

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Sciences des aliments

Formation doctorale : Sciences des Aliments

Ecole doctorale : Science et Procédé Biologiques et Industriels

présentée et soutenue publiquement

par

Isabelle Lestienne

le 16 Décembre 2004

Titre :

Contribution à l'étude de la biodisponibilité du fer et du zinc
dans le grain de mil et conditions d'amélioration
dans les aliments de complément

JURY

M. BESANÇON Pierre	Université Montpellier II	Président du jury
M. CAPORICCIO Bertrand	Université Montpellier II	Co-directeur de Thèse
M. GRONGNET Jean-François	Agrocampus Rennes	Rapporteur
Mme LULLIEN-PELLERIN Valérie	INRA Montpellier	Examineur
M. TRECHE Serge	IRD Montpellier	Directeur de Thèse
M. VAN CAMP John	Université de Gent	Rapporteur

Remerciements

Avant tout, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M. Serge TRECHE pour m'avoir, au cours de cette thèse mais également des deux années précédentes, accueillie au sein de son laboratoire et fait l'honneur de m'encadrer au cours de ma formation. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, ses précieux conseils et, également, pour l'incroyable rigueur scientifique qu'il a su me faire partager.

La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce à M. Pierre BESANÇON, M. Guy Moulin et M. Jean-Marie NAVARRO (Université Montpellier II) qui m'ont permis de réaliser, au sein de leur école doctorale, une thèse sur un sujet qui me tenait particulièrement à coeur.

Je remercie M. Bertrand CAPORICCIO (Université Montpellier II) pour avoir bien voulu participer à l'encadrement de cette thèse, en regrettant que nous n'ayons pas disposé du temps suffisant pour développer les approches cellulaires tel que nous l'avions initialement prévu.

Je suis très reconnaissante à M. Jean-François GRONGNET (Agrocampus Rennes) et M. John VAN CAMP (Université de Gent, Belgique) d'avoir bien voulu accepter d'être rapporteurs de cette thèse.

Je voudrais remercier M. Joël ABECASSIS et Mme Valérie LULLIEN-PELLERIN (INRA, Centre de Montpellier) d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et de m'avoir fait profiter de leur expérience précieuse en Technologie des céréales et accompagnée au cours de mes expériences dans ce domaine.

Je tiens à exprimer mes très vifs remerciements à M Jean-Pierre GUYOT (IRD, Centre de Montpellier) pour ses conseils judicieux et tout le soutien qu'il m'a apporté. Un grand merci pour avoir permis à mes travaux de s'insérer au projet Cerefer avec toutes les occasions de collaborations et d'échanges que cela a engendré.

Un grand merci à l'ensemble du personnel de l'UR 106 :

- M. Francis DELPEUCH pour m'avoir accueillie au sein de son unité,
- Mme Christèle ICARD-VERNIERE pour avoir fait partie de mon comité de thèse,
- Mme Claire MOUQUET-RIVIER et Melle Sylvie AVALONNE pour leurs nombreux conseils et leur sympathie,
- Mme Isabelle ROCHETTE pour son aide généreuse
- et un merci tout particulier à M. Christian PICQ pour son aide, son amitié, bien sûr, mais aussi pour m'avoir permis d'avoir le sourire au cours de toutes ces journées passées à la paillasse (sauf les lundis...).

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, que ce soit par leur participation active, leurs conseils, leur sympathie ou leur bonne humeur : Marie, Aracelli, Hassane, Mourad, Andréina, Nana, Hoan, Thuy, Tahirou, Séverine...

J'adresse ma sincère gratitude à M. Michel NICOLE, Melle Christèle MARTINEZ, M Jean-Claude BACCOU et aussi M. Philippe MARMEY pour m'avoir encadrée pendant un an et pour avoir fait preuve d'autant de compréhension et d'humanité. Un grand merci à vous.

Avec tout mon cœur, je dédie cette thèse à mon amour, Arnaud, qui aura su faire preuve de toute la patience nécessaire et qui n'aura eu de cesse de me soutenir et de me prodiguer son aide.

Mais bien sûr, cette thèse n'aurait pas pu s'écrire sans le soutien de ma famille qui m'a toujours épaulée et encouragée à continuer. Merci de tout cœur.

A mes amis :

Un grand merci à Vincent, Johann, Xavier & Christine, Lolo, Yannick & Claudie, Aymeric, Gilles, Walter, Ben, Greg, Patrice... pour votre soutien et pour avoir su me faire retrouver le sourire au cours de toutes ces années où tout n'a pas toujours été facile.

Merci également d'avoir compris mes absences...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I : <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	5
1. LE MIL : IMPORTANCE ALIMENTAIRE, CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET NUTRITIONNELLES, TRANSFORMATIONS TECHNOLOGIQUES	6
1.1. Production et importance alimentaire.....	6
1.2. Les différents types de mil	7
1.3. Caractéristiques morphologiques	8
1.3.1. <i>Aspects généraux concernant la structure des grains de céréales</i>	<i>8</i>
1.3.2. <i>Structure du grain de mil</i>	<i>9</i>
1.4. Composition biochimique et valeur nutritionnelle.....	10
1.4.1. <i>Composition des grains de céréales.....</i>	<i>10</i>
1.4.2. <i>Glucides</i>	<i>11</i>
1.4.2.1. Les sucres solubles	11
1.4.2.2. L'amidon	11
1.4.3. <i>Protéines</i>	<i>12</i>
1.4.3.1. Teneur en protéines	12
1.4.3.2. Fractions protéiques	12
1.4.3.3. Composition en acides aminés	13
1.4.3.4. Utilisation digestive et métabolique	14
1.4.4. <i>Lipides.....</i>	<i>14</i>
1.4.5. <i>Fibres</i>	<i>15</i>
1.4.6. <i>Minéraux</i>	<i>15</i>
1.4.7. <i>Vitamines.....</i>	<i>16</i>
1.4.8. <i>Facteurs antinutritionnels.....</i>	<i>17</i>
1.4.8.1. Les phytates.....	18
1.4.8.2. Les polyphénols.....	18
1.4.8.3. Les inhibiteurs d'enzymes digestives	19
1.5. Répartition des composés biochimiques dans les différentes structures du grain de mil	19
1.6. Procédés utilisés pour la transformation du mil en Afrique sahélienne	20
1.6.1. <i>Fractionnement et fragmentation.....</i>	<i>21</i>
1.6.1.1. Décorticage.....	21
1.6.1.2. Broyage	22
1.6.1.3. Formes de consommation.....	23
1.6.2. <i>Maltage</i>	<i>24</i>
1.6.2.1. Description du mode de préparation du malt.....	24
1.6.2.2. Utilisation des farines maltées	24
1.6.3. <i>Fermentation</i>	<i>25</i>
1.6.3.1. Utilisation en boulangerie.....	25
1.6.3.2. Utilisation en brasserie	25
1.6.3.3. Préparation de bouillies fermentées.....	26
2. LE FER ET LE ZINC DANS L'ALIMENTATION DU JEUNE ENFANT.....	27
2.1. Importance métabolique.....	27
2.1.1. <i>Fonctions dans l'organisme</i>	<i>27</i>
2.1.1.1. Le fer	27
2.1.1.2. Le zinc.....	28
2.1.2. <i>Conséquences des carences</i>	<i>28</i>
2.1.2.1. En fer.....	28
2.1.2.2. En zinc.....	29
2.1.3. <i>Métabolisme</i>	<i>30</i>
2.1.3.1. Le fer	30
2.1.3.2. Le zinc.....	31

2.2.	Biodisponibilité	32
2.2.1.	<i>Définition</i>	32
2.2.2.	<i>Méthodes d'évaluation</i>	33
2.2.2.1.	Méthodes in vivo	33
2.2.2.2.	Méthodes in vitro	34
2.2.2.3.	Estimations indirectes	35
2.3.	Situation pour le jeune enfant dans les pays du sud	37
2.3.1.	<i>Besoins nutritionnels du jeune enfant et apports recommandés</i>	37
2.3.1.1.	En fer	37
2.3.1.2.	En zinc	38
2.3.2.	<i>Prévalences des déficiences en fer et en zinc</i>	38
2.4.	Stratégies possibles d'augmentation des apports en fer et en zinc biodisponibles	39
2.4.1.	<i>Approche non alimentaire : la supplémentation</i>	40
2.4.2.	<i>Approches alimentaires</i>	40
2.4.2.1.	Enrichissement	40
2.4.2.2.	Bio-fortification	41
2.4.2.3.	Diversification	41
2.4.2.4.	Amélioration des procédés technologiques utilisés pour la transformation des aliments	42
3.	CAUSES ET MODALITÉS D'AMÉLIORATION DE LA FAIBLE BIODISPONIBILITÉ DU FER ET DU ZINC DANS LES ALIMENTS À BASE DE CÉRÉALES ET DE LÉGUMINEUSES.....	43
3.1.	Facteurs diminuant la biodisponibilité des minéraux.....	43
3.1.1.	<i>Les phytates</i>	43
3.1.1.1.	Généralités	43
3.1.1.2.	Activités anti-nutritionnelles	44
3.1.1.3.	Mécanismes de réduction des teneurs en phytates	46
3.1.2.	<i>Les composés phénoliques</i>	49
3.1.2.1.	Structure et classification	49
3.1.2.2.	Activités anti-nutritionnelles	52
3.1.3.	<i>Les fibres</i>	53
3.1.3.1.	Définition et classification	53
3.1.3.2.	Activités anti-nutritionnelles	55
3.1.4.	<i>Autres facteurs</i>	57
3.1.4.1.	Les protéines	57
3.1.4.2.	Les interactions entre minéraux	57
3.2.	Facteurs améliorant la biodisponibilité des minéraux.....	58
3.2.1.	<i>L'acide ascorbique.....</i>	58
3.2.2.	<i>Les autres acides organiques</i>	58
3.2.3.	<i>Les protéines animales.....</i>	59
3.2.4.	<i>Les sucres.....</i>	59
3.3.	Effets des procédés technologiques sur les teneurs en facteurs antinutritionnels et la biodisponibilité des minéraux	60
3.3.1.	<i>Les procédés mécaniques</i>	60
3.3.2.	<i>Les procédés thermiques</i>	60
3.3.2.1.	La cuisson.....	61
3.3.2.2.	La cuisson à haute pression	63
3.3.3.	<i>Les procédés chimiques.....</i>	64
3.3.3.1.	Oxydo-réduction.....	64
3.3.3.2.	Modification du pH	65
3.3.3.3.	Ajout d'enzymes.....	65
3.3.3.4.	Autres traitements chimiques	66
3.3.4.	<i>Les procédés biologiques</i>	66
3.3.4.1.	Le trempage.....	66
3.3.4.2.	La germination	68
3.3.4.3.	La fermentation	71

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	75
1. MATERIELS	76
1.1. Grains bruts de céréales et de légumineuses	76
1.1.1. <i>Céréales et légumineuses</i>	76
1.1.2. <i>Variétés de mil du Burkina Faso</i>	76
1.2. Modes de préparation des grains décortiqués	77
1.2.1. <i>Préparation des grains de mil et de soja décortiqués</i>	77
1.2.2. <i>Préparation des grains de mil décortiqués à différents taux d'extraction</i>	77
1.3. Echantillons de grains de mil et de bouillie fermentée prélevés dans les ateliers de production à Ouagadougou (Burkina Faso)	78
2. PROTOCOLES D'ETUDES	78
2.1. Etude des effets des procédés utilisables pour la préparation d'aliments de complément (chapitre III-1 et 2)	78
2.1.1. <i>Modalités de trempage</i>	79
2.1.1.1. <i>Trempage des grains entiers ou décortiqués</i>	79
2.1.1.2. <i>Trempage des farines</i>	79
2.1.2. <i>Cuisson des farines de mil et de soja trempées</i>	80
2.2. Etude des effets des modes de préparation traditionnels des bouillies de mil fermentées (chapitre IV-1 et 2)	80
2.3. Etude de la répartition des nutriments et des facteurs antinutritionnels dans le grain de mil (chapitre V-1)	81
2.4. Etude de la contribution relative des différents facteurs antinutritionnels dans le grain de mil (chapitre V-2)	81
2.4.1. <i>Préparation des échantillons</i>	81
2.4.1.1. <i>Echantillons de farine de mil à teneurs variables en phytates</i>	82
2.4.1.2. <i>Fractions à teneurs minimales et maximales en phytates, en fibres et en tanins</i>	82
2.4.2. <i>Evaluation de la contribution relative des différents FAN</i>	83
3. METHODES ANALYTIQUES	83
3.1. Dosages des nutriments	83
3.1.1. <i>Protéines totales</i>	83
3.1.2. <i>Lipides</i>	84
3.1.3. <i>Amidon</i>	84
3.1.4. <i>Minéraux</i>	84
3.2. Dosages des facteurs antinutritionnels	84
3.2.1. <i>Fibres</i>	84
3.2.1.1. <i>Fibres totales</i>	84
3.2.1.2. <i>Fibres insolubles ADF et NDF</i>	84
3.2.2. <i>Tanins</i>	85
3.2.3. <i>Phytates</i>	85
3.2.3.1. <i>Par chromatographie ionique</i>	85
3.2.3.2. <i>Par colorimétrie</i>	85
3.3. Evaluation de l'activité phytasique	86
3.4. Evaluation de la digestibilité <i>in vitro</i> du fer et du zinc	86
3.4.1. <i>Préparation des solutions de pepsine et de pancréatine / extrait de bile</i>	86
3.4.2. <i>Digestion gastrique</i>	86
3.4.3. <i>Digestion intestinale</i>	87
3.4.4. <i>Dosage des minéraux digestibles</i>	87
4. ANALYSES STATISTIQUES	87

CHAPITRE III : <u>EFFETS DE PROCÉDÉS UTILISABLES POUR LA PRÉPARATION D'ALIMENTS DE COMPLÉMENT SUR LES TENEURS EN PHYTATES, FER ET ZINC</u>	88
INTRODUCTION	89
III-1 EFFET DU TREMPAGE SUR LES TENEURS EN PHYTATES, FER ET ZINC DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE CÉRÉALES ET DE LÉGUMINEUSES	90
Lestienne I., Icard-Vernière C., Mouquet C., Picq C., Trèche S. (2005). Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. <i>Food chemistry</i> 89, 421-425	92
III-2 EFFET DU TREMPAGE DE GRAINS ENTIERS OU DÉCORTIQUÉS ET DE FARINES DE MIL ET DE SOJA SUR LA DÉGRADATION DES PHYTATES ET SUR LES RAPPORTS MOLAIRES PHY/FE ET DE PHY/ZN	97
Lestienne I., Mouquet C., Icard-Vernière C., Rochette I. et Trèche S. The effects of soaking of whole, dehulled and ground millet and soybean seeds on phytate egradation and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios. <i>Article accepté le 29/06/2004 par International Journal of Food Science and Technology</i>	99
CHAPITRE IV : <u>EFFETS DES MODES DE PRÉPARATION TRADITIONNELS DES BOUILLIES DE MIL FERMENTÉES SUR LES TENEURS EN FAN ET LES BIODISPONIBILITÉS IN VITRO DU FER ET DU ZINC</u>	112
INTRODUCTION	113
IV-1 VARIABILITÉ DE LA QUALITE NUTRITIONNELLE DES BOUILLIES DE MIL FERMENTEES PRODUITES À OUAGADOUGOU (BURKINA FASO)	115
IV-2 VARIATIONS DES TENEURS EN FACTEURS ANTINUTRITIONNELS ET DES DIGESTIBILITÉS IN VITRO DU FER ET DU ZINC PENDANT LA TRANSFORMATION TRADITIONNELLE DU MIL EN BOUILLIE FERMENTÉE	124
CHAPITRE V : <u>FACTEURS LIMITANT LA BIODISPONIBILITE IN VITRO DU FER ET DU ZINC DANS LE GRAIN DE MIL</u>	138
INTRODUCTION	139
V-1 RÉPARTITION DES NUTRIMENTS ET DES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS DANS LE GRAIN DE MIL	140
Lestienne I., Buisson M., Lullien-Pellerin V., Picq C. et Trèche S. Losses of nutrients and anti-nutritional factors during abrasive decortication of two pearl millet cultivars (<i>Pennisetum glaucum</i>). <i>Article soumis le 12/08/2004 au Journal of Cereal Science</i>	142
V-2 CONTRIBUTION RELATIVE DES DIFFÉRENTS FAN A LA FAIBLE BIODISPONIBILITÉ IN VITRO DU FER ET DU ZINC DANS LE GRAIN DE MIL	155
Lestienne I., Besançon P., Caporiccio B., Lullien-Pellerin V. et Trèche S. Iron and zinc <i>in vitro</i> digestibility in pearl millet flours (<i>Pennisetum glaucum</i>) with various phytate, tannin and fiber contents. <i>Article soumis en novembre 2004 au Journal of Agriculture and Food Chemistry</i>	157
Lestienne I., Caporiccio B., Besançon P., Rochette I. et Trèche S. Contribution relative des phytates, des fibres et des tanins à la faible solubilité in vitro du fer et du zinc de la farine de mil (<i>Pennisetum glaucum</i>). <i>Projet d'article à soumettre à Journal of Agriculture and Food Chemistry</i>	173
CHAPITRE VI : <u>DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES</u>	188
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
ANNEXES	224

Liste des figures

Chapitre I

- Figure I-1.** Contributions des principales céréales à la production céréalière totale en 2003 dans les pays d’Afrique sahélienne7
- Figure I-2.** Structure générale des grains de céréales9
- Figure I-3.** Schéma d’une coupe longitudinale de grain de mil10
- Figure I-4.** Diagramme des procédés traditionnels utilisables pour la fabrication de farine de mil21
- Figure I-5.** Diagramme général de préparation de farine de céréales germées à Ouagadougou24
- Figure I-6.** Diagramme de préparation des bouillies de mil fermentées « *ben-kida* » et « *ben-saalga* » à Ouagadougou27
- Figure I-7.** Structure de l’acide phytique, myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis phosphate, à pH neutre d’après le modèle de Anderson (à gauche) et d’un sel d’acide phytique (à droite)43
- Figure I-8.** Comparaison des voies d’hydrolyse des phytates par les phytases de céréales et les phytases microbiennes47
- Figure I-9.** Structure de l’acide hydroxycinnamique49
- Figure I-10.** Structure de base des flavonoïdes50
- Figure I-11.** Classification et structure des différents flavonoïdes alimentaires50
- Figure I-12.** Structure d’un tanin condensé51
- Figure I-13.** Structure de l’acide gallique51

Chapitre II

- Figure II-1.** Teneurs en phytates, tanins et fibres totales des variétés de mil77
- Figure II-2.** Evolution du pH au cours des trempages des farines de mil et de soja80
- Figure II-3.** Diagramme de préparation des échantillons81
- Figure II-4.** Traitements enzymatiques réalisés sur les résidus insolubles de digestion *in vitro* d’un même échantillon83

Chapitre III

Figure III-2-1. Schema of the various treatments applied to millet grains and soybean seeds101

Figure III-2-2. Effects of soaking and cooking of millet and soybean flours on inositol changes105

Chapitre IV

Figure IV-1. Distributions de fréquences du pH et de la teneur en matière sèche des échantillons de bouillie116

Figure IV-2. Distributions de fréquences des teneurs en protéines et en lipides des 48 échantillons de bouillie117

Figure IV-3. Distributions de fréquences des teneurs en fer et en zinc des 48 échantillons de bouillie118

Figure IV-4. Distributions de fréquences des teneurs en facteurs anti-nutritionnels (fibres, phytates et tanins) des 48 échantillons de bouillie119

Figure IV-5. Distributions de fréquences des rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn des 48 échantillons de bouillie120

Figure IV-6. Rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn des grains bruts et des bouillies fermentées dans les quatorze ateliers sélectionnés133

Figure IV-7. Variation de la digestibilité *in vitro* du fer des grains de mil prélevés dans les quatorze ateliers en fonction de leur teneur en fer total134

Figure IV-8. Variations de la digestibilité *in vitro* du zinc des bouillies de mil fermentées prélevées dans les quatorze ateliers en fonction de leurs teneurs en phytates et en zinc total et du pH de la bouillie135

Figure IV-9. Variations de la digestibilité *in vitro* du fer des bouillies de mil fermentées prélevées dans les quatorze ateliers en fonction de leurs teneurs en fer total, hémicelluloses, fibres ADF et du pH de la bouillie136

Chapitre V

Figure V-1-1. Changes in starch loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars147

Figure V-1-2. Changes in lipid (A) and protein (B) loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars148

Figure V-1-3. Changes in iron and zinc loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars	149
Figure V-1-4. Changes in ADF fibre (A) and tannin (B) loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars	150
Figure V-1-5. Changes in phytate (IP6) (A) and phytase activity (B) loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars	151
Figure V-2-1. Sample preparation and nomenclature	159
Figure V-2-2. Phytate and iron binding phenolic compound contents (g/100g DM) of whole pearl millet flours with decreased phytate content	162
Figure V-2-3. Phytate and iron binding phenolic compound contents (g/100g DM) of pearl millet grain fractions	163
Figure V-2-4. Fiber contents (g/100g DM) of pearl millet grain fractions	163
Figure V-2b-1. Protocole expérimental	177
Figure V-2b-2. Solubilité du fer non-digestible des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates après traitement des résidus insolubles de digestion	178
Figure V-2b-3. Solubilité du fer non-digestible des fractions de mil à teneurs faibles (DGF) et fortes (PPF) en fibres et en tanins après traitement des résidus insolubles de digestion	180
Figure V-2b-4. Solubilité du fer non-digestible des fractions de mil déphytinisées après traitement des résidus insolubles de digestion	181
Figure V-2b-5. Solubilité du zinc non-digestible des échantillons de farine de mil après traitement des résidus insolubles de digestion	182
Figure V-2b-6. Solubilité du zinc non-digestible des fractions de mil à teneurs faibles (DGF) et fortes (PPF) en fibres et en tanins après traitement des résidus insolubles de digestion	184
Figure V-2b-7. Solubilité du zinc non-digestible des fractions de mil déphytinisées après traitement des résidus insolubles de digestion	185

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I-1. Importance de la production et de la consommation humaine de mil dans les pays d'Afrique sahélienne en 2001	6
Tableau I-2. Dimensions et masse pour 1000 grains des principales céréales	8
Tableau I-3. Composition de diverses graines végétales (g/100g MS)	11
Tableau I-4. Fractions protéiques (selon la classification d'Osborne) des principales céréales	13
Tableau I-5. Teneurs en quelques acides aminés des protéines des principales espèces de céréales	14
Tableau I-6. Composition minérale des principales espèces de céréales	16
Tableau I-7. Composition en vitamines des principales espèces de céréales	17
Tableau I-8. Teneurs en phytates et en polyphénols des principales espèces de céréales	17
Tableau I-9. Composition biochimique des différentes structures du grain de mil	20
Tableau I-10. Teneurs en riboflavine, thiamine, niacine et phytates des différentes structures du grain de mil	20
Tableau I-11. Besoins et apports recommandés en fer en fonction de sa biodisponibilité dans le régime pour les enfants de 6 à 36 mois	37
Tableau I-12. Besoins et apports recommandés en zinc en fonction de sa biodisponibilité dans le régime pour les enfants de 6 à 36 mois	38
Tableau I-13. Conditions optimales de température et de pH des phytases de différentes espèces de céréales et de légumineuses	47
Tableau I-14. Conditions optimales de température et de pH des phytases de différents microorganismes	48
Tableau I-15. Tableau récapitulatif des principaux types de fibres présents dans les aliments d'origine végétale	55
Tableau I-16. Effets de la cuisson en milieu aqueux sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses	61

Tableau I-17. Effets de la cuisson en milieu aqueux sur les teneurs en composés phénoliques et/ou fibres de grains de céréales et de légumineuses	62
Tableau I-18. Effets du trempage sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses	67
Tableau I-19. Effets du trempage sur les teneurs en polyphénols totaux et/ou tanins de grains de céréales et de légumineuses	68
Tableau I-20. Effets de la germination sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses	69
Tableau I-21. Effets de la germination sur les teneurs en polyphénols totaux et/ou tanins de grains de céréales et de légumineuses	70
Tableau I-22. Effets de la fermentation sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses	72
Tableau I-23. Effets de la fermentation sur les teneurs en polyphénols totaux et/ou tanins de grains de céréales et de légumineuses	73

Chapitre II

Tableau II-1. Compositions globales des grains de céréales et de légumineuses	76
Tableau II-2. Capacités d'absorption des différentes espèces de céréales et de légumineuses au cours d'un trempage de 24 h à 30°C	79

Chapitre III

Tableau III-1-1. Changes in iron and zinc contents (mg/100g dry matter) after soaking whole seeds for 24 h	94
Tableau III-1-2. Changes in phytate content (mg/100g dry matter) after soaking whole seeds for 24 h	94
Tableau III-1-3. Influence of soaking whole seeds for 24 h on Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios	95
Tableau III-2-1. Amounts of dry matter (g) found in soaking media after soaking of millet and soybean whole seeds, dehulled seeds and flours	103
Tableau III-2-2. Effects of soaking of millet whole seeds, dehulled seeds and flour on leaching of phytates and phytases and on phytate degradation	104

Tableau III-2-3. Effects of soaking of soybean whole seeds, dehulled seeds and flour on leaching of phytates and phytases and on phytate degradation106

Tableau III-2-4. Effects of soaking of millet and soybean whole seeds, dehulled seeds and flours on leaching of iron and zinc and the Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios108

Chapitre IV

Tableau IV-1. Effet de la saison, de la nature de la bouillie et de son pH sur les caractéristiques des bouillies fermentées121

Tableau IV-2. Teneurs en fibres ADF et en hémicelluloses dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers126

Tableau IV-3. Teneurs en phytates et en tanins dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers127

Tableau IV-4. Teneurs en fer et en zinc total dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers129

Tableau IV-5. Digestibilités *in vitro* du fer et du zinc dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers131

Chapitre V

Tableau V-1-1. Nutrient and anti-nutritional factor contents in whole grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars and calculated proportion removed after decortication to 12% of extraction146

Tableau V-2-1. Total and digestible iron contents (mg/100g DM), iron digestibility (%) and Phy/Fe molar ratios of whole pearl millet flours with decreased phytate content164

Tableau V-2-2. Total and digestible zinc contents (mg/100g DM), zinc digestibility (%) and Phy/Zn molar ratios of whole pearl millet flours with decreased phytate content166

Tableau V-2-3. Total and digestible iron contents (mg/100g DM), iron digestibility (%) and Phy/Fe molar ratios of pearl millet grain fractions167

Tableau V-2-4. Total and digestible zinc contents (mg/100g DM), zinc digestibility (%) and Phy/Zn molar ratios of pearl millet grain fractions168

Tableau V-2b-1. Teneurs en phytates, tanins et fibres (ADF et NDF) des échantillons (g/100g DM)175

Tableau V-2b-2. Solubilité du fer (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates179

Tableau V-2b-3. Solubilité du fer (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des fractions de mil non-déphytinisées et déphytinisées181

Tableau V-2b-4. Solubilité du zinc (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates183

Tableau V-2b-5. Solubilité du zinc (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des fractions de mil non-déphytinisées et déphytinisées186

Liste des abréviations

ADF	Acid Detergent Fiber
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR	Association Française de NORmalisation
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
DP	Degré de Polymérisation
EDTA	EthylèneDiamineTetraAcétate
ET	Ecart-Type
FAN	Facteur AntiNutritionnel
FAO	Food and Agriculture Organization
FNB	Food and Nutrition Board
IFPRI	International Food Policy Research Institute
INERA	Institut National pour l'Etude et la Recherche Agronomiques
IOM	Institute Of Medicine
IP5, IP4...	<i>Myo</i> -Inositol 5-Phosphates, <i>Myo</i> -Inositol 4-Phosphates...
IP6	<i>Myo</i> -Inositol 6-Phosphates
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
J	Jour
MS	Matière Sèche
MT	Millions de Tonnes
N	Normal
NADPH	Nicotinamide-Adénine Dinucléotide Phosphate
NDF	Neutral Detergent Fiber
Phy/Fe	Rapport molaire phytate / fer
Phy/Zn	Rapport molaire phytate / zinc
PNB	Produit National Brut
rpm	Rotations par minute
UMR	Unité Mixte de Recherche
UNU	Université des Nations Unies
UR	Unité de Recherche
URSS	Union des Républiques Socialistes Soviétiques
WHO, OMS	World Health Organisation, Organisation mondiale de la santé

Introduction Générale

Introduction générale

Une large proportion de la population mondiale, vivant principalement dans les pays du sud, n'a pas accès à une alimentation équilibrée. En effet, les régimes de nombreuses populations sont principalement constitués de produits d'origine végétale et reposent souvent, dans les pays où les conditions de culture sont difficiles, sur la transformation et la consommation d'une espèce amylacée majoritaire (céréale, racine ou tubercule) (Ruel et Levin, 2000). Ce manque de diversité alimentaire (et parfois également de quantité) peut conduire à des carences en micronutriments, notamment pour les groupes de populations vulnérables comme les jeunes enfants, les adolescents ou les femmes enceintes ou allaitantes (Kennedy *et al.*, 2003 ; Ruel et Arimond, 2003).

La période à laquelle les jeunes enfants passent d'une alimentation au sein exclusive à la consommation des plats familiaux est particulièrement à risque en ce qui concerne l'apparition de carences en raison des besoins nutritionnels élevés de l'organisme entre 6 et 24 mois (WHO, 1998). La couverture des besoins en minéraux, tels que le fer et le zinc, est particulièrement importante à cette période de la vie en raison des conséquences irréversibles que peuvent entraîner les carences sur le développement de l'enfant (Sandstead, 2000 ; FAO/WHO, 2002a,b). Il faut donc, au cours de cette période, que les aliments donnés à l'enfant en complément du lait maternel apportent non seulement des quantités de micronutriments suffisantes, mais aussi que ceux-ci soient assimilables par l'organisme. En effet, pour être utilisé par l'organisme, un nutriment doit d'abord être absorbé au niveau de l'intestin, ce qui implique que ce nutriment doit se trouver, au cours de la digestion, sous une forme lui permettant d'être assimilé par les entérocytes constitutifs de la bordure en brosse de l'intestin grêle (Watzke, 1998). Il s'agit de la notion de biodisponibilité.

La biodisponibilité d'un nutriment dépend à la fois de facteurs intrinsèques à l'alimentation et de facteurs physiologiques propres à chaque individu (Benito et Miller, 1998 ; Camara et Amaro, 2003). En ce qui concerne le fer et le zinc, les facteurs qui vont limiter cette biodisponibilité sont nombreux, notamment chez les individus consommant des régimes à base de céréales et de légumineuses. En effet, ces produits sont riches en facteurs anti-nutritionnels (i.e. phytates, tanins, certaines fibres) formant des complexes insolubles avec les minéraux qui sont généralement stables au cours de la digestion et donc non absorbables (House, 1999).

La carence en fer est reconnue en tant que problème de santé publique depuis plusieurs décennies, tandis que la carence en zinc fait l'objet d'une attention particulière depuis les quinze dernières années (Kennedy *et al.*, 2003). De nombreux travaux ont donc déjà été réalisés afin de définir des stratégies de lutte contre ces carences. L'une de ces stratégies, adaptée aux régimes peu diversifiés et riches en céréales et légumineuses, repose sur l'augmentation des teneurs en minéraux biodisponibles grâce à la réduction des teneurs en facteurs anti-nutritionnels (FAN). Certains procédés technologiques, y compris des procédés simples traditionnellement utilisés en Afrique, permettent de réduire les teneurs en facteurs anti-nutritionnels et sont réputés pour améliorer la biodisponibilité du fer et du zinc dans les aliments préparés. Parmi les procédés traditionnels, les procédés biologiques, tels que la

germination ou la fermentation, sont les plus efficaces pour réduire les teneurs en facteurs anti-nutritionnels (Gibson et Fergusson, 2001) et le trempage, souvent utilisé en tant qu'étape préliminaire à ces procédés, peut entraîner un début de réduction des teneurs en FAN et notamment en phytates (Fredlund *et al.*, 1997 ; Duhan *et al.*, 2002).

Dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie, et particulièrement dans les pays d'Afrique sahélienne, le mil, du fait de sa capacité à résister à la sécheresse de ces régions, représente une des principales sources d'apport nutritionnel, tant sur les plans protéique ou vitaminique que minéral (FAO, 2004). Bien que le mil soit parfois qualifié de « culture du pauvre » (FAO, 1995), il fait l'objet d'un fort attachement culturel et traditionnel de la part des populations des pays dans lesquels il constitue la principale culture vivrière. Ainsi, au Nigeria et au Burkina Faso les disponibilités annuelles moyennes par habitant atteignaient respectivement 36 et 70 kg en 2002 (FAO, 2004). Le mil entre dans la composition de nombreux plats de base, dont des bouillies et des plats familiaux qui peuvent être consommées en tant qu'aliment de complément par les jeunes enfants, pour qui le mil représente souvent une source importante de fer et de zinc (Avallone *et al.*, 2003). Toutefois, du fait des faibles biodisponibilités de ces minéraux dans la farine de mil, les enfants consommant des bouillies à base de mil, comme principal source énergétique en plus du lait maternel, présentent des risques de carence importants ; d'autant plus que les facteurs anti-nutritionnels présents dans les aliments de complément peuvent réduire la biodisponibilité des minéraux du lait maternel.

Pour ces différentes raisons, le mil a été choisi comme principal sujet d'étude d'un projet européen sur l'amélioration de la qualité nutritionnelle des produits traditionnels à base de céréales fermentées (projet « Cerefer »), mené en collaboration avec l'université de Ouagadougou (Burkina Faso), et dans lequel s'insère ce travail de thèse.

La biodisponibilité des minéraux, et en particulier du fer et du zinc, fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années. Cependant, ces études, bien qu'apportant de nombreuses connaissances, soit, ne prennent pas en compte la complexité de la matrice alimentaire, soit ne sont pas adaptées au contexte des aliments de complément pour les jeunes enfants, soit ne sont pas extrapolables au contexte des pays du sud dans lesquels les céréales et les légumineuses constituent l'essentiel du régime.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les possibilités d'améliorer la biodisponibilité du fer et du zinc dans les aliments de complément préparés à base de céréales et de légumineuses en Afrique.

La présentation de ce travail est divisée en 5 chapitres :

- Le chapitre I est une introduction bibliographique dont les objectifs sont de décrire le mil, céréale encore peu connue, ainsi que ses produits dérivés, de rappeler l'importance du fer et du zinc dans l'alimentation du jeune enfant, notamment dans un contexte à haut risque de carence, et enfin de détailler les causes et les modalités d'amélioration de la faible biodisponibilité du fer et du zinc dans les aliments à base de céréales et de légumineuses.
- Le chapitre II résume les matériels, protocoles d'études et méthodes analytiques utilisés dans le cadre de ce travail.

- Le chapitre III a pour objectif d'estimer, au travers d'essais en laboratoire, les potentialités du trempage, appliqué seul ou en combinaison avec d'autres procédés technologiques simples au cours de la préparation d'aliments de complément, à améliorer la biodisponibilité du fer et du zinc grâce à la réduction des teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses.
- Le but du chapitre IV est d'évaluer les effets des modes de préparation traditionnels de bouillies fermentées sur les teneurs en facteurs anti-nutritionnels et la biodisponibilité *in vitro* du fer et du zinc. Pour cela, nous avons travaillé sur des échantillons de grains de mil et de bouillie de mil fermentée prélevés dans des ateliers de production à Ouagadougou (Burkina Faso), ce qui nous a permis, dans le même temps, d'évaluer la variabilité de la qualité nutritionnelle de ces bouillies consommées en tant qu'aliment de complément par les jeunes enfants.
- Enfin, dans le chapitre V, au vu des résultats précédents, nous nous sommes focalisés sur l'étude des facteurs limitant la biodisponibilité du fer et du zinc (phytates, fibres, tanins) dans le grain de mil. L'étude de la répartition de ces facteurs dans le grain par abrasion progressive de ses parties périphériques a été notre premier objectif. Puis, nous avons cherché à évaluer la contribution relative de ces différents facteurs à la faible digestibilité *in vitro* du fer et du zinc dans les farines de mil. Pour cela deux approches ont été combinées. La première consiste en une caractérisation de la digestibilité *in vitro* du fer et du zinc dans des farines et des fractions de grain de mil ayant des teneurs variables en FAN. La seconde approche, destinée à évaluer plus précisément la nature des interactions entre FAN et minéraux dans le grain de mil, est axée sur le traitement enzymatique des résidus insolubles de digestion *in vitro*.
- Le chapitre VI a pour but de synthétiser 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 biodisponibilité du fer et du zinc dans les aliments de complément à base de céréales et de légumineuses et, d'autre part, les perspectives de recherche restant à mener.

Dans la mesure où la majeure partie des résultats de ces travaux a fait l'objet d'une rédaction d'articles acceptés, soumis, ou en cours de finition, nous avons choisi de présenter l'essentiel de cette thèse sous cette forme.

Chapitre I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le mil : Importance alimentaire, caractéristiques morphologiques et nutritionnelles, transformations technologiques

1.1. Production et importance alimentaire

Plus de 2,1 milliards de tonnes de céréales ont été produites en 2003 sur la surface du globe terrestre. Le maïs, le riz et le blé représentent chacun plus d'un quart de la production totale de céréales. En 2003, la récolte de maïs a été la plus importante avec 638 millions de tonnes (MT). Près de la moitié de la production mondiale de maïs est réalisée en Amérique du Nord (257 MT aux Etats-Unis), le reste provenant essentiellement d'Asie (165 MT dont 114 MT en Chine) et d'Europe (69 MT). Il est important de noter que dans les pays industrialisés 90% de la production est utilisée pour la nourriture du bétail. Le riz est la deuxième céréale produite en terme de tonnage avec 589 MT. Plus de 534 MT ont été récoltées en Asie dont 166 MT en Chine. Le reste de la production provient du continent américain (États-unis, Brésil), d'Afrique ou de Madagascar. Enfin, le blé représente un tonnage annuel d'environ 556 MT et est principalement produit en Europe (154 MT), en Chine (86 MT), dans les pays de l'ex-URSS et les États-unis (64 MT chacun). Les autres céréales représentent donc un peu moins de 300 MT annuelles, soit moins de 15% de la production totale. En 2003, elles se répartissaient en 142 MT d'orge, 60 MT de sorgho, 30 MT de mil, 26 MT d'avoine et 15 MT de seigle (FAO, 2004).

Parmi les 30 MT de mil produites en 2003, 14,6 MT provenaient d'Afrique et 13,5 MT d'Asie, ce qui représente respectivement 11,5% et 1,4% de la production céréalière totale de ces continents. En 2003, les principaux pays producteurs de mil étaient l'Inde et le Nigeria qui se partageaient plus de la moitié de la production mondiale (respectivement 36 et 20%), suivi par le Niger (8%), la Chine (7%), les pays de l'ex-URSS (5%) et le Burkina Faso (4%). Mais malgré cette importante production en Inde, c'est en Afrique sahélienne que l'importance alimentaire du mil est la plus grande. En effet, en 2001, sa consommation a contribué pour plus de 10% aux disponibilités énergétiques alimentaires en Afrique sahélienne (Burkina Faso, Gambie, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal, Tchad) (Tableau I-1). Les autres céréales produites dans ces pays sont le sorgho et, dans une moindre mesure, le maïs et le riz (Figure I-1).

Tableau I-1. Importance de la production et de la consommation humaine de mil dans les pays d'Afrique sahélienne en 2001

	Production (MT)		Contribution du mil à la production céréalière (%)	Disponibilité énergétique totale (kcal/pers/j)		Contribution du mil aux disponibilités énergétiques totales (%)
	Céréales	Mil		Total	Mil	
Burkina Faso	3109	1009	32	2485	609	25
Gambie	200	105	53	2300	467	20
Mali	2584	793	31	2376	528	22
Niger	3161	2414	76	2118	1014	48
Nigeria	20114	5530	27	2747	271	10
Sénégal	962	470	49	2277	250	11
Tchad	1321	398	30	2245	323	14

Source : FAO, 2004.

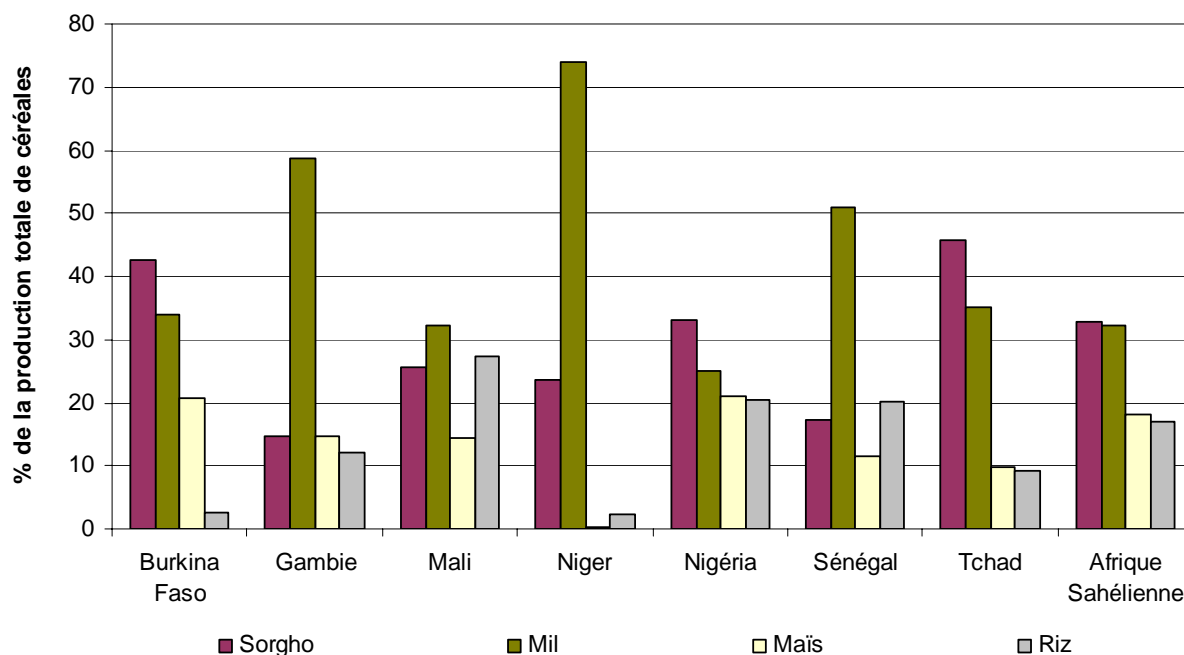


Figure I-1. Contributions des principales céréales à la production céréalière totale en 2003 dans les pays d’Afrique sahélienne (Source : FAO, 2004).

La prépondérance du mil et du sorgho dans les productions céréalières des pays d’Afrique sahélienne s’explique par le fait que ces céréales ont des rendements de production relativement bons par rapport aux autres céréales sur des sols pauvres et dans des zones où les précipitations sont rares et irrégulières. Ces rendements restent toutefois assez faibles et peuvent varier de manière très importante d’une année sur l’autre (Dendy, 1995). Le mil, comme le sorgho, n’en demeurent pas moins des cultures de première importance en terme de sécurité alimentaire. En effet, les pays d’Afrique sahélienne abritent une population de plus de 177 millions de personnes pour lesquelles le mil constitue en moyenne 20% de leurs disponibilités énergétiques alimentaires (Tableau I-1).

La production de mil des pays d’Afrique sahélienne est pratiquement totalement réservée à l’alimentation humaine. Moins de 3% de la production sont réservés pour les semences et seulement 4% sont destinés à l’alimentation animale. Moins de 5% des productions annuelles de mil et de sorgho sont transformés industriellement et commercialisés (Rohrbach, 2003).

