reseach*, 47, 151-153.
- Adeyemi, I. A. (1988). Ogi quality of sorghum flour dry-milled from fermented sorghum grains. *Journal of Food Sciences*, 53, 641-642.
- Adler-Nissen, J. and Demain, A.L. (1994). Aeration-controlled formation of acetic acid in heterolactic fermentations. *Journal of Industrial Microbiology*, 13, 335-343.
- Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D.J. (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 512-520.
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J.P. (2000). Purification and characterization of an extra-cellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microbiology and Technology*, 27, 406-413.
- Anderson, J. W., Blake, J.E., Turner, J. and Smith, B.M. (1998). Effects of soy protein on renal function and proteinuria in patients with Type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(suppl), 1347S-1353S.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. and Cook-Newall, M. E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England Journal of Medicine*, 333, 276-282.
- Anderson-Haffermann, J. C., Zhang, Y., Parsons, C. M. and Hymowitz, T. (1992). Effect of heating on nutritional quality of conventional and Kunitz trypsin inhibitor-free soybeans. *Poultry Science*, 71, 700- 709.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Hughes, C. L., Morgan, T. M. and Burke, G. L. (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of Peripubertal Rhesus Monkeys. *Journal of Nutrition*, 126, 43-50.
- Ashworth, A., Draper, A. (1992). The potential of traditional technologies for increasing the energy density of weaning foods. *A critical review*. Genève.OMS; WHO/CDD/EDP/92-4, 50p.
- Asiedu, J. J. (1991). La transformation des produits agricoles en zone tropicale. *Karthala et Centre de Technologie Adaptée (CTA)*. Paris, France.
- Aubert, C. (1985). Les aliments fermentés traditionnels. *Terre Vivante*.
- Barbi, J. W. (1996). Technology comparisons and results on processing and nutrition of fullfat soya. 2nd International Fullfat Soya Conference. *American Soybean Association*. Budapest, Hongrie, 56-66.

- Bates, L. S.** (1994). Dry heat processing of full-fat soybeans and other ingredients. FT-11. *American Soybean Association*. Singapour. 5 p.
- Batey, I. L.** (1982). Starch analysis using thermostable α -amylase. *Starch*, 4, 125-128.
- Bauer, B.A. and Knorr, D.** (2005). The impact of pressure, temperature and treatment time on starches: pressure-induced starch gelatinization as pressure time temperature indicator for high hydrostatic processing. *Journal of Food Engineering*, 68, 329-334.
- Ben Omars, N., Ampe, F., Rambault, M., Guyot, J.P. and Tailliez, P.** (2000). Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Systematic Applied Microbiology*, 23, 285-291.
- Benito de Cardenas, I. D., Peral de Portillo, M. C., Albizzatti de Rivadeneira, M. C. and Oliver, G.** (1991). Influence of medium and temperature on ends products and growth in *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 9, 363-368.
- Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y. and Pareilleux A.** (1988). Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Applied Microbiology Biotechnology*, 28, 340-344.
- Billard, P. H.** (1997). Fermentation lactique d'un amidon de manioc enrichi en protéines de levures: application à la conception de nouvelles boissons à caractère nutritionnel, compléments alimentaires pour les pays en voie de développement. *Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Paris-Grignon*. Paris, 131 p.
- Bookwalter, G. N., Peplinski, A. J., Pfeifer V. F.** (1968). Using a bostwick consistometer to measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today*, 13 (11), 407-410.
- Borch, E., Berg, H. and Holst, O.** (1991). Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. during glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 265-269.
- Bornet, F.** (1992). Technologie des amidons, digestibilité et effets métaboliques. *Cahier de la nutrition et diététique*, 27 (3), 170-178.
- Butte, N. F., Henry, C. J. K. and Torun, B.** (1996). Report of the working group on energy requirements of infants, children and adolescents. *European Journal of Clinical Nutrition*, Suppl 1, S188-S189.
- Calderon, M., Loiseau, G. and Guyot, J.P.** (2001). Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 508-516.
- Carlsen, M., Nielsen, J. and Villadsen, J.** (1995). Growth and α -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. *Journal of Biotechnology*, 45, 81-93.