1.2. Les différents types de mil

Différents types de mil sont cultivés dans le monde. Le plus grand nombre de formes de mil, aussi bien sauvages que cultivées, se trouve en Afrique occidentale tropicale d’où les mils sont probablement originaires. Il y a environ 2000 ans, cette culture a été transportée en Afrique orientale et centrale et en Inde où, en raison de son excellente tolérance à la sécheresse, elle s’est établie dans les environnements les plus secs (House, 1995).

Le mil chandelle (ang. : « *Pearl millet* ») se distingue des autres types de mils dits mineurs. Il appartient à la section *Penicillaria* du genre *Pennisetum* qui se divise en cinq sections. Les plants appartenant à cette section se caractérisent par la présence d’une touffe de poils sur l’apex des étamines. L’espèce *Pennisetum glaucum* (synonymes : *P. americanum*, *P. typhoides*) est connue sous les noms de mil chandelle, mil pénicillaire, petit mil ou mil perlé en français, de « *pearl millet* », « *bulrush millet* », « *candle millet* » ou « *cattail millet* » en anglais, de « *bajra* » en langue hindi (Inde) et de « *sanyo* », « *munga* » ou encore « *seno* »

selon les différents dialectes africains (Bezançon *et al.*, 1999). Dans la suite de cette étude, l'appellation mil désignera le mil chandelle.

Les mils mineurs sont également appelés « petits mils ». Ils comprennent l'éleusine (*Eleusine coracana*, ang. : « *Finger millet* »), le millet d'Italie ou millet des oiseaux (*Setaria italica*, ang. : « *foxtail millet* »), le millet commun (*Panicum miliaceum*, ang. : « *Proso millet* »), le petit mil (*Panicum sumatrense*, ang. : « *little millet* »), le moha du Japon (*Echinochloa crus-galli*, ang. : « *barnyard millet* ») et le millet indigène (*Paspalum scrobiculatum*, ang. : « *kodo millet* ») (FAO, 1995).

1.3. Caractéristiques morphologiques

1.3.1. Aspects généraux concernant la structure des grains de céréales

Les grains de céréales sont des caryopses, c'est-à-dire qu'ils se composent d'un grain unique contenant à la fois le tégument séminal et la semence. A l'exception du grain de maïs, les grains des céréales ont des tailles, des poids et des formes très proches (Tableau I-2).

Tableau I-2. Dimensions et masse pour 1000 grains des principales céréales

Espèce	Dimensions		Masse pour 1000 grains	
	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Moyennes (g)	Intervalle (g)
Avoine	6-13	1,0- 4,5	32	19- 30
Blé	5- 8	2,5- 4,5	37	27- 48
Maïs	8-17	5,0-15,0	324	150-600
Mil	3- 4	1,5- 3,5	8	3- 14
Orge	8-14	1,0- 4,5	36	32- 36
Riz	5-10	1,5- 5,0	27	
Seigle	4-10	1,5- 3,5	21	15- 40
Sorgho	3- 5	2,0- 5,0	28	8- 50

Source : Evers *et al.*, 1999.

Les structures anatomiques des grains des différentes espèces de céréales sont comparables (Figure I-2).

Le caryopse est un fruit dont le péricarpe constitue l'enveloppe à l'intérieur duquel se trouve une graine comprenant le germe, les téguments séminaux et le nucelle.

Le péricarpe est composé de trois sous-couches :

- l'épicarpe, lui-même divisé en épiderme et hypoderme et protégé par la cuticule et les poils,
- le mésocarpe, formé de cellules transversales,
- l'endocarpe, constitué de cellules tubulaires.

Juste en dessous de l'endocarpe se trouve l'enveloppe du grain, appelée testa ou tégument séminal. L'élément le plus volumineux du grain de céréale est l'endosperme, encore appelé nucelle ou albumen, qui est un important tissu de réserve. Il est entouré d'un épiderme et se compose d'une couche à aleurone, ou assise protéique, et de zones amyliques cornées et farineuses. L'albumen amylicé se distingue par ses longues cellules rectangulaires qui forment un ensemble compact et contiennent des granules d'amidon et des corps protéiques.

L'embryon et le scutellum sont les deux parties principales du germe qui est entouré par l'épiblaste. Le scutellum (cotylédon du grain de céréale) est un tissu de réserve riche en lipides, protéines et minéraux. L'embryon est constitué de trois parties : la gemmule, protégée par le coléoptile, la tigelle et la radicule, protégée par le coléorhize (Evers *et al.*, 1999).

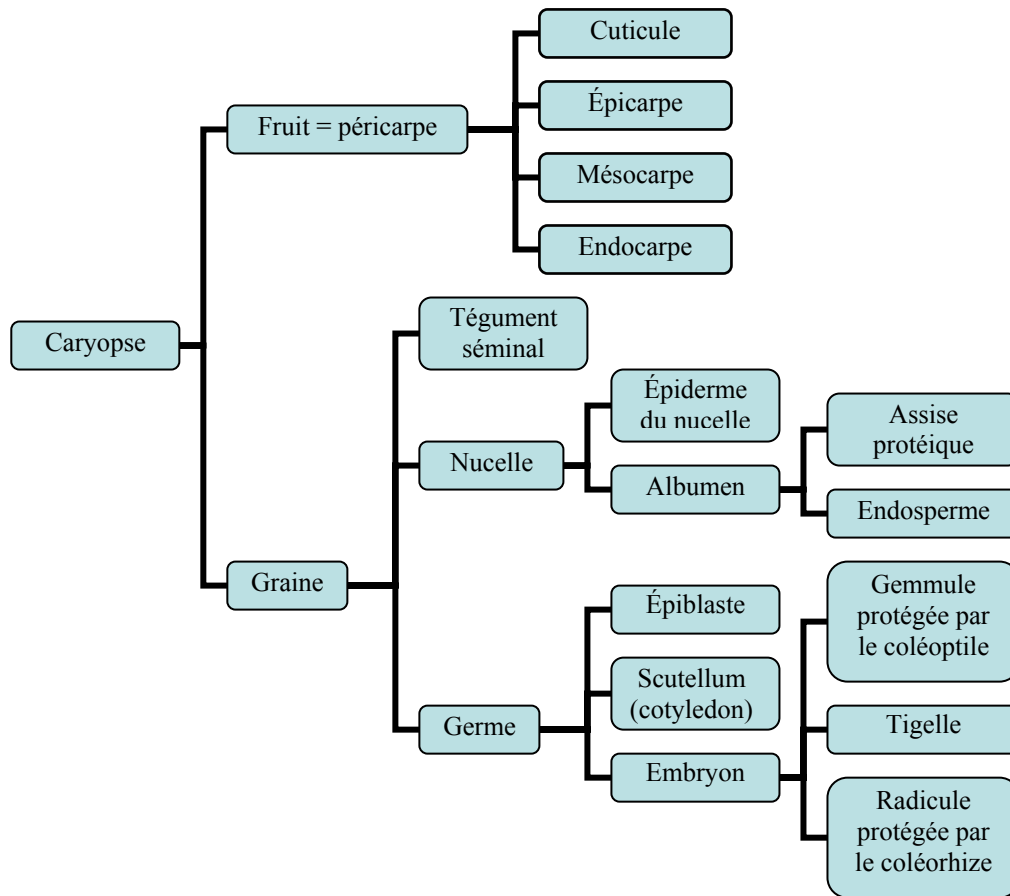


Figure I-2. Structure générale des grains de céréales

1.3.2. Structure du grain de mil

Une coupe longitudinale d'un grain de mil est donnée sur la figure I-3. Le grain de mil peut être presque blanc, jaune pâle, vert, brun, gris, bleu ardoise ou pourpre. Les différences de couleur des grains sont dues aux pigmentations respectives du péricarpe, de l'aleurone et de l'endosperme combinées à l'épaisseur du péricarpe (MacDonough et Rooney, 1989). Les grains ovoïdes sont longs d'environ 3 à 4 mm, beaucoup plus petits que ceux des autres céréales, mais beaucoup plus grands que ceux des autres mils, et la masse pour 1000 grains varie de 3 à 14 g avec une moyenne de 8 g (Tableau I-2).

Le péricarpe du caryopse du grain de mil se compose d'un épicarpe comportant des couches d'une ou deux cellules, d'un mésocarpe dont l'épaisseur varie en fonction du génotype et d'un endocarpe composé de cellules transversales et tubulaires. La couche du mésocarpe ne contient pas de granule d'amidon. La couche de testa est fine, constituée d'une seule couche de cellules de 0,4 µm d'épaisseur et parfois pigmentée (FAO, 1995).

Dans les différents mils et le sorgho, la couche à aleurone est constituée d'une seule couche de cellules. Les corps protéiques dans l'endosperme sont sphériques. Leur dimension diffère selon les espèces et également à l'intérieur de l'endosperme du même grain de mil. Dans le mil chandelle, les corps protéiques sont plus nombreux dans la zone farineuse que dans la zone cornée (Serna-Saldivar et Rooney, 1995). Les granules d'amidon de l'endosperme farineux du

mil sont sphériques et relativement plus gros et plus digestibles que les granules d'amidon de la zone cornée. Les proportions d'endosperme corné et d'endosperme farineux déterminent la texture des grains, les grains à texture tendre ayant une proportion plus importante d'endosperme farineux que d'endosperme corné. Ainsi, d'une variété de mil à l'autre, la texture des grains de mil peut être très variable selon la structure des granules d'amidon constituant leur albumen (FAO, 1995).

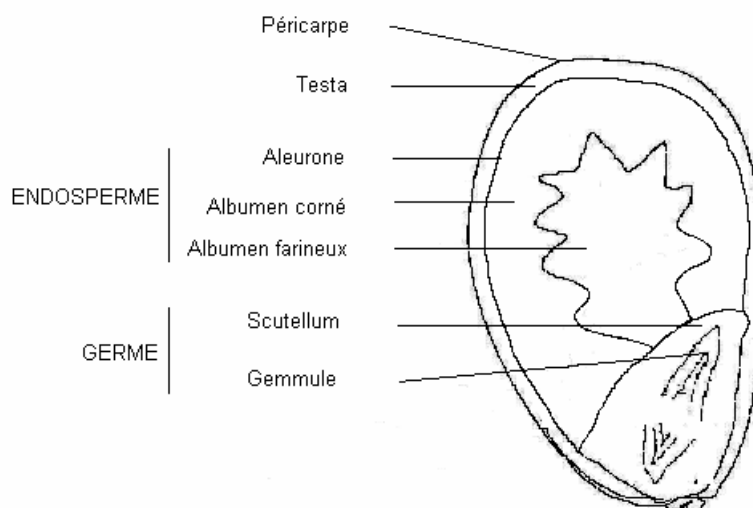


Figure I-3. Schéma d'une coupe longitudinale de grain de mil

La proportion de germe dans le grain par rapport à celle de l'endosperme est plus importante pour le mil chandelle que pour le sorgho et les autres mils (rapport endosperme/germe = 4,3/1). En effet, Abdelrahman *et al.* (1984) ont déterminé à partir de mil cultivé aux USA que le grain de mil était composé de 7,2 à 10,6% de son (péricarpe et aleurone), 15,5 à 17,4% de germe et 73,9 à 76,2% d'endosperme.

1.4. Composition biochimique et valeur nutritionnelle

1.4.1. Composition des grains de céréales

Dans le monde, les céréales apportent la majeure partie des calories nécessaires à l'organisme et couvrent plus de la moitié de ses besoins en protéines. A maturité, les grains de céréales sont composés de glucides, de matières azotées (essentiellement des protéines), de lipides, d'eau et en faibles quantités de minéraux, de vitamines et de facteurs dits anti-nutritionnels. Le tableau I-3 donne la composition nutritionnelle moyenne des principales céréales, ainsi que celle de quelques légumineuses (soja, ambérique, haricot) à titre de comparaison.

Tableau I-3. Composition de diverses graines végétales (g/100g MS)

	Glucides	Fibres totales *	Protéines brutes	Lipides	Cendres
Avoine ^a	55,7	9,7	12,6	7,1	2,85
Blé ^a	59,6	13,3	11,7	1,8	1,67
Maïs ^a	64,2	9,7	9,2	3,8	1,30
Mil ^b	71,6	7,7	13,3	6,3	1,85
Orge ^a	63,3	9,8	10,6	2,1	2,25
Riz ^a	74,1	2,2	7,8	2,2	1,20
Seigle ^a	60,7	13,2	9,5	1,7	1,90
Sorgho ^b	73,8	9,4	12,3	3,6	1,60
Soja ^a	6,3	22,0	37,6	18,3	4,69
Ambérique ^a	43,6	15,8	23,8	1,3	3,29
Haricot ^a	34,7	23,2	21,1	1,6	3,85

* Déterminées par la méthode de AOAC (Prosky *et al.*, 1988), excepté pour les teneurs en fibres de l'orge et du seigle qui ont été déterminées par la méthode de Meuser, Suckow et Kulikowski (« Berliner methode »)
Sources : a- Souci *et al.* (2000), b- Serna-Saldivar et Rooney (1995).

1.4.2. Glucides

Il est d'usage de classer les glucides selon leur degré de polymérisation : monosaccharides (sucres), oligosaccharides (dextrines) et polysaccharides (polymères). Ils constituent la fraction pondérale la plus importante des grains de céréales (77 à 87% de leur matière sèche). Les monosaccharides sont essentiellement des sucres simples, que l'on trouve en très petites quantités dans les céréales non transformées. Ils sont constitutifs des polysaccharides (i.e. amidon, cellulose) qui ont un rôle à la fois dans la structure du grain, le stockage des matières organiques et le comportement du grain et de ses produits dérivés au cours de sa transformation technologique. Le monosaccharide le plus abondant est le D-glucose qui est constitutif de l'amidon, la cellulose et les β -D-glucanes. Les pentoses les plus abondants sont le D-xylose et le D-arabinose en raison de leur présence dans les polymères constitutifs des parois cellulaires.

1.4.2.1. *Les sucres solubles*

Les sucres solubles sont présents dans les céréales à raison de 1 à 4%, principalement sous forme de saccharose et de sucres réducteurs. Subramanian *et al.* (1981) ont trouvé que les principaux sucres solubles du mil, qui représentent 2,1 à 2,8%, étaient le saccharose (66%), suivi du raffinose (28%). Les autres sucres détectés en quantités mesurables étaient le stachyose, le glucose et le fructose.

1.4.2.2. *L'amidon*

L'amidon, qui est la principale forme de stockage des hydrates de carbone dans les céréales, est constitué d'amylopectine, polymère à chaînes ramifiées, et d'amylose, polymère à chaîne linéaire. Abdalla *et al.* (1998a) ont montré pour différentes variétés de mil que la teneur en amidon des grains variait de 60,4 à 70,0%. La digestibilité de l'amidon, qui dépend de

l'hydrolyse par les amylases salivaires et pancréatiques, détermine en grande partie la teneur en énergie métabolisable des grains de céréales. Cette digestibilité est accrue par les procédés hydro-thermiques qui permettent de libérer les granules d'amidon de la matrice protéique (Hoover et Vasanthan, 1994). Les propriétés physico-chimiques de l'amidon influent sur la texture des préparations alimentaires à base de grain de mil. Abd Allah *et al.* (1987) ont montré que l'amidon de mil avait une capacité de gonflement et une solubilité supérieures à celles des amidons des autres céréales. L'absorption d'eau croît avec la température et les granules d'amidon éclatent, ce qui permet la solubilisation de l'amylose et de l'amylopectine pour former une solution colloïdale, c'est la gélatinisation. La température de gélatinisation de l'amidon du grain est influencée par le génotype et les facteurs environnementaux. D'après Beleia *et al.* (1980), les températures de début et de fin de gélatinisation sont respectivement de 59-63°C et 68-70°C, tandis que Hoover *et al.* (1996), pour d'autres variétés, ont trouvé des températures de 61-65°C et 68-78°C. Au refroidissement, l'amidon gélatinisé tend à revenir d'un état soluble, dispersé et amorphe à un état cristallin insoluble. Ce phénomène est connu sous le nom de rétrogradation et il est d'autant plus marqué que la température est basse et la concentration en amidon élevée. Hoover *et al.* (1996) reportent que la teneur en amylose, qui a une plus grande tendance à la rétrogradation, varie de 22 à 29% pour le mil.

1.4.3. Protéines

1.4.3.1. Teneur en protéines

Le tableau I-3 montre que les teneurs en protéines des céréales peuvent être assez variables (de 7,8 à 13,3 g/100g MS en moyenne, respectivement pour le riz et le mil). Mais les teneurs en protéines, comme celles en de nombreux autres nutriments, sont influencées par le génotype et les facteurs environnementaux. Buerkert *et al.* (1998) ont étudié les teneurs en protéines de grains de mil provenant de quatorze lieux de récoltes au Niger choisis en fonction de leur situation géographique et des précipitations. Ils ont trouvé une large variation des teneurs en protéines des grains (de 10,2 à 15,8%) qu'ils ont attribué aux différences de teneurs en azote des sols influencées par l'application d'engrais. Par ailleurs, ils ont montré que l'application de phosphore entraînait une diminution de la teneur en protéines des différentes variétés. Ces mêmes auteurs ont ensuite étudié la qualité de grains de mil issus de différentes variétés sauvages, améliorées et hybrides (Buerkert *et al.*, 2001). Les variétés sauvages avaient des concentrations plus élevées en protéines que les autres variétés (+ 3,0 à 3,5 g/100g MS), donnant une variation moyenne des teneurs en protéines de 11 à 15%.

1.4.3.2. Fractions protéiques

Les protéines des graines végétales peuvent être classées en quatre grandes fractions selon leur solubilité d'après la technique développée par Osborne au début du siècle :

- les albumines (solubles dans l'eau),
- les globulines (solubles dans une solution de sel dilué),
- les prolamines (solubles dans l'alcool à 70%),
- les glutélines (solubles dans les acides ou bases faibles).

Cette technique bien qu'ancienne donne des résultats très reproductibles et a l'avantage d'être simple. Bien que d'autres méthodes soient aujourd'hui nécessaires, celles suggérées jusqu'à ce jour sont très complexes et peu utilisées.

Les prolamines et les glutélines sont les protéines de stockage du grain. Les prolamines de toutes les céréales ont la particularité d'être pauvres en acides aminés essentiels tels que la lysine, la méthionine et le tryptophane, tandis que les glutélines ont une répartition en acides

aminés plus variables. Les albumines et les globulines, en revanche, sont, entre autre, riches en lysine, histidine et arginine. Les propriétés nutritionnelles des protéines de céréales sont cependant généralement considérées comme faibles. Les importances relatives des différentes fractions protéiques dans les principales céréales sont données dans le tableau I-4.

Tableau I-4. Fractions protéiques (selon la classification d'Osborne) des principales céréales

Céréales	Fractions protéiques (en % des protéines totales)			
	Albumines	Globulines	Prolamines	Glutélines
Avoine ^a	5-10	50-60	10-15	5
Blé ^a	5- 1	5-10	40-50	30-40
Maïs ^a	2-10	10-20	50-55	30-45
Mil ^b	8-19	9-15	27-40	19-38
Orge ^a	3- 4	10-20	35-45	35-45
Riz ^a	5- 6	9-10	3	81-83
Seigle ^a	20-30	5-10	20-30	30-40
Sorgho ^b	5-10	9-15	28-33	30-33

Sources : a- Godon et Laignelet (1991), b- Serna-Saldivar et Rooney (1995).

Les protéines du mil et du sorgho sont à peu près de même nature avec une prépondérance de prolamines et de glutélines. Les teneurs en albumines et globulines du mil sont toutefois relativement importantes par rapport aux autres céréales. On remarque par ailleurs que le riz a la particularité d'être riche en glutélines et pauvre en prolamines, ce qui se traduit par une teneur en lysine plus élevée que les autres céréales malgré sa plus faible teneur en protéines totales.

1.4.3.3. Composition en acides aminés

La fonction essentielle d'une protéine alimentaire est de satisfaire les besoins de l'organisme en azote et acides aminés essentiels. La qualité d'une protéine est essentiellement fonction de sa composition en acides aminés essentiels. Les structures postulées des besoins en acides aminés des nourrissons et des enfants d'âge préscolaire données dans le tableau I-5 permettent de comparer ces besoins avec les concentrations de ces acides aminés dans les protéines des principales espèces de céréales (FAO/OMS/UNU, 1986).

Ces données montrent que, bien que les teneurs en acides aminés essentiels des protéines des céréales couramment consommées répondent aux besoins des adultes, aucune céréale ne présente des teneurs en acides aminés suffisantes pour répondre aux besoins de croissance des nourrissons et des jeunes enfants. Bien que les protéines du mil aient une teneur en lysine limitante, leur profil d'acides aminés essentiels montre que les teneurs en méthionine, thréonine, tryptophane et valine sont supérieures à celles des protéines de blé, de maïs et de sorgho. Parmi les céréales cultivées en Afrique Sahélienne, le mil est donc, avec le riz, qui possède une teneur relativement élevée en lysine, la céréale présentant le meilleur profil d'acides aminés.

Tableau I-5. Teneurs en quelques acides aminés des protéines des principales espèces de céréales

Céréales	Teneurs en acides animés (en g/100g de protéines)								
	Isoleucine ^c	Leucine ^c	Lysine	Méthionine	Phénylalanine	Thréonine	Tryptophane ^c	Valine	Histidine
Avoine ^a	5,3	10,1	4,2	1,6	5,1	3,5	/	5,8	2,2
Blé ^a	4,3	8,7	2,8	1,5	4,7	2,9	/	4,9	2,3
Maïs ^a	3,5	11,9	2,9	1,9	5,1	3,5	0,7	5,1	2,7
Mil ^b	4,0	9,3	3,3	2,2	5,2	3,9	1,9	5,7	2,2
Orge ^a	4,2	7,8	3,6	1,9	5,3	3,4	/	5,5	2,1
Riz ^a	3,0	6,5	4,1	2,4	5,2	4,0	/	5,3	2,2
Seigle ^a	4,1	7,3	4,1	1,6	4,5	3,4	/	5,1	2,2
Sorgho ^b	4,0	13,5	2,2	1,4	5,0	3,3	1,2	5,4	2,2
Structure postulée pour les besoins ^d									
Nourrissons	4,6	9,3	6,6	4,2 ^e	7,2 ^f	4,3	1,7	5,5	2,6
Enfants (2-5 ans)	2,8	6,6	5,8	2,5 ^e	6,3 ^f	3,4	1,1	3,5	1,9
Adultes	1,3	1,9	1,6	1,7 ^e	1,9 ^f	0,9	0,5	1,3	1,6

Sources : a- Godon et Laignelet (1991), b- Serna-Saldivar et Rooney (1995), c- FAO (1981), d- FAO/OMS/UNU (1986).

e- Méthionine + cystéine, f- Phénylalanine + tyrosine.

1.4.3.4. Utilisation digestive et métabolique

Mis à part son profil favorable en acides aminés essentiels, la facilité d'assimilation d'une protéine est une caractéristique importante de sa bonne qualité nutritionnelle car l'indice chimique ne prend en compte, ni la digestibilité de la protéine, ni la disponibilité des acides aminés. Singh *et al.* (1987) ont étudié ces caractéristiques concernant les protéines de mil chez le rat. Ils ont montré que la digestibilité vraie des protéines variait peu (94 à 97%) et n'était pas modifiée par la teneur en protéines du grain. Dans les variétés comportant beaucoup de protéines, la teneur en lysine était faible, ce qui se traduisait par une faible valeur biologique et une faible utilisation nette de la protéine. Par ailleurs, Serna-Saldivar *et al.* (1994) ont montré que les rats nourris avec du mil, ou une variété de sorgho riche en lysine, avaient une meilleure croissance que ceux nourris avec une variété de sorgho normale. Elyas *et al.* (2002) et Ali *et al.* (2003), enfin, ont chacun étudié la digestibilité *in vitro* des protéines de deux variétés de mil. Bien que ces deux équipes aient utilisé la même méthode, les valeurs obtenues sont assez variables puisque s'échelonnant de 60 à 77%.

1.4.4. Lipides

L'étude des lipides présents dans les céréales est complexe en raison de la grande diversité de composés lipidiques existants et de la grande variabilité de composition d'une céréale à une

autre et d'une partie du grain à une autre. Les lipides les plus abondants dans les céréales sont les lipides non polaires qui sont représentés par les triglycérides qui servent de matériel de réserve pour la germination. Les moins abondants sont les lipides polaires (i.e. phospholipides, glycolipides) qui ont d'importantes fonctions biochimiques dans le grain et les composés non saponifiables (phytostérols, caroténoïdes, tocophérols). Le tableau I-3 montre que la teneur en lipides totaux se situe autour de 2% pour la majorité des céréales mais l'avoine et le mil et, dans une moindre mesure, le maïs et le sorgho sont plus riches (de 3,6 à 7,1%). Parmi les différents types de mil, c'est d'ailleurs le mil chandelle qui présente la plus forte teneur en lipides, avec 5,6 à 6,1% de lipides libres et 0,6 à 0,9% de lipides non libres (restant complexés aux autres composés de la matrice après extraction par des solvants non polaires) (FAO, 1995). Osagie et Kates (1984) ont constaté que les lipides du mil étaient constitués à 85% de lipides neutres, à 12% de phospholipides et à 3% de glycolipides. En ce qui concerne la composition en acides gras de ces lipides, il existe des différences notables d'une variété de mil chandelle à l'autre (Lai et Varriano-Marston, 1980), bien que les principaux soient l'acide linoléique (C18:2) et l'acide oléique (C18:1) (Serna-Saldivar et Rooney, 1995).

1.4.5. Fibres

En prenant comme définition des fibres alimentaires la somme de la lignine et des polysaccharides qui ne sont pas hydrolysés par les enzymes endogènes du tube digestif de l'homme, les constituants des fibres les plus abondants dans les céréales sont la cellulose, les hémicelluloses, la lignine, les pectines et les gommes (pentosanes).

Plusieurs méthodes de dosage des fibres dans les denrées alimentaires ont été proposées mais chacune de ces méthodes présente certaines limites qui peuvent contribuer à la variabilité des teneurs en fibres observées dans la littérature (cf. Paragraphe I.4.3). Kamath et Belavady (1980) ont déterminé la teneur en fibres alimentaires totales du mil qui s'est révélée plus élevée (20,4%) que celle du sorgho (14,2%), du blé (17,2%) et du riz (8,3%). Serna-Saldivar *et al.* (1994), par la méthode de Englyst et Cummings (1988) permettant de doser les fibres insolubles et solubles, ont trouvé que le mil contenait 6,3% de fibres insolubles et 0,6% de fibres solubles.

La teneur en cellulose des grains de mil serait de 1,9% (Serna-Saldivar *et al.*, 1995). Les polysaccharides autres que l'amidon et la cellulose sont représentés par les hémicelluloses et pentosanes qui constituent les parois des cellules végétales. On réserve le terme de pentosanes aux composés solubles dans l'eau alors que les pentosanes insolubles sont cités sous le nom d'hémicelluloses. Les pentosanes totaux représentent, par exemple, 2 à 3% de la farine de blé dont un tiers est soluble. On trouve des teneurs élevées en pentosanes dans le seigle (jusqu'à 8%) et l'avoine a la particularité d'être riche en β -glucane (4-6%). Le mil, quant à lui, contiendrait peu de pentosanes : de 0,7 à 2,6% selon les variétés d'après Hadimani *et al.* (2001). Ces mêmes auteurs ont également trouvé que le glucose, l'arabinose et le xylose en étaient les principaux sucres constitutifs et ont fait le lien entre les aptitudes des grains au broyage et la forte proportion de pentosanes totaux. Bailey *et al.* (1979) ont également isolé les pentosanes des grains de mil à l'aide de différents solvants et ont montré que ceux-ci contenaient sept sucres, avec prédominance de l'arabinose, du xylose et du galactose, suivis du rhamnose et du fructose.

1.4.6. Minéraux

Les phosphates et sulfates de potassium, magnésium et calcium représentent environ 95% des minéraux contenus dans les céréales. Une grande partie du phosphore est présente sous forme

d'acide phytique. Les teneurs en fer, zinc et manganèse sont comprises entre 0,5 et 5 mg/100 g, tandis que celle du cuivre est d'environ 0,5 mg/100 g (Tableau I-6).

Tableau I-6. Composition minérale des principales espèces de céréales

Céréales	Teneurs en minéraux (en mg/100g)								
	P	K	Mg	Ca	Na	Fe	Zn	Mn	Cu
Avoine ^a	523	429	177	54	2	4,7	4,0	4,9	0,63
Blé ^a	288	363	126	29	2	3,2	2,7	4,0	0,43
Maïs ^a	210	287	127	7	35	2,7	2,2	0,5	0,31
Mil ^b	285	195	114	8	5	3,0	1,7	1,6	0,75
Orge ^a	264	452	133	33	12	3,6	2,8	2,0	0,50
Riz ^a	333	223	143	23	7	1,5	2,0	3,8	0,27
Seigle ^a	374	264	121	33	6	2,7	3,7	2,7	0,45
Sorgho ^{a,b}	287	350	190 ^b	28	6	4,4	1,5 ^b	1,6 ^b	0,31 ^b

Sources : a- Cordain (1999), b- Serna-Saldivar et Rooney (1995).

Il est toutefois délicat de comparer les teneurs en minéraux de différentes espèces car la composition en sels minéraux d'une espèce de céréale est extrêmement variable d'une variété à l'autre, ou même, d'une récolte à l'autre, ou encore d'un champ à l'autre sur une même récolte. En effet, comme ont pu le constater Buerkert *et al.* (2001), au cours d'une de leurs études sur le mil au Niger, plus que les facteurs génétiques, ce sont les conditions écologiques des régions de culture qui ont une incidence sur ces teneurs.

1.4.7. Vitamines

Les vitamines ont un intérêt nutritionnel majeur. Les céréales contiennent surtout de la thiamine (B1), de la riboflavine (B2) et de la niacine (B3 ou PP), mais aussi d'autres vitamines comme la pyridoxine (B6), l'acide pantothénique (B5) ou la vitamine E (α -tocophérol) (Godon et Laignelet, 1991).

Les teneurs en vitamines des principales espèces de céréales sont données dans le tableau I-7. On remarque que le mil, par rapport aux autres espèces de céréales, présente des teneurs assez élevées en riboflavine et niacine, des teneurs moyenne en thiamine, acide pantothénique et pyridoxine et, en revanche, une très faible teneur en vitamine E tout comme le sorgho.

Simwemba *et al.* (1984) ont étudié les teneurs en thiamine, niacine et riboflavine de différentes variétés de mil cultivés dans différentes zones des États-unis. En fonction de la vitamine considérée, le lieu de culture ainsi que la variété avaient un effet ou non sur sa teneur. Ainsi, le lieu de culture aurait un effet important sur les teneurs en thiamine, pas d'effet sur celles en riboflavine et un effet modéré sur celles en niacine, qui seraient, par ailleurs, très variables selon les variétés cultivées dans une même zone. Comme pour les teneurs en minéraux, les teneurs en vitamines des différentes espèces de céréales sont donc difficilement comparables étant donné qu'elles sont variables d'une variété à l'autre et, pour certaines, étroitement liées aux conditions environnementales.

Tableau I-7. Composition en vitamines des principales espèces de céréales

Céréales	Teneurs en vitamines (en mg/100g)					
	B1	B2	B3	B5	B6	E
Avoine ^a	0,76	0,14	0,96	1,35	0,12	1,09
Blé ^{a,c}	0,38	0,12	5,47	0,95	0,30	1,00 ^c
Maïs ^a	0,39	0,20	3,63	0,42	0,62	0,49
Mil ^a	0,42	0,29	4,72	0,85	0,38	0,05
Orge ^a	0,65	0,29	4,60	0,28	0,32	0,57
Riz ^a	0,40	0,09	5,09	1,49	0,51	0,68
Seigle ^a	0,32	0,25	4,27	1,46	0,29	1,28
Sorgho ^{a,b,c}	0,24	0,14	2,92	1,25 ^b	0,59 ^b	0,07 ^c

Sources : a- Cordain (1999), b- Serna-Saldivar et Rooney (1995), c- Souci et al., 2000.

1.4.8. Facteurs antinutritionnels

Comme dans d'autres denrées alimentaires, certains inhibiteurs de l'assimilation des nutriments et certaines substances toxiques peuvent être présents dans les grains de céréales. On peut, globalement, classer ces facteurs antinutritionnels en deux catégories : ceux existant naturellement dans les grains et ceux dus à une contamination qui peut être d'origine fongique ou liée au sol ou à d'autres facteurs environnementaux. Ces facteurs modifient la valeur nutritionnelle des grains et certains peuvent avoir des conséquences très graves sur la santé des consommateurs quotidiens de céréales.

Seuls les données concernant les facteurs pouvant influencer la biodisponibilité des minéraux dans les céréales seront développés dans ce paragraphe. Il s'agit principalement des phytates et des polyphénols, dont les teneurs sont données dans le tableau I-8. Quelques données concernant les inhibiteurs d'enzymes digestives seront également reportées.

Tableau I-8. Teneurs en phytates et en polyphénols des principales espèces de céréales

Céréales	Phytates (%) ^a	Polyphénols (%) ^{b,c}
Avoine	0,4 - 1,2	1,1 ^c
Blé	0,3 - 1,4	0,4 ^c
Maïs	0,8 - 2,2	0,4 ^c
Mil	0,2 - 1,0	0,6 - 1,1 ^b
Orge	0,4 - 1,2	1,2 - 1,5 ^b
Riz	0,8 - 1,0	0,0 - 0,1 ^{b,c}
Seigle	0,5 - 1,5	0,6 ^c
Sorgho	0,7 - 1,4	0,2 - 10,3 ^b

Sources : a- Reddy (2002), b- Bravo (1998), c- Evers et al. (1999).

1.4.8.1. Les phytates

Les phytates (sels d'acide phytique) représentent une catégorie de composés naturels pouvant avoir une influence notable sur les propriétés fonctionnelles et nutritives des aliments d'origine végétale. L'acide phytique (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) constitue le principal stock de phosphore dans les grains à maturité. Il possède une forte capacité de liaison et peut donc constituer des complexes avec des protéines et des cations multivalents, diminuant ainsi leur disponibilité biologique (la structure des phytates et le détail de leurs activités anti-nutritionnelles sont données dans le paragraphe 3.1.1).

Les teneurs en phytates signalées par Reddy (2002) dans le mil sont globalement inférieures à celles des autres céréales citées (Tableau I-8). On remarque, cependant que ces valeurs sont très variables, ce qui peut être attribué, soit à des méthodes de dosage différentes, soit à l'étude de variétés différentes. Abdalla *et al.* (1998a), par exemple, ont étudié les teneurs en phytates de dix géotypes de mil du Soudan et ont trouvé des valeurs s'étalant entre 0,35 et 0,80 g/100 g, traduisant un fort effet variétal. Simwemba *et al.* (1984), par ailleurs, ont déterminé les teneurs en phytates de différents géotypes cultivés dans deux zones géographiques. Ils ont trouvé des teneurs variant de 0,18 à 0,27 g/100 g dans la première zone et de 0,21 à 0,31 g/100 g dans la seconde zone, mettant ainsi en évidence l'effet déterminant des facteurs génétiques et environnementaux sur les teneurs en phytates. Ce résultat a été confirmé par Buerkert *et al.* (1998) qui ont montré que l'application de phosphore lors de la culture du mil augmentait de 25 à 29% la teneur en acide phytique des grains. La différence importante de teneurs en phytates entre les travaux de Abdalla *et al.* (1998a) et Simwemba *et al.* (1984) peut être attribuée aux méthodes de dosages utilisées.

1.4.8.2. Les polyphénols

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'au fruits. Ils ne sont impliqués directement dans aucun processus métabolique et sont donc considérés comme des métabolites secondaires. Les tanins sont des composés polyphénoliques qui se subdivisent en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Ce sont ces derniers que l'on trouve dans les graines de céréales et de légumineuses, principalement localisés dans les téguments. Ces tanins jouent un rôle en tant que produits chimiques de défense et protègent la plante contre les attaques de prédateurs herbivores, de champignons pathogènes et de mauvaises herbes parasites. Mais si les tanins confèrent un avantage agronomique, il a été constaté qu'ils avaient des effets négatifs sur la qualité nutritionnelle des grains (Salunkhe *et al.*, 1982). En effet, les tanins se lient à la fois aux protéines exogènes et endogènes, y compris les enzymes du tube digestif, engendrant une diminution de l'utilisation des protéines (Papadopoulou et Frazier, 2004). De plus, certains polyphénols auraient la capacité de créer également des complexes avec certains cations, diminuant ainsi leur biodisponibilité (Gillooly *et al.*, 1984). Une description plus précise de la structure de ces composés et de leur activité anti-nutritionnelle est donnée dans le paragraphe 3.1.2.

Le tableau I-8 montre que le mil a une teneur en tanins relativement élevée (de 0,6 à 1,1%), bien que certaines variétés de sorgho, justement dites riches en tanins, puissent en contenir jusqu'à 10,3%. Aucune donnée n'a pu être trouvée quant à un éventuel effet des conditions de culture sur ces teneurs en tanins, mais, comme dans le cas du sorgho, il semble clair que ces teneurs varient selon les variétés.

1.4.8.3. Les inhibiteurs d'enzymes digestives

Toutes les graines végétales contiennent des inhibiteurs enzymatiques qui diminuent l'activité des enzymes digestives. Les plus néfastes sont les inhibiteurs trypsiques, mais il existe également des inhibiteurs d'amylases. Les inhibiteurs trypsiques sont des protéines capables d'inhiber des protéases à sérine comme la trypsine et la chymotrypsine. Ils agissent par la formation de complexes enzyme-inhibiteur irréversibles et il en résulte une hypertrophie du pancréas et une hypersécrétion des enzymes pancréatiques chez les petits animaux tels que la souris, le rat, le cobaye et le poulet (Besançon, 1994). L'importance nutritionnelle des inhibiteurs d'enzymes présents dans le mil n'est pas bien connue, mais des inhibiteurs d'amylases et de protéases y ont été identifiés (Pattabiraman, 1985).

Chandrasekher *et al.* (1981) ont mesuré une activité inhibitrice de l'amylase de la salive humaine uniquement dans certaines variétés de mil et de sorgho, indiquant le caractère variétal de cette activité. Ces inhibiteurs n'étaient pas dialysables et étaient inactivés par un traitement à la pepsine. Des études analogues menées sur des inhibiteurs de protéases ont montré que les variétés de mil indigène (*Paspalum scrobiculatum*), de mil commun (*Panicum miliaceum*) et de petit mil (*Panicum sumatrense*) ne présentaient aucune propriété inhibitrice des protéases, tandis que le mil chandelle, le mil des oiseaux (*Setaria italica*) et le moha du Japon (*Echinochloa colona*) présentaient une activité antitrypsique (Chandrasekher *et al.*, 1982).

1.5. Répartition des composés biochimiques dans les différentes structures du grain de mil

Les données concernant la répartition des composés biochimiques dans le grain de mil sont rares. Elles sont synthétisées dans les tableaux I-9 et I-10.

Comme dans toutes les céréales, le germe est la structure du grain de mil contenant les plus fortes teneurs en nutriments (protéines, lipides et cendres). C'est aussi dans le germe que se trouvent les protéines du type albumine et globuline, riches en lysine (Tableau I-9). Le rapport endosperme / germe élevé du mil explique donc la bonne valeur nutritionnelle de cette céréale.

D'après les travaux de Simwemba *et al.* (1984), bien que l'endosperme contienne des teneurs non négligeables en vitamines du groupe B, ces dernières sont surtout concentrées dans la couche à aleurone et le germe du grain de mil (Tableau I-10). L'enlèvement des enveloppes par décorticage risque donc de réduire de manière très importante les apports vitaminiques. La vitamine E n'a pas été localisée dans cette étude mais étant donné qu'il s'agit d'une vitamine liposoluble, elle devrait être majoritairement concentrée dans le germe.

Par ailleurs, le tableau I-10 montre que le germe, et dans une moindre mesure les enveloppes du grain de mil, sont également riches en phytates. Cependant, certains auteurs qui ont étudié l'effet du décorticage sur les teneurs en phytates ont montré que l'enlèvement des enveloppes du grain de mil entraînait des diminutions importantes des teneurs en phytates. Dans une étude sur deux variétés de mil non consacrée spécifiquement au décorticage, El Hag *et al.* (2002) ont reporté des réductions de teneur en phytates de 44 et 50% dans les grains décortiqués par rapport aux grains entiers. De même, Buerkert *et al.* (2001) ont évalué les teneurs en phytates dans les sons et grains décortiqués au mortier et au pilon de 30 variétés de mil et ont trouvé des teneurs en phytates 3 à 5 fois plus élevées dans les enveloppes que dans les grains. Il est toutefois difficile d'apporter des conclusions quant à la localisation des phytates à partir de ces travaux étant donné que les taux d'extraction des farines n'étaient pas précisés et qu'il est donc probable qu'une quantité importante de germe ait été retiré du grain en même temps que les enveloppes.

Tableau I-9. Composition biochimique des différentes structures du grain de mil

	Grain entier	Albumen	Germe	Sons *
% du grain entier	100	75,1 (73,9-76,2)	16,5 (15,5-17,4)	8,4 (7,2-10,6)
Protéines (g/100g MS)	13,3	10,9	24,5	17,1
% des protéines totales	100	59,5	31,2	9,4
Lipides (g/100g MS)	6,3	0,5	32,2	5,0
% des lipides totaux	100	6,2	87,8	5,9
Cendres (g/100g MS)	1,7	0,3	7,2	3,2
% des cendres totales	100	13,9	72,2	13,9
Acides aminés essentiels ^a				
Phénylalanine	5,5	5,5	4,4	4,3
Isoleucine	3,1	3,1	2,1	2,4
Leucine	9,6	11,2	6,5	7,1
Lysine	3,0	1,4	5,2	4,4
Méthionine	2,3	2,6	1,8	1,6
Thréonine	3,6	3,3	3,9	4,7
Valine	3,9	3,9	3,6	3,5

* Péricarpe + aleurone

^a Valeurs exprimées en g pour 100g de protéines

Source : Abdelrahman et al. (1984).

Tableau I-10. Teneurs en riboflavine, thiamine, niacine et phytates des différentes structures du grain de mil

	Grain entier	Albumen	Germe	Sons *
Riboflavine (mg/100 g) ^a	0,30	0,17	0,85	0,79
Thiamine (mg/100 g) ^a	0,55	0,36	0,77	0,78
Niacine (mg/100 g) ^a	4,42	1,98	8,03	7,07
Phytates (g/100 g) ^b	0,25	0,09	0,75	0,28

* Péricarpe + aleurone

^a Moyenne sur 3 variétés^b Résultats obtenus sur une variété

Source : Simwemba et al. (1984).

1.6. Procédés utilisés pour la transformation du mil en Afrique sahélienne

Il existe peu de produits industriels à base de mil et certains auteurs attribuent cela à la faible image de marque qui leur serait attribuée (Murty et Kumar, 1995). Les grains sont transformés au niveau des ménages ou de petits ateliers de production employant une à deux personnes. Les techniques utilisées et les savoir-faire sont traditionnels et déterminent les caractéristiques, notamment organoleptiques, particulières de ces produits. D'un pays à l'autre, en raison de préférences et de besoins communs, il existe peu de différences dans les recettes réalisées au niveau des ménages et des petites unités de production (Murty et Kumar, 1995). Les modes de préparation traditionnels ne sont pas standardisés et sont transmis par les femmes de génération en génération.

Le mil sert essentiellement à la préparation de mélanges à base de farine et d'eau, fermentés ou non, dont la consistance varie de la bouillie fluide jusqu'à des pâtes denses, couramment appelées « tô » et consommées en tant que plat principal accompagnées de sauce. La farine peut également servir à la préparation de couscous ou de galettes. Les grains, germés ou fermentés, vont aussi servir à la préparation d'une large gamme de boissons, alcoolisées ou non (Obilana, 2003).

Nous nous contenterons ici de donner un aperçu des procédés traditionnellement utilisés pour la transformation du mil en Afrique sahélienne en nous appuyant sur quelques exemples de produits largement consommés.

1.6.1. Fractionnement et fragmentation

En général, les grains de mil sont décortiqués partiellement ou totalement, avant transformation et consommation. Les grains entiers peuvent aussi être directement concassés ou broyés pour donner des brisures, des semoules ou des farines. La figure I-4 résume les différentes options utilisées traditionnellement pour obtenir des farines de mil.

Les farines vont permettre de préparer une large gamme de produits plus ou moins complexes et peuvent parfois être mélangées à d'autres farines, telles que des farines de blé, de riz ou de légumineuses, pour améliorer la texture des produits, leurs qualités organoleptiques ou encore leur valeur nutritionnelle. Des techniques de fractionnement mécaniques ont été développées pour aider ces transformations, mais pour des raisons socio-économiques ces technologies ne sont pas encore très répandues dans la plupart des pays où le mil est utilisé comme aliment de base.

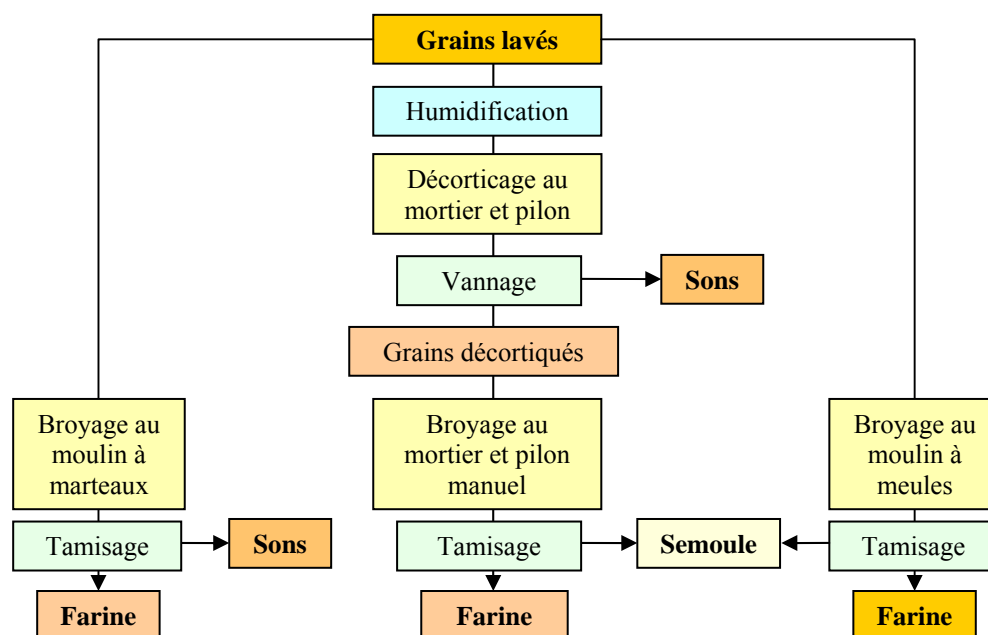


Figure I-4. Diagramme des procédés traditionnels utilisables pour la fabrication de farine de mil (Murty et Kumar, 1995).

1.6.1.1. *Décorticage*

Ce traitement de fractionnement joue un rôle important en dissociant des tissus de propriétés mécaniques, compositions et origines histologiques différentes. Ainsi, la première transformation des céréales sépare les enveloppes peu digestibles de l'albumen amylicé. La

grande plasticité des enveloppes est mise à profit lors de cette étape. Les fractions générées, de compositions biochimiques différentes, ont des qualités nutritionnelles distinctes.

Traditionnellement, ce procédé consiste en un pilage des grains, suivi d'un vannage (Figure I-4), mais, comme pour le broyage, il existe maintenant des décortiqueuses mécaniques dont l'utilisation se développe de manière assez importante dans certains pays d'Afrique Sahélienne. Il s'agit de décortiqueuses à meules abrasives qui ont l'énorme avantage d'être relativement peu coûteuses à installer et relativement simples à entretenir et à faire fonctionner (cf. Annexe 1). Quelle que soit la technique utilisée le grain est en général humidifié avant décortiquage, soit par addition d'environ 10% d'eau, soit par trempage toute la nuit, afin de faciliter l'élimination du son.

Un décortiquage idéal devrait permettre l'élimination totale des enveloppes tout en conservant la couche à aleurone riche en nutriments essentiels (Favier, 1989). Or, les différentes parties des grains sont abrasées à des rythmes très différents et il y a forcément des pertes d'endosperme, en particulier lorsque les grains sont endommagés, et même lorsque le grain n'est que légèrement abrasé. De plus, les grains de mil sont non sphériques et tendent à être abrasés beaucoup plus vite à certains endroits qu'à d'autres. La fraction de sons obtenue contient donc l'essentiel du péricarpe ainsi qu'une partie du germe et de l'endosperme. Cette fraction est généralement utilisée pour l'alimentation des animaux domestiques, tandis que la fraction de grains décortiqués, qui contient l'essentiel de l'endosperme et une grande partie du germe est conservée pour la consommation humaine.

Selon certains auteurs, la technique traditionnelle de décortiquage au mortier et au pilon permettrait d'obtenir un produit plus riche en nutriments essentiels et à teneur plus faible en fibres que la technique mécanisée (Reichert et Youngs, 1977). Mais l'efficacité du décortiquage est surtout conditionnée par la structure du grain et plus particulièrement par l'épaisseur du péricarpe et la texture de l'albumen. En effet, De Francisco *et al.* (1982) ont montré que le péricarpe des grains de mil se détachait en petits fragments à la jonction entre l'endosperme et la couche à aleurone, à l'opposé de celui des grains de sorgho qui était détaché en larges fragments à partir du mésocarpe, et ont attribué ce phénomène au péricarpe plus épais des grains de sorgho. Par ailleurs, les grains ayant une prépondérance d'endosperme cornu offrent un meilleur rendement de décortiquage que les grains à endosperme majoritairement farineux qui se cassent plus facilement (Murty et Kumar, 1995).

1.6.1.2. Broyage

La taille des particules de la fraction endosperme peut être réduite par broyage ou mouture pour produire des farines fines ou grossières. Dans un mode de préparation traditionnel utilisé dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie, le grain décortiqué est broyé en farine grossière, soit au mortier, soit entre des pierres. Le grain peut également être moulu grâce à des moulins mécanisés que l'on trouve maintenant dans de nombreux villages. Le grain est en général trempé dans l'eau avant d'être pilé, en général toute la nuit et parfois plus longtemps, ce qui permet de rendre l'albumen plus friable et le péricarpe plus élastique et ainsi de faciliter le broyage. Dans ce cas, de l'eau est généralement également ajoutée au cours du broyage et on obtient une pâte. Avec ce procédé de mouture humide, le rendement d'amidon est plus élevé avec les génotypes à endosperme tendre (farineux), tandis qu'avec une mouture sèche, le rendement de farine est plus élevé avec les endospermes de type corné.

Le type de moulin le plus généralement utilisé est le moulin à marteaux, car il s'agit du plus simple à employer, du moins cher à installer et qu'il est disponible dans toutes les dimensions. Il se compose de lames émoussées tournant rapidement dans un cylindre qui comporte un orifice couvert par un tamis dont la taille des trous détermine la taille des particules de la farine.

Les broyeurs à cylindres sont souvent les plus efficaces pour séparer les constituants des céréales. Pour la mouture industrielle du blé, le grain passe par une succession de broyeurs, dans lesquels deux types de cylindres sont utilisés : les cylindres cannelés qui séparent l'endosperme du péricarpe (en le coupant de l'intérieur), et les cylindres lisses, qui broient progressivement les morceaux d'endosperme en une farine de plus en plus fine. La technologie de mouture du blé convient pour moulin de grandes quantités de grain, mais elle exige d'importants investissements et une grande expérience du fonctionnement et de l'entretien de l'équipement. Pour toutes ces raisons, elle ne convient pas pour la mouture du mil qui est en général effectuée sur de très petites quantités, puisque non industrialisée. Les broyeurs à cylindres sont cependant très efficaces pour séparer la partie comestible du mil des déchets quelles que soient les caractéristiques physiques du grain.

Toutefois, pour résister au stress du broyage par cylindres, le péricarpe du mil doit être beaucoup plus humide que celui du blé. Quand le grain est sec, le péricarpe se brise en petits morceaux trop cassants pour permettre leur séparation de l'endosperme. Avec des techniques traditionnelles de trempage, Perten (1983) n'a pas pu réussir une séparation efficace des déchets du mil de l'endosperme. Il en a conclu que le sorgho et les mils étaient plus difficiles à moulin que le blé et qu'ils produisent une farine plus grossière et beaucoup plus sombre contenant des niveaux élevés de matière grasse et de cendres. L'utilisation de niveaux d'humidité beaucoup plus élevés que ceux qui sont utilisés pour le blé a été signalée pour la première fois par Abdelrahman *et al.* (1983). Le terme de mouture semi-humide a été adopté pour cette nouvelle technique. Le mil doit être conditionné avec environ 10% d'eau pendant 4 h avant qu'il ne soit prêt à être moulin. La mouture semi-humide présente plusieurs avantages, notamment une excellente séparation et la possibilité d'utiliser les équipements de mouture du blé existants sans avoir à modifier le montage des moulins. Des mélanges de mil, des variétés tendres, des grains mal formés et des mélanges avec d'autres grains (y compris du blé) peuvent tous être moulus ensemble si nécessaire. Le mouillage de l'endosperme l'attendrit de telle sorte qu'il faut très peu d'énergie pour le moulin. La mouture semi-humide a pourtant certains inconvénients. Bien qu'il ne soit pas très difficile ou très coûteux de sécher les produits de ce type de mouture à l'échelle industrielle, ils sont généralement trop humides pour pouvoir être stockés longtemps (croissance microbologique). De ce fait, la mouture semi-humide ne convient pas pour des transformations à petite échelle. Enfin, bien qu'on ait montré qu'il était possible de procéder à la mouture semi-humide du mil sans aucune difficulté à l'aide d'équipements industriels, la technique n'a pas encore fait ses preuves pendant une période prolongée (FAO, 1995).

1.6.1.3. Formes de consommation

Certains produits vont être préparés directement à partir des grains, semoules ou farines de mil, par cuisson sans intervention de procédé biologique. Il s'agit de formes de consommation de type riz (grains décortiqués bouillis), couscous (préparés à partir de la farine), ou de pâtes denses (« tô »). Ces produits constituent souvent les bases de nombreux plats familiaux consommés par des millions de personnes en Afrique de l'ouest. Le couscous est préparé à partir de fines particules de farine de grains décortiqués que l'on fait s'agglomérer par addition d'eau de manière à obtenir des granules d'environ 1,5 mm de diamètre. Le « tô » est particulièrement consommé en zone rurale et peut être à base de mil, de sorgho, de riz ou de maïs, selon les pays. Il est simplement préparé à partir de farine de grains décortiqués et d'eau (avec éventuellement ajout de cendres), mais le procédé de malaxage/cuisson nécessite un important savoir-faire.

1.6.2. Maltage

1.6.2.1. Description du mode de préparation du malt

Le maltage implique de faire germer le grain avec apparition d'une pousse. La germination des matières premières amylicées est un procédé traditionnellement utilisé dans de nombreux pays en raison du potentiel amylytique des farines qui en résulte (Mosha et Svanberg, 1983 ; Malleshi et Desikachar, 1988).

Les grains de sorgho, de mil ou d'autres céréales sont trempés dans l'eau, puis maintenus humides deux ou trois jours et enfin séchés, la plupart du temps au soleil. Les grains séchés sont alors dégermés puis écrasés au mortier et au pilon (Figure I-5).

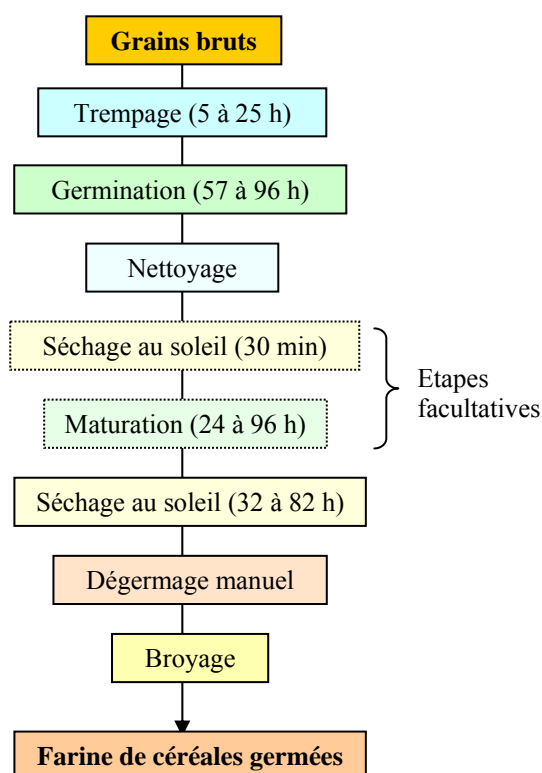


Figure I-5. Diagramme général de préparation de farine de céréales germées à Ouagadougou (Traoré *et al.*, 2004).

1.6.2.2. Utilisation des farines maltées

Cette farine peut être utilisée dans la préparation de bouillies consommées par les jeunes enfants comme aliment de complément. En effet, au cours du processus de germination, le grain produit des α -amylases qui, en hydrolysant l'amidon au cours de la cuisson de la bouillie, permettent de réduire la viscosité des bouillies. Après incorporation de farines maltées, il est donc possible de préparer des bouillies qui, tout en ayant la même consistance que les bouillies traditionnelles, peuvent avoir une teneur en matière sèche, donc une densité énergétique, nettement plus élevée que les bouillies traditionnelles. Ceci permet d'améliorer les ingérés énergétiques des jeunes enfants dans la mesure où le volume de bouillie qu'ils ingèrent est limité par leur capacité gastrique et le nombre de repas reçus par jour (Trèche, 1995 ; Capdevila *et al.*, 1998). Beaucoup de travaux ont été consacrés à l'étude des farines à

base de grains maltés afin d'améliorer la qualité nutritionnelle des aliments de complément, mais leur utilisation dans ce domaine reste cependant très limitée (Trèche et Mbome, 1999).

De plus, la germination permet d'améliorer la valeur nutritionnelle des farines à de nombreux niveaux : augmentation de teneurs en vitamines dont l'acide ascorbique (Malleshi et Desikachar, 1986 ; Chavan et Kadam, 1989), réduction des teneurs en certains facteurs antinutritionnels et donc augmentation de la biodisponibilité de certains nutriments (Sehgal et Kawatra, 1999).

Notons toutefois que le sorgho malté est traditionnellement utilisé dans plusieurs pays d'Afrique, mais toujours après élimination soigneuse des pousses et racelles qui contiennent de grande quantité de glucoside cyanogénétique qui après hydrolyse donne de l'acide cyanhydrique hautement toxique (Panasiuk et Bills, 1984).

La grande majorité de la farine de grains germés est utilisée pour la fabrication de bière locale.

1.6.3. Fermentation

La fermentation est également un procédé connu des sociétés traditionnelles et de nombreux types d'aliments fermentés sont préparés un peu partout en Afrique (Blandino *et al.*, 2003). La fermentation présente de nombreux avantages parmi lesquels : la réduction des risques de développement de microorganismes pathogènes par acidification du milieu, la dégradation de certains facteurs antinutritionnels (phytates, α -galactosides), le développement de qualités organoleptiques spécifiques par synthèse d'acides organiques et arômes (Nout, 1994 ; Nout et Sarkar, 1999).

1.6.3.1. *Utilisation en boulangerie*

La farine de mil peut être fermentée, en Inde ou en Afrique, pour préparer de nombreuses sortes de pains ou galettes. N'importe quelle farine de céréale peut être utilisée pour donner une pâte après addition d'eau, que l'on peut laisser fermenter ou non et que l'on fera ensuite frire pour obtenir les galettes. Le « *kisra* », aliment traditionnel de base au Soudan, est une galette préparée à partir de sorgho ou de mil (Murty et Kumar, 1995). Ce produit est appelé « *massa* » au Niger et simplement « *galette* » au Burkina Faso.

Par ailleurs, plusieurs études ont examiné la possibilité de faire du pain à l'aide de farines composées comprenant de la farine de sorgho ou de mil. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces farines ne présente pas de difficulté technique. Casey et Lorenz (1977) ont indiqué qu'un pain confectionné avec une partie de farine de mil présentait une texture excellente et un goût analogue à celui du pain de blé. Il reste cependant un point faible qui est la densité du pain, limitant à environ 10% le taux d'incorporation d'une farine autre que la farine de blé. L'utilisation de farine composée en boulangerie reste donc très limitée.

1.6.3.2. *Utilisation en brasserie*

Les bières traditionnelles africaines diffèrent des bières industrielles car elles sont généralement acides et ne contiennent pas de houblon. Elles ne sont pas raffinées après fermentation et contiennent donc des quantités élevées de substrats non fermentés ainsi que de microorganismes (Blandino *et al.*, 2003). On peut distinguer deux types de bières traditionnelles : les sucrées, relativement claires, non acides avec peu de matière, courantes en Afrique, et les acides, brunes, opaques, ressemblant à des bouillies fluides, plus communes dans le sud de l'Afrique (Murty et Kumar, 1995). La principale différence entre ces deux types de bière est la courte durée de fermentation lactique pour les moins acides.

Le sorgho et le mil conviennent tout à fait pour la fabrication de ces bières traditionnelles, qui sont des boissons populaires dans plusieurs pays d'Afrique. On les appelle « *chibuki* » au Zimbabwe, « *impeke* » au Burundi, « *dolo* » au Mali et au Burkina Faso et « *pito* » au Nigeria. Ces bières contiennent de fortes proportions d'amidon, de sucres, de protéines, de matières grasses, de vitamines et de minéraux (FAO, 1995).

1.6.3.3. Préparation de bouillies fermentées

La consistance des bouillies préparées traditionnellement en Afrique dépend essentiellement de leur mode de préparation, de leur teneur en matière sèche et de l'état de l'amidon, ces trois paramètres étant étroitement liés. Les bouillies de consistance fluide contiennent, soit peu de matière sèche, soit une source d'amylases (généralement du malt) (Ashworth et Draper, 1992). Bien qu'elle ait peu d'effet sur la viscosité des bouillies, la fermentation est utilisée dans les modes de préparation de nombreuses bouillies dans de nombreux pays d'Afrique, principalement en raison des arômes qu'elle permet de générer. « *L'ogi* » et le « *ben-saalga* » (ou « *ben-kida* »), par exemple, sont des bouillies fermentées fluides consommées en général au petit-déjeuner et faisant également office d'aliment de complément pour les jeunes enfants (Murty et Kumar, 1995). « *L'ogi* » est connu dans plusieurs pays d'Afrique de l'ouest (Bénin, Nigéria, Ghana), dans lesquels il est généralement préparé à base de maïs, mais peut également être fait à partir de farines de mil ou de sorgho. Au Burkina Faso, le « *ben-saalga* » et le « *ben-kida* » désignent des bouillies de mil fermentées traditionnellement fabriquées et particulièrement consommées en milieu urbain à Ouagadougou (Mouquet, 2003).

Les modes de préparation de « *l'ogi* » et du « *ben-saalga* » sont similaires, bien qu'il existe des différences dans les pratiques, les matériaux utilisés, ou encore, les durées appliquées aux différentes étapes. Le diagramme de préparation du « *ben-saalga* » est donné en figure I-6.

La préparation de ces bouillies comporte deux étapes de fermentation essentiellement lactique, intervenant successivement au cours du trempage des grains et de la décantation de la farine. Il existe une variante de ce produit, le « *ben-kida* », qui est un « *ben-saalga* » auquel sont ajoutées des granules préparées à partir de farine de mil (Figure I-6).

Bien que les modifications biochimiques apportées par la fermentation améliore la qualité nutritionnelle des produits céréaliers transformés, les bouillies obtenues traditionnellement présentent une grande variabilité, une densité énergétique encore trop faible et une qualité sanitaire parfois douteuse (Chavan et Kadam, 1988).

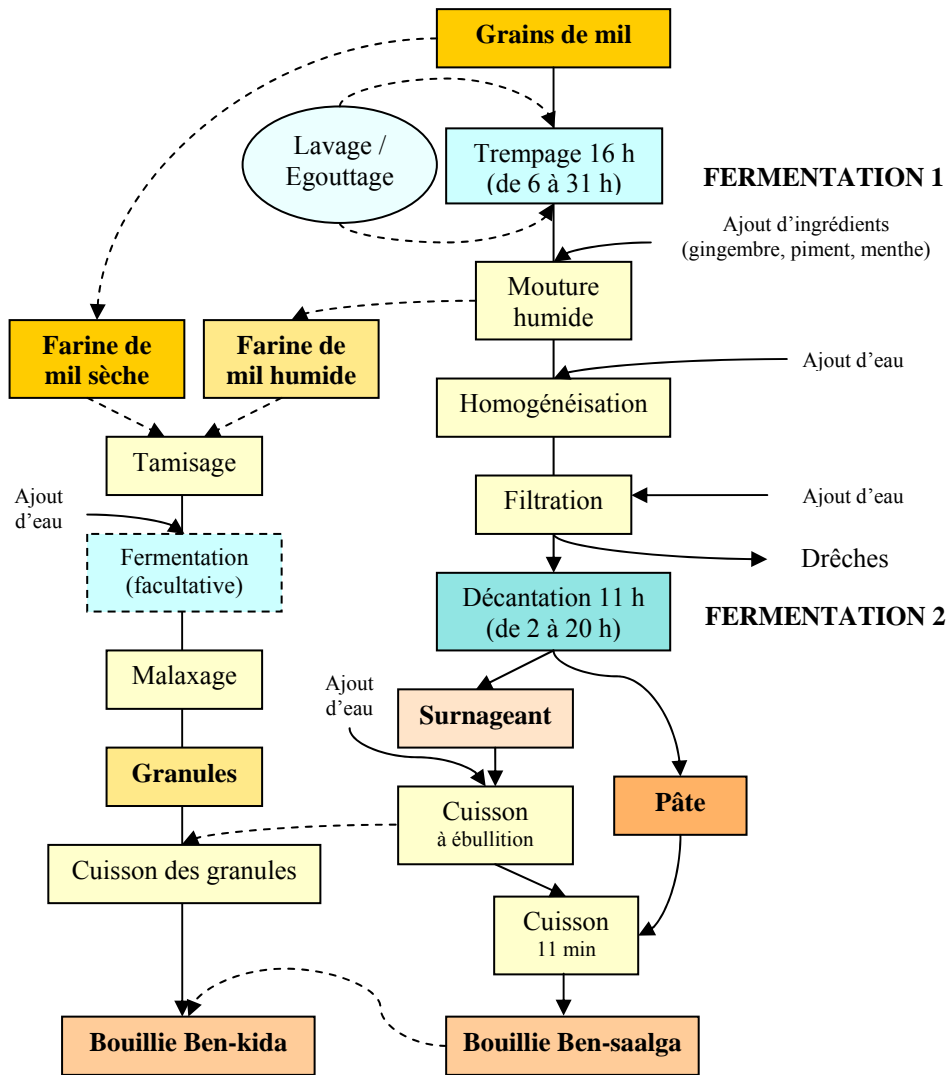


Figure I-6. Diagramme de préparation des bouillies de mil fermentées « *ben-kida* » et « *ben-saalga* » à Ouagadougou (D'après Mouquet, 2003).

2. Le fer et le zinc dans l'alimentation du jeune enfant

2.1. Importance métabolique

2.1.1. Fonctions dans l'organisme

2.1.1.1. *Le fer*

Dans l'organisme humain, bien que présent en très faible quantité (0,005% du poids corporel ce qui équivaut environ à 4,0 et 2,5 g respectivement chez l'homme et la femme adultes), le fer assure un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions vitales. Il sert de transporteur d'oxygène pour les différents tissus depuis les poumons par l'hémoglobine des cellules sanguines, il sert aussi de transporteur d'électrons au sein des cellules et fait partie des systèmes enzymatiques de différents tissus (synthèse d'hormones et d'acides biliaires,

détoxication par le foie, contrôle du signal de certains neurotransmetteurs). Il est présent dans l'organisme, soit sous forme héminique, soit sous forme non héminique, et il est réparti dans de nombreux tissus en fonction des réactions biologiques auxquelles il participe.

Le fer héminique représente 68 à 70% du fer total de l'organisme, où son rôle est principalement fonctionnel (Hercberg *et al.*, 1991). Le fer héminique est principalement présent dans l'hémoglobine des érythrocytes qui est une molécule composée de quatre unités, chaque unité contenant un groupement hème et une chaîne protéique. Dans les muscles, la myoglobine est une protéine de stockage de l'oxygène contenant également une grande proportion du fer de l'organisme, étant donné qu'elle a une structure similaire à celle de l'hémoglobine mais avec une seule unité hème.

Le fer non héminique, qui représente environ 30% du fer total de l'organisme, entre dans la composition de la ferritine, de l'hémosidérine ou d'enzymes non hémiques. La ferritine et l'hémosidérine stockent le fer, de manière réversible, principalement dans le foie. Enfin, environ 0,1% du fer est lié à la transferrine qui assure son transport dans le sang entre les différents organes.

2.1.1.2. *Le zinc*

L'organisme humain contient entre 2,0 et 2,5 g de zinc, principalement lié à des protéines. Le foie, organe clé dans la régulation du métabolisme du zinc, contient environ 5% du zinc total de l'organisme (Arnaud, 1995). Le zinc intervient dans l'activité de près de 300 enzymes, dans l'expression des gènes, dans la stabilisation des structures nucléiques, protéiques et hormonales et a également un important rôle antioxydant.

Les métalloenzymes à zinc appartiennent aux six classes d'enzymes (Vallee, 1995). Le rôle du zinc au niveau de ces enzymes peut être structural, régulateur, catalytique ou mixte. Le zinc intervient ainsi dans la plupart des métabolismes (glucides, lipides, protéines et acides nucléiques). Au niveau des hormones et des neurotransmetteurs, le zinc peut agir sur leur synthèse, leur sécrétion, leur activité, leur stabilité ou leur fixation tissulaire (Agett et Favier, 1993). Le zinc intervient dans le métabolisme des vitamines, en particulier du rétinol, de la vitamine B6 et des folates. Les protéines « à doigts de zinc » activent l'expression de nombreux gènes et sont impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire. Le zinc joue également un rôle important sur les fonctions de reproduction et de gestation, au niveau des fonctions sensorielles (gustation, vision) et du système immunitaire (Shankar *et al.*, 1998). Le rôle antioxydant du zinc s'exerce grâce à ses interactions avec les groupements thiols, à l'existence d'une compétition avec le cuivre et le fer, à l'induction des métallothionéines, à son action au niveau d'enzymes clés (superoxyde dismutase et NADPH oxydase) et à la stabilisation des membranes (Arnaud, 1995).

2.1.2. Conséquences des carences

2.1.2.1. *En fer*

Dans les pays du Nord, les hémorragies sont une des principales causes de carence en fer. En revanche, dans les pays du Sud, la carence en fer est majoritairement due à la malnutrition, les inflammations et les parasites intestinaux. La carence en fer est la principale cause d'anémie ferriprive. Le diagnostic de l'anémie se base sur la concentration en hémoglobine qui doit être supérieure à 12 et à 14 g/100ml, respectivement chez la femme et l'homme (FAO/WHO, 2002a). Il s'agit d'un concept peu précis qui n'a pas forcément de conséquence physiologique pour un sujet donné, étant donné que la concentration en hémoglobine d'un sujet en bonne santé peut être très variable (de 12 à 16 g/100ml pour la femme et de 14 à 18 g/100ml pour

l'homme). La carence en fer, en revanche, est définie comme une absence de réserve de fer, combinée à des signes de déficience de l'érythropoïèse, ce qui implique un approvisionnement insuffisant en fer des différents tissus. Elle est diagnostiquée à des concentrations en ferritine sérique inférieures à 15 µg/l (FAO/WHO, 2002a), seuil en dessous duquel le fer ne peut plus être mobilisé à partir des réserves et des quantités insuffisantes de fer sont amenées à la transferrine, la principale protéine de transport du fer. Les sites de liaison du fer sur la transferrine contiennent de moins en moins de fer, ce qui est décrit par une diminution de la saturation de la transferrine. Lorsque la saturation de la transferrine chute en dessous d'une certaine valeur critique, les précurseurs des érythrocytes, qui ont besoin de fer pour la formation de l'hémoglobine, ne sont plus suffisamment approvisionnés. De même, les autres tissus sont touchés par ce manque d'apport en fer par la transferrine. Les cellules du foie recevant moins de fer synthétisent plus de transferrine, conduisant à une forte augmentation de la concentration en transferrine dans le plasma. Les cellules qui ont le plus fort taux de renouvellement, comme les cellules intestinales, sont les premières à être affectées. Le complexe fer-transferrine se lie aux récepteurs membranaires des cellules des différents tissus avant d'y être intégré. Cette entrée du fer dans les cellules semble être liée à la saturation de la transferrine et au nombre de récepteurs à transferrine à la surface des cellules. Par ailleurs, il existe une forte variation diurne du taux de saturation de la transferrine, en raison d'un fort taux de renouvellement du fer dans le plasma, et ceci rend très difficile l'évaluation du statut en fer à partir d'une seule détermination du taux de saturation de la transferrine.

Chez les nourrissons et les jeunes enfants, la carence en fer provoque des troubles de l'attention, de la mémoire et des capacités d'apprentissage pour lesquels l'administration de fer n'a aucun effet. L'approvisionnement des cellules du cerveau en fer se déroule principalement au début de son développement et une carence précoce peut causer des dommages irréversibles de ses cellules (FAO/WHO, 2002a). La prévention de l'apparition de cette carence dès le plus jeune âge est donc primordiale.

La carence en fer influence également négativement le système immunitaire, en raison d'une diminution du nombre de lymphocytes T et d'une diminution de la phagocytose. Le faible nombre de lymphocytes est dû à l'inhibition de la synthèse d'ADN qui dépend de l'activité de la ribonucléotide réductase nécessitant du fer. La phagocytose, qui permet la lutte contre les infections en détruisant les bactéries responsables, est également diminuée en raison des activités enzymatiques dépendantes du fer qu'elle implique (NADPH oxydase, cytochrome b) (FAO/WHO, 2002a). Les défenses immunitaires des sujets carencés peuvent être ramenées à la normale en 4 à 7 j grâce à l'administration de fer. Cependant, il est difficile de démontrer que la prévalence ou la sévérité des infections est plus élevée chez les sujets carencés que chez les sujets normaux.

2.1.2.2. En zinc

Plusieurs études ont mis en évidence la responsabilité de la carence en zinc en matière de retard de croissance et également de risque sévère de maladies infectieuses (Simmer *et al.*, 1988 ; Black, 1998). Les carences en zinc sont associées à de nombreuses pathologies (rénales, digestives, inflammatoires, infections, diabète...). Lorsqu'elle est très sévère, la carence en zinc entraîne une maladie aiguë caractéristique : l'acrodermatie entéropathique. Cette maladie est caractérisée par un tableau clinique varié dû aux nombreuses fonctions du zinc. Elle provoque souvent une diarrhée de gravité variable associée à des lésions cutanées péri-orificielles ou au niveau des extrémités. Parmi les autres signes figurent une difficulté de cicatrisation des plaies, une anorexie associée à des troubles du goût et de l'odorat, des troubles de la vision et des lésions oculaires, des troubles de la calcification, des troubles

neurologiques, un retard de la maturation sexuelle chez l'adolescent, un retard de croissance chez l'enfant et une perte de poids, une immunodépression associée à une susceptibilité accrue aux infections et aux tumeurs.

2.1.3. Métabolisme

2.1.3.1. *Le fer*

Le fer de l'organisme est en renouvellement permanent et son métabolisme s'effectue quasiment en circuit fermé. Le fer ayant servi à la synthèse de l'hémoglobine est récupéré après la destruction des globules rouges puis recyclé. Les quantités de fer éliminées sont d'environ 1 à 2 mg par jour, ce qui ne représente que 1/1000 à 1/4000 du pool total de l'organisme (Hercberg, 1995).

L'étape préliminaire à l'absorption du fer est sa solubilisation qui va dépendre de la forme sous laquelle se trouve le fer. Le fer non héminique représente environ 90% du fer ingéré dans le cas d'une alimentation variée de type occidental, 60% du fer contenu dans les tissus animaux et 100% du fer des tissus végétaux (Beard *et al.*, 1996). Contrairement à sa forme héminique, la forme non héminique du fer alimentaire n'est pas directement absorbable. Au niveau de l'estomac, les sécrétions acides et la pepsine permettent de libérer le fer non héminique lié aux protéines, ou aux autres constituants de la matrice alimentaire, et favorisent la solubilisation du fer en le réduisant de l'état ferrique à l'état ferreux. Ces deux formes d'oxydation du fer peuvent être absorbées de façon équivalente, mais les ions ferriques, qui précipitent plus facilement que les ions ferreux, sont moins solubles et donc moins facilement absorbables au pH intestinal.

L'absorption du fer s'effectue principalement dans le duodénum et dans le jéjunum (Parkkila *et al.*, 2001) et décroît de la partie proximale à la partie distale de l'intestin. Le fer solubilisé à partir des aliments est absorbé par les entérocytes matures situés au sommet de la villosité intestinale. Il entre alors dans le pool cellulaire et pourra être soit stocké dans l'entérocyte sous forme de ferritine, soit exporté dans le plasma au niveau de la membrane basolatérale (Parkkila *et al.*, 2001). Le processus d'absorption du fer, héminique ou non, passe par trois étapes qui sont : (1) sa fixation sur l'entérocyte, (2) son transport et son stockage à l'intérieur de l'entérocyte et (3) son transfert dans le plasma. Après sa réduction de l'état ferrique à ferreux par une réductase membranaire, le fer non héminique est transporté à travers la membrane par un transporteur spécifique aux cations divalents. Le fer héminique, en revanche, est transporté en l'état à travers la membrane apicale de l'entérocyte, par des mécanismes moléculaires encore inconnus (Parkkila *et al.*, 2001). Dans le cytoplasme, le fer non héminique est ensuite dirigé vers le pôle basolatéral par un transport vectoriel dont le mécanisme reste inconnu, tandis que l'hème est dégradé par l'hème oxygénase avec libération du fer. Une partie de ce fer réduit, d'origine héminique ou non, est stocké sous forme de ferritine avant d'être éliminé par desquamation des entérocytes matures ou de rejoindre le pool de fer plasmatique via le pôle basolatéral des entérocytes. La majeure partie du fer est exportée vers le plasma par la ferroportine. Puis, dans le plasma, le fer ferreux est réoxydé et s'associe avec la transferrine plasmatique.

Le pool de fer de l'organisme est généralement bien contrôlé grâce à des procédés de régulation de son absorption. Ainsi, l'absorption du fer diminue quand les réserves sont adéquates et, inversement, augmente lorsque les réserves deviennent insuffisantes. Cette régulation est assurée par les cellules de la crypte qui prennent l'information concernant les stocks en fer de l'organisme au contact du sang circulant. Ainsi, au cours de leur migration le long de la villosité intestinale jusqu'au sommet de celle-ci où aura lieu l'absorption, ces cellules se différencient et expriment les protéines de capture (DMT1) et de transfert

(ferroportine¹) du fer, à un niveau variable suivant les besoins de l'organisme (Beaumont, 2004). Ceci s'effectuerait sous le contrôle des « store regulator » (régulateur des réserves en fer) et « erythropoietic regulator » (régulateur de l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse). Bien que le mécanisme exact du « store regulator » ne soit pas connu, il impliquerait des facteurs solubles tels que le fer lié à la transferrine, la ferritine sérique, les récepteurs de transferrine sérique et l'hepcidine. L'« erythropoietic regulator » serait également composé de molécules solubles du plasma, mais différentes de celles du « store regulator ». Les protéines HFE et l'hepcidine interviendraient de façon prépondérante dans ces deux types de régulation, bien qu'avec des mécanismes encore mal connus. L'hepcidine pourrait avoir un effet direct sur l'activité d'exportation du fer, ou un effet indirect, en modulant l'expression des protéines de transport. En cas de carence en fer, la production d'hepcidine serait inhibée, entraînant une augmentation de l'absorption du fer par le duodénum. Des découvertes récentes laissent penser que la protéine HFE participerait à la régulation de l'hepcidine (Beaumont, 2004). Cette protéine s'associerait avec le récepteur de la transferrine, facilitant l'endocytose du complexe fer-transferrine et modulant la quantité de fer reçue par les cellules. A côté de ces facteurs de régulation circulants, qui maintiennent l'homéostasie du fer au niveau de l'organisme, il existe, au niveau des cellules, des systèmes protéiques associant l'IRE (*Iron Responsive Element*) et l'IRP (*Iron Regulatory Protein*), qui leur permettent de maîtriser la quantité de fer entrant et de l'orienter si nécessaire vers la ferritine afin de protéger la cellule d'un effet délétère d'un excès de fer cytosolique (Loréal et Brissot, 2003).

2.1.3.2. Le zinc

Le zinc serait absorbé essentiellement au niveau de la bordure en brosse du jéjunum (bien que cette localisation demeure controversée), tant par voie active que par diffusion (Camara et Amaro, 2003). La voie d'absorption active est saturable aux fortes concentrations en zinc dans la lumière intestinale. La seconde voie d'absorption est un procédé non saturable, qui dépend du gradient de concentration du zinc. L'absorption active du zinc serait réalisée par le biais d'un transporteur de cations divalents au niveau de la bordure en brosse. Il y aurait donc une compétition entre les différents cations, ce qui expliquerait que la présence de calcium, fer, cuivre, magnésium ou manganèse inhibe l'absorption du zinc (Camara et Amaro, 2003). L'absorption du zinc varie également en fonction du statut en zinc de l'individu, de la teneur en zinc du régime et surtout de la composition du régime. Au cours d'une étude clinique, Ziegler *et al.* (1989) ont montré que les pourcentages de zinc absorbé étaient supérieurs chez les enfants ayant reçu précédemment des régimes avec de faibles teneurs en zinc. Certains composés, tels que l'acide picolinique sécrété par le pancréas, la vitamine B6 qui augmente les sécrétions d'acide picolinique, l'acide citrique et certains acides aminés (lysine, cystéine, histidine et méthionine), facilitent l'absorption du zinc (Turnlund *et al.*, 1991 ; Sandstead et Smith, 1996 ; Salgueiro *et al.*, 2000). En revanche, d'autres facteurs du régime vont pouvoir former des complexes insolubles avec le zinc, diminuant ainsi sa biodisponibilité (Sandström, 1997).

Après avoir été absorbé, une partie du zinc est utilisée par la cellule intestinale et la partie non utilisée *in situ* est, soit excrétée par la membrane basolatérale, soit fixée sur des protéines de petit poids moléculaire, les métallothionéines, qui jouent un rôle régulateur en modifiant la vitesse d'excrétion du zinc.

Le transport plasmatique du zinc est assuré par plusieurs vecteurs. La sérumbalbumine transporte environ 60 à 65% du zinc sérique total. L' α -2 macroglobuline fixe environ 20% du zinc et cette fraction est peu affectée par les variations de concentrations en zinc sérique total et est peu disponible pour les tissus. Enfin, environ 12% du zinc serait lié à la transferrine de façon très labile, d'où une très grande disponibilité de ce métal pour les tissus demandeurs de

zinc (Arnaud, 1995). Ainsi, une expérience sur des hommes nourris avec des régimes à faible teneur en zinc a montré que le niveau de zinc circulant et les activités des enzymes contenant du zinc pouvaient être maintenus à des valeurs normales pendant plusieurs mois, prouvant l'efficacité du maintien de l'équilibre homéostatique du zinc (Lukaski *et al.*, 1984).

En ce qui concerne son excrétion, la voie fécale est prépondérante dans les conditions physiologiques. Le zinc fécal (environ 10 mg/j) correspond au zinc non absorbé (67%) des aliments et à du zinc endogène (33%). L'excrétion fécale participe de façon importante à la régulation de l'homéostasie zincique. L'élimination rénale ne représente qu'environ 5% des apports quotidiens normaux. Le zinc filtré au niveau glomérulaire (2 mg/j) est réabsorbé au niveau du tubule distal et réexcrété au niveau proximal. Les métallothionéines rénales seraient un mécanisme de défense contre les fuites de zinc dans les urines. Les autres fluides corporels (sueur, desquamation, sperme, lait) sont également des voies importantes d'élimination du zinc (Arnaud, 1995).

2.2. Biodisponibilité

2.2.1. Définition

La biodisponibilité d'un nutriment contenu dans un aliment est la proportion de ce nutriment qui est effectivement utilisable pour assurer les fonctions de l'organisme. Trois phénomènes entrent en jeu : (i) l'absorption par les cellules de l'intestin, (ii) le transport vers les organes et (iii) l'utilisation par l'organisme. La biodisponibilité d'un minéral varie, non seulement en fonction de l'aliment ingéré, mais aussi en fonction des conditions physiologiques propres à l'individu qui consomme l'aliment (statut en ce minéral, état de santé, sécrétions et pH gastriques, durée du transit) (Benito et Miller, 1998 ; Hallberg et Hulten, 2002). Reddy *et al.* (2000), qui ont étudié les déterminants de la biodisponibilité du fer dans des régimes complets, ont montré que les facteurs diététiques n'influaient que pour une faible part sur la quantité de fer absorbée (environ 16%), qui était majoritairement dépendante de facteurs physiologiques propres aux individus. Ce résultat est cependant à prendre avec précaution étant donné que certains facteurs, tels que les fibres n'ont pas été pris en compte pour la construction du modèle et que les régimes étaient en grande majorité de type occidentaux et contenaient donc, pour la plupart, de fortes proportions de tissus animaux et peu de phytates (de 15 à 291 mg/repas). Dans les pays en développement, la biodisponibilité n'en demeure pas moins un paramètre majeur dans l'apparition des carences en fer et en zinc dont les fortes prévalences sont moins dues à des apports alimentaires insuffisants qu'à de faibles biodisponibilités de ces minéraux (Van Dokkum, 1992).

L'absorption d'un nutriment apporté par l'alimentation est définie comme le pourcentage de ce nutriment qui, après digestion, traverse la muqueuse intestinale et passe dans le sang (Van Dokkum, 1992). Les facteurs alimentaires pouvant influencer l'absorption d'un minéral sont sa valence, sa teneur et la présence de composés activateurs ou inhibiteurs. Les constituants du régime qui vont améliorer l'absorption des minéraux, et donc leur biodisponibilité, forment généralement des composés solubles avec les minéraux. Ce complexe minéral-activateur peut alors (i) être absorbé sous cette forme, (ii) être hydrolysé de manière à libérer l'élément minéral sous une forme soluble, ou (iii) transférer l'élément à un accepteur sérique ou à un accepteur de la muqueuse. Les constituants du régime qui diminuent l'absorption des minéraux, en revanche, forment des complexes qui sont, soit insolubles, soit solubles, mais qui ne peuvent ni être absorbés sous cette forme, ni être hydrolysés (House, 1999). Ces facteurs alimentaires ont une influence certaine sur l'absorption du fer et du zinc, mais il est très difficile d'évaluer la contribution relative de chacun d'entre eux en raison des nombreuses interactions possibles entre les différents composés de la matrice alimentaire.