- Castillo Pompeyo, C., Suarez-Gomez, M., Gasparian, S. and Morlon-Guyot, J. (1993).** Comparaison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and *Lactobacillus amylophilus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 40, 266-269.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J. and Landon, M. (1986).** Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters*. 8, 625-628.
- Champ, M. et Faisant, N. (1992).** Technologies et qualités nutritionnelles des amidons. Dans *Aspects nutritionnels des constituants des aliments. Influences des technologies*. Edited by Bernard, A. et Carlier, H., 8, 1-23. Dijon. Les cahiers de l'ENSBANA.
- Cheng, Y. J., Thompson, L.D. and Brittin, H.C. (1990).** Sogurt, a yoghurt-like soybean product: development and properties. *Journal of Food Science*, 55, 1178-1179.
- Chiang, C. J., Johnson, J. A. (1977).** Measurement of total and gelatinized starch by glucoamylase and o-toluidine reagent. *Cereal Chemistry*, 54 (3), 429-435.
- Chong, Y. H. (1979).** Malnutrition, food patterns and nutritional requirements in Southeast Asia. In : *Proceedings UNU/IRRI Workshop on Interfaces Between Agriculture, Nutrition and Food Science*. IRRI, 1977, 1-17. Los Baños, Laguna, the Philippines.
- Chu F. S., Chang C. C., Ahsoor S. H. and Prentice N. (1975).** Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin in brewing. *Applied Microbiology*, 29 (3), 313-316.
- Colona, P. and Champ M. (1990).** Significance of starch damage in feeds. *Sci. Alim*, 10, 877-897.
- Colonna, P., Buléon, A. (1994).** Transformations structurales de l'amidon. Dans : *La cuisson extrusion*. Edité par Colonna, P. et Della Valle, G. p18-43. Paris, Collection sciences et techniques agro-alimentaires, Lavoisier.
- Cristofaro, E., Mottu, F. and Wuhriman, J. J. (1974).** Involvement of the raffinose family of oligosaccharides in flatulence. In : *Sugar in nutrition*. Edited by Sipple, H.L. et Mc Nutt, K.W, p313. Academic Press, New York.
- Crouse, J. R., Morgan, T., Terry, J., Ellis, J., Vitolins, M. and Burke, G. L. (1999).** A randomised trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Archives of Internal Medicine*, 159, 2070-2076.
- de Benoist, B. (1999).** Complementary feeding: a challenge to both children and mother. In: *Complementary feeding of young children in Africa and the Middle East*. Edited by Dop, M. C., Benbouzid, D., Trèche, S., de Benoist, B., Verster, A., and Delpuch, F. World Health Organisation. Geneva.
- de Man, J. C., Rogosa, M. et Sharpe, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- de Schutter, A. C. and Morris, J. R. (1990).** Soybeans: Full fat. In: *Non traditional Feed Sources in Swine production*. Edited by Thacker, P.D. et Kirkwood, R.N., p439-451. Butterworths Publishers. New-York, Etats-Unis.

- Dellagio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. et Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques*. Edité par de Roissart, H. et Luquet, F.M., Vol 1, 25-70. Lorica, Uriage.
- Desikachar, H. S. R. (1980).** Development of weaning foods with high caloric density and low hot-paste viscosity using traditional technologies. *Food and Nutrition Bulletin*, 2, 21-23.
- Desmazeaud, M. J. et Roissart, H. (1994).** Métabolisme général des bactéries lactiques. En : *Bactéries lactiques*. Edité par : de Roissart, H. et Luquet, F.M., Vol. 1, 169-207. Lorica, Uriage.
- Dewey, K. G., and Brown, K. H. (2003).** Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin*, 24 (1), 5-28.
- Douzals, J. P., Marechal, P. A., Coquille, J. C. and Gervais, P. (1996).** Microscopic study of starch gelatinisation under high hydrostatic pressure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1403-1408.
- Douzals, J. P., Perrier Cornet, J. M., Gervais, P. and Coquille, J. C. (1998).** High-pressure gelatinization of wheat starch and properties of pressure-induced gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4824-4829.
- Duprat, F., Gallant, D., Guilbot, A., Mercier C. et Robi, J.P. (1980).** Dans : *Les polymères végétaux*. Edité par Monties, B. p176-231. Gauthier-villars.
- Dupuy, P., Sautier, C. et Stievenard, S. (1994).** Le soja en alimentation humaine. *Cahier de la Nutrition et diététique*, 29 (1), 47-53.
- Dwyer J. (1993).** Vegetarian diets for treating nephrotic syndrome. *Nutrition Review*, 44-66.
- Eggum, B. O., Juliano, B. O. and Maniñgat, C. C. (1982).** Protein and energy utilization of rice milling fractions by rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 31, 371-376.
- Erdman, J. W. Jr. (1995).** Control of Blood Lipids with Soy Protein. *The New England Journal of Medicine*, 333, 313-315.
- Erten, H. (1998).** Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Process Biochemistry*, 33(7), 735-739.
- Evers, T. and Millar, S. (2002).** Cereal grain structure and development: Some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, 36 (3), 261-284.
- Ezaki, S. and Hayashi, R. (1992).** High pressure effects on starch: structural change and retrogradation. In: *High pressure and biotechnology*. Edited by Balny, C. Hayashi, R. Heremans, K. et Masson, P. p. 163-165. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext, Montrouge, France.
- FAO (2003).** Food energy-methods of analysis and conversion factors. Food and nutrition paper, Rome. 77.
- FAO. (2004).** Année Internationale du riz.

<http://museum.agropolis.fr/pages/animations/air2004/genese.htm>.

FAO/WHO. (1991). Protein Quality Evaluation: Report of Joint FAO/WHO. Expert Consultation. No 51. *Food and Nutrition Paper*. Food and Agriculture Organization, Rome.

FAO/WHO. (1995). Workshop on fermentation as a household technology to improve food safety. *FAO/WHO report*. Pretoria, South-Africa.

FAO/WHO Codex. (1994). Commission du Codex Alimentarius. Vol.4, 2nd edition. *Food and Agriculture Organization/World Health Organization*. Rome

FAO/WHO. (1997). Carbohydrate in human nutrition. *Interim Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*. Rome, Italy, 14 to 18 April 1997.

FAO/WHO. (2001). Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Amerian Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina* 1-4 October 2001.

Farrow, J.A.E., Facklam, R.C. and Collins, M.D. (1989). Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomonsenteroides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 279-283.

Furukawa, N., Matsuoka, A., Takahashi, T. and Yamanaka, Y. (1991). Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 43, 450-453.

Gänzle, M. G., Ehman, M. and Hammes W. P. (1998). Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2616-2623.

Garreau, J. J. (1996). Soja et systèmes alimentaires. *CIEH. Université de Bordeaux I*. Mai 1996.

Garro, M. S., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. and Oliver, G. (1993). Characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 485-488.

Garro, M. S., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. and Oliver, G. (1994). α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 16-19.

Garro, M. S., Font de Valdez, G., Oliver, G. and Savoy de Giori, G. (1996). Purification of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology*, 45, 103-109.

Gasser, F., Montel, M-C., Talon, R. et Champomier, M. Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. Edité par de Roissart, H. et Luquet. F.M. (1994), Vol. 1, 117-139. Loriga.

Gauthier, S. (1990). Utilisation de moisissures pour la fabrication de produits fermentés à base de soja. Dans : *Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle*. Edité par Coodinateur Larpent, J.P., Ed. Masson, Paris.

- Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B. and Raimbault, M. (1991).** Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 379-383.
- Giraud, E. (1993).** Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. *Thèse doctorale présentée à l'Université de Provence Aix-Marseille I*.
- Giraud, E., Champailier, A., and Raimbault, M. (1994).** Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4319-4323.
- Gobbetti, M., Corsetti, A. and Rossi, J. (1995).** Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 fructose-negative strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 939-944.
- Godon, B. (1990).** Les constituants des céréales : nature, propriétés et teneurs. Dans : *Biotransformation des produits céréaliers*. Edité par Godon B. p1-22. Sciences et Technique Agro-alimentaire. Tec. et Doc., Lavoisier. Paris.
- Golpadas, T., Deshpande, S. and John, C. (1988).** Studies on a wheat based amylase-rich food. *Food and Nutrition Bulletin*, 10: 55-59.
- Golpadas, T., Mehta, P. et John, C. (1989).** La réduction du volume des gruaux de sevrage traditionnels en Inde. Dans : *Pour améliorer l'alimentation des jeunes enfants en Afrique orientale et australe: une technologie à la portée des ménages*. Edité par Alnwick, D., Moses, S., Schmidt, O.G. Compte rendu d'un atelier tenu à Nairobi, Kenya, 12-16 octobre 1987. Ottawa: CRDI-265f, 375-385.
- Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed *Dunod*, Paris. Tome 1, 91-92.
- Gundel, J. and Matrai, T. (1996).** Different methods of heat treatment for soybeans in piglet nutrition. 2nd International Fullfat Soya Conference. *American Soybean Association*. Budapest, Hongrie, 433-450.
- Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Ampe, F., Talamond, P. and Raimbault, M. «New strains of lactic acid bacteria, cultivation and applications»** Date de publication (France) 4.02.2000, numéro de publication: FR2781811/. Date de publication (International): 10.02.2000, numéro de publication: WO0006695.
- Hammes, W. P., Stolz, P. and Gänzle, M. (1996).** Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Advanced Food Science*, 18 (5/6), 176-184.
- Herkelman, K. L., Cromwell, G. L. and Stahly, T. (1991).** Effects of heating time and sodium metabisulfite on the nutritional value of full- fat soybeans for chicks. *Journal of Animal Science*, 69, 4477-4486.
- Hibi, Y., Matsumoto, T., and Hagiwara, S. (1993).** Effect of high pressure on the crystalline structure of various starch granules. *Cereal Chemistry*, 70, 671- 676.
- Holmes, J., Bjöck, I. and Drews, A. Asp. N. (1986).** A rapid method for the analysis of starch. *Starch*, 38, 224-226.