2.2.2. Méthodes d'évaluation

Il existe un grand nombre d'approches pour estimer la biodisponibilité du fer et du zinc dans les aliments. Les méthodes peuvent être divisées en deux groupes : les méthodes *in vivo*, qui vont pouvoir être appliquées, soit chez l'homme, soit chez les animaux, et les méthodes *in vitro* qui simulent, de manière plus ou moins sophistiquée, les conditions physiologiques de la digestion. Un autre moyen consiste à utiliser des calculs prédictifs décrits dans la littérature. La méthode à adopter pour une étude doit être choisie en prenant en compte les ressources disponibles (financières, matérielles), les considérations éthiques et, surtout, la nature et l'objectif de l'étude (étude de la biodisponibilité dans un aliment, dans un régime complet ou comparaison des effets de procédés technologiques).

2.2.2.1. *Méthodes in vivo*

Modèles animaux

Les mesures du taux d'hémoglobine se sont révélées fiables pour comparer l'efficacité relative de différentes sources de fer chez des rats anémiés (Forbes *et al.*, 1989). Cependant, le fer, et probablement d'autres minéraux tels que le zinc, sont relativement mieux absorbés chez le rat que chez l'homme, notamment lorsque le fer a une biodisponibilité faible dans l'aliment (Reddy et Cook, 1991). En effet, les rats possèdent une phytase intestinale dont l'activité est au moins 30 fois supérieure à celle de l'homme (Iqbal *et al.*, 1994), ce qui permettrait d'expliquer en partie qu'ils absorbent mieux le fer des régimes riches en phytates. Le modèle animal n'est donc pas adapté à l'étude de l'absorption des minéraux dans le cas d'aliments ou de régimes à base de céréales ou de légumineuses riches en phytates.

Essais cliniques

Parmi les méthodes *in vivo* réalisées chez l'homme, on peut distinguer la méthode des bilans entrées-sorties et des méthodes plus précises basées sur l'utilisation de traceurs. Elles ont été largement utilisées pour étudier l'influence de certains facteurs, tels que la présence dans le régime de tissus ou de protéines animales, sur l'absorption des minéraux (Turnlund *et al.*, 1982 ; Ferguson *et al.*, 1989 ; Siegenberg *et al.*, 1991 ; Hurrell *et al.*, 1992). La fiabilité de ces essais cliniques a nettement augmenté avec l'utilisation des marqueurs isotopiques extrinsèques (ajoutés à l'aliment ou au repas) et le développement de méthodes de double marquage dans lesquelles les composés marqués n'interagissent pas (Abrams *et al.*, 2002). Elles n'en demeurent pas moins coûteuses en terme de matériels (consommables, analyses, équipements) et nécessitent la participation d'un nombre suffisant de volontaires. Par ailleurs, les résultats des études cliniques doivent être comparés avec précaution. En effet, leur interprétation varie selon que l'étude a concerné l'absorption des minéraux d'un régime complet ou d'un repas simple et, dans ce dernier cas, l'interprétation dépendra également du reste de l'alimentation, à savoir si celle-ci a été imposée par l'expérimentateur ou a été laissée au choix des sujets (Hunt, 2001). En raison de l'importance du reste de l'alimentation dans le cas des études de repas simples, les essais cliniques semblent plus adaptés à l'étude de régimes complets (Cook et Reddy, 2001). Concernant l'étude des effets de composés susceptibles d'inhiber ou d'activer l'absorption des minéraux, de même que pour ceux de procédés technologiques, il est également reconnu que le nombre d'échantillons nécessaires rend irréalisable ce genre d'essais et que les méthodes *in vitro* sont préférables (Reddy *et al.*, 2000). Enfin, notons que les différences de métabolisme et de besoins en fer et en zinc entre les adultes et les enfants supposent que, dans le cas de l'étude de la qualité nutritionnelle d'aliments de complément, les essais doivent être réalisés sur des sujets enfants, ce qui, bien

que réalisable avec l'utilisation d'isotopes stables, reste peu pratiqué (Fairweather-Tait, 1995).

2.2.2.2. Méthodes *in vitro*

Concrètement, il est impossible de simuler les facteurs physiologiques qui influent majoritairement sur l'absorption des minéraux. Ainsi, la valeur d'une « biodisponibilité » déterminée *in vitro* ne doit pas être considérée comme une estimation de la véritable biodisponibilité d'un nutriment dans un aliment. En revanche, ces méthodes permettent de travailler sur un nombre d'échantillons beaucoup plus important que les méthodes *in vivo* et peuvent donc permettre de classer, soit différents aliments, soit des aliments ayant subi différents traitements, en fonction de leur biodisponibilité afin d'évaluer les effets, soit de la présence de certains composés (activateurs ou inhibiteurs de la solubilité des minéraux et donc de leur absorption intestinale potentielle), soit de procédés technologiques. Les principales méthodes *in vitro* utilisées pour évaluer l'absorption sont la détermination : (i) de l'extractabilité HCl, (ii) du pourcentage d'élément dialysable ou soluble après digestion *in vitro* et (iii) de la quantité d'élément absorbée ou transportée par le modèle de cellules Caco-2 après digestion *in vitro*.

Extractabilité HCl

Cette méthode simule les conditions de pH et de température de l'estomac en procédant à une hydrolyse des aliments durant 3 h dans une solution d'acide chlorhydrique (0,03 N) à 37°C, suivie d'une filtration. Elle a été utilisée durant de nombreuses années pour évaluer l'impact de procédés sur la biodisponibilité des minéraux (Khetarpaul et Chauhan, 1989 ; Sharma *et al.*, 1997 ; Usha Anthony et Chandra, 1998 ; Duhan *et al.*, 1999 ; Duhan *et al.*, 2002). Il s'agit d'une méthode peu coûteuse et simple, mais ces résultats ne sont pas corrélés à ceux donnés par les essais cliniques ou par d'autres méthodes *in vitro* plus élaborées (Forbes *et al.*, 1989). En effet, les interactions entre facteurs anti-nutritionnels et minéraux étant étroitement liées aux conditions de pH (cf. paragraphes 3.1.1.2 et 3.1.3.2), c'est le passage à un pH neutre au cours de la digestion intestinale qui détermine si l'élément sera soluble ou non au moment où il sera en contact des entérocytes. Les résultats de solubilités du manganèse et du zinc sont ainsi diminués de plus de moitié entre une digestion gastrique simple et une digestion gastrique suivie d'une digestion intestinale (Hocquelliet et L'Hotelier, 1997).

Digestibilité in vitro

Comme indiqué précédemment, les méthodes de digestion *in vitro* vont donc comprendre deux étapes principales : l'une simulant la digestion gastrique généralement à pH 2 avec ajout de pepsine et l'autre la digestion intestinale par ajustement du pH à 7 en présence de pancréatine et d'extrait de bile. Le pourcentage de minéraux assimilables peut ensuite être déterminé de deux manières, soit après dialyse, soit après centrifugation.

Étant donné la complexité du processus de digestion (nature des enzymes et des solutés, niveau de pH, durée des étapes), il doit exister à peu près autant de méthodes de digestion *in vitro* que d'auteurs les utilisant. En effet, la méthode initialement décrite par Miller *et al.* (1981) a sans cesse été modifiée dans les travaux plus récents. Wolters *et al.* (1993) ont proposé une méthode de dialyse en continu dans laquelle les minéraux dialysables sont continuellement retirés du système afin de simuler l'absorption par les cellules intestinales. Cependant, les résultats obtenus avec cette méthode ne montrent aucune différence significative avec ceux obtenus par la méthode de Miller. Wolfgor *et al.* (2002) ont réalisé plusieurs expériences montrant l'importance des solutions utilisées pour atteindre les pH

gastriques et intestinaux et préconisent l'utilisation d'un tampon pour obtenir un pH plus stable et donc des résultats plus répétables.

L'étape de dialyse a également été remise en question et remplacé par une simple centrifugation (Bermejo *et al.*, 2002). Une étude précédente destinée à comparer ces deux méthodes a montré que les variations des biodisponibilités estimées du fer et du zinc dues à des traitements technologiques étaient comparables avec les deux méthodes et que la centrifugation, plus facile à mettre en œuvre, permettait d'obtenir des résultats plus répétables (Grefeuille, 2002).

Par ailleurs, certains auteurs ont adapté la méthode de Miller au pH gastrique du nouveau né, qui est de 5, afin d'estimer la biodisponibilité des minéraux dans le lait maternel ou maternisé (Lönnerdal *et al.*, 1993 ; Bermejo *et al.*, 2002). Ces auteurs ont cependant réalisé en parallèle les digestions gastriques aux pH habituellement utilisés et ont ainsi montré qu'il n'y avait pas de différence majeure due au changement de pH. Notons, par ailleurs, qu'il existe peu de données sur l'évolution du pH gastrique des jeunes enfants.

Les estimations réalisées à partir des méthodes de digestion *in vitro* sont donc très variables et peu comparables d'une étude à l'autre. Cependant, ce sont de bons indicateurs de l'effet de procédés ou de composés sur la solubilité des minéraux et/ou leur capacité d'absorption au niveau de l'intestin selon la méthode utilisée. Par ailleurs, certaines études reportent qu'il existe de bonnes corrélations entre les résultats de ces méthodes et les études cliniques (Schricker *et al.*, 1981 ; Hurrell *et al.*, 1988 ; Forbes *et al.*, 1989).

Absorption par le modèle cellulaire Caco-2 (ex vivo)

La mesure des quantités de minéraux captés par des cellules vivantes à partir d'un aliment ayant subi une digestion *in vitro* permet d'obtenir un modèle plus proche de la réalité. L'estimation de la quantité de fer absorbée par les cellules intestinales après digestion *in vitro* a été proposée par Gangloff *et al.* (1996). Les cellules Caco-2 sont des cellules d'origine humaine (carcinome colique) qui possèdent de nombreuses caractéristiques des cellules de l'épithélium intestinal et capables d'absorber les minéraux selon les mêmes modalités que les entérocytes. En effet, les cellules Caco-2 en culture ont la propriété de se différencier et de se polariser spontanément lorsqu'elles atteignent la confluence, formant ainsi une bordure en brosse comparable à celle de la muqueuse intestinale (Pinto *et al.*, 1983). Des améliorations ont ensuite été apportées à cette technique, notamment avec la mesure de la ferritine formée dans les cellules à partir du fer absorbé, évitant l'utilisation d'isotopes radioactifs. En effet, la formation de ferritine dans les cellules Caco-2 est proportionnelle à la quantité de fer prélevée dans le milieu (Glahn *et al.*, 1998). Ce modèle a récemment été utilisé pour montrer l'inhibition de l'absorption du fer par les phytates, les tanins et le chlorure de zinc (Glahn *et al.*, 2002). Les cellules Caco-2 ont également été utilisées pour estimer le transport à travers la monocouche cellulaire d'autres minéraux tels que le zinc ou le magnésium (Reeves *et al.*, 2001 ; Planes *et al.*, 2002).

2.2.2.3. *Estimations indirectes*

Il existe deux types d'estimation indirecte de la biodisponibilité du fer et du zinc. La première, la détermination des rapports molaires phytates / minéraux, est une estimation très simple qui repose sur des données obtenues sur modèle animal. Elle est généralement utilisée pour estimer la biodisponibilité du zinc. La seconde consiste à l'application de modèles prédictifs de l'absorption du fer qui ont été déterminés à partir de résultats d'études cliniques prenant en compte les aliments ingérés par les sujets, soit au cours d'un repas, soit au cours de la journée.

Les rapports molaires phytates / minéraux

Des études ont mis en relation l'absorption du fer et du zinc chez des rats recevant des quantités de phytates et/ou de minéraux différentes de manière à obtenir des rapports molaires phytates/fer (Phy/Fe) et phytates/zinc (Phy/Zn), ou encore (phytates*calcium)/zinc (Phy*Ca/Zn) variables. Le calcul du rapport Phy*Ca/Zn est utilisé dans certaines études, lorsque les teneurs en calcium sont relativement élevée, pour prédire la biodisponibilité du zinc en tenant compte de l'effet aggravant de la concentration en calcium qui, lorsqu'elle est élevée, favorise la précipitation des phytates et des minéraux qui y sont liés au pH intestinal (Gibson *et al.* 1998 ; Lönnerdal, 2000).

Davies et Olpin (1979) ont été les premiers à relier le rapport Phy/Zn à l'absorption du zinc. Dans leur étude, les rats recevaient une solution minérale avec des concentrations variables soit en phytates, soit en zinc, et ils ont montré que l'absorption du zinc était inhibée pour des valeurs du rapport Phy/Zn supérieures à 10-15. Fordyce *et al.* (1987) ont ensuite déterminé une valeur seuil pour le rapport molaire (Phy*Ca/Zn) qui diminuait l'utilisation du zinc pour des valeurs supérieures à 3,5 chez le rat. Dans l'étude de Saha *et al.* (1994), les rats étaient nourris avec des farines de blé contenant du fer, du zinc et du calcium marqués et des teneurs variables en phytates obtenues, soit à partir de grains cultivés avec différentes concentrations en phosphore, soit après déphytinisation enzymatique des farines. Ils ont également montré que les rapports Phy/Zn supérieurs à 15 diminuaient l'absorption du zinc et ce seuil correspondait à un rapport molaire (Phy*Ca/Zn) de 0,13. Dans le même temps, ils ont aussi évalué que l'absorption du fer diminuait pour des rapports Phy/Fe supérieurs à 14.

L'efficacité de ces rapports pour prédire la biodisponibilité des minéraux est toutefois mise en doute. Il apparaît, en effet, que les rapports Phy/Zn et Phy*Ca/Zn ne permettent pas d'obtenir de meilleures corrélations que les teneurs en phytates elles-mêmes (Saha *et al.*, 1994). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas de stoechiométrie fixe entre l'acide phytique et un minéral particulier, ou encore que les sécrétions digestives peuvent diluer ces rapports (Weaver et Kannan, 2002). Par ailleurs, ces rapports ont été reliés à des données d'absorption réalisées chez le rat, or comme cela a été mentionné précédemment, le rat possède une forte activité phytasique intestinale et n'est donc pas un bon modèle pour évaluer l'effet des phytates. Malgré tout, ces rapports sont utilisés dans de nombreuses études car ils constituent un indicateur simple à déterminer parallèlement à la teneur en phytates.

Les modèles prédictifs

Les rapports molaires présentés précédemment partent de l'hypothèse que la quasi-totalité de la variance de la biodisponibilité des minéraux peut être expliquée par la teneur en phytates et ne prennent donc pas en compte l'ensemble de la matrice alimentaire. Or, de nombreuses études ont montré, d'une part, que les phytates ne sont pas les seuls inhibiteurs de l'absorption des minéraux et, d'autre part, que d'autres composés de la matrice alimentaire pouvaient influencer positivement leur absorption.

Monsen *et al.* (1978) ont déterminé une méthode de calcul permettant d'estimer la teneur en fer biodisponible d'un aliment en ne prenant en compte que les facteurs pouvant influencer de façon positive sur l'absorption du fer. Ce modèle présente de nombreuses limites étant donné qu'il a été déterminé à partir de régime occidentaux et qu'il ne prend pas en compte les facteurs inhibiteurs de l'absorption du fer. Une version encore plus simpliste de ce modèle ne prenant en compte que les apports journaliers en fer héminique, non héminique et en acide ascorbique a d'ailleurs été proposée par la FAO et l'OMS (FAO/WHO, 1988). Ces choix s'expliquent par le fait que la présence des composés activant l'absorption des minéraux annule souvent l'effet négatif des composés qui l'inhibent. Plus récemment, Tseng *et al.* (1997), suite à une étude réalisée sur des femmes et des enfants en Russie, ont suggéré de

déterminer la biodisponibilité du fer en trois étapes : en l'estimant d'abord grâce au modèle de Monsen, puis en la corrigeant en prenant en compte la quantité de phytates, puis la consommation de thé, correspondant aux apports en tanins. Contrairement aux modèles précédents qui prenaient en compte les apports journaliers, celui-ci détermine l'absorption du fer provenant des aliments ingérés au cours d'un repas. Ces différents modèles ont été testés lors d'une étude clinique en Chine et n'ont pas donné de bons résultats, ce qui a conduit les auteurs de cette étude à construire un nouveau modèle, plus adapté aux populations ayant des régimes quasi-végétariens, prenant en compte, en plus des variables précédentes, les quantités journalières de riz et de haricot (Du *et al.*, 2000). Enfin, Reddy *et al.* (2000) ont évalué l'absorption du fer chez des sujets recevant 25 repas de type occidentaux et ont montré que la présence de tissus animaux et les teneurs en acide ascorbique et en phytates devaient être prises en compte pour obtenir une évaluation correcte, tandis que les teneurs en calcium et en polyphénols n'avait pas d'effet significatif.

Comme montré par Du *et al.* (2000), ces modèles déterminés dans un contexte précis (pays, âge et sexe des sujets, état de santé des sujets, nature du régime) sont difficilement applicables dans d'autres situations. Notons, cependant, qu'ils permettent d'apporter des informations sur les déterminants de la biodisponibilité du fer dans différents types de régimes.

2.3. Situation pour le jeune enfant dans les pays du sud

2.3.1. Besoins nutritionnels du jeune enfant et apports recommandés

2.3.1.1. *En fer*

Les nouveau-nés naissent avec environ 75 mg de fer /kg de poids corporel, dont 75% se présente sous forme d'hémoglobine. Durant la première année de vie, les besoins en fer des nouveau-nés doivent permettre l'expansion de la masse érythrocytaire (en moyenne le volume sanguin triple), la couverture des pertes basales et la croissance des tissus de l'organisme (FAO/WHO, 2002a). Au cours de cette période l'enfant va tripler son poids de naissance et presque doubler son fer corporel, ce qui explique les besoins importants présentés dans le tableau I-11. Ce tableau donne également les apports recommandés en fer, qui ont été calculés à partir des besoins physiologiques en prenant en compte la biodisponibilité du fer de différents régimes. Dans, les pays du sud, les régimes sont principalement composés de céréales, de légumineuses ou de tubercules, riches en facteurs anti-nutritionnels, et contiennent peu de protéines d'origine animale pouvant activer l'absorption du fer. Les besoins en fer à considérer sont donc ceux correspondants à des biodisponibilités de 5 ou 10%.

Tableau I-11. Besoins et apports recommandés en fer en fonction de sa biodisponibilité dans le régime pour les enfants de 6 à 36 mois

Âge (mois)	Poids moyen (kg)	Besoins en fer pour la croissance (mg/jour)	Pertes en fer (mg/jour)	Besoins totaux en fer (mg/jour) ^a	Apport en fer recommandé (mg/jour)			
					Biodisponibilité du fer (%)			
					15	12	10	5
6-11	9,0	0,55	0,17	0,93	6,2	7,7	9,3	18,6
12-36	13,3	0,27	0,19	0,58	3,9	4,8	5,8	11,6

^a 95^{ème} percentile du total des besoins en fer prenant en compte la croissance et les pertes. D'après FAO/WHO (2002a).

Le lait maternel ne contient que 0,2 à 0,4 mg de fer /l, mais environ 50% de ce fer est absorbé, contre 10% pour le lait de vache (OMS, 1998). Les nouveaux-nés à terme qui sont nourris au sein exclusivement pendant les six premiers mois de vie ne sont pas à risque de carence en fer (Saarinen *et al.*, 1977). En revanche, si des aliments solides sont administrés, ils peuvent compromettre la biodisponibilité du fer provenant du lait maternel (Oski et Landaw, 1980). De la naissance à quatre mois, le pool de fer total de l'enfant est relativement stable mais sa répartition change de sorte que les réserves de fer sont utilisées pour permettre la croissance. Bien que certains nourrissons exclusivement nourris au sein jusqu'à l'âge de neuf mois aient un statut en fer normal (Siimes *et al.*, 1984), une source de fer diététique est recommandée à partir de six mois afin de subvenir aux besoins de l'enfant pour l'augmentation du volume sanguin (Davidsson, 2003). Cet âge correspond à celui auquel les aliments de complément doivent être introduits dans l'alimentation de l'enfant (WHO, 2001).

2.3.1.2. *En zinc*

Le manque de spécificité et de sensibilité des indicateurs utilisés pour l'évaluation du statut en zinc limite les possibilités de déterminer les besoins en zinc à partir des observations épidémiologiques. Dans le rapport de la FAO et de l'OMS sur les besoins en vitamines et en minéraux (FAO/WHO, 2002b), les besoins en zinc ont été estimés en considérant les besoins pour la croissance, la maintenance, le métabolisme et les pertes endogènes. Les besoins en zinc sont fonction de sa biodisponibilité supposée dans le régime, elle-même fonction de la composition du régime. Les apports recommandés sont donc été estimés pour trois catégories de régime correspondant à une biodisponibilité du zinc élevée (50%), moyenne (30%) et faible (15%) (Tableau I-12). Les valeurs données dans ce tableau correspondent à des apports de sécurité prenant en compte les variations inter-individuelles en matière de besoins en zinc (+ 2 écart-types).

Tableau I-12. Besoins et apports recommandés en zinc en fonction de sa biodisponibilité dans le régime pour les enfants de 6 à 36 mois

Âge (mois)	Besoins en zinc (mg/jour)			Apport en zinc recommandé (mg/jour)		
	Biodisponibilité du zinc (%)			Biodisponibilité du zinc (%)		
	50 ^a	30 ^b	15 ^c	50 ^a	30 ^b	15 ^c
6-11	1,67	2,80	5,59	2,5	4,1	8,4
12-36	1,84	3,05	6,10	2,4	4,1	8,3

D'après FAO/WHO (2002b).

Les concentrations en zinc du lait maternel sont assez élevées durant les premières semaines d'allaitement, dépassant 3 mg/l à deux semaines (Tapiero *et al.*, 2001). En revanche, dans les laits dits matures (plus de 21 jours post-partum) la concentration en zinc est nettement plus faible avec de 1 à 1,4 mg/l (OMS, 1998). Il est donc important que les aliments de complément donnés à l'enfant à partir de six mois pour compléter la couverture de ses besoins nutritionnels contiennent des quantités suffisantes de zinc biodisponible.

2.3.2. *Prévalences des déficiences en fer et en zinc*

La carence en fer est probablement la carence nutritionnelle la plus fréquente dans le monde. Une estimation de l'OMS de 1985 indiquait que 600 à 700 millions de personnes à travers le

monde souffraient d'anémie (De Mayer *et al.*, 1985). Il est difficile de déterminer la prévalence de carence en fer pour différentes raisons : grandeur de la population représentative, non standardisation des méthodes, variabilité saisonnière en fonction des niveaux d'infections de certaines populations (FAO/WHO, 2002a).

Concernant le zinc, on ne dispose pas, pour le moment, de bon indicateur pour évaluer le statut en zinc d'un individu. Les concentrations en zinc du plasma, des cellules sanguines et des cheveux, ainsi que son excrétion urinaire, sont diminués en cas de carence sévère. Cependant, ces facteurs peuvent être affectés par d'autres facteurs n'ayant aucun rapport avec le statut en zinc de l'individu et ne constituent donc pas de bons indicateurs. Par exemple, les infections, les situations de stress ou la grossesse peuvent diminuer la concentration en zinc du plasma (Agett et Favier, 1993). Aucune enzyme dont l'activité dépend du zinc n'a encore pu être identifiée comme marqueur du statut en zinc. Des indicateurs fonctionnels, tels que la capacité de cicatrisation ou la perception du goût ont été suggérés. Cependant, les modifications de ces fonctions ne sont pas spécifiques au zinc et ces indicateurs n'ont pas encore pu prouver leur efficacité pour traduire une carence en zinc chez l'homme (FAO/WHO, 2002b). En raison de cette absence, il n'existe pas d'information précise sur les prévalences de carence en zinc et, jusqu'à il y a environ 15 ans, la carence en zinc n'était même pas considérée comme un problème nutritionnel grave (Kennedy *et al.*, 2003). Cependant, lorsque des tentatives d'évaluation simultanée des statuts en fer et en zinc d'une population sont réalisées, la prévalence de carence en zinc apparaît être du même ordre que la prévalence de carence en fer (Lønnerdal, 1996).

Partout dans le monde, les prévalences de déficiences en fer et en zinc les plus fortes se rencontrent chez les nourrissons, les jeunes enfants, les adolescents et les femmes en âge de procréer et particulièrement les femmes enceintes. La période à laquelle un enfant passe de l'allaitement maternel exclusif à la consommation progressive d'aliment solide est une période particulièrement critique en raison des niveaux très élevés de besoins en fer et en zinc. Dans la plupart des pays industrialisés, en raison d'une meilleure information et de l'accès à des aliments de complément fortifiés, le statut en fer et en zinc des jeunes enfants s'est nettement amélioré et les fortes prévalences de déficience ne sont plus observées aujourd'hui que chez les femmes enceintes et les adolescents des deux sexes. Dans les pays en développement, en revanche, la situation est très critique pour de nombreux groupes et particulièrement pour les jeunes enfants en période d'alimentation complémentaire. En raison des conséquences sur l'organisme des déficiences en fer et en zinc mentionnées plus haut, la couverture des besoins en ces minéraux pour ces enfants est primordiale pour leur assurer un développement normal et une bonne prévention contre les maladies infectieuses.

Les conséquences économiques de ces carences, et notamment de l'anémie, au niveau d'un pays sont loin d'être négligeables. Elles entraînent une baisse de la force productive, une augmentation des dépenses de santé, une perte de capital humain et social et une diminution du PNB (Hunt, 2002).

2.4. Stratégies possibles d'augmentation des apports en fer et en zinc biodisponibles

Étant données les prévalences élevées de carences en fer et en zinc dans les pays en développement et les conséquences qu'elles engendrent sur la santé des populations vulnérables (nourrissons, enfants, femmes en âge de procréer), de nombreuses stratégies de lutte contre ces carences ont déjà été mises en œuvre. La supplémentation, l'enrichissement, le bio-enrichissement, la diversification et la modification des procédés de préparation des aliments peuvent être utilisés, mais le choix de l'approche doit dépendre des moyens (financiers, logistiques), de la population et de considérations pratiques. Selon la FAO, les

approches fondées sur l'amélioration de la qualité nutritionnelle de l'alimentation permettent de répondre durablement aux besoins nutritionnels propres à chaque groupe de population (Kennedy *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est important de noter que de nombreux facteurs (soins de santé, éducation, assainissement, approvisionnement en eau, conditions de logement) peuvent influencer sur les résultats de telles stratégies. Mais, les interventions complémentaires axées notamment sur les traitements anti-parasitaires, la prophylaxie anti-paludéenne, l'amélioration des conditions sanitaires et la vaccination infantile peuvent aussi contribuer à faire reculer la malnutrition due aux carences en micronutriments. Il ne faut donc pas perdre de vue que les stratégies les plus efficaces sont celles qui abordent l'ensemble de ces questions de manière intégrée et coordonnée.

2.4.1. Approche non alimentaire : la supplémentation

La supplémentation est une approche dans laquelle les nutriments sont délivrés directement par le biais d'injections, de sirop ou de comprimés. La supplémentation peut être quotidienne ou hebdomadaire (Olivares *et al.*, 1999). Il s'agit de l'approche la plus appropriée pour des populations cibles à haut risque de carence ou dans des situations particulières telles que grossesse ou pénuries alimentaires. Par exemple, la supplémentation est reconnue pour être la seule option valable pour contrôler ou prévenir la carence en fer chez les femmes enceintes, tant leur besoin quotidien en fer est élevé. Pour les jeunes enfants, la supplémentation est à envisager lorsque des aliments de complément enrichis ou naturellement riches en fer ne sont pas disponibles (Yip, 1997). Cependant, dans des circonstances normales, les programmes de supplémentation ne peuvent être utilisés qu'en tant que mesure à court terme et sont ensuite remplacés par des mesures alimentaires à long terme, telles que la fortification ou la diversification (Kennedy *et al.*, 2003). En effet, la supplémentation est coûteuse en terme de production et de distribution de la source de fer et implique la création ou l'existence d'une structure adaptée (Yip, 1997).

2.4.2. Approches alimentaires

Les stratégies alimentaires consistent à modifier le régime, soit en augmentant les apports en minéraux ou en composés favorisant leur absorption (acide ascorbique, protéines animales...), soit en réduisant les apports en composés inhibant leur absorption (phytates, tanins, fibres...). Il est important de noter que les composés influant sur la biodisponibilité des minéraux initialement présents dans le régime, influent également sur celle des minéraux ajoutés, même si ceux-ci sont hautement biodisponibles au départ (Hurrell, 2002).

2.4.2.1. Enrichissement

L'enrichissement est défini comme l'addition à un aliment d'un ou plusieurs nutriments essentiels, normalement ou non contenus dans l'aliment, avec pour objectif de prévenir ou de corriger une carence en un ou plusieurs nutriments, au sein d'une population ou de groupes de population spécifiquement vulnérables (FAO/WHO, 1994). Les stratégies d'enrichissement utilisent des aliments vecteurs facilement accessibles et largement consommés. Un exemple d'enrichissement particulièrement réussi et à grande échelle est l'enrichissement du sel en iode. Dans les pays industrialisés, de nombreux aliments à base de blé (céréales, pain...) sont également enrichis en un ou plusieurs micronutriments comme le calcium, le fer, le zinc, la niacine, la riboflavine, ou encore la thiamine. Le succès d'un programme d'enrichissement requiert une volonté politique affirmée et la collaboration du secteur privé, des scientifiques, des consommateurs, des agences internationales et des ONG (Berger, 2003). Une fois le

véhicule alimentaire choisi, le choix de chaque micronutriment à ajouter dépend de sa biodisponibilité dans l'aliment et de sa stabilité au cours du procédé de préparation et au cours du stockage. Pour fonctionner et être efficace à long terme, le procédé d'enrichissement doit être simple et l'aliment enrichi acceptable par le consommateur en terme de propriétés organoleptiques (goût, texture mais aussi odeur et couleur) et d'accessibilité (approvisionnement et prix). En matière d'efficacité, une étude menée au Chili, par exemple, a montré que l'enrichissement en fer du lait réduisait la prévalence d'anémie de 36 à 13% chez les enfants de trois à quinze mois (Stekel *et al.*, 1985). Ils ont également montré que la combinaison de l'enrichissement en fer et en vitamine C permettait une efficacité encore plus importante avec une diminution de la prévalence de 28 à 2%.

2.4.2.2. *Bio-fortification*

La consommation d'une grande variété d'aliments, incluant des aliments riches en micronutriments, demeure la solution la plus pérenne pour limiter l'apparition de carences. En suivant cette idée et grâce à l'évolution des biotechnologies, la bio-fortification fait l'objet de nombreuses études. La bio-fortification consiste à améliorer les propriétés nutritionnelles de certaines variétés de plantes, au travers de sélections ou de modifications génétiques. Les techniques de marquages moléculaires ont rendu possible l'identification chez certains végétaux du matériel génétique contrôlant les teneurs en nutriments et anti-nutriments, de sorte qu'il est aujourd'hui possible d'effectuer des sélections variétales en fonction de ces critères (Kennedy *et al.*, 2003). Les possibilités offertes sont nombreuses : augmenter les teneurs en micronutriments, en facteurs améliorant l'absorption des minéraux, diminuer les teneurs en phytates, introduire un gène codant pour une phytase particulièrement active ou encore combiner plusieurs approches (Holm *et al.*, 2002 ; Lucca *et al.*, 2002). Cependant, il est nécessaire avant d'investir dans de telles recherches, de se poser la question de la réalité agronomique et économique de ces possibilités (Welch, 2002). Par exemple, dans les grains de céréales, les phytates étant la principale forme de stockage du phosphore nécessaire à la croissance de la plantule lors de la germination, on peut se demander si les grains d'une variété mutante à très faible teneur en phytates auront la capacité de germer. Certaines interventions utilisant cette approche (maïs riche en protéines, manioc et patate douce riches en carotène, riz riche en fer) semblent avoir montré une certaine efficacité (IFPRI, 2002). Cette stratégie peut être appropriée aux populations dont au moins 50% des apports énergétiques sont fournis par une seule culture. Cependant, il faut au préalable s'assurer que les cultures modifiées ne présentent pas d'inconvénient agronomique et qu'elles permettent réellement une amélioration de l'état nutritionnel des consommateurs (Gibson et Hotz, 2001).

2.4.2.3. *Diversification*

Depuis longtemps, il est reconnu qu'avoir un régime alimentaire diversifié est la clé pour permettre de couvrir les besoins en nutriments essentiels des individus. Dans les pays en développement, les gens les plus pauvres ont un régime monotone, principalement à base de produits amylacés et incluant peu ou pas de produits animaux et peu de fruits et légumes. Ainsi, ce manque de diversité dans leur régime est un problème majeur dans l'apparition de carences en micronutriments et en particulier pour les jeunes enfants en période d'alimentation complémentaire. La diversification alimentaire est une stratégie tendant à augmenter la disponibilité, l'accessibilité, la consommation et la bio-efficacité des aliments sources de micronutriments. Elle est particulièrement appropriée pour le contrôle de l'avitaminose A et pour faire reculer les carences en fer (Delisle, 2003) et semble engendrer un meilleur état nutritionnel général. En effet, Ruel et Arimond (2003) ont analysé

l'importance de la variété du régime alimentaire sur la croissance des enfants de six à vingt trois mois à partir des résultats de onze enquêtes démographiques et de santé effectuées dans différents pays (Afrique, Asie, Amérique latine). Cette analyse montre un lien évident entre une importante variété alimentaire et un meilleur état nutritionnel des enfants dans la majorité des populations. Malheureusement, dans de nombreuses situations les possibilités pour les individus d'accéder à une alimentation variée sont limitées. Les céréales et les plantes à racines ou à tubercules, qui constituent la base de l'alimentation des jeunes enfants dans les pays du sud, contiennent des quantités de fer et de zinc souvent insuffisantes pour couvrir les besoins élevés de cette population à risque. L'addition de légumineuses peut permettre d'augmenter légèrement les teneurs en fer et en zinc de ces régimes. Cependant, comme les céréales, les légumineuses sont riches en facteurs anti-nutritionnels qui limitent la biodisponibilité de ces minéraux. Ainsi, d'après la FAO et l'OMS, il semble qu'il soit impossible d'atteindre les apports recommandés en fer et en zinc avec une telle approche alimentaire dans le cas de régimes à base de céréales si de la viande, du poisson, des produits laitiers ou encore des légumes feuilles en grande quantité ne sont pas inclus dans les régimes (FAO/WHO, 2002a). Cependant, il est intéressant de noter que certaines interventions visant à promouvoir la production de produits animaux engendrant une source de revenu pour les ménages et leur consommation n'ont pas eu les résultats escomptés. N'ayant pas reçu d'éducation nutritionnelle en parallèle, les ménages préféraient souvent subvenir à d'autres besoins grâce aux profits réalisés, qu'à une amélioration de leur régime alimentaire (Ruel et Levin, 2000).

2.4.2.4. Amélioration des procédés technologiques utilisés pour la transformation des aliments

L'amélioration des procédés technologiques va permettre d'augmenter, non pas les teneurs en minéraux, mais leur biodisponibilité dans l'aliment grâce à la réduction des teneurs en facteurs anti-nutritionnels. Plusieurs procédés technologiques alimentaires, utilisés de manière traditionnelle en Afrique, en Asie ou en Amérique latine, tels que la germination (Gibson et Ferguson, 1996) ou la fermentation (Nout et Ngoddy, 1997), sont connus pour leurs effets bénéfiques, notamment à réduire les teneurs en phytates. Les effets des différents procédés technologiques applicables aux grains de céréales et de légumineuses sur les teneurs en facteurs anti-nutritionnels et sur la biodisponibilité du fer et du zinc sont détaillés dans le chapitre suivant (partie 3.3). Ces procédés peuvent être très efficaces pour réduire les teneurs en facteurs anti-nutritionnels, mais leurs effets sont très variables selon l'espèce de grain traitée et les modalités d'application du procédé. Par ailleurs, les procédés technologiques peuvent aussi avoir des effets néfastes sur la qualité nutritionnelle des produits. Ainsi, certains procédés vont entraîner des réductions de teneurs en nutriments (décorticage, cuisson...), tandis que d'autres, comme l'autoclavage, peuvent diminuer la biodisponibilité des minéraux (Lombardi-Boccia *et al.*, 1995).

Bien que peu d'informations soient disponibles dans la littérature concernant l'efficacité de l'amélioration des procédés technologiques sur le contrôle des carences en fer et en zinc, il s'agit d'une approche potentiellement efficace à long terme, car peu coûteuse et adaptée aux usages des populations (Ruel et Levin, 2000). Avec les caractéristiques des matières premières, les procédés technologiques sont les facteurs déterminants de la qualité nutritionnelle des aliments et ne doivent pas être négligés, même si d'autres stratégies (enrichissement, diversification) sont nécessaires pour réussir à couvrir les apports en fer et en zinc des populations vulnérables.

3. Causes et modalités d'amélioration de la faible biodisponibilité du fer et du zinc dans les aliments à base de céréales et de légumineuses

3.1. Facteurs diminuant la biodisponibilité des minéraux

3.1.1. Les phytates

3.1.1.1. Généralités

L'acide phytique, *myo*-inositol hexaphosphate, est la principale forme de stockage du phosphore chez les plantes. Dans les grains, sa synthèse commence dès le début de l'embryogenèse et se poursuit jusqu'à la fin de la maturation (Walker, 1974). Il y est présent sous forme de phytates, sels principalement de calcium et de magnésium, et renferme 60 à 90% du phosphore total du grain (Erdman, 1979). Ce stockage du phosphore est le principal rôle biologique des phytates qui participent également, par la même occasion, au stockage de l'énergie (ATP) et régulent l'initiation de la dormance (Reddy, 2002).

Dans les céréales, les phytates sont réputés pour être localisés dans les enveloppes du grain, principalement au niveau de la couche à aleurone, et dans le germe. Dans le maïs, 88% des phytates se trouvent dans le germe ; dans le blé, en revanche, on en retrouve 87% dans la couche à aleurone (13% dans le germe) ; dans le riz, 80% des phytates sont dans le péricarpe (Reddy, 2002) et dans le mil environ 60% des phytates seraient localisés dans le germe et 10% dans les enveloppes (Abdelrahman *et al.*, 1984 ; Simwemba *et al.*, 1984). Dans les graines de légumineuses, ils sont uniformément répartis dans les cotylédons où ils sont associés aux corps protéiques.

La teneur en acide phytique varie entre 0,5 et 1,9% dans les céréales (sauf riz blanchi) et entre 0,4 et 2,1% dans les légumineuses. La teneur en phytates d'un aliment d'origine végétale peut varier selon l'espèce, la variété, les conditions climatiques, les conditions de culture ou encore l'année de récolte (cf paragraphe 1.3.7.1).

La structure chimique de l'acide phytique a longtemps été remise en question, mais le modèle proposé par Anderson (1914) semble maintenant admis (Figure I-7).

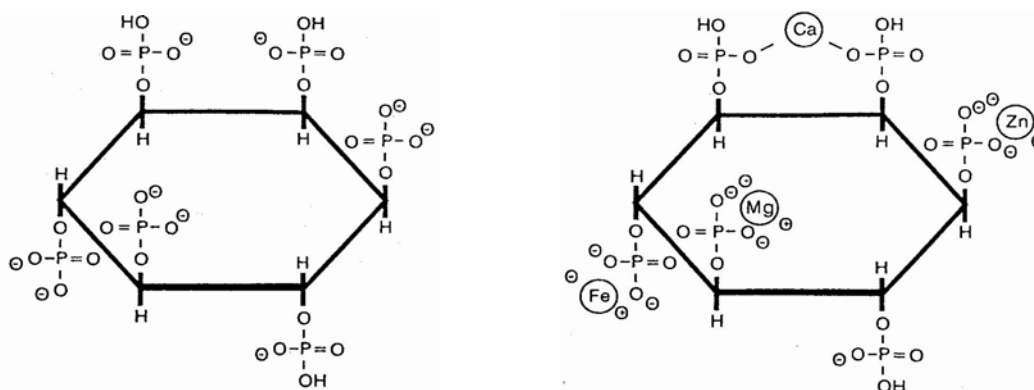


Figure I-7. Structure de l'acide phytique, *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis phosphate, à pH neutre d'après le modèle de Anderson (à gauche) et d'un sel d'acide phytique (à droite).

En raison de l'occurrence simultanée de l'acide phytique et de ces sels dans de nombreux grains, la distinction entre ces deux formes est rarement faite dans la littérature. Dans ce document, le terme générique de « phytates » sera utilisé, même lorsqu'il s'agira d'acide phytique.

Les phytates, de par leur structure et leurs fonctionnalités dans les grains, peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes lorsqu'ils sont ingérés par l'homme. Ils sont, aujourd'hui, l'objet de nouvelles recherches en raison de leur activité anti-oxydante pouvant avoir une activité anti-cancéreuse (Jenab et Thompson, 2002) et certains auteurs commencent même à préconiser de limiter leur dégradation au cours des procédés technologiques (Shi *et al.*, 2004). Cette activité anti-cancéreuse serait due à leur capacité à chélater des minéraux qui sont des co-facteurs essentiels de nombreuses oxydo-réductases. Seules leurs activités anti-nutritionnelles seront développées dans cette introduction bibliographique.

3.1.1.2. Activités anti-nutritionnelles

Les phytates sont les principaux agents chélateurs des graines de céréales et de légumineuses. En raison de leur nature ionique, ils réagissent directement avec les groupements chargés des macroéléments et les cations divalents.

Interactions avec les macro-éléments

Avec les protéines, les phytates peuvent réagir, soit directement avec les groupements chargés positivement, soit indirectement, par l'intermédiaire d'un cation tel que le calcium, avec les groupements chargés négativement (Wise, 1995). Dans les deux cas, les liaisons entre phytates et protéines seront des liaisons ioniques et le type d'interaction, directe ou indirecte, va dépendre du pH. Pour des pH supérieurs aux pH isoélectriques des protéines, les phytates se lieront d'abord à des cations, tandis que pour des pH inférieurs aux pHi, les groupements aminés des protéines étant chargés positivement, les phytates vont pouvoir directement créer des liaisons ioniques. Les complexes phytate-protéines et phytate-minéral-protéines résultant influencent négativement la digestion et la biodisponibilité des protéines (Harland et Morris, 1995). Le pH de l'estomac va faciliter ces interactions phytates-protéines, et dans le cas d'une fixation avec une enzyme digestive, une inhibition peut avoir lieu. C'est ce que Knuckles (1988) a étudié dans le cas de la lipase pancréatique dont l'inhibition augmente avec le degré de phosphorylation des phytates. Les phytates ont donc un double effet négatif sur la digestibilité des protéines qu'ils diminuent, d'une part, par la présence de complexes phytate-protéines difficilement hydrolysables et, d'autre part, par l'effet inhibiteur des phytates sur les enzymes digestives (Singh et Krikorian, 1982 ; Knuckles *et al.*, 1985). O'Dell et Savage (1960), par ailleurs, ont constaté que ces interactions avaient une répercussion sur la biodisponibilité du zinc qui se trouve en général fixé aux protéines végétales.

Les phytates peuvent également interagir avec l'amidon, soit directement par la formation de liaisons hydrogène avec un groupement phosphate, soit indirectement par l'intermédiaire de protéines, ce qui peut également conduire à une diminution de la solubilité et de la digestibilité de l'amidon (Thompson et Yoon, 1984).

Interactions avec les minéraux

La capacité de l'acide phytique à chélater les minéraux est un sujet de préoccupation en nutrition animale et humaine. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal et chez l'homme ont clairement mis en évidence que les phytates diminuaient la biodisponibilité des minéraux en formant des complexes avec ceux-ci. Beaucoup de ces complexes sont insolubles et sont donc non absorbables aux conditions physiologiques normales (Cheryan, 1980). Cet effet des phytates sur la biodisponibilité des minéraux va dépendre de plusieurs facteurs : (i) le pH, (ii) la taille et la valence du minéral, (iii) le degré de phosphorylation des phytates (iv) les concentrations en minéral et en phytates ainsi que leur rapport molaire et (v) la matrice alimentaire incluant la présence d'activateurs ou d'autres inhibiteurs de l'absorption

intestinale. Par ailleurs, tous les minéraux n'ont pas la même affinité pour les phytates et il peut donc exister des compétitions si l'équilibre phytates / minéraux est perturbé.