- Horan, F. E.** (1974). Soy Protein Products and their Production. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51, 67A-73A.
- Imam, S.H., Burgess-Cassler, A., Cote, G. L. and Gordon, S. H.** (1991). A study of corn starch granule digestion by an unusually high molecular weight α -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Current Microbiology*, 22, 365-370.
- Iwasaki, T.** (1987). Measures for the enhancement of rice consumption and diversification of rice utilization. *Paper presented at the International Seminar on the Diversification of Rice Utilization*. 12 - 17 October, Bangkok. 3 p.
- Jansen, G. R., O'Deen, L., Tribelhorn, R. E. and Harper, J. M.** (1981). The calories densities of gruels made from extruded corn-soy blends. *Food and Nutrition Bulletin*, 3, 39-44.
- Jarvis, B.** (1971). Factors affecting the production of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 34, 199-213.
- Joarder, G. K., Khalaque, A., Khatoon, M. and Rashid, A.** (1978). Studies on the preparation of and properties of soy-dahi. *Bangladesh Journal of Agriculture*, 3, 367-372.
- Johansson, M. L., Sanni, A., Lonner, C., and Molin, G.** (1995). Phenotypically-based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigerian Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 159-168.
- Juliano, B. O.** (1972). The rice caryopsis and its composition. In : *Rice chemistry and technology*. Edited by Houston, D.F. p 1674. American Association of Cereal Chemists. Saint Paul, MN, United State.
- Juliano B. O.** (1985a). Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In : *Rice chemistry and technology*. Edited by Juliano, B.O. 2nd ed., p. 59-174. American Association of Cereal Chemists. Saint Paul, MN, United State.
- Juliano B. O.** (1985b). Rice: chemistry and technology, 2nd ed. *American Association of Cereal Chemists*. Saint Paul, MN, United State. 774 p.
- Juliano, B. O. and Bechtel, D.B.** (1985). The rice grain and its gross composition. In : *Rice chemistry and technology*. Edited by Juliano, B.O. 2nd ed., p. 17-57. American Association of Cereal Chemists. Saint Paul, MN, United State.
- Juliano, B. O.** 1994. Le riz dans la nutrition humaine. (Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 26). ISBN 92-5-203149-9.
- Kainuma, K., Matsunaga, F., Itagawa, M. and Kobayashi, S.** (1981). New enzyme system β -amylase-pullulanase to determine the degree of gelatinization and retrogradation of starch or starch products. *Journal of Japanese Society on Starch Science*, 28 (4), 235-240.
- Kandler, O. and Weiss, N.** (1986a). Regular nonsporing Gram-positive rods. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. 1208-1209. Williams, Wilkins, Baltimore.

- Kandler, O. and Weiss, N. (1986b).** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1209-1234. Williams, Wilkins, Baltimore.
- Khor, G. L., Tee, E. S. and Kandiah, M. (1990).** Patterns of food production and consumption in the ASEAN Region. *World review of nutrition and dietetics*, 61, 1 -40.
- Koch, A. L. (1981).** Manual of Methods for General Bacteriology. In: *American Society for Microbiology*. Edited by Gerhardt, P. Washington D.C.
- Kondo, H., Abe, K. and Arai, S. (1989).** Immunoassay of oryzacystatin occurring in rice seeds during maturation and germination. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2949-2954.
- Konijn, A. M., Gershon, B and Guggenheim, K. (1973).** Further purification and mode of action of a goitrogenic material from soybean flour. *Journal of Nutrition*, 103, 378.
- Kotwal, S. M., Gote, M. M., Sainkar, S. R., Khan, M. I. and Khire, J. M. (1998).** Production of α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. In : *Solid-state fermentation and its application in soymilk by hydrolysis*, 33 (3), 337-343. Process Biochem.
- Kouzeh-Kanani, M., van Zuilichem, D. J., Roozen, J. P. and Pilnik, W. (1981).** A modified procedure for low temperature infrared radiation of soybeans. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 14, 242-244.
- Kouzeh-Kanani, M., van Zuilichem, D.J., Roozen, J.P. and Pilnik, W. (1982).** A modified procedure for low temperature infrared radiation of soybeans. Inactivation of lipoxigenase and keeping quality of full-fat flour. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 15, 139-142.
- Kratzer, F.M., Bersch, S., Vohra, P., and Ernst, R.A. (1990).** Chemical and biological evaluation of soyabean flakes autoclaved for different durations. *Animal Feed Science and Technology*, 31, 247-259.
- Lai, M.-N., Chang, W. T. H. and Luh, B. S. (1980).** Rice vinegar fermentation. In: *Rice: production and utilization*. Edited by Luh B. S. p 690-711. Westport, CT, United State, AVI Publishing Company.
- Law, B.A. (1981).** The formation of aroma and flavor compounds in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. Abstracts, 43, 143.
- LeBlanc, J. G., Garro, M. S., Silvestroni, A., Connes, C., Piard, J.C., Sesma, F. and Savoy de Giori, G. (2004).** Reduction of α -galactooligosaccharides in soymilk by *Lactobacillus fermentum* CRL 722: *in vitro* and *in vivo* evaluation of fermented soymilk. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 876-881.
- Lee, H.P., Gourley, L. and Duffy, S.W. (1991).** Dietary effects on breast cancer risk in Singapore. *The Lancet*, Vol 337, 1197-1200.
- Leistner, L. (1994).** Die ernahrungsphysiologische Bedeutung von Angkak. *Fleischwirtschaft*, 74 (7), 774.

- Lin, T.-C., Shao, Y.-Y. and Chiang, W. (1988).** Investigation of the processing and the quality of rice milk. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 26, 130-137.
- Lindgren, S. and Refai, O. (1984).** Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *Journal of Applied Microbiology*, 57, 221-228.
- Lis, H., Fridman, C., Sharon, N. and Katchalski, E. (1966).** Multiple hemagglutinins in soybeans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 117-301.
- Liu, K. (1999).** Soybeans: Chemistry, Technology and Utilisation. *Aspen Publishers Inc, United State*.
- Lo, G. S., Goldberg, A.P., Lim, A., Grundhauser, J. J., Anderson, C. and Schonfeld, G. (1986).** Soy fibre improves lipid and carbohydrate metabolism in primary hyperlipidemic subjects. *Atherosclerosis*, 62, 239-248.
- Lo, G.S., (1990).** Nutritional and physical properties of dietary fibre from soybeans. *Cereal foods world*.
- Loiseau, G., Guyot, J.P., Guy, C., Krespine, V. et Montet, D. (2000).** Produits liquides fermentés riches en céréales, procédé d'élaboration et utilisation comme boissons. *Brevet français FR 0013863*, déposé le 20 Octobre 2000.
- Lorri, W. and Svanberg, U. (1993).** Lactic acid-fermented cereal gruels: viscosity and flour concentration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 207-213.
- Lorri, W. and Svanberg, U. (1995).** An overview of the use of fermented foods for child feeding in Tanzania. *Ecology of Food and Nutrition*, 34, 65-81.
- Marty, B. J. and Chavez, E. R. (1993).** Effects of heat processing on digestible energy and other nutrient digestibilities of fullfat soybeans fed to weaner, grower and finisher pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 73, 411-419.
- Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R. and Torii, S. (1988).** Purification and properties of an allergenic protein in rice grain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 1465-1470.
- Mc Bride, G. and Stetchmeyer, B. (1981).** Soy viilla: new soymilk yoghurt culture. *Soy foods*, 1, 7-8.
- Mc Ghee, J., Silman, R. and Bagley, E. B. (1977).** Production of α -galactosidase from *Aspergillus awamori* : Properties and action on para-nitrophenyl- α -galactopyranoside and galacto-oligosaccharides of soy milk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 244-247.
- Mensah, P., Tomkins, A. M., Drasar, B. S. and Harrison, T. J. (1991).** Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 203-210.
- Messina, M., Barnes, S. (1991).** The role of soy products in reducing the risk of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 83 (8), 542-546.

Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D. and Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data. *Nutrition and Cancer*, 12, 113-131.

Messina, M. (1999). Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (Suppl), 439S-450S.

Messink, R.P. and Katan M.B. (1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 Trials. *Arterioscler Thromb*, 12, 911-919.

Mestres, C., Matencio, F., Pons, B., Yajid, M. and Fliedel, G. (1996). A rapid method for the determination of amylose content by using differential scanning calorimetry, *Starch*, 48, 2-6.

Miao, G.-H. and Tang, X.-H. (1986). Isolation, purification and the properties of rice germ lectin receptors in rice embryo and endosperm. *Kexue Tongbao* (English translate.), 22, 1569-1573.

Michaelsen, K. M. and Friss, H. (1998). Complementary feeding: a global perspective. *Nutrition*, 14, 763-766.

Mital, B.K. and Steinkraus, K.H. (1975). Utilisation of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. *Journal of Food Science*, 40, 114.

Mitchell, C.R., Mitchell, P.R. and Nissenbaum, R. (1988). Nutritional rice milk production. *United State Patent*. No 4 744 992, 8 p.

Mittal, G.S. (1992). Food biotechnology-techniques and applications. *Technomic Publishing Co Inc*. Lancaster.

Miyoshi, H., Okuda, T., Kobayashi, N., Okuda, K. and Koishi, H. (1987a). Effects of rice fiber on mineral balance in young Japanese men. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 40, 165-170 (in Japanese).

Miyoshi, H., Okuda, T., Okuda, K. and Koishi H. (1987b). Effect of brown rice on apparent digestibility and balance of nutrients in young men on low protein diets. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 33, 207-218.

Modler, H.W., McKellar, R.C. (1990). Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, 23, 29-41.

Montelongo, J. L., Chassy, B. M. and Mc Cord, J. D. (1993). *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid. *Journal of Food Science*, 58, 863-866.

Montet, D., Zakhia, N., Mouquet, C., Loiseau, G. (1999). Fermentation traditionnelle, ch. 20, vol. 2. ISBN 81-87198-04-4. Biotechnology: Food Fermentation, Editors - V K Joshi & Ashok Pandey, Publishers- Educational Publishers & Distributors, New Delhi.

Montet, D., Loiseau, G., Zakhia, N. (2004). Fermented vegetables. Concise Encyclopedia Bioresource Technology. The Haworth press, USA. ISBN 1-56022-980-2. Ashok Pandey, Editor, 211-223.