Le pH, en influençant le degré d'ionisation de l'acide phytique et des protéines va favoriser ou non la liaison avec les cations. Il y a donc une compétition forte entre cations et protéines. A pH 2-4, les ions calcium et zinc dissocient les complexes phytate-protéines pour former des complexes calcium-zinc-phytate solubles (Champagne et Phillippy, 1989). Une fois les phytates formés, d'une manière générale, ils sont solubles à pH bas et insolubles à pH basique. Cependant, la solubilité des phytates dépend de la nature du cation chélaté. Un phytate de zinc, par exemple, est soluble aux pH inférieurs à 4,3 et insoluble aux pH supérieurs ; de même, un phytate de magnésium est soluble à pH acide et insoluble aux pH supérieurs à 7. Les phytates de fer ferrique, en revanche, sont une exception étant donné que leur solubilité est très faible aux pH très acides (de 1 à 3,5) et augmente pour les pH supérieurs à 4 pour atteindre 50% à pH 10 (Jackman et Black, 1951). Toutefois, cette notion de solubilité est controversée ; certains auteurs pensent que les complexes sont totalement dissociés aux pH bas, tandis que d'autres pensent qu'ils existent sous forme de sels solubles non ionisés (Cheryan, 1980).

Ceci amène donc à la notion de stabilité des complexes phytates-minéraux. L'acide phytique forme des complexes très stables avec le zinc, suivi par le cuivre, le nickel, le cobalt, le manganèse, le calcium et les complexes les moins stables étant ceux formés avec le fer (Cheryan, 1980). Ainsi, le zinc risque d'être l'élément le plus affecté par la présence de phytates, tandis que le fer devrait être facilement libéré en cas de complexion.

Des études de terrain comme celle de Reinhold (1971) en zones rurales en Iran ont mis en évidence la relation entre les apports en phytates et les déficiences en zinc. Lönnerdal *et al.* (1988) ont également travaillé sur l'absorption du zinc et ont trouvé une relation entre la teneur en phytates et la biodisponibilité de cet élément qui augmente de manière significative lorsque les régimes sont déphytinisés, l'absorption passant alors de 27 à 45%. Saha *et al.* (1994) ont démontré par l'utilisation d'isotopes radioactifs chez le rat que l'absorption du calcium, du fer et du zinc, ainsi que celle du sélénium, diminuait pour des concentrations croissantes en phytates. Concernant le fer, Gillooly *et al.* (1983) et Hallberg *et al.* (1989) ont constaté, grâce à l'utilisation de fer radioactif chez l'homme, qu'une faible biodisponibilité de cet élément était associée à de fortes teneurs en phytates dans les aliments. Hurrell *et al.* (1992) ont mené le même genre d'étude sur des sujets consommant des repas à base d'isolats protéiques de soja et sont arrivés à la même conclusion, bien que d'autres facteurs semblaient également influencer sur la biodisponibilité du fer. L'étude de la concentration en zinc et en fer des os de rats consommant différentes farines de sorgho à teneurs plus ou moins élevées en phytates a aussi démontré l'effet inhibiteur de ces composés (Ali et Harland, 1991).

Concernant le degré de phosphorylation des phytates, apparemment, seuls les *myo*-inositols 6-phosphates (IP6) et les *myo*-inositols 5-phosphates (IP5) auraient une influence significative sur la solubilité *in vitro* du fer et sur l'absorption du zinc chez l'homme (Sandberg *et al.*, 1989 ; Sandström et Sandberg, 1992). Ces résultats sont, cependant, difficilement extrapolables étant donné qu'ils se réfèrent soit à des estimations *in vitro*, soit à des résultats *in vivo* mais obtenus avec des régimes contenant des *myo*-inositols-phosphates isolés ce qui ne reflète certainement pas les interactions qui ont lieu avec les phytates naturellement présents dans les aliments. Par ailleurs, certains *myo*-inositol-phosphates pourraient améliorer l'absorption des cations, comme l'ont montré Shen *et al.* (1998) dans le cas de l'inositol 1,2,3,6-tetraphosphate qui augmente de manière significative l'absorption du calcium. Une dégradation partielle des phytates serait donc d'autant plus souhaitable.

Concernant les concentrations en phytates susceptibles d'agir sur la biodisponibilité des minéraux, les conclusions des travaux existants ne sont pas non plus très claires. Certains travaux tendent à prouver que l'effet inhibiteur des phytates sur la biodisponibilité des

minéraux serait proportionnel à la concentration en phytates (Bothwell *et al.*, 1989 ; Hallberg *et al.*, 1989 ; Cook *et al.*, 1997). D'autres montrent plutôt l'existence d'une valeur seuil de teneur en phytates en dessous de laquelle la biodisponibilité des minéraux commencerait à être améliorée (Bosscher *et al.*, 2001a ; Sandberg et Svanberg, 1991 ; Hurrell *et al.*, 1992).

Cependant, le rôle majeur des phytates sur l'inhibition de l'absorption des minéraux a parfois été controversé. Levrat-Verny *et al.* (1999), qui ont comparé l'absorption des minéraux chez des rats ayant des régimes à base de farine de blé blanche et de farine de blé complet, ont montré que le gain en minéraux dû à la présence de son permettait un meilleur apport en fer et en magnésium malgré la présence de phytates. Ce résultat pourrait toutefois être expliqué par la présence d'une forte activité phytasique chez le rat (Iqbal *et al.*, 1994) et dans le son de blé (Bagheri *et al.*, 1982). En effet, Sandberg *et al.* (1987) ont montré que les phytases du son de blé pouvaient agir sur les phytates du régime au cours de la digestion. Enfin, Sandström *et al.* (2000) ont observé que l'augmentation de la teneur en phytates, par ajout de son d'avoine, d'un régime à base de protéines et pauvre en fibres ne freinait pas l'absorption du zinc chez l'homme. Ceci remet en cause la responsabilité directe des phytates dans la diminution de la biodisponibilité des minéraux qui serait alors dépendante de la composition globale des aliments ingérés au cours d'un repas.

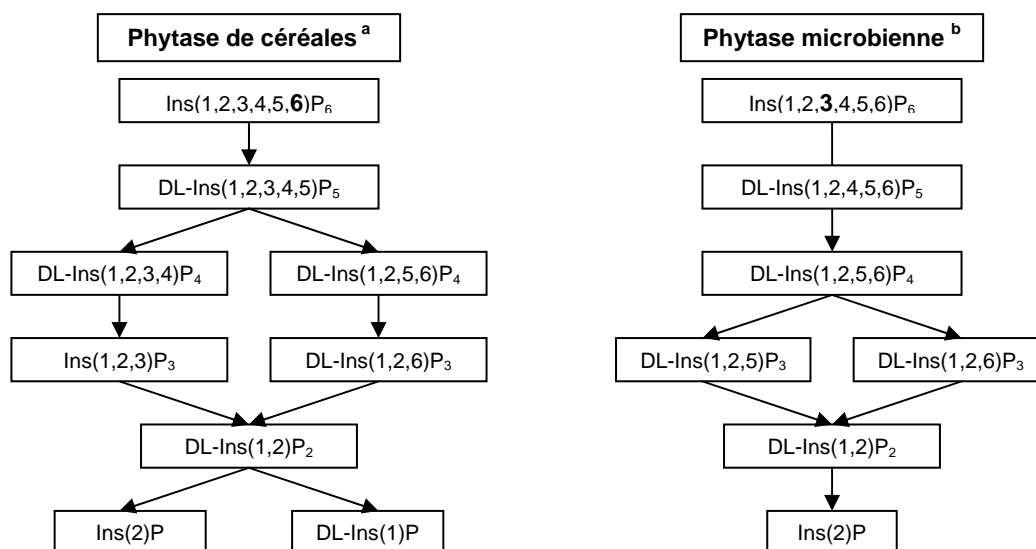
3.1.1.3. Mécanismes de réduction des teneurs en phytates

La réduction d'une teneur en un composé peut être obtenue, soit par son élimination physique de la matrice (fractionnement, diffusion dans le milieu), soit par sa dégradation chimique ou thermique (hydrolyse). De par leur structure, les phytates sont des composés relativement stables à la chaleur, mais la réduction de leur teneur peut avoir lieu au cours de procédés technologiques tels que le décorticage, le trempage ou la fermentation, et aussi au cours du transit intestinal.

Comme mentionné précédemment, il existe des travaux à propos de l'influence du pH et de la nature du minéral chélaté sur la solubilité des phytates (Cheyran, 1980), mais ceux-ci ne concernent pas les matrices alimentaires complexes. En effet, dans une matrice alimentaire, il est très difficile de dissocier la diffusion des phytates dans un milieu, et donc leur solubilité, de leur dégradation enzymatique. Quoi qu'il en soit, il semble que la principale cause de réduction des teneurs en phytates soit l'action de phytases.

Les phytases hydrolysent le *myo*-inositol hexaphosphate (IP6) pour donner du phosphore inorganique (Pi) et des *myo*-inositol phosphates (IP5 à IP1). Elles appartiennent au groupe des phosphatases. Il en existe deux types selon la position du groupement phosphate qu'elles attaquent en premier (Figure I-8). Elles se trouvent dans les plantes, les microorganismes et certains tissus animaux.

La résistance des phytates aux phytases, comme leur solubilité, dépend de la nature du minéral chélaté. Ainsi, à pH neutre un complexe phytate-zinc est beaucoup plus résistant à l'hydrolyse qu'un complexe phytate-fer, les complexes les plus sensibles étant ceux formés avec le magnésium (Maenz *et al.*, 1999).



^a Blé, orge, avoine et seigle ; ^b *Aspergillus niger*, *Klebsiella terrigena* et *Pseudomonas sp.*
Source : Sandberg, 2002

Figure I-8. Comparaison des voies d'hydrolyse des phytates par les phytases de céréales et les phytases microbiennes.

Les phytases d'origine végétale

Les phytases végétales sont particulièrement abondantes dans les grains et le pollen des plantes supérieures telles que les céréales, les légumineuses, les oléagineux et les noix, mais une faible activité phytasique existe aussi dans les racines. Les phytases végétales sont généralement des 6-phytases (EC 3.1.3.26), c'est à dire qu'elles démarrent l'hydrolyse au niveau du phosphate 6 de la molécule de phytate (Figure I-8), mais il peut également exister des 3-phytases végétales. Leur activité dépend de paramètres tels que l'espèce, la variété, le stade de germination du végétal, le pH, la teneur en eau, la température, la présence d'inhibiteurs et la nature des complexes phytates-minéraux (Cheryan, 1980 ; Maenz *et al.*, 1999). Le pH optimum d'activité de la majeure partie des phytases végétales se situe autour de 4-5 (Konietzny et Greiner, 2002). Le tableau I-13 répertorie les conditions optimales d'action des phytases de quelques espèces de céréales et de légumineuses.

Tableau I-13. Conditions optimales de température et de pH des phytases de différentes espèces de céréales et de légumineuses

Espèces	Température (°C)	pH	Références
Avoine	38	4,0-4,5	Larsson (1996)
Orge	53-58		Rutgersson <i>et al.</i> (1997)
Blé, ambérique, haricot Maïs, sorgho, soja	60 24	4,5-5,0	Gibson et Ferguson (1998a)
Haricot rouge	50		Greiner et Konietzny (1998)
Orge	57	4,8	Bergman <i>et al.</i> (2000)

Bergman *et al.* (2000) ont observé chez l'orge une différence entre les conditions optimales d'activité phytasique ($\theta=57^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH}=4,8$) et celles de dégradation des phytates ($\theta=47^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH}=5,2$), qu'ils ont principalement attribué à une différence de stabilité thermique entre les phytases dans la farine et les phytases extraites pour le dosage de leur activité. Ils ont également constaté qu'un pH bas et une température forte pouvaient favoriser la mise en contact de l'enzyme avec son substrat grâce à l'activité des protéases et aux changements structuraux ayant lieu dans le grain. Viveros *et al.* (2000), quant à eux, ont tenté de corrélérer les activités des phytases et phosphatases acides de différentes variétés de blé et d'avoine en fonction des teneurs en phosphore phytique, mais les mécanismes se sont révélés trop complexes pour pouvoir obtenir un modèle valable. Notons enfin qu'une espèce végétale peut posséder différentes phytases comme cela a été montré dans le grain de blé par Konietzny *et al.* (1994). Ils ont, en effet, extrait quatre enzymes différentes capables d'hydrolyser les phytates et ont pu étudier un mélange phytase/phosphatase acide après purification. Ils ont ensuite mis en évidence la spécificité de ces enzymes pour différents substrats mais avec une affinité particulière pour les phytates.

Concernant la localisation des phytases dans les grains, peu d'études ont été réalisées mais il semblerait qu'elles soient associées aux protéines de la couche à aleurone dans les céréales, tandis que les phytases des légumineuses seraient localisées dans les cotylédons (Bergman *et al.*, 2000 ; Konietzny et Greiner, 2002).

Les phytases microbiennes

Les phytases microbiennes sont en général des 3-phytases (EC 3.1.3.8), bien que les phytases d'*Escherichia coli*, par exemple, appartiennent au groupe des 6-phytases. En général, la plupart des microorganismes produisent uniquement des phytases intra-cellulaires. Les activités phytasiques extracellulaires sont, toutefois, relativement fréquentes chez les champignons filamenteux, parmi lesquels *Aspergillus niger* a été identifié comme en étant le meilleur producteur (Gargova *et al.*, 1997). De nombreuses bactéries possèdent également une activité phytasique, parmi lesquelles certaines bactéries des genres *Bacillus* et *Enterobacter* qui ont montré des activités extracellulaires (Konietzny et Greiner, 2002). Concernant les bactéries lactiques, aucune preuve de l'existence d'activité phytasique extracellulaire n'a encore été apportée (Fredrikson *et al.*, 2002). Les conditions optimales d'activité de quelques phytases microbiennes sont données dans le tableau I-14.

Tableau I-14. Conditions optimales de température et de pH des phytases de différents microorganismes

Espèces	Température ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Références
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	3,5	Türk <i>et al.</i> (1996)
<i>Candida krusei</i>	40	2,5 ; 5,5	Quan <i>et al.</i> (2001)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	65	5,5	Zamudio <i>et al.</i> (2001)
<i>Aspergillus niger</i>	55-58	2,5 ; 5,0-5,5	Simon et Igbasan (2002)

Les microorganismes utilisés en fermentation sont souvent évalués en fonction de leur capacité à dégrader les phytates au cours du procédé. Ainsi, certaines levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Schwanniomyces castellii* produisent des phytases (Konietzny et

Greiner, 2002). En revanche, en ce qui concerne les bactéries lactiques, peu de souches ont pu être identifiées comme produisant des phytases. La réduction des teneurs en phytates au cours des fermentations lactiques des aliments serait donc plutôt due à la co-précipitation des phytates et des protéines ou à l'activation des phytases végétales endogènes en raison de l'abaissement du pH (Shirai *et al.*, 1994).

Les phytases intestinales

Peu d'études ont été menées à propos des phytases animales. Des phytases ont cependant été détectées dans des extraits de muqueuse intestinale, entre autre, chez le rat, le lapin, le poulet et l'homme (Konietzny et Greiner, 2002). Chez l'homme, la dégradation des phytates au niveau de l'intestin grêle peut s'effectuer par l'action d'une 3-phytase (EC 3.1.3.8) ou d'une phosphatase alcaline (EC 3.1.3.26). Cependant, l'activité de ces enzymes ne joue pas un rôle significatif dans la digestion des phytates chez les monogastriques par rapport à celle des phytases amenées par le régime (Iqbal *et al.*, 1994). Sandberg et Andersson (1988) ont montré chez l'homme qu'en moyenne 95% des phytates d'un régime à base de son de blé, dont les phytases avaient été désactivées, étaient retrouvées dans l'iléon. Par ailleurs, lorsqu'elles sont ajoutées dans les aliments, les phytases d'*Aspergillus niger* sont plus résistantes aux enzymes digestives (pepsine et pancréatine) que les phytases de blé (Phillippy, 1999). La dégradation des phytates chez les monogastriques peut également être causée par la microflore présente au niveau du côlon (*Escherichia coli*).

3.1.2. Les composés phénoliques

3.1.2.1. *Structure et classification*

Les composés phénoliques peuvent être classés en 3 groupes : les acides phénoliques, les flavonoïdes et un dernier groupe comprenant les stilbènes (e.g., resveratrol) et les lignanes (e.g., enterodiol, enterolactone) (Tapiero *et al.*, 2002).

Parmi les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques constituent une classe importante de phénylpropanoïdes (C₆-C₃) dans le règne végétal (Figure I-9). Le principal acide hydroxycinnamique est l'acide caféique, mais l'acide férulique est également important étant donné qu'il peut entrer dans la composition des arabinoxylanes des parois végétales.

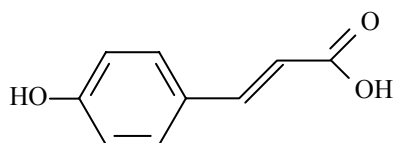


Figure I-9. Structure de l'acide hydroxycinnamique

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, grains, fruits, ...) et sont donc les polyphénols les plus abondants dans l'alimentation humaine. Leur structure commune est celle des diphenylpropanes (C₆-C₃-C₆) et consiste en deux noyaux aromatiques liés par 3 carbones qui forment généralement un hétérocycle oxygéné (Figure I-10).

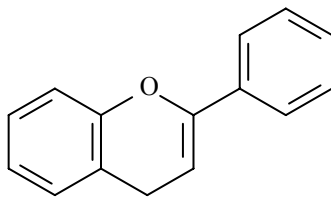


Figure I-10. Structure de base des flavonoïdes.

Ils peuvent être divisés en sous-classes selon la nature et l'arrangement des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles ou autres) et selon les conjugaisons entre les noyaux aromatiques A et B (Figure I-11). A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme glycosylée au niveau d'une ou de plusieurs de leurs fonctions hydroxyles (Bravo, 1998).

Classe	Structure générale	Flavonoïde
Flavanol		(+)-catéchine (+)-épicatéchine épigallocatechine gallate
Flavone		chrysin apigénine rutine lutéoline lutéoline glucosides
Flavonol		kaempferol quercétine
Flavanone		myricétine tamarixétine naringine taxifoline hesperidine
Isoflavone		génistéine génistéine
Anthocyanidine		apigénidine cyanidine

Figure I-11. Classification et structure des différents flavonoïdes alimentaires (Heim *et al.*, 2002).

Parmi les flavonoïdes, les flavones (e.g., apigénine, lutéoline, diosmétine), les flavonols (e.g., myricétine, quercétine, kaempferol) et leurs multiples formes glycosylées sont les composés

les plus courants. Les flavanols (e.g., catéchine, épicatechine, gallocatéchine), bien que très répandus sous leur forme monomérique (catéchine du thé), sont aussi constitutifs des tanins condensés (Figure I-12).

Les phénols simples et la plupart des flavonoïdes ont des poids moléculaires relativement faibles et sont solubles selon leur polarité et leur structure chimique. Certains d'entre eux peuvent cependant se lier aux composés des parois cellulaires (polysaccharides, lignine). En revanche, les tanins condensés, ou proanthocyanidines, sont des polymères de 2 à 50 unités flavanols et sont donc des composés de poids moléculaires intermédiaires à élevés. En général, le poids moléculaire des tanins condensés varie autour de 5000 Da, mais certains pourraient dépasser les 30000 Da.

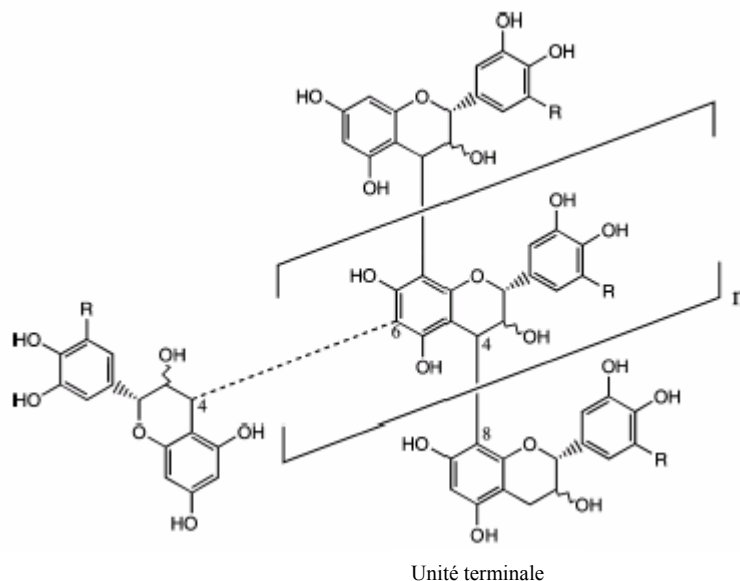


Figure I-12. Structure d'un tanin condensé (Schofield *et al.*, 2001).

Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent donc former des complexes insolubles avec les protéines et les glucides. La formation de complexes entre les tanins et les protéines salivaires va provoquer leur précipitation qui est responsable du caractère astringent des aliments riches en tanins. Les tanins provenant des végétaux peuvent se subdiviser en deux groupes (i) hydrolysables et (ii) condensés.

Les tanins hydrolysables sont représentés par l'acide gallique (Figure I-13) et son dimère de condensation, l'acide hexahydroxydiphénique, estérifié principalement en glucose.

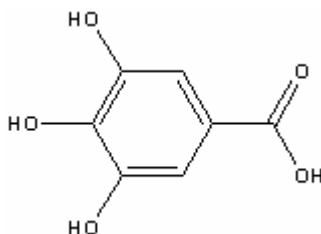


Figure I-13. Structure de l'acide gallique

Ces composés peuvent se condenser par oxydation avec d'autres molécules d'acide gallique ou hexahydroxydiphénique pour former des polymères de hauts poids moléculaires. Comme leur nom l'indique, ces tanins sont facilement hydrolysables par des acides, des bases, la chaleur ou des enzymes. Selon leur nature, ces tanins sont subdivisés en gallotanins, dérivés

de l'acide gallique, ou en ellagitanins, dérivés de l'acide hexahydroxydiphénique. Le tanin hydrolysable le plus connu est l'acide tannique qui est un gallotanin.

Les tanins condensés oligomériques et les tanins hydrolysables de faible poids moléculaire sont solubles dans différents solvants (acétone, méthanol, eau), tandis que les tanins condensés et hydrolysables de haut poids moléculaire sont insolubles. Lorsqu'ils forment des complexes avec les protéines ou les polysaccharides des parois cellulaires, les tanins deviennent insolubles (Bravo, 1998).

3.1.2.2. Activités anti-nutritionnelles

Les propriétés de chélation des flavonoïdes et particulièrement des tanins contribuent à leur activité antioxydante, mais par la même occasion à leur effet inhibiteur sur la biodisponibilité des minéraux. Par le biais de leurs groupements carboxyliques et hydroxyliques, les polyphénols forment des complexes avec les macronutriments et les cations métalliques. De nombreuses études chez l'homme et l'animal ont montré que les polyphénols inhibaient fortement l'absorption du fer (Gillooly *et al.*, 1983, 1984 ; Hurrell *et al.*, 2003). En effet, les complexes formés avec le fer non hémérique sont stables et leur absorption au niveau de l'intestin est très limitée.

Cette aptitude des polyphénols à former des complexes avec le fer a d'abord été principalement attribuée aux groupements galloyls des tanins (Brune *et al.*, 1989). Cependant, Khokhar et Apenten (2003) ont montré, en étudiant plus en détail à l'aide de la même méthode, la capacité des différents groupements dihydroxyliques et trihydroxyliques des polyphénols à complexer le fer, que la complexation du fer dépendait plutôt de la présence de groupements catéchols (3',4' dihydroxyl) et était réduite par la présence de groupements galloyls (3',4',5' trihydroxyl). La capacité de complexation de l'acide tannique avec le fer ne serait donc pas due à la présence de ces groupements galloyls mais à d'autres interactions. Cet effet inhibiteur de l'acide tannique a d'ailleurs également été montré *in vitro* en utilisant le modèle cellulaire Caco-2 pour simuler l'absorption intestinale (Glahn *et al.*, 2002). Ils ont mis en évidence que l'absorption du fer était inhibée jusqu'à 97,5% pour des rapports molaires acide tannique / fer supérieurs à un. Auparavant, Siegenberg *et al.* (1991) avaient montré au cours d'une étude chez l'homme que l'inhibition de l'absorption du fer par les polyphénols était dose-dépendante lorsque 12 à 55 mg d'acide tannique étaient ajoutés aux aliments consommés. Udayasekhara Rao et Deosthale (1988) ont également montré cet effet des tanins en étudiant la biodisponibilité *in vitro* du fer dans des variétés blanches d'éleusine (pas de tanins détectables) et brunes (0,35 à 2,39 g de tanins /100 g). Après extraction des tanins, la digestibilité du fer des variétés brunes augmentait de 85% et l'addition aux variétés blanches des tanins extraits la réduisait de 52 à 65%. Par ailleurs, Matuschek *et al.* (2001) ont montré que l'incubation d'échantillons de céréales déphytinisés riches en tanins avec une polyphénol oxydase (tyrosinase), diminuait les teneurs en polyphénols totaux et en groupements catéchols et résorcinol et entraînait une augmentation de la digestibilité *in vitro* du fer supérieure à celle obtenue après dégradation des phytates seuls.

Mais les composés phénoliques sont également réputés pour leur capacité à se lier et à précipiter les protéines, diminuant ainsi leur digestibilité (Haslam, 1974 ; Hagerman et Butler, 1981). Ces complexations se font par le biais de ponts hydrogènes ou d'interactions hydrophobes et sont caractéristiques des tanins fortement polymérisés (Bravo, 1998). De plus, les tanins peuvent se lier aux protéines endogènes du tube digestif et inhiber leur activité, causant ainsi non seulement une réduction de la digestibilité des protéines mais aussi des autres macronutriments (amidon, lipides) (Longstaff et McNab, 1991 ; Al-manary *et al.*, 2001).

Il est, par ailleurs, intéressant de noter que la chélation de cations divalents ne rend pas nécessairement les polyphénols inactifs, puisqu'ils gardent leur capacité d'inactivation des formes réactives de l'oxygène (Heim *et al.*, 2002), tandis que leur complexation avec les protéines de la matrice alimentaire ou du tube digestif influence de manière significative leur activité biologique (Papadopoulou et Frazier, 2004).

Notons enfin que de par cette capacité à se lier aux protéines, les tanins peuvent également avoir un effet indirect sur la biodisponibilité des minéraux en inhibant les enzymes susceptibles de réduire les teneurs en facteurs anti-nutritionnels (Svanberg *et al.*, 1993).

3.1.3. Les fibres

3.1.3.1. *Définition et classification*

Définition

Le terme de « fibres alimentaires » est apparu pour la première fois en 1953 et faisait référence aux hémicelluloses, à la cellulose et à la lignine. En 1972, Trowell définissait une première fois les fibres alimentaires comme « les fractions de parois végétales non hydrolysées par les enzymes digestives de l'homme ». Cette définition a ensuite été élargie par le même auteur en 1976 puisqu'à l'expression « fractions de parois végétales » était substituée celle de « polysaccharides végétaux et la lignine » (Trowell *et al.*, 1976). En 1981, l'AOAC proposait de retenir une définition très similaire à celle proposée par Trowell en 1972 mais dut l'abandonner en raisons de considérations à la fois d'ordres analytiques et physiologiques.

En effet, bien qu'aucune définition ne réunisse l'ensemble de ces critères, les définitions des fibres alimentaires sont censées répondre aux critères suivants (Champ, 2003) :

- l'origine biologique ou synthétique des fibres,
- la nature chimique des composés inclus,
- le degré de polymérisation minimum des polymères glucidiques,
- leur résistance à l'hydrolyse par les enzymes endogènes du tube digestif,
- la notion d'aliment ou de composé « comestible »,
- la référence à une méthode d'analyse,
- une référence à leur fermentescibilité dans le côlon,
- la référence à des effets physiologiques.

En 2002, le groupe de travail de l'AFSSA proposait donc de considérer comme fibres alimentaires, soit (i) des polymères glucidiques ($DP \geq 3$) d'origine végétale, associés ou non dans la plante à de la lignine ou à d'autres constituants non glucidiques (polyphénols, cires, saponines, cutine, phytates, phytostérols...), soit (ii) des polymères glucidiques transformés (physiquement, enzymatiquement ou chimiquement) ou synthétiques ($DP \geq 3$) consignés dans une liste dont le contenu pourra évoluer en fonction des autorisations de l'AFSSA (e.g. fructooligosaccharides, oligofructoses). En outre, l'AFSSA précise que les fibres alimentaires ne sont ni digérées, ni absorbées dans l'intestin grêle et qu'elles présentent l'une au moins des propriétés suivantes :

- Augmentation de la production des selles
- Stimulation de la fermentation colique
- Distribution de la cholestérolémie à jeun
- Diminution de la glycémie et/ou de l'insulinémie post-prandiale(s).

Classification

- Les polysaccharidiques structuraux

Les polysaccharides (à l'exclusion de l'amidon) qui représentent l'essentiel des structures pariétales des végétaux sont constitués d'enchaînements linéaires ou ramifiés de monosaccharides neutres à six carbones (hexoses et méthyl pentoses) ou à cinq carbones (pentoses) et de monosaccharides acides à six carbones (acides uroniques). Les polysaccharides peuvent être classés en homopolysaccharides, constitués d'un seul monomère (cas de la cellulose) et en hétérosaccharides contenant plusieurs types d'oses constitutifs (arabinoxylanes).

Ils sont usuellement répartis en trois catégories selon leur solubilité :

- Cellulose : homopolysaccharide essentiellement insoluble dans les solvants alcalins.
- Hémicelluloses : classe d'hétéropolysaccharides solubilisés par les bases diluées.
- Substances pectiques : classe d'hétéropolysaccharides acides et neutres solubilisés par les agents chélatant le calcium (EDTA).

Cependant, cette terminologie reposant sur des procédés d'extraction différentielle peu sélectifs a tendance à disparaître. Il paraît donc préférable de décrire les polysaccharides d'après leurs structures chimiques à partir desquelles on peut distinguer trois types de fibres polysaccharidiques. La **cellulose** est composée d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons β (1 \rightarrow 4) et dont le degré de polymérisation peut atteindre 10000. Dans les structures pariétales, les molécules de cellulose se réunissent en microfibrilles qui s'associent pour former des fibres de cellulose. Le terme de **xylanes** regroupe des composés dont le squelette linéaire est formé d'unités xylose reliées en β (1 \rightarrow 4) et qui possèdent des ramifications courtes (1 à 4 unités) pouvant contenir de l'arabinose, de l'acide glucuronique, du xylose et du galactose. Il s'agit essentiellement de constituants de la paroi secondaire des végétaux et sont donc associés à la lignine. Les **rhamnogalacturonanes (pectines)** sont des polysaccharides acides constitués d'enchaînements linéaires d'unités acide galacturonique liées en α (1 \rightarrow 4) et entrecoupées d'unités rhamnose auxquelles se rattachent des ramifications constituées d'oses neutres (e.g., arabinose, galactose, xylose). Le degré de polymérisation, le pourcentage d'unités rhamnose, la nature, la structure et les proportions relatives de chaînes latérales sont extrêmement variables selon le végétal considéré. Ils sont surtout présents dans les fruits, les feuilles, les racines et les tubercules.

- Les composés non polysaccharidiques structuraux

Il s'agit principalement de la lignine qui est un composé phénolique.

- Les composés polysaccharidiques non structuraux

Ces composés incluent les gommés et les mucilages, ainsi que des polysaccharides tels que la carraghénane et l'agar, que l'on trouve principalement dans les algues.

Le tableau I-15 illustre les principaux types de fibres présents dans les aliments d'origine végétale avec leur structure.

Tableau I-15. Tableau récapitulatif des principaux types de fibres présents dans les aliments d'origine végétale.

Nature et fonction	Type de composés		Structure	Principales sources alimentaires
Polysaccharides structuraux des parois cellulaires végétales	Polysaccharides	Cellulose	Longues chaînes de β -glucanes	Toutes parois cellulaires
	Polysaccharides non cellulosiques	Hémicelluloses	Arabinogalactanes Arabinoxylanes Glucuronoarabinoxylanes	Céréales Céréales
			Glucuronoxylyanes Xyloglucanes β -glucanes	Fruits, légumes Fruits, légumes Céréales
		Pectines	Galacturonanes	Fruits, légumes
Composés non polysaccharidiques structuraux	Composé phénolique	Lignine		
Polysaccharides non structuraux	Gommes, mucilages		Hétéropolysaccharides	Graines, fruits

Modifié d'après Southgate (1995).

Les teneurs en fibres peuvent être diminuées par élimination mécanique des enveloppes ou par solubilisation après destruction des liaisons glycosidiques intra- ou inter-polysaccharidiques. La cuisson dans des solutions de sodium ou de calcium, par exemple, s'est révélée efficace pour dégrader les fibres de carotte et diminuer leur teneur en acide uronique (Nyman et Svanberg, 2002). En revanche, dans les grains de céréales, cet effet éventuel de la cuisson n'a pas été mis en évidence.

3.1.3.2. Activités anti-nutritionnelles

Bien qu'il soit difficile de dissocier l'effet des fibres de celui des phytates et des tanins qui y sont souvent associés, la fixation de cations est une propriété physique reconnue également pour les fibres alimentaires. En effet, les diminutions de la biodisponibilité des minéraux et de l'absorption des électrolytes présents dans des aliments riches en fibres sont attribuées à la capacité des fibres à créer des liaisons avec ces minéraux et électrolytes, entraînant une augmentation de leur excrétion (Schneeman, 1986). Par ailleurs, en faisant varier les teneurs en phytates et en fibres totales de mélanges à base de carottes, de riz et de pois, Olivares *et al.*, (2001) ont montré que, outre la teneur en phytates, l'augmentation de la teneur en fibres influait négativement sur la biodisponibilité *in vitro* du fer, du zinc et du calcium. Hocquelliet et L'Hotellier (1997) ont d'ailleurs montré que l'action de cellulases sur le résidu insoluble de digestion d'un aliment riche en fibres entraînait la libération d'environ 20% du fer et du zinc total, montrant ainsi l'existence de liaisons entre les groupements carboxyliques des fibres et ces cations.

Le nombre de groupements carboxyliques des sucres et la teneur en acide uronique des polysaccharides semblent être reliés à cette capacité des fibres à échanger des cations. Ainsi, dans les légumineuses, les acides uroniques et les pectines ont été incriminés dans la diminution de la biodisponibilité des minéraux et particulièrement du zinc et du manganèse

(Rubio *et al.*, 1992). Bagheri *et al.* (1982) ont également mis en évidence un fort pouvoir de captation du zinc par les hémicelluloses et n'ont pas trouvé d'influence de la cellulose.

D'autres études ont semblé montrer que la cellulose et le son de blé seraient capables d'interagir avec le fer et/ou le zinc et, comme dans le cas des interactions phytates-minéraux, ces interactions cellulose-minéraux seraient dépendantes du pH (Reinhold *et al.*, 1975 ; Persson *et al.*, 1987). Ainsi, en présence de différents types de fibres, le fer, le zinc et le cuivre seraient totalement solubles à pH 0,65 et deviendraient progressivement insolubles par augmentation du pH jusqu'à une insolubilisation totale à pH 6,8 (Thompson et Weber, 1979).

Au delà de ces controverses quant aux responsables de la diminution de la biodisponibilité des minéraux parmi les fibres insolubles, il existe également une controverse quant à l'activité anti-nutritionnelle même des fibres. Shah *et al.* (1991) n'ont pas constaté d'effet négatif à long terme de la teneur en fibres (ni de la teneur en phytates) sur l'absorption du fer et du zinc chez le rat. De même, Davidsson *et al.* (1996) ont montré que l'augmentation de la teneur en fibres de laits maternisés à base de blé et/ou de soja ne diminuait pas l'absorption du fer, du zinc et du calcium chez le nourrisson. Ils précisent cependant que d'éventuels effets ont pu être masqués par une teneur en phytates trop élevée dans les régimes et que ce résultat n'est pas forcément transposable dans le cas d'enfants malnutris. Une autre étude réalisée sur des hommes consommant des pains à base de farines plus ou moins fermentées, a montré que la teneur en fibres n'avait pas d'influence sur l'absorption du fer qui n'était réduite que par les fortes teneurs en phytates (Brune *et al.*, 1992). Martinez *et al.* (1998), quant à eux, ont étudié l'effet des fibres et des phytates sur la biodisponibilité *in vitro* du fer et du zinc dans des farines d'Amérique. Les fibres n'avaient pas d'effet sur la digestibilité du fer mais diminuaient celle du zinc, qui était toutefois réduite de manière plus importante par les fortes teneurs en phytates. Enfin, un effet bénéfique de l'ajout de fibres d'enveloppes de maïs sur l'absorption du zinc a même été montré chez le rat consommant des régimes sans fibre (Hara *et al.*, 2001). L'hypothèse de la formation de complexes zinc-acide uronique solubles et absorbables par la muqueuse intestinale a été formulée pour expliquer ce phénomène.

En ce qui concerne les fibres solubles, elles peuvent avoir des effets également très variables sur la biodisponibilité des minéraux. Ainsi, testées en tant qu'agents épaississants ajoutés à des laits maternisés, différentes fibres solubles (gommes, pectine, inuline) ont, soit augmenté, soit diminué, la biodisponibilité des minéraux, selon leur nature, la formulation et le minéral considéré (Bosscher *et al.*, 2001b, 2003). D'autres polysaccharides (chitosane, amidon résistant de pomme de terre) ont eu un effet positif sur la biodisponibilité du zinc chez le rat et Yonekura et Suzuki (2003) et Yonekura *et al.* (2003) ont ainsi émis l'hypothèse que ces composés avaient la capacité de diminuer l'effet inhibiteur des phytates présents dans le régime. En revanche, d'autres études réalisées chez l'homme et l'animal, n'ont pas mis en évidence d'effet significatif des fibres solubles sur la biodisponibilité des minéraux (Torre *et al.*, 1991 ; Munoz et Harland, 1993).

En conclusion, nous pouvons dire que l'effet des fibres sur la biodisponibilité des minéraux est loin d'avoir été totalement élucidé. De nombreux facteurs semblent devoir être pris en compte dans l'interprétation des résultats des études destinées à montrer l'effet de ces composés : la présence d'autres agents inhibiteurs ou activateurs de l'absorption des minéraux dans la matrice étudiée, les concentrations en minéraux, le pH au cours d'études *in vitro* et l'état nutritionnel des sujets dans le cas d'études *in vivo*.

Ainsi, le principal résultat qui semble ressortir de cette synthèse est qu'il est difficile de tirer des conclusions définitives sur l'étude d'un composé si tous les facteurs de la matrice n'ont pas été pris en compte. Bien que les résultats de ces études semblent difficilement extrapolables à l'étude de matrices alimentaires différentes, ces études apportent toutefois des éléments de compréhension concernant les interactions possibles entre composés.

3.1.4. Autres facteurs

3.1.4.1. *Les protéines*

Plusieurs études ont montré que la présence de protéines d'origine végétale inhibait significativement l'absorption du fer non héminique (Derman *et al.*, 1987 ; Macfarlane *et al.*, 1988, 1990). Cet effet est principalement dû aux phytates liés à ces protéines, mais a également été attribué aux peptides de haut poids moléculaires (Kane et Miller, 1984). Cette inhibition a surtout été étudiée dans le cas du soja et de quelques autres légumineuses telles que le pois. Hurrell *et al.* (1992) ont montré que, même après une dégradation totale de la teneur en phytates d'isolats protéiques de soja, l'absorption du fer était encore réduite de moitié par les protéines de soja par rapport à celle du blanc d'œuf utilisé comme contrôle. Les produits à base de soja tel que le « *miso* », dans lesquels les complexes protéiques ont été rompus au cours de leur préparation, présentent une biodisponibilité *in vitro* du fer significativement supérieure à celle des autres produits à base de soja (Macfarlane *et al.*, 1990).

3.1.4.2. *Les interactions entre minéraux*

Il existe deux types d'interactions possibles entre minéraux dans les systèmes biologiques. Dans le premier, deux éléments partagent la même voie d'absorption, ce qui signifie qu'une forte concentration en un des deux éléments peut interférer avec l'absorption de l'autre. Le second type d'interaction a lieu lorsque la carence en l'un des deux éléments affecte le métabolisme de l'autre, comme une carence en cuivre qui peut induire une carence en fer (Cohen *et al.*, 1985).

Bien que le fer et le zinc ne soient pas en compétition directe pour les sites d'absorption, Solomons et Jacob (1981) ont montré que de fortes teneurs en fer pouvaient interférer de manière dose dépendante avec les apports en zinc. Sandström *et al.* (1985) ont étudié ce phénomène lors d'une étude clinique avec des aliments qui avaient des teneurs en zinc normales. Ils ont montré que l'absorption du zinc n'était pas influencée par la concentration en fer tant que le rapport molaire fer/zinc était inférieur ou égal à 2,5, bien que lorsque ce rapport atteignait 25, le niveau d'absorption du zinc diminuait de 60 à 38%. En revanche, aucune interaction n'a été trouvée lorsque les prises de fer et de zinc étaient décalées dans le temps. Par ailleurs, en ce qui concerne l'effet de fortes teneurs en zinc sur l'absorption du fer, Rossander-Hultén *et al.* (1991) n'ont trouvé aucune diminution chez l'homme même pour des rapports molaires zinc/fer de 300, tandis que Glahn *et al.* (2002) ont montré que la présence de chlorure de zinc diminuait jusqu'à 80% l'absorption du fer par les cellules Caco-2. Dans les travaux de Boccio *et al.* (2002), l'ajout de sulfate de zinc diminuait également l'absorption du fer chez le rat, mais uniquement lorsqu'il était ajouté en solution dans de l'eau et non lorsqu'il était incorporé aux aliments d'un repas, alors que l'ajout de sulfate de fer n'avait pas d'effet sur l'absorption du zinc.

Le calcium peut également interférer avec l'absorption du fer, bien que les mécanismes pouvant expliquer ce phénomène restent controversés (Hallberg *et al.*, 1992a). Il semblerait que l'inhibition se passe au niveau du transport intracellulaire du fer. En effet, les absorptions du fer héminique et non héminique peuvent toutes deux être inhibées par le calcium, alors que leurs mécanismes de pénétration dans les cellules de la muqueuse se font par des voies différentes (Hallberg *et al.*, 1992b). Cet effet inhibiteur du calcium sur l'absorption du fer est indépendante de la teneur en phytates et n'interfère pas avec l'effet activateur de la viande (Hallberg *et al.*, 1992b) ou de l'acide ascorbique (Hallberg *et al.*, 1992a).