- Mørkeberg, R., Carlsen, M. and Nielsen, J.** (1995). Induction and repression of α -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, 141, 2449-2454.
- Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut, I. and Raimbault, M.** (1998). *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1101-1109.
- Mosha, A.C. and Svanberg, U.** (1983). Preparation of weaning foods with high nutrient density using flour of germinated cereals. *Food and Nutrition Bulletin*, 5, 10-14.
- Mouquet, C., Bruyeron, O., Trèche, S.** (1998). Caractéristique d'une bonne farine infantile. *Bulletin du Réseau TPA* (Technologie et partenariat en agroalimentaire), n°15.
- Mouquet, C. and Trèche, S.** (2001). Viscosity of gruels for infants: a comparison of measurement procedures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 389-400.
- Mouquet, C., Salvignol, B., Van Hoan, N., Monvois, J., and Trèche, S.** (2003). Ability of a « very low-cost extruder » to produce instant infant flours at a small scale in Vietnam. *Food Chemistry*, 82, 249-255.
- Murphy, M.G., O'Connor, L., Walsh, D and Condon, S.** (1985). *Archives of Microbiology*, 141, p75.
- Murti, T.W., Bouillanne, C., Landon, L. and Desmazeaud, M.J.** (1992). Bacterial growth and volatile compounds in yoghurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* ssp. *Journal of Food Science*, 57, 153-157.
- Myer, R.O. and Froseth, J.A.** (1983). Extruded mixtures of beans (*Phaseolus Vulgaris*) and soybeans as protein sources in barley-based swine diets. *Journal of Animal Science*, 57, 296-306.
- Nakamura, L.K.** (1981). *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31, 56-63.
- NF 03-720.** (1971). Céréales et produits de mouture, détermination des cendres. *Association française de normalisation*.
- NF V03-050** (1975). Agricultural Food Products: General Directions for the Determination of Nitrogen by the Kjeldahl method. *Association française de normalisation*.
- NF XP V18-202** (1997). Aliments des animaux : dosage des inhibiteurs trypsiques. *Agence française de normalisation* (AFNOR).
- NF XP V 08-102** (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *Agence française de NORmalisation* (AFNOR).
- Nip, W. K., Chang, C. C., Chu, F. S. and Prentice, N.** (1975). Rate of ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology*, 30, 1048-1049.

Nout, M.J.R. (1993). Processed weaning foods for tropical climates. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 43, 213-221.

Nwankwo, D., Anadu, E. Usoro, R. (1989). Cassava-fermenting organisms. *MIRCEN Journal*, 5, 169-179.

Oboh, H. A., Muzquiz, M. (2000). Effect of soaking, cooking and germination on the oligosaccharide content of selected Nigerian legume seeds. *Plant Foods for Human Nutrition Dordrecht.*, 55(2): 97-110. {a} Area de Tecnologia de Alimentos, SGIT-INIA, 28080, Madrid, Spain.

Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., and Takano, M. (1995). Characterization of starch-hydrolysing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda" and its amylolytic enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 124-130.

Ordóñez, L. F. & Palencia, J. C. (1998). Efecto de diferentes temperaturas de tostado seco sobre la calidad nutricional del frijol de soya integral empleado en alimentación de pollos de engorde. Dans *Contrôle de qualité des graines de soja entières commerciales*. Edité par Ruiz, N. Technical Bulletin. American Soybean Association. Singapour. MITA (P) No. 070/10/2001.

Ory, R.L., Bog-Hansen, T.C. and Mod, R. R. (1981). Properties of hemagglutinins in rice and other cereal grains. In: *Antinutrients and natural toxicants in foods*. Edited by Ory R.L. Westport, CT, United State, Food and Nutrition Press.

Osella, C. A., Gordo, N. A., Gonzalez, R. J., Tosi, E. and Re, E. (1997). Soya bean heat-treated using a fluidised bed. *Lebensmittel Wisscheschaft und Technologie*, 30, 676-670.

Pedersen, B. and Eggum, B. O. (1983). The influence of milling on the nutritive value of flour from cereal grains. IV. Rice. Qual. Plant. *Plant Foods for Human Nutrition*, 33, 267-278.

Pedersen, H., Beyer, M. and Nielsen, J. (2000). Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiological Biotechnology*, 53, 272-277

Poola, I. (1989). Rice lectin: physicochemical and carbohydrate-binding properties. *Carbohydr. Polym*, 10, 281 -288.

Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F. and Erdman, J. W. Jr. (1998). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and one density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (Suppl), 1375S- 1379S.

Raimbault M., Pintado Valverde J. and Guyot J.P.. «Process to produce lactic acid flours and co-products». Brevet Européen, date de publication 5.05.2000, numéro de publication: FR2785294.

Rackis, J. J. (1976). Flatulence problems associated with soy products. In: *World Soybean Research*. Edited by Hill, L.D, p 892. Interstate Printers and Publishers, Danville, III.

- Rackis, J. J., Mc Ghee, J. E., Gumbmann, M. R. and Booth, A. N. (1979).** Effects of soya proteins containing trypsin inhibitors in longterm feeding studies in nuts. *Journal American Oil Chemists' Society*, 56, p162.
- Rambaud, P. (1995).** Besoins nutritionnels du nourrisson et de l'enfant-Energie, fer, protéines, acides gras essentiels, vitamine D, calcium. Consultation du Corpus Médical. *Pédiatre*.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A. and Eisenbraun, G. R. (1993)** Correlation between Chopin and AACC Methods of determining damaged starch. *Cereal Chemistry*, 70, 235-236.
- Rocheman, M. (1986).** Les aliments fermentés dérivés du soja. *Biofutur*, 34-42.
- Rodriguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, J. and Guyot, J.P. (2000).** Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3350-3356.
- Rodriguez-Sanoja, R. (2001).** Contribution à l'étude des relations structures fonction des α -amylases de lactobacilles. *Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II*.
- Roissart, H. et Luquet, F. M. (1994).** Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica*, Vol. I. 605 p.
- Roy, D., Dussault, F., Ward, P. (1990).** Growth requirements of *bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft*, 45, 500-502.
- Sagara, Y. (1988).** The rice surplus and new technology for rice processing in Japan. *Food and Fertilizer Technology Center for Asian and Pacific Region*, 273,1127.
- Sanchez, P. C., Laude, V.T., Yap, A. B., and Juliano B. O. (1989).** Effect of toasting and variety on "tapuy" quality. *Philippines. Agriculture*, 72, 225-230.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. and Mikami, B. (2000).** Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35, 711-715.
- Scardovi V. (1986).** Genus Bifidobacterium. Orla-Jensen 1924, 472^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1418-1434. Williams, Wilkins, Baltimore.
- Schleifer, K. H. (1986).** Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 999-1002. Williams, Wilkins, Baltimore.
- Scott, P. M., Fuleki, T. and Harwig, J. (1977).** Patulin content of juice and wine produced from Moldy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25 (2), 434-437.
- Serrano, X. and Villalbi, E. (1999).** The extrusion cooking process in piglet feeding. Nutritional implications. *Homatge al Dr. F. Puchal*. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelone, 188-197.
- Shelef, L. A., Bahnmler, K. R., Zemel, M. B. and Monte, L. M. (1988).** Fermentation of soymilk with commercial freeze-dried starter lactic cultures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12, 187-195.

- Sherman, J. M. (1937). The Streptococci. *Bacteriological Reviews*, 1, 3-97.
- Silvestroni, A., Connes, C., Sesma, F., Savoy de Giori, G. and Piard, J.C. (2002). Characterization of the melA locus for alpha-galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5464-5471.
- Simon, J. A., Fong, J., Bernert, J. T. and Browner, W. S. 1995. Serum fatty acids and the risk of stroke. *Stroke*. 26(5):778
- Slavin, J. (1991). Nutritional benefits of soy protein and soy fibre. *Perspectives in practice*, 91 (7), 816-819.
- Smith, A. K. and Circle, S. J. (1972). Soybeans: Chemistry and Technology, Vol. 1. *AVI Publishing*. Westport, Connecticut.
- Snauwaert, J., and Heremans, K. (1999). Pressure induced swelling kinetics of starch granules. In *Advances in high pressure bioscience and biotechnology*. Edited by Ludwig, H., 349- 352. Berlin: Springer Verlag.
- Stackebrandt, E., Fowler, V. J. and Woese, C. R. (1983). A phylogenetic analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 326-337.
- Stackebrandt, E. and Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 317-324.
- Steinkraus, K. H. (1983). Handbook of indigenous fermented foods. *New York, Marcel Dekker, Inc*, p 671.
- Stute, R., Klingler, R. W., Boguslawski, S., Eshtiaghi, M. N. and Knorr, D. (1996). Effects of high pressures treatment on starches. *Starch/Stärke*, 48, 399- 408.
- Sugimoto, H. and Van Buren, J. P. (1970). Removal of oligosaccharides from soymilk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*. *Journal of Food Science*. 35, 655.
- Sumitani, J. I., Tottori, T., Kawaguchi, T. and Arai M. (2000). New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp, 195 -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. *Biochemistry Journal*. 350, 477-484.
- Svanberg, U. (1987). Dietary bulk in weaning food. *Thèse, Cjalmers University of Technology*. Goteborg, Suède.
- Svanberg, U., Sjögren, E., Lorri, W. Svennerholm, A.-M. and Kaijser, B. (1992). Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented cereal gruels. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 601-606.
- Takasaki, Y., Furutani, S., Hayashi, S. and Imada, K. (1994). Acid-stable and thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(1), 94-96.