3.2. Facteurs améliorant la biodisponibilité des minéraux

3.2.1. L'acide ascorbique

L'acide ascorbique est connu comme étant une molécule favorisant l'absorption du fer non hémérique. Les mécanismes de cette activation sont basés sur (i) la réduction du fer ferrique en fer ferreux, présentant une meilleure capacité d'absorption par la muqueuse intestinale et (ii) sur la formation de complexe fer-acide ascorbique à pH acide. Ces complexes sont formés à un pH inférieur à celui auquel se forment les complexes entre fer et phytates, tanins ou d'autres inhibiteurs de l'absorption du fer. Ainsi, le fer ferreux est préférentiellement lié à l'acide ascorbique au niveau de l'estomac et reste sous cette forme même au niveau de l'intestin alors que le pH devient plus alcalin. Les agents chélateurs qui auraient normalement complexés le fer au niveau du duodénum n'ont donc pas d'effet inhibiteur en présence d'acide ascorbique (Hurrell, 1984). D'après une synthèse réalisée par Allen et Ahluwalia (1997) concernant l'ajout d'acide ascorbique à des repas à base de maïs, de blé et de riz, l'absorption du fer chez les sujets est à peu près doublée par l'addition de 25 mg d'acide ascorbique et peut être multipliée de trois à six fois lorsque 50 mg sont ajoutés. Cet effet favorable de l'acide ascorbique, dû à l'affinité préférentielle du fer pour ce composé par rapport aux autres composés chélateurs, se manifeste d'autant plus quand les aliments sont riches en phytates ou en composés phénoliques (Derman *et al.*, 1977 ; Siegenberg *et al.*, 1991). Cette relation a été illustrée pour une large gamme de régimes par Hallberg *et al.* (1986). Toutefois, si l'effet activateur de l'acide ascorbique sur l'absorption du fer est supérieur en présence d'agents chélateurs, lorsque leurs teneurs augmentent, la quantité d'acide ascorbique nécessaire pour contrecarrer leur effet est également augmentée. Ainsi, Gillooly *et al.* (1984) ont montré que l'amélioration de l'absorption du fer due à l'ajout de 50 mg d'acide ascorbique à une bouillie à base de sorgho germé pouvait être annulée en grande partie par la consommation simultanée de thé. Ceci s'explique par le fait que les complexes fer-tanin une fois formés sont résistants à la réduction par l'acide ascorbique (South et Miller, 1998). Par ailleurs, Davidsson *et al.* (1997) ont étudié l'effet de la déphytinisation d'une formule infantile à base de farine de blé et n'ont pas trouvé d'effet significatif, ce qu'ils ont attribué à la forte teneur en acide ascorbique de la formule.

L'acide ascorbique peut être apporté aux jeunes enfants par le biais de jus de fruits qui, consommés au moment du repas, permettent de doubler la biodisponibilité du fer de différents types d'aliments (Fairweather *et al.*, 1995). Notons toutefois que l'effet activateur de l'acide ascorbique sur l'absorption du fer s'est révélé beaucoup moins prononcé lorsque l'ensemble des ingérés de la journée était pris en compte et non pas ceux relatifs à un seul repas (Cook et Reddy, 2001).

3.2.2. Les autres acides organiques

D'autres acides organiques améliorent également l'absorption du fer. L'addition de 1 g d'acide citrique, tartrique ou malique à un repas à base de riz a permis de multiplier l'absorption du fer respectivement par 3,0, 2,3 et 2,0 (Gillooly *et al.*, 1983). Ekholm *et al.* (2003) ont également étudié l'effet de l'ajout d'acides citrique et malique sur la solubilité *in vitro* des minéraux et ont mis en évidence un effet positif important de l'ajout d'acide citrique (particulièrement pour le calcium, le magnésium et le zinc) mais faible pour l'acide malique. Cet effet serait dû aux groupements carboxyliques et hydroxyliques de ces acides qui leur permettent de créer des liaisons avec le fer formant ainsi des complexes solubles. Cependant, l'effet de l'acide citrique sur l'absorption du fer ne se vérifie pas toujours. Hallberg et

Rossander (1984) ont trouvé une diminution significative de la biodisponibilité du fer après ajout de 1 g d'acide citrique à des repas à base de maïs, de riz et de haricots noirs.

L'effet activateur de l'acide lactique sur l'absorption du fer n'a pas été non plus très bien évalué. Derman *et al.* (1980) ont montré qu'il pouvait se révéler efficace dans des bières à base de sorgho et de maïs, tandis que Baynes *et al.* (1990) a montré que l'addition de 340 mg d'acide lactique à un repas à base de riz n'avait aucun effet sur l'absorption du fer.

Par ailleurs, Maenz *et al.* (1999) ont montré que les acides organiques (citrique et phtalique) pouvaient avoir un effet indirect sur la biodisponibilité des minéraux, car en tant que chélateur compétitif face aux phytates, ils peuvent faciliter leur hydrolyse par les phytases, l'acide phytique étant plus sensible que les sels de phytates, et ainsi faciliter leur dégradation au cours des procédés biologiques.

3.2.3. Les protéines animales

L'effet activateur de la plupart des protéines animales (viande, poisson, volaille) sur l'absorption du fer est bien connu. Cet effet serait dû spécifiquement aux protéines musculaires et non aux protéines animales en général (Cook et Monsen, 1976 ; Bjorn-Rasmussen et Hallberg, 1979). Martinez-Torres et Layrisse (1970) indiquaient déjà que la consommation de 100 g de poisson, ou d'une quantité équivalente d'acides aminés synthétiques, à des haricots noirs doublait l'absorption du fer. Des études font état de l'effet positif de la viande sur l'absorption du fer (Olivares *et al.*, 2001), de même que sur l'absorption du zinc (Sandström, 1992). Les mécanismes par lesquels ces protéines augmenteraient l'absorption des minéraux ne sont pas clairs, mais les hypothèses les plus fréquentes font référence aux produits intermédiaires formés au cours de la digestion des protéines qui se lieraient aux minéraux et en faciliteraient l'absorption (Kane et Miller, 1984 ; Lönnerdal, 2000). Cet effet serait particulièrement influencé par la composition en acides aminés des peptides formés et notamment par la présence d'acides aminés soufrés ou hétérocycliques tels que la cystéine ou l'histidine (Layrisse *et al.*, 1984 ; Swain *et al.*, 2002). Par ailleurs, Hurrell *et al.* (1988) ont montré que les protéines de viande n'avaient pas ou peu d'effet sur la teneur en fer dialysable, suggérant soit, que les produits de digestion générés *in vitro* étaient différents soit, que les protéines de la viande jouaient un rôle dans la solubilisation des minéraux, mais également dans des mécanismes physiologiques comme la stimulation des sécrétions intestinales.

L'effet des protéines contenues dans 1 g de viande serait équivalent à 1 mg d'acide ascorbique pour améliorer l'absorption du fer non héminique de repas semi synthétiques (Monsen *et al.*, 1978). De même, l'ajout de 75 g de viande ou de 50 mg d'acide ascorbique conduisent à des améliorations identiques de la biodisponibilité en fer de repas typiques d'Amérique latine à base de maïs, de riz et de haricots noirs (Hallberg et Rossander, 1984).

3.2.4. Les sucres

Certains oligosaccharides tels que le lactose et les maltodextrines peuvent améliorer l'absorption du zinc au niveau de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale (Bertelo *et al.*, 2001). Cependant, aucun effet stimulant de l'absorption du zinc n'est observé en présence des monosaccharides constitutifs du lactose (galactose et glucose) ou de maltose (Ekholm *et al.*, 2003). D'autres études sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes par lesquels le lactose et les maltodextrines favorisent l'absorption du zinc. Il a également été montré que l'ajout de sorbitol à un rapport de 12/1 (p/p) par rapport au fer permettait de doubler l'absorption du fer de préparations pharmaceutiques de sulfate de fer (Loria *et al.*, 1962).

3.3. Effets des procédés technologiques sur les teneurs en facteurs antinutritionnels et la biodisponibilité des minéraux

Les traitements technologiques peuvent avoir sur les teneurs et la biodisponibilité du fer et du zinc (i) un effet direct en modifiant leur localisation dans l'aliment ou leur valence (ii) ou bien indirect en modifiant les teneurs en molécules améliorant et/ou diminuant leur biodisponibilité. L'impact des traitements sur la biodisponibilité des minéraux dépend de la structure de l'aliment (solide structuré, liquide, ...) et de la localisation des différents constituants influant sur cette biodisponibilité.

3.3.1. Les procédés mécaniques

De manière générale, les chélateurs du fer et/ou du zinc, notamment les phytates, sont localisés dans le germe (maïs, mil) et/ou les tissus périphériques (blé, triticale, sorgho, riz...) des grains de céréales (O'Dell *et al.*, 1972 ; Reddy, 2002). En revanche, pour les légumineuses, les phytates sont localisés dans les cotylédons de sorte que leur teneur augmente après décortilage de 11, 10 et 2% respectivement pour le pois, la fève et le haricot (Alonso *et al.*, 1998 ; 2000). Le fractionnement des céréales réduit considérablement les teneurs en facteurs anti-nutritionnels du produit fini en séparant l'albumen amylic des tissus riches en phytates, composés phénoliques ou fibres (Gillooly *et al.*, 1984), mais parallèlement une quantité non négligeable de minéraux peut être également perdue. Dans le cas du blé, l'optimisation du procédé de mouture permet de produire des farines blanches à faible taux d'extraction ; les teneurs en phytates dans les produits obtenus sont peu élevées et la biodisponibilité du fer relativement bonne (Davidsson *et al.*, 1997).

Le décortilage est particulièrement efficace dans le cas des grains de sorgho dans lesquels les composés phénoliques sont concentrés dans les enveloppes. Grâce à ce procédé, des efforts considérables ont pu être permis pour améliorer la qualité nutritionnelle des variétés de sorgho riches en tanins qui sont généralement celles cultivées en raison de leurs avantages agronomiques (Reichert *et al.*, 1988 ; Salunkhe *et al.*, 1990).

3.3.2. Les procédés thermiques

Utilisés à l'échelle ménagère (blanchiment, cuisson hydrothermique, friture...) et/ou à l'échelle industrielle (extrusion, torréfaction...), ils mettent les aliments au contact d'un fluide caloporteur (eau, huile, vapeur, air sec, ...) ou d'une surface métallique chauffée. S'il s'agit d'une immersion en milieu liquide, des transferts de matière sont observés entre l'aliment et son environnement et des minéraux peuvent être perdus par simple solubilisation dans le milieu de cuisson (lixiviation).

Au cours du traitement, la chaleur transmise à l'aliment va modifier la biodisponibilité du fer en agissant à différents niveaux : (i) altération de la structure cellulaire et libération des minéraux plus ou moins complexés dans le milieu, (ii) modification de leur spéciation (*i.e.* valence, liaison à des ligands, ...), (iii) dénaturation des protéines auxquelles ils peuvent être liés (*i.e.* enzymes, myoglobine des produits animaux), (iv) destruction des molécules améliorant (vitamine C, phytases...) et/ou diminuant (phytates, composés phénoliques,...) la biodisponibilité, (v) réactions secondaires (Maillard) impliquant ces éléments par le biais des protéines. Dans certains cas, ces modifications conduiront à une augmentation de la biodisponibilité des minéraux, tandis que dans d'autres cas ils la diminueront ; les effets observés dépendront essentiellement des conditions d'application du traitement et de la matrice alimentaire.

3.3.2.1. La cuisson

Réduction des teneurs en phytates

Les taux de réduction des teneurs en phytates obtenus par différents auteurs ayant effectué des cuissons dans des conditions de température et de durée variables et sur différents matériels végétaux sont résumés dans le tableau I-16.

Tableau I-16. Effets de la cuisson en milieu aqueux sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Caractéristiques et durée de la cuisson	Réduction des teneurs en phytates (%)
Duhan <i>et al.</i> (2002)	Pois d'angole	Trempage de 12 h + Cuisson	15
	Pois	Cuisson pendant : 20 min	24
Habiba (2002)		30 min	42
		40 min	48
Duhan <i>et al.</i> (1999)	Pois d'angole	Cuisson jusqu'à ramollissement	50
Elsheikh <i>et al.</i> (1999)	Haricot	Cuisson à ébullition pendant 45 min	17
Greiner et Konietzny (1998)	Haricot	Trempage à 25°C pendant 15 h + Cuisson à ébullition pendant 2 h	20
Maghoub et Elhag (1998)	Farine de sorgho	Cuisson en bouillie à 95°C	29
Valencia <i>et al.</i> (1999)	Farine de quinoa	Cuisson en bouillie à 100°C pendant 25 min	15-20
	Niébé	Cuisson pendant : 10 min	9
Vijayakumari <i>et al.</i> (1998)		20 min	25
		30 min	31
Chau <i>et al.</i> (1997)	Haricot	Cuisson pendant 60 min	26
	Maïs	Caractéristiques non précisées	16
	Sorgho		16
Marfo <i>et al.</i> (1990)	Riz		31
	Niébé		17
	Soja		17
Akpanunam et Achinewhu (1985)	Niébé	Cuisson à 100°C pendant 90 min	7
Tabekhia et Luh (1980)	Niébé	Cuisson pendant 3 h	13
	Haricot		36

Bien que les phytates soient thermiquement stables, on observe des réductions des teneurs en phytates au cours de la cuisson. Ces réductions sont dues, soit à une diffusion des phytates dans l'eau de cuisson, soit à une hydrolyse enzymatique due à l'activation de phytases ou de phosphatases au début de la cuisson. Les travaux répertoriés dans le tableau I-16 font état de taux de réduction des teneurs en phytates pouvant aller de 7 à 50% pour des cuissons en milieu aqueux de 10 min à 3 h. On remarque cependant que les résultats reportés sont différents selon les auteurs. Pour le niébé, par exemple, Vijayakumari *et al.* (1998) ont

constaté une réduction des phytates de 31% en 30 min, tandis que Akpapunam et Achinewhu (1985) en 90 min et Tabekhia et Luh (1980) en 3 h n'ont constaté respectivement que 7 et 13% de réduction. Ces différences peuvent être attribuées, soit à des différences inter-variétales, soit à l'application de durées de trempage préalable différentes, soit à l'application de modalités de cuisson différentes qui ne sont en général pas précisées (proportion matériel/eau, température de la plaque chauffante...).

Réductions des teneurs en d'autres facteurs anti-nutritionnels

Les effets de la cuisson sur les teneurs en fibres et/ou en composés phénoliques sont synthétisés dans le tableau I-17.

Tableau I-17. Effets de la cuisson en milieu aqueux sur les teneurs en composés phénoliques et/ou fibres de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée de la cuisson (min)	Variation des teneurs en composés phénoliques ou en fibres (%)	
			Fibres insolubles	Fibres totales
Kutos <i>et al.</i> (2003)	Haricot	120	ns	+ 21
	Haricot (après 18 h de trempage)	40	ns	+ 16
Matuschek <i>et al.</i> (2001)	Farine de sorgho	5	Catéchols	Polyphénols
	Farine d'éléusine		ns	- 36
Chau <i>et al.</i> (1997)	- <i>Phaseolus angularis</i>	30	- 59	ns
	- <i>Phaseolus calcaratus</i>	60	- 71	ns
	- <i>Phaseolus calcaratus</i>	30	- 52	
	- <i>Phaseolus calcaratus</i>	60	- 65	
	- <i>Dolichos lablab</i>	60	- 75	
	- <i>Dolichos lablab</i>	90	- 82	
		120	- 86	

ns : non significatif

On remarque que la cuisson permet d'obtenir de forts taux de réduction des teneurs en composés phénoliques (de 52 à 86% pour les graines de légumineuses après 30 à 120 min de cuisson) par rapport à ceux observés pour les phytates. Il semblerait toutefois que la préparation de bouillie par cuisson pendant 5 min de farine de céréale n'entraîne qu'une diminution limitée, notamment des groupements catéchols des tanins. Par ailleurs, la variation passive de teneur en fibres totales reportée par Kutos *et al.* (2003) après cuisson peut être attribuée à la solubilisation d'autres composés de la matrice dans l'eau de cuisson.

Effet sur la biodisponibilité des minéraux

Toujours dans le cas d'une cuisson en milieu liquide, des minéraux sont perdus par lixiviation (Latunda-Dada, 1997), mais une partie des éléments de l'eau de cuisson ou des particules provenant du matériel utilisé (casserole, ...) peuvent pénétrer dans l'aliment et l'enrichir, notamment en fer (Borigato et Martinez, 1992 ; Kollipara et Britin, 1996). La quantité de fer incorporée dans l'aliment sera d'autant plus importante que les ustensiles seront neufs, le pH de l'aliment bas et le temps de cuisson long (Zhou et Brittin, 1994). Les résultats concernant la biodisponibilité de ce fer sont toutefois controversés. Certaines études tendraient à montrer

que sa biodisponibilité dans l'aliment est supérieure à celle du fer intrinsèque (Martinez et Vannucchi, 1986 ; Kumari *et al.*, 2004), tandis que d'autres auteurs soutiennent qu'elle est la même que celle du fer de l'aliment et donc faible si ce dernier contient beaucoup de facteurs anti-nutritionnels (Miller, 1996).

Lorsque les modalités de cuisson ne s'accompagnent pas d'une augmentation de la quantité de fer total, des diminutions de biodisponibilité *in vitro* du fer après cuisson dans l'eau ont été reportées. Matuschek *et al.* (2001), par exemple, ont montré que la digestibilité du fer passait de 3,5 à 1,9% et de 3,0 à 2,4% après cuisson respectivement de farine de sorgho et d'éleusine en bouillie. Koplík *et al.* (2004) ont étudié les changements de solubilité des minéraux du pois après cuisson dans l'eau et ont montré de très fortes diminutions des quantités de fer et de zinc extractibles en raison de modification de la spéciation de ces éléments qui deviennent moins solubles.

En revanche, selon Gahlawat et Sehgal (1994) le fait de griller des mélanges de grains de blé, d'avoine et de haricot mungo augmente d'environ 17% la biodisponibilité *in vitro* du fer. Notons cependant que la biodisponibilité du fer étant très faible dans les céréales et légumineuses, une telle augmentation relative représente une très faible augmentation absolue. Ces faibles améliorations peuvent être attribuées aux faibles diminutions de teneurs en facteurs anti-nutritionnels, et notamment en phytates, observées au cours de la cuisson.

La cuisson engendre donc des modifications complexes des interactions entre minéraux et matrice alimentaire et d'autres études concernant ses effets sur la biodisponibilité des minéraux sont nécessaires.

3.3.2.2. La cuisson à haute pression

Deux types de cuisson à haute pression peuvent être distingués : les traitements hydrothermiques (cocotte minute, appertisation, autoclavage) et les traitements thermomécaniques (cuisson-extrusion).

Réduction des teneurs en phytates

L'appertisation est le seul procédé de cuisson à haute pression dont l'efficacité sur les teneurs en phytates a pu être prouvée. Tabekhia et Luh (1980) ont montré que 68 et 91% des phytates respectivement des graines de niébé et de haricot mungo pouvaient être dégradés par ce procédé. En revanche, l'autoclavage des graines de légumineuses, ne se révèle pas efficace d'après Ologobo et Fetuga (1984) et Habiba (2002) qui ont obtenu respectivement des réductions de 7 et 20% des teneurs en phytates du soja et du pois. Vijayakumari *et al.* (1998) ont trouvé à peu près les mêmes résultats après 20 min d'autoclavage de graines de haricot indien et de dolique avec respectivement 25 et 13% de réduction des teneurs en phytates.

La cuisson-extrusion également modifie peu les teneurs en phytates. Alonso *et al.* (1998) indiquent qu'une cuisson-extrusion à 148°C réduit de 8% la teneur en phytates d'une farine de pois. Des taux de réduction de 21 et 4% des phytates, respectivement de farines de pois et de haricot blanc, ont également été observées avec une température d'extrusion légèrement plus élevée (Alonso *et al.*, 2001). Enfin, Sandberg *et al.* (1987) ont reporté que la cuisson-extrusion à 120°C d'un mélange d'amidon, de gluten et de son provoquait l'hydrolyse de 25% des IP6 en IP5 et IP4.

Réductions des teneurs en autres facteurs anti-nutritionnels

L'autoclavage permet de dégrader la majorité des composés phénoliques, contrairement à son effet sur les phytates. Vijayakumari *et al.* (1998) ont trouvé des réductions de 92 et 82% des teneurs en polyphénols totaux et de 64 et 79% des teneurs en tanins, respectivement pour les

graines de haricot indien et de dolique. Siljeström *et al.* (1986), ont étudié l'effet de ce procédé sur la teneur en fibres totales d'une farine de blé en conditions drastiques (25 min à 150°C) et ont montré une réduction de 6%.

La cuisson-extrusion semble, elle aussi réduire davantage les teneurs en composés phénoliques que les phytates. Alonso *et al.* (2000), par exemple, ont montré des réductions de 54 et 84% des teneurs en tanins et de 29 et 46% des teneurs en polyphénols totaux, respectivement pour la fève et le haricot. Ils ont également étudié les variations de teneurs en polysaccharides après cuisson-extrusion de farines de pois et de haricot blanc et n'ont pas montré de variation significative des teneurs en fibres ou en mono- et disaccharides (Alonso *et al.*, 2001). Siljeström *et al.* (1986) n'ont pas non plus trouvé de réduction significative des teneurs en fibres totales de la farine de blé par cuisson-extrusion.

Effet sur la biodisponibilité des minéraux

D'après les études existantes, les effets des traitements de cuisson à haute pression sur la biodisponibilité des minéraux sont très variables. L'autoclavage de graines de haricot marbré entraîne une diminution de 59% de la biodisponibilité *in vitro* du fer (Lombardi-Boccia *et al.*, 1995). D'autres travaux réalisés sur l'homme ont également montré que de tels traitements pouvaient réduire la biodisponibilité des minéraux par modification des liaisons chimiques (Kivisto *et al.*, 1986 ; Lykken *et al.*, 1986). En revanche, Kaur et Kawatra (2002) reportent que la cuisson sous pression de graines d'ambérique préalablement trempées engendre une augmentation de 26% de la solubilité du zinc qui se traduit par une meilleure rétention du zinc chez le rat. Cissé *et al.* (1998), quant à eux, ont montré que la cuisson-extrusion améliorerait la biodisponibilité du fer d'aliments de complément à base de mil, mais que celle-ci restait insuffisante pour assurer une couverture des besoins en fer des jeunes enfants.

On peut également souligner que, d'après les résultats de Sandberg *et al.* (1987), la consommation de produits extrudés limite l'absorption des minéraux en raison de la dégradation au cours du procédé des phytases de l'aliment susceptibles d'agir au niveau de l'intestin. Ce problème de dégradation des phytases se rencontre également lors du pré-traitement de l'avoine qui subit un autoclavage dans le but de détruire les lipases, dont les teneurs relativement élevées causent des problèmes de rancissement au cours du stockage. Cet avoine autoclavé présente une forte teneur en phytates qui ne pourra plus être diminuée au cours des autres procédés qui seront appliqués ultérieurement à l'aliment (Rossander-Hulten *et al.*, 1990).

3.3.3. Les procédés chimiques

Les procédés chimiques peuvent modifier un aliment au travers, soit de réactions d'oxydo-réductions par ajout de certaines molécules oxydantes ou anti-oxydantes, soit de modifications de pH par ajout de composés acides ou basiques. Ces deux types de modifications chimiques vont pouvoir, soit améliorer la biodisponibilité des minéraux, soit la diminuer. Parmi les procédés chimiques, l'ajout d'enzymes, qui par hydrolyse des FAN vont pouvoir améliorer la biodisponibilité des minéraux, sera également évoqué.

3.3.3.1. *Oxydo-réduction*

Le fer est particulièrement sujet aux phénomènes d'oxydo-réduction qui vont le convertir (i) soit en fer ferrique (Fe^{3+}) ($\text{O}_2\dots$), (ii) soit en fer ferreux (Fe^{2+}) (acide ascorbique...). Au niveau métabolique, ces deux formes de fer sont solubles dans les conditions de pH acides de l'estomac. En revanche, avec l'augmentation du pH au niveau de l'intestin, où l'absorption des minéraux a majoritairement lieu, le fer ferrique devient insoluble et son absorption est

donc limitée. Les effets de l'ajout d'acide ascorbique qui favorise donc la solubilisation et l'absorption du fer sont détaillés dans le paragraphe 3.2.1.

3.3.3.2. Modification du pH

L'alcalinisation ou l'acidification des denrées alimentaires sont des traitements utilisés depuis longtemps notamment pour stabiliser ou modifier la texture des produits. Les modifications de pH qui en résultent modifient la solubilité des composés et des complexes et ont donc un effet tant sur les minéraux que sur les facteurs anti-nutritionnels. Ainsi, les minéraux de la matrice, insolubles à un pH légèrement acide, deviennent solubles lorsque le pH diminue (Thompson et Weber, 1979 ; Champagne et Phillippy, 1989), tandis que les phytates vont avoir tendance à former des complexes insolubles avec les protéines aux pH inférieurs à leur pH isoélectrique (Cheryan, 1980).

Le traitement alcalin à la chaux (hydroxyde de calcium), appelé nixtamalisation, utilisé lors de l'élaboration des tortillas à base de maïs, est un des procédés chimiques les plus répandus, mais d'après Hernandez *et al.* (2003) il ne modifie ni les teneurs en phytates, ni la biodisponibilité du fer. Il est cependant possible que ce procédé inhibe l'absorption du fer et du zinc étant donné qu'il enrichit fortement l'aliment en calcium (Cook *et al.*, 1991).

Par ailleurs, Ibrahim *et al.* (1988) ont montré que l'ajout d'acide ortho-phosphorique ou de phosphate dicalcique à des régimes à teneur élevée en tanins était également efficace pour réduire ces teneurs.

Enfin, notons que la modification du pH du milieu peut également être provoquée par l'addition d'acides organiques connus pour améliorer l'absorption de certains minéraux (cf. paragraphe 3.2.3).

3.3.3.3. Ajout d'enzymes

L'addition d'enzymes produites industriellement (phytases, phosphatases alcalines, polyphénol oxydase), pures ou en mélange, est une pratique connue pour améliorer la biodisponibilité *in vitro* du fer dans certains produits (Yeung *et al.*, 2001). Les phytases ajoutées peuvent être d'origine végétale (Sandberg et Svanberg, 1991), ou être produites par des moisissures (Ahmad *et al.*, 2000), des bactéries lactiques (De Angelis *et al.*, 2003) ou des levures (Quan *et al.*, 2001). Une fois purifiées, elles peuvent, par exemple, être utilisées comme additif lors de l'élaboration de pain (Türk et Sandberg, 1992) ou de bouillie à base de farine fermentée (Usha Antony et Chandra, 1999).

Bien qu'efficace, cette solution reste difficilement applicable dans les pays en développement en raison de l'augmentation de coût provoqué par de tels additifs, en général non disponible au niveau local. Le malt présente toutefois une alternative intéressante aux enzymes commerciales étant donné qu'il représente une source importante d'hydrolases (phytases...) efficaces pour améliorer la biodisponibilité du fer et du zinc (Gahlawat et Sehgal, 1994). Son taux d'incorporation est cependant limité notamment en raison de son fort pouvoir amylolytique (Traoré *et al.*, 2004). Marklinder *et al.* (1995) ont comparé les taux de dégradation de phytates obtenus par addition de différentes sources de phytases avant fermentation d'une préparation à base d'avoine. L'incorporation de 0,5% (p/p) de farine d'orge ou d'avoine maltée a permis d'obtenir 73% de dégradation des phytates après 15 h de fermentation ; 1% (p/p) de pâte fermentée à base de seigle inoculée avec une culture starter, 80% de dégradation ; l'ajout de phytase de blé, 89% et l'ajout de phytase microbienne (*Aspergillus niger*), 100% de dégradation des phytates.

Notons enfin que l'addition de phytases s'avère inutile pour des aliments riches en vitamine C et pauvres en phytates (Davidsson *et al.*, 1997 ; Matuschek *et al.*, 2001).

3.3.3.4. *Autres traitements chimiques*

Price *et al.* (1978) ont constaté que le traitement des sorghos à teneur élevée en tanins à l'aide d'une solution d'ammoniaque était efficace pour réduire les teneurs en tanins. De plus, ces auteurs ont testé l'effet de ce sorgho traité sur les gains en poids de rats et de poulets et ont montré qu'il avait la même valeur nutritionnelle que le sorgho à faible teneur en tanins.

Par ailleurs, il est à noter que d'autres additifs tels que le sel (exhausteur de goût) ou les fibres (agents épaississants), modifient la répartition du fer et sa biodisponibilité (Bosscher *et al.*, 2001b ; Kristensen et Purslow, 2001).

3.3.4. *Les procédés biologiques*

Au cours des traitements biologiques, des modifications profondes se mettent en place, favorisées par l'hydratation du matériel et le maintien à une température relativement contrôlée. Ces traitements sont relativement longs puisqu'ils mettent en jeu des phénomènes de diffusions passives et/ou de multiplications cellulaires. Lors du développement de nouvelles cellules (végétales ou microbiennes), de nombreuses enzymes liées au métabolisme et à la croissance apparaissent, dont des phytases endogènes ou exogènes.

3.3.4.1. *Le trempage*

Les grains de céréales et de légumineuses sont protégés par des enveloppes plus ou moins rigides et imperméables. Le trempage est souvent utilisé en tant que pré-traitement des grains, afin de faciliter leur transformation en permettant une meilleure élimination de ces enveloppes et un attendrissement des grains.

Au cours du trempage, des transferts de matière ont lieu entre le compartiment alimentaire et l'eau de trempage : une partie des minéraux diffuse dans le milieu environnant (Purchas *et al.*, 2003) ainsi que les activateurs et/ou inhibiteurs de biodisponibilité (Hötz et Gibson, 2001). Cette lixiviation dépend de la localisation et de la solubilité des différents constituants, du gradient de concentration entre le matériel et le milieu, ainsi que de la durée du trempage (Duhan *et al.*, 2002). La température de trempage quant à elle semble ne pas avoir de réelle influence sur cette lixiviation, mais constitue un paramètre déterminant des activités enzymatiques endogènes (phytases, oxydases) et de la vitesse de pénétration de l'eau dans le grain.

Réduction des teneurs en phytates

Les taux de réduction des teneurs en phytates obtenus au cours de trempages effectués dans différentes conditions de température et de durée et sur différents matériels végétaux sont donnés dans le tableau I-18.

Les données présentées dans le tableau montrent qu'il existe de grandes variations d'efficacité du trempage selon le type de matériel végétal trempé. Les teneurs en phytates du haricot, par exemple, sont peu diminuées dans les conditions de trempage appliquées (0, 8 et 6% pour des trempages de 8, 12 et 16 h), tandis que pour le poids d'angole et le haricot mungo les taux de réduction obtenus sont plus élevés (respectivement 28% en 18 h et 25 à 30% en 12 h). Tabekhia et Luh (1980) attribuent ces différences aux caractéristiques physico-chimiques de la matrice (pH, teneur et nature des protéines, teneurs en cations divalents) et aussi à la vitesse de pénétration de l'eau dans le grain qui dépend en partie de l'épaisseur des enveloppes. De plus, les conditions d'activités optimales des phytases étant variables selon les espèces, un trempage à 60°C, par exemple, pourra être très efficace pour réduire les phytates dans le cas

du blé, mais aura peu d'influence sur la teneur en phytates de grains de maïs pour lesquels la température optimale des phytases est de 24°C (Gibson et Ferguson, 1998).

Par ailleurs, il semble que le trempage de farines permette une meilleure dégradation des phytates que le trempage des grains, puisque 12 h de trempage de farines de maïs et de quinoa conduisent à des réductions des teneurs en phytates respectivement de 57 et 61%.

Tableau I-18. Effets du trempage sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée du trempage et température (h/°C)	Réduction des teneurs en phytates (%)
Duhan <i>et al.</i> (2002)	Pois d'angole	6 / 30	6
		12 / 30	15
		18 / 30	28
Hotz et Gibson (2001)	Farine de maïs	12 / 25	57
Mamiro <i>et al.</i> (2001)	Mil	3 / 24	5
	Haricot	8 / 24	0
Nestares <i>et al.</i> (1999)	Pois chiche	9 / T° ambiante	14
Maghoub et Elhag (1998)	Sorgho	12 / non précisée	11
		24 / non précisée	18
Valencia <i>et al.</i> (1999)	Farine de quinoa	12 à 14 / 20	61 à 76
Fredlund <i>et al.</i> (1997)	Blé	24 / 60	46
	Seigle	24 / 55	57
	Orge	24 / 55	56
	Avoine	24 / 37	13
Schlemmer <i>et al.</i> (1995)	Soja, lentille, pois	16 / 22	0
	Haricot		6
Sandberg et Svanberg (1991)	Avoine	17 / non précisée	55
Duhan <i>et al.</i> (1989)	Pois chiche	12 / 37	12-16
	Haricot mungo		25-30
Ologobo et Fetuga (1984)	Niébé	72 / 27	26
	Soja		10
Tabekhia et Luh (1980)	Niébé, haricot rouge	12 / 24	8
	Ambérique		13
	Haricot blanc		19

Réductions des teneurs en autres facteurs anti-nutritionnels

Les taux de réduction des teneurs en composés phénoliques obtenus après trempage sont donnés dans le tableau I-19.

Tableau I-19. Effets du trempage sur les teneurs en polyphénols totaux et/ou tanins de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée de trempage et température (h/°C)	Réduction des teneurs en composés phénoliques (%)	
			Catéchols	Polyphénols
Matuschek <i>et al.</i> (2001)	- Sorgho	24 / non précisée	ns	ns
	- Eleusine		33	13
Alonso <i>et al.</i> (2000)	- Fève	12 / 30	Tanins	Polyphénols
	- Haricot		48	5
			24	21
Ikemefuna <i>et al.</i> (1991)	Sorgho	Non précisées	Tanins	
			33	

ns : non significatif

Les taux de réduction des teneurs en composés phénoliques dus au trempage sont comparables à ceux observés pour les phytates avec une variabilité due à la nature du matériel trempé. On remarque que les teneurs en tanins sont nettement plus diminuées que celles en polyphénols totaux (de 24 à 48% pour les tanins contre 5 à 21% pour les polyphénols), certainement en raison de leur plus grande solubilité.

Aucune donnée concernant la variation des teneurs en fibres au cours du trempage n'a été trouvée, mais la majorité des fibres des grains de céréales ou de légumineuses étant insolubles, les teneurs devraient être augmentées par variation passive compte tenu de la perte en matières solubles qui affecte d'autres composés.

Amélioration de la biodisponibilité des minéraux

En dépit des réductions de teneurs en facteurs anti-nutritionnels observées, tout comme dans le cas de la cuisson, le trempage a, selon les auteurs, un effet bénéfique ou non sur la biodisponibilité des minéraux. Saharan *et al.* (2001) ainsi que Duhan *et al.* (2002) ont montré des augmentations de l'extractabilité HCl du fer après des trempages de 12 h de 8% pour l'ambérique, 5% pour la fève et 8% pour le poids d'angole. Mamiro *et al.* (2001) ont également trouvé des améliorations significatives des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc pour l'éleusine et le haricot blanc. En revanche, Matuschek *et al.* (2001), reportent que la digestibilité *in vitro* du fer diminue de 3,5 à 2,6% et de 3,0 à 1,9% après 24 h de trempage respectivement dans des grains de sorgho et d'éleusine. Cette diminution peut être attribuée à la perte de fer soluble par diffusion dans le milieu de trempage.

3.3.4.2. La germination

Au cours de ce procédé, la température et l'humidité permettent la mise en place de modifications biologiques profondes au sein des graines végétales et un grand nombre d'hydrolases sont activées.

Réduction des teneurs en phytates

Les taux de réduction des teneurs en phytates obtenus après germination de différentes graines végétales sont donnés dans le tableau I-20.

Tableau I-20. Effets de la germination sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée de germination (j)	Réduction des teneurs en phytates (%)
Saharan <i>et al.</i> (2001)	Fève	2	57
	Ambérique		30
Alonso <i>et al.</i> (1998)	Pois	3	36
Honke <i>et al.</i> (1998)	Poids	2, 5, 8	15, 33, 80
	Haricot		11, 30, 78
	Lupin		4, 22, 42
Maghoub et Elhag (1998)	Sorgho	4	81
Sehgal et Kawatra (1998)	Mil	2	46
		3	53
Marero <i>et al.</i> (1988)	Riz	4	66
	Maïs		60
Khetarpaul et Chauhan (1990)	Mil	1	62
		Eleusine (pigmenté)	1
Udayasekhara Rao et Deosthale (1988)	Eleusine (non pigmenté)	3	69
		1	36
		3	73
Ologobo et Fetuga (1984)	Niébé	3	39
	Soja		32
Sathe <i>et al.</i> (1983)	Haricot	2	21
		3	39
		4	50
		5	58
Tabekhia et Luh (1980)	Niébé	1, 5	16, 77
	Haricot mungo		17, 30

Parmi les hydrolases actives au cours de la germination, les phytases ont un rôle particulièrement important étant donné qu'elles libèrent le phosphore stocké dans les graines sous forme de phytates pour assurer la croissance rapide de la plantule.

Comme le montrent les données du tableau I-20, la germination est un procédé domestique efficace pour réduire les teneurs en phytates, mais son efficacité est une fois de plus variable selon le matériel germé, les conditions de germination et surtout la durée de germination (de 4% à 80% pour des germinations de 2 à 8 j). Il est toutefois important de noter que, dans le cas des longues durées de germination, ce procédé va entraîner non seulement de fortes réductions de teneur en phytates, mais aussi des pertes importantes de matière sèche. Par ailleurs, l'efficacité de la germination est maximale si la quantité d'enzymes capables d'hydrolyser les phytates est élevée et si les conditions de germination sont favorables à l'activité de ses enzymes.

Par ailleurs, l'acide gibbérellique présent dans le grain au cours de la germination augmente la sécrétion de phytases, leur permettant ainsi d'accéder aux phytates, et stimule également leur activité (Konietzny et Greiner, 2002).

Réductions des teneurs en autres facteurs anti-nutritionnels

Certains travaux font état de réductions des teneurs en polyphénols totaux et en tanins au cours de la germination de grains de céréales et de légumineuses. Les résultats de ces travaux sont résumés dans le tableau I-21.

Tableau I-21. Effets de la germination sur les teneurs en polyphénols totaux et/ou tanins de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée de germination (j)	Réduction des teneurs en composés phénoliques (%)	
			Catéchols	Polyphénols
Matuschek <i>et al.</i> (2001)	Sorgho Eleusine	3	51	56
			35	11
Alonso <i>et al.</i> (2000)	Fève	1	56	9
		2	58	9
		3	60	21
	Haricot	1	44	32
		2	64	41
		3	72	53
Sehgal et Kawatra (1999)	Mil	2		Polyphénols 39
		3		41
Ikemefuna <i>et al.</i> (1991)	Sorgho	1	Tanins 33	
		2	40	
		3	52	
		4	60	

La germination engendre des réductions importantes des teneurs en composés phénoliques (de 9 à 56%) et notamment en tanins (de 33 à 72%). Comme dans le cas des réductions de teneurs en phytates, ces taux dépendent de l'origine génétique des grains mis à germer et de leurs conditions de culture et augmentent avec la durée de germination.

Les causes de ces réductions ne sont pas encore clairement établies. Certains auteurs les attribuent à des diffusions des composés phénoliques, soit dans le milieu au cours de la phase de trempage précédent la germination, soit dans le tissu recouvrant les grains au cours de la germination (Matuschek *et al.*, 2001). Une autre hypothèse repose sur la capacité des tanins à se complexer avec les macromolécules et particulièrement les protéines (enzymes), ce phénomène ayant pour conséquence de les rendre non extractibles et donc non dosables. Chavan *et al.* (1981) ont étudié les variations de teneurs en tanins et en protéines et amidon ainsi que leurs produits de dégradation au cours de la germination de grains de sorgho à faible et forte teneurs en tanins. L'accumulation de sucres réducteurs et d'acides aminés libres était beaucoup plus marquée après cinq jours de germination dans la variété à faible teneur en tanins que dans celle à forte teneur en tanins, indiquant que l'hydrolyse des protéines de stockage du grain et de l'amidon était inhibée par la présence de tanins. Ainsi, Chavan et

Kadam (1989) concluent dans leur revue sur les améliorations nutritionnelles dues à la germination des céréales que ce procédé ne diminuerait pas les teneurs en tanins, mais favoriserait la formation de complexes.

Concernant l'évolution des teneurs en fibres au cours de la germination, les résultats sont partagés. Il semblerait qu'il puisse y avoir diminution ou augmentation des teneurs en fibres (Chavan et Kadam, 1989). Les diminutions peuvent s'expliquer par la dégradation des parois cellulaires des grains au cours de la germination, tandis que les augmentations de teneurs en fibres peuvent être des augmentations apparentes dues à la forte modification de la matrice en raison de la dégradation de l'amidon (Malleshi et Desikachar, 1986).

Amélioration de la biodisponibilité des minéraux

En rendant disponible le phosphore par hydrolyse d'une importante partie des phytates, les phytases libèrent d'autres minéraux chélatés (Eastwood et Laidman, 1971). Ainsi certains travaux reportent une très forte efficacité de la germination pour augmenter la biodisponibilité des minéraux (Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000). Valencia *et al.* (1999), par exemple, reportent une augmentation de 12 à 17% de la digestibilité *in vitro* du fer après un jour de germination de grains de quinoa. Mamiro *et al.* (2001) ont montré que deux jours de germination entraînaient des augmentations de 4,5 à 10,6% de la digestibilité *in vitro* du fer et de 30,2 à 39,2% de celle du zinc pour l'éleusine et que ces améliorations étaient encore plus flagrantes lors de la germination de graines de haricot blanc.

3.3.4.3. La fermentation

Les modifications du produit au cours de sa fermentation sont principalement dues aux activités d'enzymes endogènes et/ou exogènes permettant la dégradation de certains facteurs anti-nutritionnels (Chavan et Kadam, 1989). La température, la durée de fermentation et l'abaissement de pH, dans le cas de fermentation acidifiante, déterminent l'importance de ces activités enzymatiques (Anjum *et al.*, 2002).

Réduction des teneurs en phytates

De nombreuses études ont évalué les possibilités de réduire les teneurs en phytates par fermentation et les résultats d'une partie de ces études sont donnés dans le tableau I-22.

La nature de la microflore fait partie des principaux paramètres pouvant influencer la dégradation des phytates au cours de la fermentation. Celle-ci peut être composée de microorganismes se trouvant à la surface des grains en début de transformation (fermentation naturelle ou spontanée) ou de microorganismes volontairement ajoutés (souches starters, pied de cuve). Quelle que soit leur origine ces microorganismes ont, ou non, parmi leur pool d'enzymes, des phytases qui seront actives dans les conditions de fermentation. Lopez *et al.* (2001) ont observé une dégradation des phytates de 62 et 38% après fermentation, respectivement, par des bactéries lactiques et par des levures. Ceci peut expliquer, par exemple, les différences de réduction des teneurs en phytates observées lors de la fermentation du mil par El Hag *et al.* (2002) et Elyas *et al.* (2002) (Tableau I-22). Des recherches ont été menées afin d'identifier des souches starters naturellement riches en phytases (Konietzny et Greiner, 2002). L'utilisation de tels additifs dans le cadre de l'amélioration de produits fermentés traditionnels dans les pays d'Afrique sahélienne semble cependant difficilement applicable. Une alternative toutefois serait de rechercher parmi les souches naturellement présentes au cours de ces fermentations, celles offrant le plus d'avantages physiologiques (fortes activités phytasique, amylolytique, synthèse de bactériocines...).

Tableau I-22. Effets de la fermentation sur les teneurs en phytates de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée de fermentation (h)	Réduction des teneurs en phytates (%)
El Hag <i>et al.</i> (2002)	Mil	14	53
Elyas <i>et al.</i> (2002)	Mil	12	12
		24	30
		36	50
Mouquet <i>et al.</i> (2001)	Maïs (<i>Mawé</i>)	10-24	45-97
	Maïs (<i>Ogi</i>)	20-24	30-75
	Mil (<i>Ben-saalga</i>)	2-16	37-97
Usha Anthony et Chandra (1999)	Eleusine	24	20
		48	39
Abdalla <i>et al.</i> (1998b)	Mil	14	44
Maghoub et Elhag (1998)	Sorgho	12	58
Marfo <i>et al.</i> (1990)	Maïs	72	55
	Riz		80
	Sorgho		52
	Niébé		65
	Soja		61
Sudarmadji et Markakis (1977)	Soja	30	32

Outre l'origine et les caractéristiques physiologiques des microorganismes présents, la matrice va également influencer l'hydrolyse des phytates, notamment comme il a déjà été signalé par la présence de phytases endogènes (Pallauf et Rimbach, 1997). Türk *et al.* (1996) ont d'ailleurs montré que la dégradation des phytates ayant lieu au cours de la fermentation du pain par des levures était plus imputable aux phytases endogènes de la farine qu'à celles des levures. Mais la matrice peut également influencer sur la dégradation des phytates par la présence d'autres composés comme les tanins, susceptibles de limiter la dégradation des phytates en raison de leur effet inhibiteur sur les phytases (Sandberg *et al.*, 1993).

Enfin, le tableau I-22 nous montre également l'importance du temps de fermentation qui est un facteur déterminant de la dégradation des phytates.

Réductions des teneurs en autres facteurs anti-nutritionnels

Quelques auteurs ont recherché si la fermentation de farine de céréales, telles que le mil ou l'éleusine, entraînait une diminution des teneurs en composés phénoliques (Tableau I-23).

Les dégradations des composés phénoliques au cours de la fermentation sont moins importantes que celles observées pour les phytates. On remarque que selon les auteurs ce sont soit les tanins, soit les polyphénols totaux qui vont être majoritairement dégradés. Par ailleurs, ces dégradations vont dépendre de l'espèce, de la variété et de la durée de fermentation. Elyas *et al.* (2002) attribuent ces dégradations en début de fermentation à l'activation de polyphénol oxydases, mais d'autres enzymes pourraient également être incriminées (peroxydases, laccases). Le fait que le taux de dégradation diminue ensuite entre 24 h et 36 h serait dû à la diminution importante des teneurs en glucides.

Tableau I-23. Effets de la fermentation sur les teneurs en polyphénols totaux et/ou tanins de grains de céréales et de légumineuses

Références	Matériel végétal	Durée de fermentation (h)	Réduction des teneurs en composés phénoliques (%)	
			Polyphénols	
El Hag <i>et al.</i> (2002)	Mil (Standard)	14	60%	
	Mil (Ugandi)		31%	
Elyas <i>et al.</i> (2002)	Mil (Composite population III)	12	ns	23%
		24	ns	38%
		36	ns	26%
	Mil (Baladi)	12	ns	22%
		24	ns	29%
		36	ns	25%
Usha Antony et Chandra (1999)	Eleusine	18	11%	
		48	41%	
Usha Antony et Chandra (1998)	Eleusine	48	Tanins	Polyphénols
			44-52%	26-29%

ns : non significatif

En ce qui concerne les variations des teneurs en fibres au cours de la fermentation, certains auteurs ont observé des diminutions qu'ils ont attribuées à une dégradation des parois celluloses par les enzymes bactériennes (Kazanas et Fields, 1981), tandis que d'autres ont montré des augmentations qui peuvent être attribuées à l'importante dégradation par les microorganismes des autres polysaccharides (El-Tinay *et al.*, 1979).

Amélioration de la biodisponibilité des minéraux

De manière générale, qu'elles soient spontanées (microorganismes naturellement présents) ou dues à une inoculation, les fermentations traditionnelles sont connues pour améliorer la biodisponibilité des minéraux (MacFarlane *et al.*, 1990).

De nombreuses études tendent à prouver que la fermentation pourrait augmenter la biodisponibilité des minéraux avec des facteurs de multiplication allant de 1,1 à 10,5. Ainsi, l'extractabilité HCl du fer de la farine d'éleusine serait doublée et celle du zinc multipliée par 1,5 après 48 h de fermentation (Usha Antony et Chandra, 1998). Sripriya *et al.* (1997) ont également effectué des fermentations de 48 h de la farine d'éleusine, mais après 24 h de germination, et ont obtenu des extractibilités HCl multipliées par 3,6 et 1,4 respectivement pour le fer et le zinc. Après 48 h de fermentation, Mamiro *et al.* (2001) ont également observé des augmentations des digestibilités *in vitro* du fer (multipliée par 1,1 pour l'éleusine et par 10,5 pour le haricot blanc) et du zinc (multipliée par 1,7 pour l'éleusine et par 2,6 pour le haricot blanc). Toutefois, Agte *et al.* (1997) ont trouvé des améliorations moindres de digestibilité *in vitro* du zinc, mais après seulement 15 h de fermentation de différentes espèces de céréales et de légumineuses.

Concernant la fermentation du pain, Năvert *et al.* (1985) ont montré qu'elle augmentait la biodisponibilité du zinc dans des produits à base de blé complet et que la fermentation lactique naturelle était plus efficace que celle provoquée par l'ajout de levures. Svanberg *et al.* (1993) ont également reporté que la fermentation lactique augmentait la solubilité *in vitro* du calcium, du magnésium, du fer et du zinc.

Ces augmentations de biodisponibilités peuvent être expliquées par les réductions des teneurs en facteurs anti-nutritionnels, mais aussi par la synthèse d'autres métabolites. En effet, au cours des fermentations acidifiantes, certains métabolites primaires excrétés par la microflore (acide lactique, acétique, butyrique, propionique) peuvent favoriser l'absorption du fer (Gillooly *et al.*, 1983) et également celle du zinc via la formation de complexes solubles (Desrosiers et Clydesdale, 1989). De plus, une augmentation des teneurs en vitamine C a également été montrée au cours de la fermentation (Agté *et al.*, 1997) et pourrait donc participer à l'augmentation de l'absorption du fer.

Chapitre II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels

1.1. Grains bruts de céréales et de légumineuses

1.1.1. Céréales et légumineuses

Les grains de céréales et de légumineuses étudiés dans le chapitre III (cf. photos en annexe 2) ont été achetées sur des marchés locaux en France pour le maïs (*Zea mays*) et le riz (*Oriza sativa*), au Burkina Faso pour le mil (*Pennisetum glaucum*) et le sorgho (*Sorghum bicolor*), à Madagascar pour l'ambérique (*Vigna radiata*), au Sénégal pour le niébé (*Vigna unguiculata*) ou importées de Chine pour le soja (*Glycine hispida*). Les résultats des déterminations faites pour caractériser ces différentes espèces sont donnés dans le tableau II-1.

Tableau II-1. Compositions globales des grains de céréales et de légumineuses

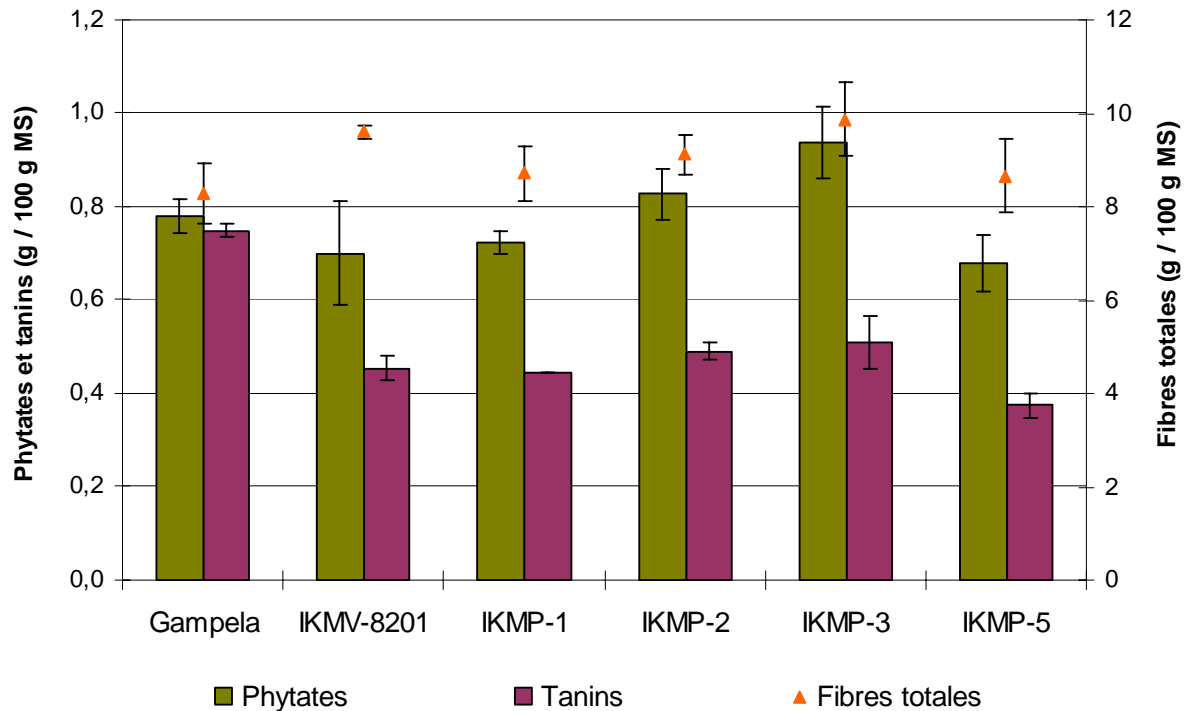
	Matière sèche (g/100g MB)	Lipides (g/100g MS)	Protéines (g/100g MS)	Fibres totales* (g/100g MS)	Cendres (g/100g MS)
Maïs	88,1	4,4	7,8	11,8	1,5
Mil	92,0	5,4	9,6	10,8	1,9
Riz	87,3	1,5	8,5	5,0	1,7
Sorgho	92,4	3,6	7,6	9,9	1,6
Ambérique	88,5	0,6	21,3	23,2	3,9
Niébé	88,7	1,2	24,3	31,0	3,2
Soja	90,2	21,0	38,7	20,4	4,9

* Déterminées d'après la méthode de Prosky et al. (1988).

1.1.2. Variétés de mil du Burkina Faso

Des variétés de mil de l'espèce *Pennisetum glaucum* nous ont été fournies par l'INERA de Ouagadougou (Burkina Faso). Six variétés ont été étudiées : deux variétés locales et couramment cultivées, l'une jaune (Gampela) et l'autre grise (IKMV-8201) et quatre variétés de mil vert issues de sélections dans des stations agronomiques afin de leur conférer un meilleur rendement de production et/ou une meilleure valeur nutritionnelle (IKMP-1, IKMP-2, IKMP-3 et IKMP-5).

Les résultats des déterminations des teneurs en phytates, tanins et fibres totales des grains de la récolte de l'année 2002 de ces 6 variétés sont représentées sur la figure II-1.



* Déterminées d'après la méthode de Prosky et al. (1988)

Figure II-1. Teneurs en phytates, tanins et fibres totales des variétés de mil

Les variétés étudiées présentent peu de différences au niveau de leurs teneurs en FAN. Les teneurs en phytates varient entre 0,68 et 0,94 g/100g MS et celles en fibres totales entre 8,3 et 9,9 g/100g MS. Les différences de teneurs en tanins sont un peu plus importantes (de 0,38 à 0,75 g/100g MS) avec notamment une teneur relativement élevée pour la variété Gampela.

Afin de disposer de variétés ayant des teneurs différentes en tanins, nous avons choisi de travailler sur les variétés Gampela et IKMP-5.

1.2. Modes de préparation des grains décortiqués

Les décorticages ont été réalisés à l'aide d'un décortiqueur de laboratoire (TM 050, Satake, Stockport, Angleterre) dans la halle de technologie des céréales de l'UMR « Ingénierie des Agropolymères et des Technologies Emergentes » (centre INRA de Montpellier).

1.2.1. Préparation des grains de mil et de soja décortiqués

Les décorticages des grains de mil et de soja utilisés dans le chapitre III ont été réalisés sur les grains non conditionnés, uniquement dans le but d'enlever leurs enveloppes.

1.2.2. Préparation des grains de mil décortiqués à différents taux d'extraction

Les teneurs en eau des grains de mil des variétés Gampela et IKMP-5 ont été ajustées à 15% afin de faciliter le décorticage. Les grains de mil, initialement à 7,8 et 9,3% d'eau, ont été conditionnés par ajout de la quantité d'eau (deminéralisée) manquante dans des récipients en plastique fermés, agités pendant 16 h à 20°C sous agitation douce (30 rpm) dans un agitateur rotatif (Reax 2, Heidolph, Schwabach, Allemagne). Les grains ont ensuite été tamisés mécaniquement afin d'obtenir des lots de grains de diamètres homogènes situés entre 2,0 et 2,5 mm. Cette étape de tamisage sert à éliminer les grains cassés ou suffisamment petits pour

passer au travers de la grille du décortiqueur et qui empêchent de déterminer précisément le taux d'extraction. Chaque décortiquage a été réalisé sur 80 g de grains humidifiés.

Après détermination de leur teneur en matière sèche, les grains décortiqués ont été congelés, puis lyophilisés, broyés dans un broyeur de laboratoire (IKA M20, Labortechnik, Staufen, Allemagne) et tamisés afin d'obtenir des particules de farine de tailles inférieures à 500 µm.

Les taux d'extraction ont été calculés pour chaque décortiquage sur la base des teneurs en matière sèche des grains avant et après décortiquage.

1.3. Echantillons de grains de mil et de bouillie fermentée prélevés dans les ateliers de production à Ouagadougou (Burkina Faso)

Le diagramme de production des bouillies de mil fermentées (*Ben-saalga* et *Ben-kida*) est donné dans l'introduction bibliographique (Chapitre 1.5.3.3, Figure I-6).

Dans le cadre du projet Cerefer, 48 échantillons de bouillie, ainsi que les 48 échantillons de grains de mil correspondants, ont été prélevés dans 48 ateliers de production répartis dans la ville de Ouagadougou, à raison de quatre échantillons par mois entre les mois de juin 2002 et mai 2003, afin de prendre en compte une possible variabilité saisonnière. Ces 48 ateliers de production ont été tirés au sort parmi 150 ateliers en activité qui avaient été répertoriés lors d'une enquête préliminaire destinée à évaluer le niveau de consommation de ces bouillies par les ménages Ouagalais (Mouquet, 2003).

Les échantillons de grains de mil ainsi que ceux de bouillies, prélevés après cuisson, ont été transportés en glacière du lieu de production jusqu'au laboratoire de l'IRD de Ouagadougou. Le pH, ainsi que la teneur en matière sèche des bouillies, avaient été déterminés, puis les échantillons ont été congelés et lyophilisés. Ces échantillons ont ensuite été apportés au laboratoire de l'UR 106 de l'IRD de Montpellier où ils ont été broyés dans un moulin de laboratoire (IKA M20, Labortechnik, Staufen, Allemagne) et tamisés afin d'obtenir des particules de tailles inférieures à 500 µm.

2. Protocoles d'études

2.1. Etude des effets des procédés utilisables pour la préparation d'aliments de complément (Chapitre III- 1 et 2)

Le trempage constitue un des procédés les plus influents sur l'évolution des teneurs en composés biochimiques des grains et farines de céréales et de légumineuses au cours de la préparation de bouillies non fermentées. Dans une première partie, afin d'étudier les variations des teneurs en phytates, fer et zinc, et des rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn, des farines de céréales et de légumineuses au cours de ce procédé, des trempages de grains entiers de différentes espèces ont été réalisés. Puis, des trempages de grains décortiqués et de farines de mil et de soja (ainsi que leur cuisson) ont également été effectués afin de caractériser l'effet du trempage en combinaison avec d'autres procédés technologiques simples. Dans le même temps, nous avons tenté d'évaluer les conditions de réduction des teneurs en phytates (diffusion ou dégradation enzymatique) en déterminant les proportions d'activités phytasiques et les quantités de phytates et de phosphores inorganiques libérées dans le milieu de trempage.

2.1.1. Modalités de trempage

2.1.1.1. Trempage des grains entiers ou décortiqués

Pour le trempage des grains entiers, 100 g ont d'abord été mis à agiter pendant 15 min dans une solution d'eau de javel à 1% afin de limiter le développement ultérieur de micro-organismes. Les grains de mil et de soja décortiqués, en revanche, ont uniquement été rincés à l'eau millipore afin de limiter la perte de composés par diffusion. Les grains ont ensuite été mis à tremper dans 300 ml d'eau minérale pour les céréales et dans 500 ml pour les légumineuses afin de tenir compte de leur différence de capacité d'absorption (Tableau II-2).

Tableau II-2. Capacités d'absorption des différentes espèces de céréales et de légumineuses au cours d'un trempage de 24 h à 30°C

	Maïs	Mil	Riz	Sorgho	Ambérique	Niébé	Soja
Volume d'eau absorbé (ml/100g MB)	53	62	39	55	112	124	139
Taux de gonflement (% v/v)	50	37	18	33	126	151	176

Les grains ont été trempés pendant 24 h à 30°C sous agitation douce (60 rpm) dans une étuve à plateau agitant (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, USA). Les grains ont ensuite été égouttés et les milieux de trempage ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse dans la journée. Les grains trempés ont été congelés, lyophilisés, puis broyés (IKA M20, Labortechnik, Staufen, Allemagne) et tamisés afin d'obtenir des particules de tailles inférieures à 500 µm. Pour chaque espèce, les trempages ont été réalisés en double.

2.1.1.2. Trempage des farines

Les farines de mil et de soja ont été préparées à partir des grains décortiqués décrits précédemment à l'aide d'un broyeur de laboratoire (3303, Perten Instruments, Roissy, France) afin d'obtenir des farines de granulométries proches de celles des farines préparées traditionnellement (environ 80% des particules de taille inférieure à 500µm).

Pour le trempage des farines de mil, la proportion farine/eau a été calculée pour correspondre à celle nécessaire à la préparation d'une bouillie de consistance acceptable pour le jeune enfant avec une teneur en matière sèche située entre 25 et 30 g/100g de bouillie après cuisson correspondant une densité énergétique suffisante (OMS, 1998). Des essais préliminaires ont permis de déterminer que le trempage de 90 g de farine de mil dans 300 ml d'eau permettait d'atteindre ces objectifs.

Le trempage de la farine de soja a été réalisé avec les mêmes proportions de farine et d'eau.

La durée de trempage des farines a été choisie de manière à arrêter le trempage avant que la farine ne commence à fermenter. Pour cela, les évolutions de pH ont été suivies pendant 24 h de trempage pour chaque farine et ont permis de déterminer que la production d'acide lactique débutait au bout de 8 h (Figure II-2). Les farines ont donc été trempées pendant 8 h à 30°C sous agitation douce (60 rpm) dans une étuve à plateau agitant.

Les mélanges ont ensuite été centrifugés à 4500g pendant 15 min à 4°C afin de séparer la farine trempée du milieu de trempage. Les surnageants ont été conservés à 4°C avant analyse dans la journée, tandis que les culots ont été congelés, lyophilisés puis broyés au mortier et au pilon. Les trempages des farines ont été réalisés en double.

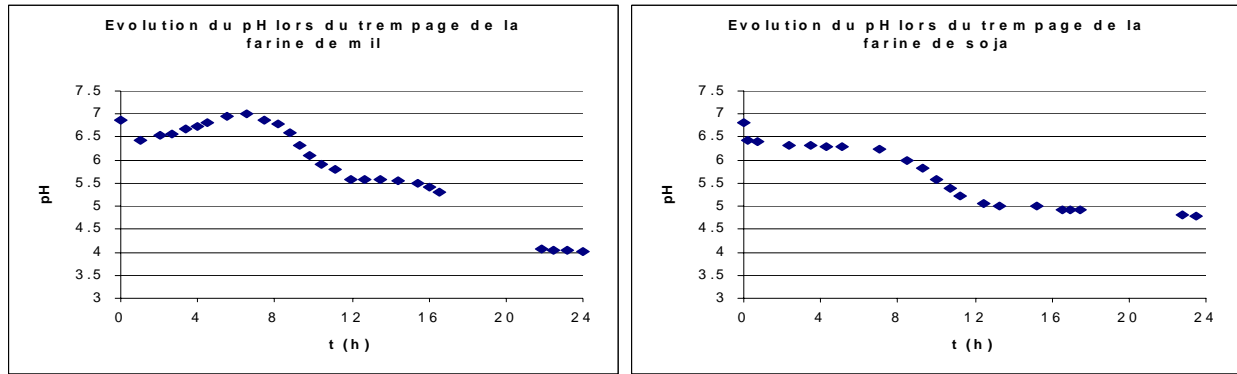


Figure II-2. Evolution du pH au cours des trempages des farines de mil et de soja

2.1.2. Cuisson des farines de mil et de soja trempées

Des trempages des farines de mil et de soja ont été réalisés comme décrits précédemment (cf. paragraphe 2.1.1.) afin de préparer des bouillies à partir des farines trempées. Après trempage, les cuissons ont été effectuées dans une casserole avec la totalité de la farine et de l'eau de trempage. La durée de cuisson a été fixée à 5 min à partir de l'ébullition ce qui correspond à la durée de cuisson couramment utilisée en Afrique. La plaque chauffante était réglée à une température stable de 230°C permettant d'atteindre l'ébullition au bout de 7 et 9 min respectivement pour le mil et le soja. Après refroidissement, les préparations ont été congelées, lyophilisées, puis broyées au mortier et au pilon. Les cuissons ont été réalisées en double.

2.2. Etude des effets des modes de préparation traditionnels des bouillies de mil fermentées (Chapitre IV- 1 et 2)

Des déterminations de teneurs en matière sèche, protéines, lipides, phytates, tannins, fibres ADF, fer et zinc ont été effectuées sur les 48 échantillons de bouillie prélevés dans les ateliers de production de la ville de Ouagadougou afin de caractériser la variabilité de leur qualité nutritionnelle. Les effets de la saison de préparation de la bouillie, de la présence de granules de farine de mil dans la bouillie (« *Ben-saalga* » ou « *Ben-kida* ») et du pH sur ces différents teneurs, ainsi que sur la teneur en matière sèche de la bouillie, ont été étudiés.

Un nombre limité d'échantillons a ensuite été sélectionné dans le but d'évaluer l'effet de la transformation des grains de mil en bouillie fermentée sur les teneurs en FAN, fer et zinc totaux, ainsi que sur les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc et de rechercher des relations entre les teneurs en FAN et les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc. Pour cela, quatorze échantillons de bouillie présentant des valeurs minimales, moyennes et maximales de teneurs en fibres, phytates et tanins et de rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn ont été sélectionnés parmi les 48 précédemment caractérisés.

Des déterminations de teneurs en phytates, tannins, fibres ADF, fer et zinc ont été réalisées sur les quatorze échantillons de grains de mil correspondants aux bouillies sélectionnées. Puis sur l'ensemble des 28 échantillons, les teneurs en fibres NDF ainsi que les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc ont été déterminées. Pour chacun des quatorze ateliers, les pourcentages de réduction des teneurs en FAN et de variation des teneurs en fer et en zinc totaux et des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc ont été calculés.

2.3. Etude de la répartition des nutriments et des facteurs anti-nutritionnels dans le grain de mil (Chapitre V-1)

Le fractionnement des grains de mil par décortilage abrasif a été utilisé dans le but de caractériser la répartition de certains nutriments, FAN et de l'activité phytasique dans le grain. Pour cela, des séries de décortilage à différents taux d'extraction ont été réalisées sur deux variétés de mil du Burkina Faso (Gampela et IKMP-5). Pour chaque durée de séjour dans le décortiqueur des grains d'une même variété, des grains décortiqués à un taux d'extraction en matière sèche précis ont été obtenus.

Des déterminations des teneurs en amidon, lipides, protéines, fer, zinc, fibres, phytates, tannins et des activités phytasiques ont ensuite été effectuées sur les farines obtenues à partir de ces grains. Chaque taux d'extraction a donc pu être associé à des taux de perte en chacun des composés biochimiques. Les taux de perte en un composé biochimique donné ont été déterminés en faisant le rapport des quantités de ce composé perdues par décortilage, sur la quantité initialement présente dans les grains.

2.4. Etude de la contribution relative des différents facteurs anti-nutritionnels dans le grain de mil (Chapitre V-2)

Afin d'étudier les effets des phytates, des tannins et des fibres sur les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, deux types d'échantillons ont été utilisés ; d'une part, des échantillons issus d'une farine de mil complète contenant des teneurs en phytates réduites par traitement enzymatique et, d'autre part, des échantillons, déphytinisés ou non, issus de deux fractions de grain de mil à teneurs minimales et maximales en tanins et en fibres.

2.4.1. Préparation des échantillons

La figure II-3 résume le procédé de préparation des échantillons ainsi que leur nomenclature.

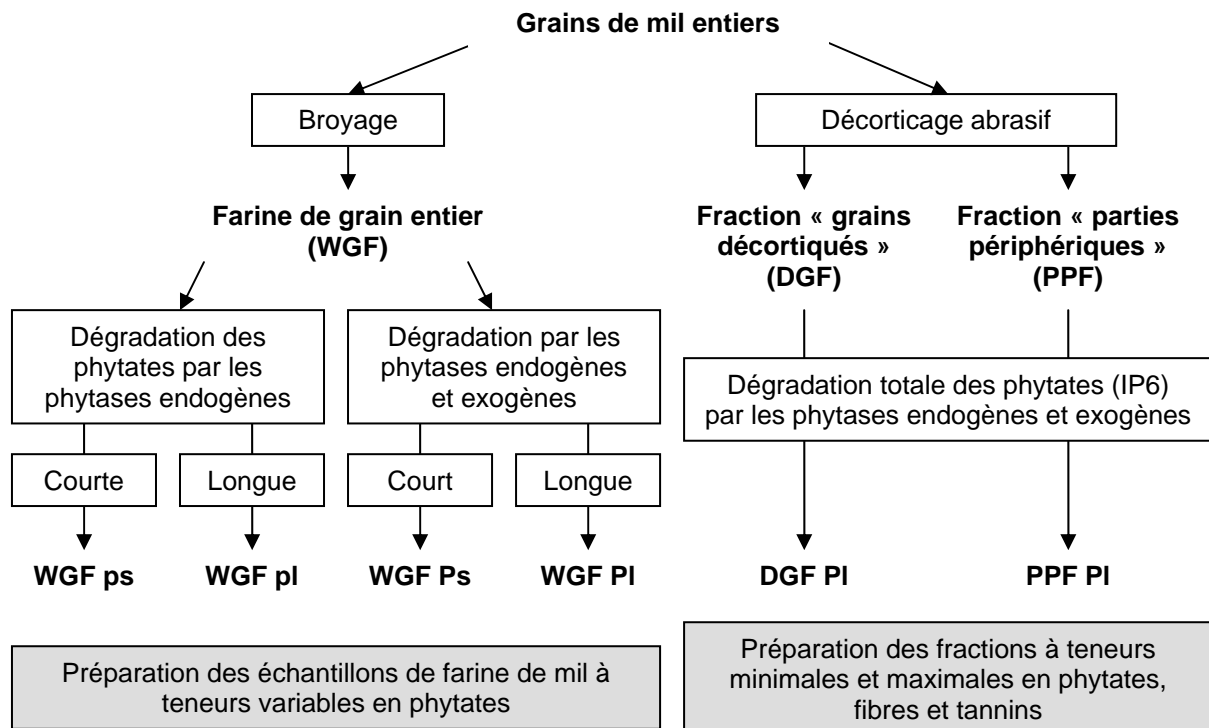


Figure II-3. Diagramme de préparation des échantillons.

2.4.1.1. *Echantillons de farine de mil à teneurs variables en phytates*

Les échantillons de farine de mil à teneurs variables en phytates ont été obtenus par dégradation enzymatique des phytates de la farine complète de mil de la variété Gampela. Pour la préparation de chaque échantillon, 30 g de farine ont été répartis dans des tubes Falcon de 50 ml, mélangés à raison de 5 g pour 7,5 ml dans du tampon acétate 0,1 M, pH 5,0 avec ou sans phytases et incubés à 37°C sous agitation douce (60 rpm) dans un incubateur à plateau agitant (New Brunswick scientific Co., Inc., Edison, USA). L'incubation dans le tampon a permis une dégradation partielle des phytates par les phytases endogènes, tandis que l'addition de phytases exogènes a entraîné une dégradation plus poussée des phytates. Des phytases végétales de blé (Sigma, P-1259) et des phytases microbiennes d'*Aspergillus ficuum* (Sigma, P-9792) ont été utilisées afin d'obtenir des produits d'hydrolyse des phytates venant de deux voies métaboliques différentes. Elles ont été solubilisées dans du tampon acétate à raison de 144 u/l pour les phytases de blé et de 516 u/l pour les phytases microbiennes. Ces concentrations en enzymes ont été déterminées dans une étude préliminaire de manière à obtenir la même activité phytasique pour les deux types d'enzymes dans les conditions opératoires choisies (cf. Annexe 3). Cette étude préliminaire a également permis de déterminer les durées d'incubation courte (1h) et longue (3h30) nécessaires à l'obtention de dégradations partielles des phytates dans 3 échantillons (WGF ps, WGF pl et WGF Ps) et une dégradation maximale des *myo*-inositol 6 phosphate (IP6) de la farine incubée 3h30 en présence de phytases exogènes (WFG PI). A la fin de l'incubation, les réactions enzymatiques ont été stoppées en refroidissant les tubes à 4°C jusqu'à centrifugation à 2600g, pendant 15 min à 4°C. Les culots ont ensuite été congelés, lyophilisés, puis broyés au mortier et au pilon.

2.4.1.2. *Fractions à teneurs minimales et maximales en phytates, en fibres et en tanins*

Afin de sélectionner des fractions à teneurs minimales et maximales en FAN, les teneurs en FAN de différentes combinaisons de fractions (sons ou grains décortiqués) de grains de mil de la variété Gampela obtenues après décorticage abrasif, ont été calculées d'après les résultats de l'étude de leur taux de perte au cours du décorticage du grain. Deux combinaisons ont été retenues en fonction des différences de teneurs en FAN qu'elles présentaient, tout en essayant de minimiser les différences de teneurs en macro-nutriments (amidon, protéines, lipides). Pour la première (DGF), il s'agit d'une fraction d'endosperme et de germe à teneurs moyennes en phytates et faibles en tanins et en fibres, obtenues par mouture de grains décortiqués à 35% d'extraction. La seconde fraction (PPF) est une farine riche en tanins et en fibres, avec une teneur également moyenne en phytates, obtenue en mélangeant les sons issus de 3 décorticages (un à 35% d'extraction et deux autres à 12% d'extraction correspondant à l'élimination des parties non amylacées du grain de mil). Cette fraction est donc constituée de plusieurs « fractions » d'enveloppes et d'une faible « fraction » d'endosperme et de germe. Les fractions DGF et PPF ont été congelées, lyophilisées, puis broyées à l'aide d'un broyeur de laboratoire (IKA M20 Labortechnik, Staufen, Allemagne) jusqu'à ce que la totalité des particules aient un diamètre inférieur à 500 µm.

Afin d'obtenir des échantillons sans phytates mais à teneurs faibles et fortes en fibres et en tanins, 30 g de chacune de ces fractions ont été incubés pendant 3h30 à 37°C sous agitation douce avec la solution de phytases précédemment décrite. A la fin de l'incubation les mélanges ont été refroidis à 4°C et centrifugés à 2600g, pendant 15 min. Les culots ont ensuite été congelés, lyophilisés et broyés au mortier et au pilon.

2.4.2. Evaluation de la contribution relative des différents FAN

Afin d'identifier les facteurs responsables de l'inhibition de l'absorption intestinale du fer et du zinc, les résidus insolubles de digestion *in vitro* des échantillons préalablement présentés ont été incubés en présence d'enzymes dégradant les phytates et les fibres. Cette méthode est dérivée de l'approche proposée par Hocquellet et L'Hotelier (1997) avec plusieurs modifications.

Les différents traitements appliqués aux résidus insolubles de digestion d'un même échantillon sont résumés dans la figure II-4.

Douze digestions indépendantes ont été réalisées par échantillon de façon à obtenir 12 résidus insolubles sur lesquels ont pu être réalisées trois répliques de chacun des quatre traitements suivants : incubation dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,0 sans enzyme, dans une solution de xylanases, dans une solution de phytases ou dans une solution de xylanases et phytases. Les concentrations en enzymes de ces solutions ainsi que leurs modes de préparation sont donnés en annexe 4. Chaque résidu a été solubilisé dans 20 ml de solution. Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés sous agitation magnétique (100 rpm) dans un bain-marie à 37°C pendant 16 h. Les suspensions ont ensuite été centrifugées à 10000g pendant 30 min à 4°C. Les surnageants ont été récupérés dans des capsules en silice et traités de la même manière que les digesta gastro-intestinaux afin de déterminer les quantités de fer et de zinc libérées par chaque traitement (cf. Paragraphe 3.3.4).

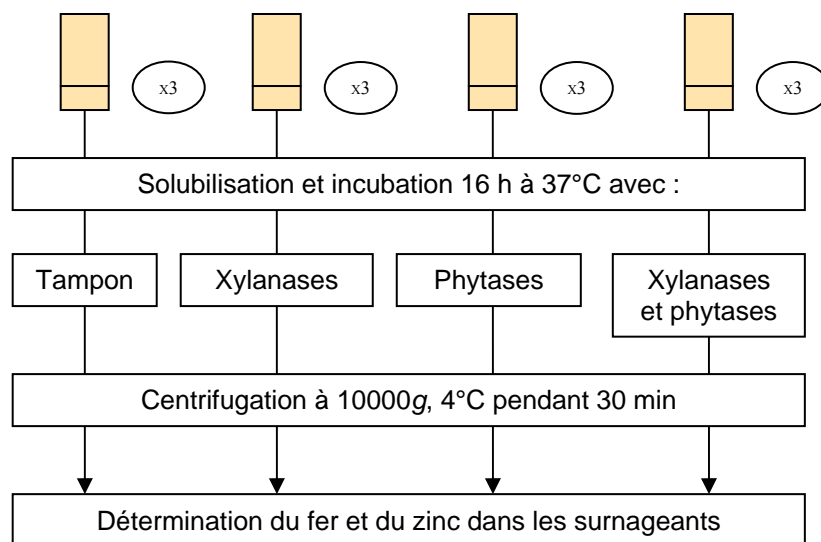


Figure II-4. Traitements enzymatiques réalisés sur les résidus insolubles de digestion *in vitro* d'un même échantillon

3. Méthodes analytiques

3.1. Dosages des nutriments

3.1.1. Protéines totales

Les protéines ont été dosées par la méthode de Kjeldhal (norme NF V03-050) 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'ammoniac qui est entraîné par distillation à la vapeur, puis titré par une solution d'acide sulfurique 0,04 N. Cette teneur en

azote est ensuite transformée en teneur en protéines totales en utilisant 6,25 comme coefficient de conversion.

3.1.2. Lipides

Les lipides sont traités à l'acide chlorhydrique, puis extraits à l'éther de pétrole par le système HT Soxtec de Tecator (note d'application n°3144). Le solvant est ensuite évaporé afin de déterminer la teneur en lipides par gravimétrie.

3.1.3. Amidon

L'ensemble des sucres consistant en des polymères du glucose a été dosé d'après les méthodes de Batey (1982) et Holmes *et al.* (1986). Ces polymères sont hydrolysés par actions successives d'enzymes (thermamyli, α -amylase thermostable, puis amyloglucosidase), puis la concentration en glucose de l'hydrolysate est déterminée par colorimétrie à 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.

3.1.4. Minéraux

Le fer et le zinc ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique (SpectrAA 200, Varian, Victoria, Australie) selon la méthode de Laporte *et al.* (1980). Pour cela, 2 g d'échantillon sont minéralisés par voie sèche pendant 3 h à 530°C dans une capsule en silice. Les cendres sont ensuite fixées par ajout de 3 ml de solution de HNO₃ 7 N évaporé sur plaque chauffante, puis solubilisées dans 25 ml d'HCl 0,5 N. Les résidus qui n'étaient pas totalement blancs après évaporation de l'acide nitrique, ont été minéralisés au four à 530°C pendant 1 h supplémentaire.

3.2. Dosages des facteurs antinutritionnels

3.2.1. Fibres

Selon les échantillons traités, différentes méthodes ont été utilisées.

3.2.1.1. *Fibres totales*

La méthode gravimétrique de Prosky *et al.* (1988) est la méthode reconnue comme celle étant la plus adaptée pour le dosage des fibres totales (Champ, 2003).

Trois digestions enzymatiques successives (thermamyli, protéase non spécifique et amyloglucosidase) sont réalisées sur 1 g d'échantillon. Les fibres solubles sont ensuite précipitées avec de l'éthanol à 96,2°G.L. pendant une nuit, puis le précipité est filtré et lavé à l'éthanol et à l'acétone. Les teneurs en fibres alimentaires retenues correspondent à celles obtenues après soustraction des teneurs en protéines et en cendres des résidus déshydratés.

3.2.1.2. *Fibres insolubles ADF et NDF*

Les fibres insolubles ont été dosées par les méthodes de Van Soest (1963) et de Van Soest et Wine (1967). Les fibres ADF correspondent approximativement à la cellulose et la lignine,

tandis que les fibres NDF peuvent être assimilées à la somme des fibres ADF et des hémicelluloses.

Les échantillons ont été préalablement délipidés à l'éther de pétrole. Après dégradation de l'amidon et incubation, avec un détergent acide pour le dosage des fibres ADF, ou neutre pour celui des fibres NDF, les teneurs en fibres sont déterminées 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).

3.2.2. *Tanins*

La méthode choisie (Brune *et al.*, 1989) permet de doser les groupements galloylés et les groupements catéchols des tanins qui sont les principaux groupements phénoliques capables d'interagir avec les minéraux.

Les composés phénoliques sont extraits au diméthylformamide pendant 16 h et les mélanges ont été filtrés sur filtre Whatman GF-A en fibres de verre. Le filtrat est ensuite mis à réagir avec de l'ammonium sulfate ferrique qui forme des complexes colorés Fe-galloyl et Fe-catechol dosés au spectrophotomètre, respectivement à 578 et 680 nm.

3.2.3. *Phytates*

3.2.3.1. *Par chromatographie ionique*

Les phytates ont été extraits selon la méthode décrite par Talamond *et al.* (2000). Le dosage des *myo*-inositol 6-phosphates (IP6) a été réalisé par chromatographie ionique Dionex, soit selon la méthode décrite par Talamond *et al.* (2000), soit selon une méthode dérivée de celle-ci en raison d'un changement de colonne chromatographique. Les inositols à degrés de phosphorylation inférieur à six (IP5, IP4,...), issus de la dégradation des IP6, n'ont pas été quantifiés par chromatographie ionique.

Deux cent milligrammes de farine additionnés de 10 ml d'HCl 0,5 M sont mis à agiter 6 min au bain marie à ébullition, puis centrifugés à 5000g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est amené à une concentration en HCl équivalente à 2 M en ajoutant 1,5 ml d'HCl 12 N. Les échantillons sont ensuite évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur centrifuge (Jouan RC 10-10, Saint Herblain, France), puis stockés à 4°C jusqu'au dosage.

Dans les 10 min précédant l'injection, le culot est repris dans 2 ml d'eau millipore et filtré (Acrodisc de 0,2 µm). Le filtrat obtenu est dilué au 1/50.

Pour la première modalité de dosage, 50 µl de filtrat sont passés sur une colonne échangeuse d'anions Omnipac Pax-100 (25 cm x 4 mm I.D. Dionex) équipée d'une pré-colonne Omnipac Pax-100 (8 µm) et d'un suppresseur d'anion (ASRS-I 4 mm). La séparation est assurée par un gradient d'élution composé de 3 solvants : solution de NaOH à 200 mM, eau-isopropanol (1/1, v/v) et eau (Talamond *et al.*, 2000).

Pour la seconde modalité, 50 µl de filtrat sont passés sur une colonne échangeuse d'anions Ion Pac AS11 (4 x 250 mm, Dionex) équipée d'une pré-colonne Ion Pac AG11 (4 x 50 mm) et d'un suppresseur d'anion (AMMS-III 4 mm). La séparation est assurée par un gradient d'élution composé de NaOH et d'eau.

3.2.3.2. *Par colorimétrie*

Pour la détermination des teneurs en phytates résiduels au cours de la recherche des conditions de dégradation des phytates décrite en annexe 2, la méthode décrite par Latta et

Eskin (1980) et reprise par Vaintraub et Lapteva (1988), basée sur la réactivité du fer avec l'acide sulfosalicylique a été utilisée.

Les phytates sont extraits à partir de 300 mg de farine additionnés de 5 ml d'HCl à 2,4% et mis à agiter pendant 2 h à 20°C sous agitation douce (agitateur rotatif à 20 tr/min). Les mélanges sont centrifugés à 18500g, à 20°C pendant 30 min. Puis, dans un tube eppendorf de 2 ml, 0,25 ml de rose de Wade (0,03% [FeCl₃, 6 H₂O], 0,3% acide sulfosalicylique) sont ajoutés à 0,75 ml de surnageant dilué au 1/25. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000g, à 20°C pendant 10 min, puis l'absorbance mesurée à 500 nm.

3.3. Evaluation de l'activité phytasique

Deux grammes de farine sont mis à agiter avec 20 ml de tampon acétate 0,1 M pH 5,6 pendant 2 h à 4°C afin d'en extraire les phytases. Après centrifugation (30 min, 10000g à 4°C), les phosphores inorganiques et les phytates du surnageant sont fixés sur 1 g de résine échangeuse d'anions (AG-1-X8) (selon Konietzky *et al.*, 1995, préconisé par Bergmann *et al.*, 2000). Deux millilitres d'extrait purifié sont incubés avec 2 ml d'une solution de phytate de sodium 2,5 mM dans 10 ml de tampon 0,1 M (citrate pH 5,8 ou acétate pH 5,6) pendant 1 h à 30°C. La réaction est stoppée avec 4 ml d'HCl 2 M.

L'activité phytasique est déterminée par spectrophotométrie à 405 nm en dosant le phosphore inorganique libéré selon la méthode colorimétrique de Heinonen et Lahti (1981). Pour cela, 0,25 ml de solution de phytase incubée (éventuellement diluée) sont mis à réagir avec 2 ml de réactif acide / acétone / molybdate.

3.4. Evaluation de la digestibilité *in vitro* du fer et du zinc

Les biodisponibilités du fer et du zinc ont été estimées par leur digestibilité en conditions physiologiques simulées *in vitro* à l'aide d'une méthode dérivée de celle de Lönnerdal *et al.* (1993) avec des modifications proposées par différents auteurs dans des travaux plus récents (Glahn *et al.*, 2000 ; Bermejo *et al.*, 2002 ; Wolfgor *et al.*, 2002).

3.4.1. Préparation des solutions de pepsine et de pancréatine / extrait de bile

Juste avant l'utilisation, 0,4 g de pepsine sont dissous dans 10 ml d'HCl 0,1 M, puis mélangés avec 5 g de résine Chelex-100 (ref 142-2842, Bio-Rad, Hercules, CA) et agités pendant 30 min avec un agitateur rotatif à 60 rpm (Reax 2, Heidolph, Allemagne), selon la méthode de Glahn *et al.* (2000). La résine est ensuite enlevée par filtration sur papier filtre sans cendre Whatman n°41. Le filtre est rincé avec 10 ml de HCl 0,1 M récupérés dans la solution de pepsine. Le volume final de la solution de pepsine est de 17 ml à 14900 U/ml.

De même, 0,05 g de pancréatine et 0,3 g d'extrait de bile sont dissous dans 25 ml de NaHCO₃ 0,1 M et additionnés de 12,5 g de résine Chelex-100 puis agités 30 min. Le mélange est ensuite filtré pour enlever la résine et 10 ml de NaHCO₃ sont ajoutés pour rincer le filtre. Le volume final de la solution de pancréatine – extrait de bile est de 27 ml (1,85 mg de pancréatine/ml, 11 mg d'extrait de bile/ml).

3.4.2. Digestion gastrique

Dans un erlenmeyer préalablement trempé dans une solution d'acide nitrique à 20% et rincé à l'eau Millipore, environ 2 g de farine ont été dissous dans 20 ml d'eau Millipore. Le mélange est conditionné dans un bain marie à 37°C placé sur un agitateur magnétique multiposte pendant 5 à 10 min. Le pH est ajusté à 2 avec une solution de HCl 1 M avant d'ajouter 1 ml

de solution de pepsine. Le mélange est incubé pendant 1 h sous légère agitation. Cette valeur de pH n'est pas représentative du pH physiologique, qui est probablement très hétérogène au niveau de l'estomac, mais correspond à celle habituellement appliquée pour les simulations de digestion *in vitro*.