- Tani, T.** (1985). Rice processing industries in Japan. In : *FAO/UNDP Regional Workshop on Rice Processing Industries*. Jakarta, 15-20 July, p88-101. Bangkok FAO Regional Office for Asia and the Pacific.
- Teuber, M.** (1987). Genetisch veränderte mikroorganismen in lebensmitteln: Möglichkeiten und Grenzen. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber*, 39, 265-274.
- Thomason, D. M.** (1987). Review of processing systems for full- fat soy. In : *Full fat soya*. A regional Conference. American Soybean Association. Milan, Italie, 114-122.
- Thompson, J. et Gentry-Weeks, C. R.** (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : *Bactéries Lactiques*. Edité par Roissart, H. et Luquet, F.M, Vol 1, p239-290. Uriage, Lorica.
- Tomkins, A., Alnwick, D. and Haggerty, P.** (1988). Fermented foods for improving child feeding in Eastern and Southern Africa: a review en Improving young child feeding in Eastern and Southern Africa: household-level food technology. *Proceedings of a workshop held in Nairobi, Kenya*. 12-16 October 1987. Ottawa, International Development Research Center, 136-167.
- Tratnik, L. and Jadsic, B.** (1982). Production of fresh cheese and yoghurt from cow milk with added soymilk. *Mljekarstvo*, 32, 48-51.
- Trèche, S.** (1995). Techniques pour augmenter la densité énergétique des bouillies. In S.Trèche, B. de Benoist, D. Benbouzid, A. Verster, F. Delpeuch, *L'alimentation de complément du jeune enfant*, pp 123-146. Paris, ORSTOM.
- Trèche, S.** (1998). Les aliments de complément. Enjeux, contraintes et potentialité. Dans : *Dossier : les farines infantiles*. Bulletin du réseau Technologie et Partenariat en Agroalimentaire. No 15. <http://www.gret.org/tpa/bulletins/bulletin15/b15p4a7.htm>.
- Trèche, S.** (1999). Technique for increasing the energy density of gruel. In *Complementary feeding of young children in Africa and the Middle East*. Edité par Dop, M.C., Benbouzid, D., Trèche, S., de Benoist, B., Verster, A et Delpeuch, F, p101-119. WHO, Geneva.
- Trèche, S. and Mbome, I. L.** (1999). Viscosity, energy density and osmolality of gruels for infants prepared from locally produced commercial flours in some developing countries. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 117-125.
- Turner, R. H. and Liener, I. E.** (1975). The effects of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 284.
- Uchida, K.** (1988). Trends in preperation and uses of fermented and acid-hydrolysed soy sauce. Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in humain foods and animal feedstuffs. 2-7/10/1988, Singapore. *American Oil Chemists' Society*. Champaign, Illinois, United State, 78-83.
- UNICEF** (1997). The state of the world's children. *Oxford University Press*, 77, p2.
- USDA** (United States Department of Agriculture). (1999). Nutrient Database for Standard Reference. Release 13.

Van Soest, P.S. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*, 46, 829-835.

Van Veen, A. G., Graham, D. C. W. and Steinkraus, K. H. (1968). Fermented peanut presscake. *Cereal Science Today*, 13, 96-99.

Warriner, K. S. R., Morris, J. G. (1995). The effects of aeration on the bioreductive abilities of some heterofermentative lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 20, 323-327.

Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirao, T., Yoshizawa, T. and Arai, S. (1990a). Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent proteins. *Journal of Food Science*, 55, 781-783.

Watanabe, M., Yoshizawa, T., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Abe, K., Yanagesawa, T. and Arai, S. (1990b). Quality improvement and evaluation of hypoallergenic rice grains. *Journal of Food Science*, 55, 1105-1107.

Weaver, L.T. (1994). Feeding the weaning in the developing world: problems and solutions. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 45, 127-134.

WHO. (1990). Diet, Nutrition and the Prevention of chronic diseases. *Report of a WHO study group, technical report series No 797*. WHO, Geneva.

WHO/NUT. (1998). Complementary feeding of young children in developing countries: A review of current scientific knowledge. *Programme of nutrition, family and reproductive*. WHO, Geneva.

Wolff, I. A. (1982). Handbook of processing and utilization in agriculture. Volume II, Part I, Plant products. *CRC Press Inc.* Boca Raton, Florida.

Wong, W. W., Smith, E. O., Stuff, J. E., Hachey, D. L., Heird, W. C. and Pownell, H. J. (1998). Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68 (Suppl), 1385S-1389S.

Wu Leung, W.T., Butrum, R.R., Chang, F.H., Rao, M.N. and Polacchi, W. (1972). Food composition tables for use in East Asia. *Rome, FAO/Bethesda, Maryland, USA*. United States Department of Health, Education and Welfare.

Yin, Y. L., Zhong, H. Y., Huang, R. L. and Cheng, X. S. (1993). Effects of autoclaving on urease activity, trypsin inhibitors and ileal digestibility of crude protein in jack bean, field bean, and soybean for growing - finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 71 (2), 65-75.

Yoshizawa, K. and Kishi, S. (1985). Rice in brewing. In: *Rice chemistry and technology*. Edited by Juliano, B.O. 2nd editions, p619-645. Saint Paul, MN, United State. American Association of Cereal Chemists.