3.4.3. Digestion intestinale

Le pH des digesta gastriques est augmenté à environ 4,5 avec du tampon PIPES (piperazine-N, N'-bis-[acide 2-ethanesulfonique]) 0,15 mM, avant ajout de 5 ml de solution de pancréatine-extrait de bile (Wolfgor *et al.*, 2002). Le pH est ensuite ajusté à 7 avec le même tampon PIPES qui permet de limiter les variations de pH au cours de la digestion intestinale. Les mélanges sont incubés pendant 2 h à 37°C toujours sous légère agitation. Les mélanges sont ensuite placés dans la glace jusqu'à refroidissement, puis transvasés en totalité dans des tubes et centrifugés à 10000g, pendant 30 min à 4°C (Bermejo *et al.*, 2002). Les surnageants, qui constituent les digesta dans lesquels sont dosés les minéraux libérés au cours de la digestion, sont récupérés dans des capsules en silice.

3.4.4. Dosage des minéraux digestibles

Les digesta sont mis à évaporer sur plaque chauffante sous hôte aspirante dans un premier temps, puis placés à l'étuve à 95°C pour terminer l'évaporation et traités comme pour le dosage des minéraux totaux (minéralisation, fixation dans l'acide nitrique, solubilisation dans une solution de HCl et dosage du fer et du zinc digestibles au spectrophotomètre d'absorption atomique).

Le pourcentage de minéraux digestibles correspond au rapport de la quantité de minéral dans le digesta sur la quantité initialement présente dans l'échantillon, multiplié par 100.

4. 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-types (ET).

La normalité des données quantitatives a été étudiée en utilisant la combinaison de plusieurs tests de normalité : le test d'adéquation du Chi-carré, le test d'asymétrie de Shapiro-Wilks et le test d'aplatissement de Kurtosis. L'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Bartlett.

Lorsque les distributions étaient normales et que les variances pouvaient être considérées comme homogènes, les moyennes obtenues après différents traitements ont été comparées par analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de Duncan à un niveau de signification de 0,05. En cas de non normalité des distributions ou de non homogénéité des variances, les médianes ont été comparées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis à un niveau de signification de 0,05.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.0 v.

Chapitre III

EVOLUTION DES TENEURS EN PHYTATES,
FER ET ZINC AU COURS
DE LA PRÉPARATION DE FARINES
CONSOMMABLES SOUS
FORME DE BOUILLIES

INTRODUCTION

Certains modes de préparation de farines consommables sous forme de bouillies utilisées comme aliments de complément pour les jeunes enfants peuvent être aisément reproduits en laboratoire étant donné qu'ils n'impliquent pas de savoir-faire particuliers ou de microflore spécifique. Ces modes de préparation consistent en des procédés technologiques simples, réalisés de manière traditionnelle au niveau des ménages ou de petites unités de production, tels que le trempage, le décortilage, le broyage et la cuisson.

Le trempage des grains de céréales ou de légumineuses, entiers ou décortiqués, est une étape commune à de nombreux modes de préparation. Il peut être court et se limite alors à un simple lavage des grains, ou prolongé et constitue alors un procédé à part entière, effectué dans un but précis. Il sert à ramollir les grains avant la mouture ou la cuisson, à débiter un processus de fermentation ou encore à hydrater les grains avant leur germination. Il s'effectue généralement à température ambiante et peut durer de quelques heures à plus d'une journée selon les espèces de grains traités, la finalité du trempage, ou encore les habitudes des productrices. Le trempage peut également concerner les farines. Il est alors effectué après mouture (sèche ou humide) des grains et précède la cuisson qui permet de préparer, entre autres, des bouillies de consistance plus ou moins fluides.

De précédentes études ont montré qu'une réduction des teneurs en phytates pouvait avoir lieu au cours du trempage de grains ou de farines de céréales et de légumineuses (Svanberg et Svanberg, 1991 ; Duhan *et al.*, 1989 ; Hotz et Gibson, 2001). Cependant, les taux de réduction reportés sont très variables selon le type de grains ou de farines trempés et les conditions de trempage appliquées. Par ailleurs, il existe peu de données sur les quantités de minéraux perdus par lixiviation et sur les modalités de réduction des teneurs en phytates intervenant au cours du trempage (diffusion, dégradation enzymatique).

Ce chapitre a pour objectifs d'évaluer les potentialités du trempage, appliqué seul ou en combinaison avec d'autres procédés qui peuvent lui être associés pour la préparation de farines consommables sous forme de bouillies, à réduire les teneurs en phytates et à augmenter les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn qui peuvent être considérés comme des indicateurs de la biodisponibilité, respectivement, du fer et du zinc (Davies et Olpin, 1979 ; Saha *et al.*, 1994).

Les travaux réalisés dans le cadre de ce chapitre sont présentés sous forme de deux publications.

La première publication (*Food Chemistry*) a pour but de caractériser et de comparer l'effet d'un trempage réalisé dans des conditions comparables à celles appliquées en milieu naturel sur les teneurs en phytates, fer et zinc de grains entiers de différentes espèces de céréales (maïs, mil, riz, sorgho) et de légumineuses (ambérique, niébé, soja).

Dans la seconde publication (*International Journal of Food Science and Technology*), nous nous sommes focalisés sur l'étude du mil et du soja, afin d'évaluer dans quelles mesures les réductions de teneurs en phytates précédemment observées pouvaient être augmentées en procédant à des trempages de grains décortiqués ou de farines puis à leur cuisson sous forme de bouillie. Au cours de cette étude nous avons également tenté d'identifier les conditions favorisant la dégradation des phytates au cours du trempage en considérant la répartition de l'activité phytasique, des phytates et des phosphores inorganiques libérés par leur hydrolyse entre le matériel trempé et le milieu de trempage.

Chapitre III-1

Effet du trempage sur les teneurs
en phytates, fer et zinc de
différentes espèces de céréales
et de légumineuses

Effets du trempage sur les teneurs en phytates, fer et zinc de différentes espèces de céréales et de légumineuses

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

Centre IRD de Montpellier, Unité de Recherche 106 « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Résumé

Les effets du trempage de grains entiers de céréales (maïs, mil, riz, sorgho) et de légumineuses (ambérique, niébé, soja) sur leurs teneurs en fer (Fe), zinc (Zn) et phytates (Phy) ont été évalués. Pour toutes les céréales précitées, excepté le mil, les rapports molaires Phy/Fe étaient supérieurs à 14 et les rapports molaires Phy/Zn supérieurs à 20, tandis que ces rapports étaient plus faibles pour les légumineuses. Le trempage de grains entiers pendant 24 h a entraîné des diffusions des ions fer et, dans une moindre mesure, des ions zinc dans le milieu de trempage. Le trempage a également entraîné une réduction significative ($P \leq 0,05$) des teneurs en phytates des grains de mil, maïs, riz et soja, mais n'a pas permis d'améliorer les rapports molaires Phy/Fe, tandis que les rapports Phy/Zn ont été légèrement diminués. Le trempage ne s'est pas révélé efficace pour améliorer la biodisponibilité des minéraux, mais les résultats de cette étude montrent qu'il pourrait l'être en combinaison avec d'autres procédés ou après optimisation des conditions de trempage.

Mots-clés

Phytates ; Fer ; Zinc ; Rapports molaires ; Trempage.

Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents

Isabelle Lestienne^{*}, Christèle Icard-Vernière, Claire Mouquet, Christian Picq, Serge Trèche

Unité de Recherche 106 "Nutrition, Alimentation, Sociétés", Centre IRD de Montpellier, BP 64501, 911, Avenue Agropolis, 34394, Montpellier Cedex 5, France

Received 4 April 2003; accepted 3 March 2004

Abstract

The effects of soaking whole cereal (maize, millet, rice, sorghum) and legume seeds (mung bean, cowpea, soybean) on iron (Fe), zinc (Zn) and phytate (Phy) contents were investigated. In all the above cereals, except millet, the molar ratios of Phy/Fe were above 14, and ratios of Phy/Zn were above 20 while, in legumes, ratios were lower. Soaking whole seeds for 24 h led to leaching of iron and, to a lesser extent, of zinc ions into the soaking medium. Soaking led to a significant ($P \leq 0.05$) reduction in the phytate content of millet, maize, rice and soybean, but did not improve the Phy/Fe molar ratio, while decreasing the Phy/Zn molar ratio only slightly. Soaking on its own was not found to be a good method for improving mineral bioavailability but the results showed that, in combination with other treatments, or with optimized soaking conditions, it could nevertheless prove useful.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Phytate; Zinc; Iron; Molar ratios; Soaking

1. Introduction

Cereals and legumes are often rich in fibre-associated anti-nutritional factors (namely phytate, polyphenols, oxalate) (Frölich, 1995) that reduce the bioavailability of minerals. The bioavailability of a nutrient is defined as the proportion of the total nutrient content in a food, meal or diet that is utilized for normal metabolic functions. Many minerals and trace elements are inefficiently and variably absorbed from the diet, for instance iron (<1–30%) and zinc (<15–50%). This phenomenon must be taken into consideration in the preparation of complementary foods in developing countries, where young children often suffer from micro-nutrient deficiencies, such as anemia, caused by iron deficiency (Hurrell, 1997) or decreased growth rate due to zinc deficiency (Gibson & Ferguson, 1998).

Phytate is especially known as a chelating agent that reduces the bioavailability of divalent cations (Weaver &

Kannan, 2002). Certain biological or thermal treatments, such as appertisation (Tabekhia & Luh, 1980), allow phytate content to be reduced. The most effective treatments are fermentation (Marfo, Simpson, Idowu, & Oke, 1990) and germination (Honke, Kozłowska, Vidal-Valverde, & Gorecki, 1998) but their application remains limited because of the additional workload they imply or the particular organoleptic properties they induce. Soaking is a simple technological treatment that is often used by mothers to prepare complementary foods at home. Moreover, it can be a simple prolongation of the obligatory washing of the seeds and can also have other advantages, such as facilitating dehulling or swelling of seeds. Previous studies have shown that a long soaking period before fermentation or germination, leads to a reduction in phytate content and to an enhancement of mineral HCl-extractability, used to estimate mineral bioavailability (Duhan, Khetarpaul, & Bishnoi, 2002; Sandberg & Svanberg, 1991).

The inhibitory effect of phytate on zinc absorption can also be predicted in vitro by the molar ratio of phytate to zinc (Phy/Zn). Davies and Olpin (1979)

^{*} Corresponding author.

E-mail address: lestienn@mpl.ird.fr (I. Lestienne).

showed that molar ratios above 10–15 progressively inhibited zinc absorption and were associated with suboptimal zinc status in rats fed with egg-albumen-based diets with added phytate (0–7.43 g/kg) or zinc (18–144 mg/kg). In the same way, Saha, Weaver, and Mason (1994) showed that absorption of radiolabelled iron in rats decreased significantly when the molar ratios of phytate to iron (Phy/Fe) were above 14 in wheat-flour-based diets containing between 0.19% and 1.85% of phytate.

The objective of this work was to investigate the effects of soaking (for 24 h) whole grains (sorghum, millet, rice, maize) and seeds (soybean, cowpea, mung bean) on iron, zinc and phytate contents in order to evaluate the effectiveness of this treatment for improving the molar ratios of Phy/Fe and Phy/Zn.

2. Materials and methods

2.1. Cereals and legumes

The whole cereal grains of millet (*Pennisetum glaucum*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) were purchased at a local market in Ouagadougou (Burkina Faso), while maize (*Zea mays*) and rice (*Oriza sativa*) came from France, and whole legume seeds from China (soybean, *Glycine hispida*), Senegal (cowpea, *Vigna unguiculata*) and Madagascar (mung bean, *Vigna radiata*).

2.2. Soaking process

Hundred grams of dry whole seeds were cleaned by soaking for 15 min in 300 ml of 1% bleaching-water solution to ensure that the bacteriological quality of each species was constant. The cereal seeds were then soaked in 300 ml and the legume seeds in 500 ml of mineral water because of the difference between their water absorbance capacities. Seeds were soaked for 24 h at 30 °C with slow shaking (60 rpm) in an incubator (New Brunswick scientific Co., Inc., Edison, USA). After draining, the soaking waters were stored at 4 °C before chemical analysis, which was carried out on the same day. Soaked seeds were freeze-dried and ground (IKA M20 Labortechnik, Staufen, Germany) to pass through a 0.5 mm screen. Soaking of each different species of seed was carried out in duplicate.

2.3. Determination of phytate content

Phytate content was estimated by determination of myo-inositol hexaphosphate content obtained by anion-exchange HPLC separation, according to the method of Talamond, Gallon, and Trèche (1998) with slight modifications. Phytate was extracted from 0.2 g of flour treated with 10 ml of HCl (0.5 M). The mixture was

heated with stirring, for 6 min, by immersing the vial in boiling water, and then centrifuged for 20 min at 5000g, at 4 °C. The supernatant was recovered and 1.5 ml of HCl (12 N) was added. The resulting solution was then shaken and evaporated to dryness with a centrifugal evaporator (JOUAN RC 10-10, Saint Herblain, France). The vial was stored at 4 °C until analysis. Ten minutes before injection, the residue was diluted with 2 ml of deionized water and filtered through a 0.2 µm disposable filter tip-syringe assembly. The filtrate was then diluted in deionized water (1/50, v/v) and 50 µl were injected into an Omnic Pax-100 anion-exchange column (25 cm × 4 mm I.D. Dionex) equipped with an Omnic Pax-100 (8 µm) pre-column and an anion suppressor (ASRS-I 4 mm). The separation was performed by gradient elution using three solvents: 0.2 M NaOH solution, deionized water–isopropanol (1/1, v/v), and deionized water.

2.4. Determination of total Fe and Zn contents

Total Fe and Zn contents were determined by atomic absorption spectrophotometry (Varian SpectrAA 200, Victoria, Australia) after dry mineralization for 2 h at 530 °C. Depending on the botanical origin of the seeds, 2–4 g of flour were weighed in a silicon evaporating dish. Next, the ashes were wet-acid digested with nitric acid on a hot plate and solubilized with 25 ml of 0.5 N HCl.

2.5. Statistical analysis

Values were calculated per 100 g dry matter (DM) of raw seeds used for soaking. Each sample was analyzed in triplicate and values were then averaged. Thus, mineral or phytate contents are the means of three values for raw seeds and of six values for soaked seeds (soaking carried out in duplicate). Data were assessed by analysis of variance (ANOVA). Duncan's multiple range test was used to separate means. Significance was accepted at probability $P \leq 0.05$ (Duncan, 1955).

3. Results and discussion

3.1. Effect of soaking on total iron and zinc contents

As far as mineral contents of raw seeds are concerned, the iron content of millet were very high (11.1 mg/100 g DM) while other cereals contained only 1.7–3.7 mg/100 g DM (Table 1). The iron contents of the legumes were generally higher, from 6.6 to 7.3 mg/100 g DM. Zinc contents showed nearly the same profile, with low values for cereals, between 1.6 mg/100 g DM for sorghum and 3.7 mg/100 g DM for millet, and higher values for legumes, from 2.8 to 3.8 mg/100 g DM.

The iron content of soaked seeds was significantly ($P \leq 0.05$) lower than unsoaked seeds in all species except

Table 1
Changes in iron and zinc contents (mg/100g dry matter)^A after soaking whole seeds for 24 h

Varieties	Treatment	Iron content	Zinc content
Millet	Unsoaked	11.1 ± (0.68)a	3.66 ± (0.08)a
	Soaked	7.33 ± (0.34)b	3.39 ± (0.09)b
Maize	Unsoaked	1.97 ± (0.12)a	1.93 ± (0.04)a
	Soaked	1.85 ± (0.10)a	1.72 ± (0.11)b
Sorghum	Unsoaked	3.73 ± (0.09)a	1.57 ± (0.04)a
	Soaked	2.22 ± (0.09)b	1.55 ± (0.07)a
Rice	Unsoaked	1.66 ± (0.38)a	2.94 ± (0.11)a
	Soaked	0.67 ± (0.06)b	2.07 ± (0.25)b
Soybean	Unsoaked	7.31 ± (0.26)a	3.64 ± (0.19)a
	Soaked	6.16 ± (0.19)b	3.50 ± (0.14)a
Cowpea	Unsoaked	6.60 ± (0.26)a	3.78 ± (0.12)a
	Soaked	5.68 ± (0.17)b	4.10 ± (0.24)a
Mung bean	Unsoaked	7.17 ± (0.28)a	2.81 ± (0.10)a
	Soaked	5.17 ± (0.15)b	2.71 ± (0.20)a

^A Values are means ± (SD). Means for the same species in the same column that do not have the same letter are significantly different at $P \leq 0.05$, as assessed by Duncan's multiple range test.

maize. The biggest reduction in iron content occurred in rice grains (60%). Zinc content also decreased significantly ($P \leq 0.05$) in millet, maize and rice grains, but the reduction did not exceed 30%. Reduction after soaking may be attributed to leaching of iron and zinc ions into the soaking medium (Saharan, Khetarpaul, & Bishnoi, 2001). The leaching of zinc was lower than iron and this phenomenon may be due to the fact that zinc and iron are not located in the same place in the seeds nor are they linked with the same molecules. Indeed, zinc is found in a large number of enzymes and other proteins, where it plays an important structural role. Table 1 shows that the zinc in legume seeds did not leach and, indeed, legume seed envelopes do not contain any protein, whereas zinc did leach from cereal grains whose hulls contain protein bodies (aleurone layer) (Pernollet, 1978).

3.2. Effect of soaking on phytate content

The phytate contents of the different raw materials, shown in Table 2 varied from 236 to 1084 mg/100 g DM.

These values are close to those reviewed by Reddy (2002), except for soybean and mung bean, which appear to be rather low in our study (878 mg/100 g compared to 1000–2200 mg/100 g for soybean in the literature and 236 mg/100 g against 590 to 1100 mg/100 g for mung bean). In legumes, phytates are associated with protein bodies (Reddy, 2002) and Maga (1982) pointed out that phytate levels should increase with increasing protein content. We also observed this correlation in our study, since analyzed seeds showed rather low protein contents for soybean and mung bean seeds (37.7 and 20.3 g/100 g DM, respectively), as well as low levels of phytate.

Depending on the botanical origin of the seeds, a significant reduction ($P \leq 0.05$) in phytate content (between 17% and 28%) was obtained by soaking whole seeds for 24 h at 30 °C. Two groups were distinguished: Millet, maize, rice and soybean which showed a significant reduction in phytate content, and sorghum, cowpea and mung bean which showed no significant reduction. As regards the phytate content of the soaking water,

Table 2
Changes in phytate content (mg/100g dry matter)^A after soaking whole seeds for 24 h

Varieties	Phytate content		% Phytate loss
	Unsoaked	Soaked	
Millet	762 ± (66)a	550 ± (18)b	28
Maize	908 ± (97)a	721 ± (16)b	21
Sorghum	925 ± (81)a	882 ± (44)a	4
Rice	1084 ± (12)a	904 ± (81)b	17
Soybean	878 ± (130)a	678 ± (32)b	23
Cowpea	559 ± (44)a	624 ± (42)a	Apparent increase
Mung bean	236 ± (36)a	225 ± (12)a	8

^A Values are means ± (SD). Means with a different letter in the same row are significantly different at $P \leq 0.05$, as assessed by Duncan's multiple range test.

after soaking for 24 h, no *myo*-inositol hexaphosphate was found (results not shown). This means that phytate was hydrolyzed by phytases either directly in seeds or in the water after leaching into the soaking medium.

3.3. Effect of soaking on Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

The Phy/Fe molar ratios of raw materials (Table 3), which are associated with iron absorption capacity, were generally consistent with those reported by Allen and Ahluwalia (1997). They were below 14 for millet, soybean, cowpea and mung bean, which consequently may have an acceptable level of iron bioavailability. However, for soybean, these authors mention a Phy/Fe molar ratio of 70 (against 10 in our study) which is more in agreement with the low absorption of iron reported in *in vivo* studies using soybean-based diets. Our result can be explained by the low phytate content measured here in soybean seeds. The Phy/Zn molar ratios of maize, sorghum and rice were above 30 and close to 20 for millet and soybean. These results reinforce previous results (Adeyeye, Arogundade, Akintayo, Aisida, & Alao, 2000; Ferguson, Gibson, Thompson, Ounpuu, & Berry, 1988) showing that the bioavailability of zinc in cereals and legumes would be lower than that in vegetables and in some roots and tubers whose Phy/Zn molar ratios are generally less than 20.

Soaking of whole seeds for 24 h did not decrease Phy/Fe molar ratios, which remained above 14 in maize, sorghum and rice. In fact there was an increase in these molar ratios after soaking, especially in sorghum and rice, because of the decrease in the iron content. After soaking, the Phy/Zn molar ratios decreased slightly in almost all seed species but they nevertheless remained much higher than the limiting value generally recognized

for improvement of zinc absorption in maize, sorghum, rice and soybean. The Phy/Zn molar ratio of these species is above 20, which hence predicts a low rate of zinc absorption for these seeds.

4. Conclusion

Based on the molar ratios of phytate to mineral of analyzed raw grains and seeds, iron and zinc bioavailability is insufficient in the cereals studied, except for millet, and legumes have only low zinc bioavailability. Soaking under the chosen conditions (related to those applicable in households in developing countries) does not adequately improve the molar ratios of phytate to iron and phytate to zinc in the analyzed seeds, and hence probably does not improve the bioavailability of these minerals. Nevertheless, soaking can be used to increase the bioavailability of zinc, estimated by the Phy/Zn molar ratio, because it leads to a slight reduction in the phytate content. On the other hand, soaking is not effective for iron owing to the leaching of iron ions into the soaking medium. Finally, since no phytate remains in the soaking medium, in order to limit mineral loss, the water used for soaking can also be used for cooking whole seeds of rice, cowpea and mung bean, which absorb a considerable amount of cooking water and, in this way, the leached minerals may be to a certain extent recovered.

Acknowledgements

The authors wish to thank I Rochette for technical assistance with HPIC analyses of phytate. Our thanks to S. Chanliou and J.P. Guyot for their advice.

Table 3

Influence of soaking whole seeds for 24 h on Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

		Phy/Fe molar ratio	Phy/Zn molar ratio
Millet	Unsoaked	5.3	18.5
	Soaked	6.5	16.4
Maize	Unsoaked	34.4	40.6
	Soaked	33.3	41.4
Sorghum	Unsoaked	22.8	62.8
	Soaked	35.2	58.5
Rice	Unsoaked	55.5	36.3
	Soaked	123	45.8
Soybean	Unsoaked	10.1	23.5
	Soaked	9.8	20.0
Cowpea	Unsoaked	7.8	15.8
	Soaked	9.7	15.7
Mung bean	Unsoaked	2.8	8.2
	Soaked	3.6	8.0

References

- Adeyeye, E. I., Arogundade, L. A., Akintayo, E. T., Aisida, O. A., & Alao, P. A. (2000). Calcium, zinc and phytate interrelationships in some foods of major consumption in Nigeria. *Food chemistry*, 71, 435–441.
- Allen, L. H., & Ahluwalia, N. (1997). *Improving iron status through diet. The application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations*, OMNI Opportunities for Micronutrients Interventions. Washington, DC: John Snow, Inc./OMNI Project.
- Davies, N. T., & Olpin, S. E. (1979). Studies on the phytate: Zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *British Journal of Nutrition*, 41(3), 590–603.
- Duhan, A., Khetarpaul, N., & Bishnoi, S. (2002). Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chemistry*, 78(1), 9–14.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and Multiple-*F* tests. *Biometrics*, 11, 1.
- Ferguson, E. L., Gibson, R. S., Thompson, L. U., Ounpuu, S., & Berry, M. (1988). Phytate, Zinc, and Calcium contents of 30 east African foods and their calculated phytate:Zn, Ca:Phytate and

- [Ca]/[Phytate]/[Zn] molar ratios. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1, 316–325.
- Frölich, W. (1995). Bioavailability of micronutrients in a fibre-rich diet, especially related to minerals. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49(S3), 116–122.
- Gibson, R. S., & Ferguson, E. L. (1998). Nutrition intervention strategies to combat zinc deficiency in developing countries. *Nutrition Research Reviews*, 11, 115–131.
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, J. F., & Gorecki, R. (1998). Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und – Forschung A*, 206, 279–283.
- Hurrell, R. F. (1997). Bioavailability of iron. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(S1), 4–8.
- Maga, J. A. (1982). Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and method of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 1–9.
- Marfo, E. K., Simpson, B. K., Idowu, J. S., & Oke, O. L. (1990). Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(7), 1580–1585.
- Pernollet, J. C. (1978). Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*, 17(9), 1473–1480.
- Reddy, N. R. (2002). Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In N. R. Reddy & S. K. Sathe (Eds.), *Food phytates* (pp. 25–52). Boca Raton: CRC Press.
- Saha, P. R., Weaver, C. M., & Mason, A. C. (1994). Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 2531–2535.
- Saharan, K., Khetarpaul, N., & Bishnoi, S. (2001). HCl-extractability of minerals from ricebean and fababean: Influence of domestic processing methods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(4), 323–325.
- Sandberg, A. S., & Svanberg, U. (1991). Phytate hydrolysis by phytase in cereals; effects on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*, 56(5), 1330–1333.
- Tabekhia, M. M., & Luh, B. S. (1980). Effects of germination, cooking and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans. *Journal of Food Science*, 45, 406–408.
- Talamond, P., Gallon, G., & Trèche, S. (1998). Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *Journal of Chromatography A*, 805, 143–147.
- Weaver, C. M., & Kannan, S. (2002). Phytate and mineral bioavailability. In N. R. Reddy & S. K. Sathe (Eds.), *Food phytates* (pp. 211–224). Boca Raton: CRC Press.

Chapitre III-2

Effet du trempage de grains entiers ou décortiqués et de farines de mil et de soja sur la dégradation des phytates et sur les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn

(Article accepté le 29/06/2004 par
International Journal of Food Science and Technology)

Effets du trempage de grains entiers ou décortiqués et de farines de mil et de soja sur la dégradation des phytates et sur les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn

Isabelle Lestienne*, Claire Mouquet, Christèle Icard-Vernière, Isabelle Rochette & Serge Trèche

Centre IRD de Montpellier, Unité de Recherche 106 « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Résumé

La dégradation des phytates et leur diffusion, ainsi que celles de l'activité phytasique, du fer et du zinc, ont été étudiées après trempage de grains entiers, de grains décortiqués et de farines de mil et de soja, afin d'évaluer l'efficacité du trempage à réduire les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn. Pour les grains de mil, leur décortilage et leur broyage avant trempage a favorisé la diffusion des phytates et des phytases dans le milieu aqueux et donc la dégradation des phytates. Le décortilage des grains de soja a entraîné une forte augmentation de la teneur en phytates, tandis que le broyage a facilité les réactions entre phytases et phytates au cours du trempage. Les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn n'ont été que faiblement diminués au cours des trempages. Les plus fortes diminutions ont été obtenues après trempage de la farine pendant 8 h pour le mil (Phy/Fe de 10,8 à 7,7 et Phy/Zn de 20,3 à 15,1) et après trempage des grains entiers pendant 24 h pour le soja (Phy/Fe de 10,4 à 9,4 et Phy/Zn de 23,8 à 19,1). La cuisson des farines trempées dans leur eau de trempage n'a pas permis d'augmenter les taux de dégradation de phytates.

Mots-clés

Diffusion ; Phytase ; Fer ; Zinc.

The effects of soaking of whole, dehulled and ground millet and soybean seeds on phytate degradation and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

Isabelle Lestienne*, Claire Mouquet, Christèle Icard-Vernière, Isabelle Rochette & Serge Trèche

Centre IRD de Montpellier, Unité de Recherche 106 « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Running title

Effects of soaking on phytate degradation

Keywords

Leaching, phytase, iron, zinc.

* Correspondent: Fax: + 04 67 41 63 30 ; e-mail: lestienn@mpl.ird.fr

Abstract

The degradation and leaching of phytates, phytase activity and iron and zinc concentration have been studied after soaking of whole seeds, dehulled seeds and flours of millet and soybean, in order to investigate the efficiency of soaking on reducing Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios. For millet grains, dehulling and milling before soaking facilitated the leaching of phytates and phytases in the aqueous medium and hence phytate degradation. Dehulling of soybean seeds led to a marked increase in phytate content, whereas milling favoured reactions between phytases and phytates. The Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios decreased only slightly during soaking. The highest decreases for millet were obtained after soaking of flour for 8 h (Phy/Fe: 10.8 to 7.7 and Phy/Zn: 20.3 to 15.1), and after soaking of whole seeds for 24 h for soybean (Phy/Fe: 10.4 to 9.4 and Phy/Zn: 23.8 to 19.1). Cooking of flours, with water used for soaking, did not increase phytate degradation.

1. Introduction

Iron deficiency is the most common nutritional disorder in the world. According to WHO (2000), 66-80% of the world's population is iron deficient and over 30% is anaemic. Zinc deficiency affects tens of millions of children throughout the developing world (Sandstead, 1995). Achieving adequate iron and zinc nutrition in developing countries is hindered by their poor bioavailability in predominantly plant-based diets (Gibson, 1994). The high proportion of cereals and legumes in these diets is a particular problem during the period of complementary feeding, when the infant moves from exclusive breast-feeding to dependency on solid family foods. Cereals and legumes are often rich in anti-nutritional factors associated with fibres that reduce mineral bioavailability (Frölich, 1995). The absorption of plant iron is usually only 1 to 10% efficient, while 20 to 40% of zinc is absorbable (Solomons & Ruz, 1997). Phytate, *myo*-inositol hexaphosphate (IP6), is known especially as a chelating agent that reduces the bioavailability of divalent cations (Weaver & Kannan, 2002).

Several authors have proposed that the bioavailability of iron and zinc should be estimated by the molar ratios of phytate to iron (Phy/Fe) and phytate to zinc (Phy/Zn). Davies & Olpin (1979) reported that Phy/Zn molar ratios higher than 10-15 limit zinc absorption and are associated with suboptimal zinc status in rats fed with egg-albumen-based diets with added phytate or zinc. In the same way, Saha *et al.* (1994) reported that adding phytate to wheat-flour-based diets significantly decreases iron absorption in rats when Phy/Fe molar ratios were above 14.

Thus, reducing these molar ratios to below specific thresholds seems to be a practical way to improve iron and zinc bioavailability. This can be achieved by reducing phytate content using certain thermal or biological treatments. Apart from drastic thermal treatment such as canning (Tabekhia & Luh, 1980), or extrusion cooking (Alonso *et al.*, 2000), the efficiency of temperature in reducing phytate is limited because of the high stability of the molecule. As far as biological treatments are concerned, fermentation and germination can result in more than 80% of phytate degradation (Marfo *et al.*, 1990; Mahgoub & Elhag, 1998). However, their application remains limited because of the additional workload they impose or the particular organoleptic properties they induce. Duhan *et al.* (2002) have reported that during soaking phytate content is reduced starts, soaking is a common household process. This reduction may be due to enzymatic degradation by endogenous phytases (Sandberg & Svanberg, 1991), whereby IP6 is hydrolysed giving free inorganic phosphorus (Pi) and *myo*-inositol phosphates (IP5 to IP1) or inositol, or to leaching of phytates into the soaking medium (Hotz & Gibson, 2001).

The objectives of this work were (i) to characterise the effect of soaking, alone or in combination with other conventional technological treatments (dehulling, milling, cooking), on iron and zinc leaching and phytate degradation in order to evaluate its efficiency in improving the Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios during millet and soybean processing into complementary foods and (ii) to identify conditions which favour phytate degradation by taking into account the distribution of phytate, phytase activity and free inorganic phosphorus between material and soaking medium.

2. Materials and methods

2.1. Cereals and legumes

Whole millet grains (*Pennisetum glaucum*) were purchased from a local market in Ouagadougou (Burkina Faso), whereas soybean seeds (*Glycine hispida*) came from China. Dehulling was done by using a laboratory dehuller (TM 050, Satake, Stockport, UK) so that the hulls of the seeds were removed. Flours were obtained from dehulled millet and soybean seeds using a laboratory mill (3303, Perten Instruments, Roissy, France). The mill was set to obtain flours with a particle size similar to that of traditionally produced flours.

2.2. Soaking and cooking processes

Figure 1 summarises the various treatments applied to raw seeds.

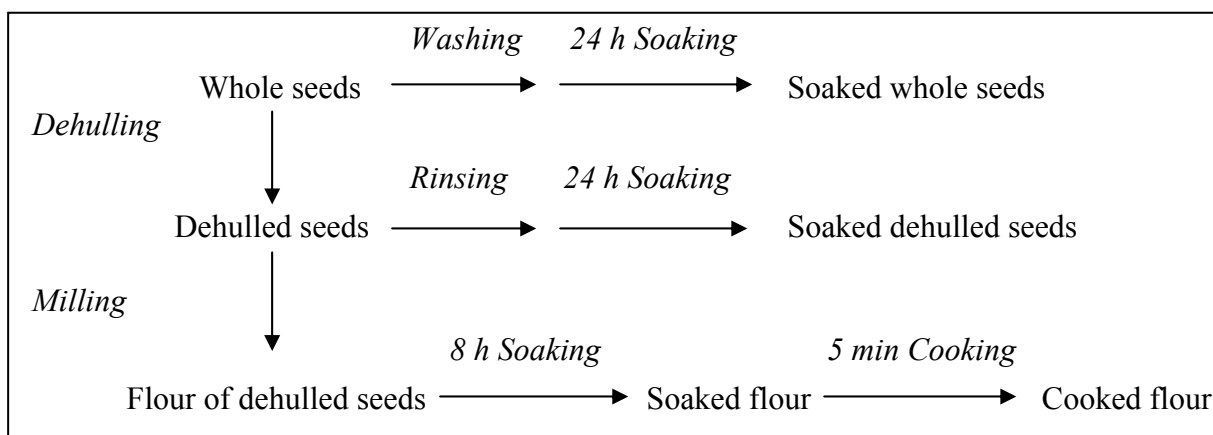


Figure 1. Schema of the various treatments applied to millet grains and soybean seeds

2.2.1. Soaking process of seeds

A hundred grams of dry whole seeds were first dipped for 15 min in 300 ml of 1% bleaching-water solution to limit bacterial growth, dehulled seeds were rinsed in deionised water to reduce leaching of components into the bleaching-water solution. Millet grains were then soaked in 300 ml and soybean seeds in 500 ml of mineral water (Evian), the different volumes took into account the swelling capacity. Seeds were soaked for 24 h at 30°C under low shaking (60 rpm) in an incubator (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, USA). After draining, the soaking media were stored at 4°C before chemical analyses, which were completed on the same day. Soaked seeds were freeze dried and ground (IKA M20, Labortechnik, Staufen, Germany) to pass through a 0.5 mm screen. Both kinds of seeds were soaked in duplicate.

2.2.2. Soaking process of flours

The proportion of flour to water used for soaking (90 g / 300 ml) corresponded to that used to prepare cereal-based gruels (WHO, 1998). Soaking was limited to 8 h to prevent fermentation. The mixtures were then centrifuged at 4500g for 15 min at 4°C to separate soaked flours from soaking media. The supernatants were stored at 4°C before chemical analysis, while the pellets were freeze dried and milled with a porcelain mortar and pestle. Flours were soaked in duplicate.

2.2.3. Cooking process of soaked flours

After soaking, flours were cooked with their entire soaking medium, in a pan for 5 min after bringing to the boil, as often traditionally performed in West Africa. The hot plate was kept in a standard position corresponding to a stable plate temperature of 230°C, this permitted the boiling after 7 and 9 min of cooking for millet and soybean, respectively. After cooling, the preparations were frozen, freeze dried and milled with a porcelain mortar and pestle. Soaked flours were cooked in duplicate.

2.3. Analytical methods

Phytate content was estimated by determination of *myo*-inositol hexaphosphate (IP6) content, this was obtained by anion-exchange HPLC separation according to the method of Talamond *et al.* (1998) with slight modifications (after extraction centrifugation was at 4500g for 20 min at 4°C and dilution of the residue before injection in 2 ml of deionized water).

Phytase activity was estimated by using the colorimetric determination of phosphorus released during incubation of phytase extract in a sodium phytate solution. Phytase was extracted from 2 g of flour in 20 ml of buffer (0.1 M acetate buffer, pH 5.6) at 4°C according to the procedure of Konietzny *et al.* (1995). The samples were magnetically stirred for 2 h at 4°C and centrifuged at 10000g for 30 min at 4°C. The supernatants (or directly 20 ml of soaking medium) were shaken for 10 min with 1 g of AG 1-X8 anion resin (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) to remove phosphorus and *myo*-inositol phosphates (Bergman *et al.*, 2000). The samples were centrifuged again and the supernatants were used as enzyme extracts, while the resins were kept to measure the free inorganic phosphorus (Pi) content later. Two ml of crude enzyme extract were incubated for 1 h at 30°C with 2 ml of 2.5 mM sodium phytate solution and 10 ml of 0.1 M citrate buffer at pH 5.8. The reaction was then stopped by adding 4 ml of 2 M HCl. Free Pi contents were measured by spectrophotometry on 0.25 ml of solution according to the method of Heinonen & Lahti (1981). The results were calculated as mg of released Pi per hour by phytase extracted from 100 g DM of raw or dehulled seeds, or material initially used for soaking, according to a standard range prepared with 5 mM KH₂PO₄ solution.

Free inorganic phosphorus (Pi) contents were measured by the same colorimetric method after they were eluted twice used for the determination of phytase activity by 20 ml of 1 N HCl from the anion resins.

Total iron and zinc contents were determined by atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA 200, Varian, Victoria, Australia) after dry ashing as described by Laporte *et al.* (1980).

2.4. Statistical analysis

Values were calculated per 100 g dry matter (DM) of raw material or material initially used for soaking by taking into account the loss of dry matter that occurred during soaking (Table 1). Each sample was analyzed in triplicate. Means were calculated from 3 determinations for raw and dehulled seeds and of 6 values (2 treatments * 3 determinations) for soaked seeds, soaked flours, soaking media and cooked flours. Data were assessed by analysis of variance (ANOVA). Duncan's multiple range test was used to separate means. Significance was accepted at the probability $P \leq 0.05$ (Duncan, 1955).

Table 1. Amounts of dry matter (g) found in soaking media after soaking of millet and soybean whole seeds, dehulled seeds and flours

	Amount of dry matter (g) in the soaking medium of			
	Soaking replicate	Whole seeds	Dehulled seeds	Flour
Millet	1	1.05	2.01	3.55
	2	1.08	2.32	3.46
Soybean	1	0.94	3.63	20.27
	2	0.92	3.73	21.31

3. Results and discussion

3.1. Effects of dehulling of millet and soybean seeds on phytate contents and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

Phytate content of raw grains of millet was 762 mg/100g DM and there was no significant variation after dehulling according to Duncan's test (Table 2).

This is consistent with existing data about phytate contents and the weight proportions of the different millet grain fractions, it can be deduced that about 60% of the phytates are located in the germ, 30% in the endosperm and 10% in the hulls (Abdelrahman *et al.*, 1984; Simwemba *et al.*, 1984). Phytases are partly located in the hulls as shown by the significant reduction in phytase activity after dehulling (-18%).

In soybean, the phytate content of raw seeds is shown in table 3 and increased after dehulling, which confirms that phytates are located in the cotyledons of legume seeds as reported by Reddy (2002). Phytase activity also increased after dehulling (+40%) which indicates that phytases are mainly located in soybean cotyledons. Hence, it seems that, in legumes, substrates and enzymes are located in the same seed fraction.

Iron and zinc contents for whole millet and soybean seeds, are shown in Table 4. These values were in agreement with those usually reported. Dehulling of millet and soybean seeds led to significant reductions ($P \leq 0.05$) in iron contents (-51 and -30%, respectively) but not in zinc contents. Although whole seeds had been winnowed and the stones manually removed, it is possible that iron losses were partly due to the removal of dust on the surface of the seeds. It seems that, in both kinds of seeds, the hulls have high iron contents, whereas zinc seems to be more uniformly distributed in the different fractions.

The Phy/Fe molar ratios increased after dehulling (table 4). The Phy/Zn molar ratio of millet remained constant around 20, while that of soybean increased (23.8 to 36.4) but mainly because of the higher phytate content of dehulled soybean seeds (Table 4).

Table 2. Effects of soaking of millet whole seeds, dehulled seeds and flour on leaching of phytates and phytases and on phytate degradation

Samples	Whole seeds		Dehulled seeds		Flour	
	Raw ^a	Soaked ^b	Raw ^a	Soaked ^b	Soaked ^b	+ Cooked ^b
IP6						
In material	762 ± 66	544 ± 18	691 ± 81	415 ± 72	512 ± 80	562 ± 38
In soaking medium ^c		1 ± 0 (0)		4 ± 1 (1)	29 ± 7 (5)	
Total	762 ± 66	545 ± 18	691 ± 81	419 ± 72	541 ± 79	562 ± 38
% Total reduction ^d		- 29 %		- 39 %	- 22 %	- 19 %
Phytase activity						
In material	153 ± 9	110 ± 8	125 ± 12	92 ± 10	56 ± 6	
In soaking medium ^c		11 ± 1 (9)		28 ± 1 (23)	60 ± 5 (52)	
Total	153 ± 9	121 ± 9	125 ± 12	120 ± 9	116 ± 6	
% Total reduction ^d		- 21%		- 4 %	- 7 %	
Pi						
In material	88 ± 4	59 ± 2	56 ± 3	67 ± 6	61 ± 6	147 ± 14
In soaking medium ^c		61 ± 2 (51)		119 ± 2 (64)	68 ± 4 (53)	
Total	88 ± 4	120 ± 4	56 ± 3	186 ± 6	129 ± 5	147 ± 14
rPi / dIP6 molar ratios ^e		1.0		3.1	3.2	4.6

Means ± SD of 3 determinations for raw whole seeds and dehulled seeds (^a IP6 and Pi expressed on mg/100g DM and phytase activity on mg released H₂PO₄ / h per 100g DM) and of 6 values (3 determinations * 2 treatment replicates) for soaked seeds, soaked flour and cooked flour (^b IP6 and Pi expressed on mg/100g DM initially used for soaking and phytase activity on mg released H₂PO₄ / h per 100g DM initially used for soaking).

^c Values in brackets are the percent of IP6, phytase activity and Pi found in the soaking medium

^d The percents of total reductions in IP6 and phytase activity are calculated on the basis of the material initially used for soaking

^e Molar ratios of released Pi to degraded IP6 are calculated from the differences between the total amounts of Pi and IP6 before and after soaking

3.2. Effects of soaking of millet and soybean whole seeds, dehulled seeds and flour on phytate degradation and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

3.2.1 Effects of soaking of millet whole seeds, dehulled seeds and flour on phytate degradation

The soaking of whole millet grains for 24 h led to a 29% loss in phytates ($P \leq 0.05$) which was concomitant with a release of Pi (Table 2). There was a significant loss in total phytase activity (-21%) probably because of the washing step using the bleaching-water solution, this made have caused a de-activation of the enzymes on the surface of the grains. The soaking medium contained a small proportion of the remained phytase activity (9%) and 51% of the Pi. Conversely, only few traces of IP6 were found in the medium. These results seem to indicate that IP6 degradation probably occurred in the soaking medium.

The soaking of dehulled seeds resulted, on one hand, in a 39% loss in IP6 and, on the other hand, in an increase of the rPi/dIP6 molar ratio (3.1) compared to the soaking of whole grains (1.0). Therefore, the soaking of dehulled grains led to the degradation of a greater number of IP6 molecules and to a greater hydrolysis of these molecules (higher release of Pi). Thus, it seems that the hulls hinder phytate degradation by phytases because they limit the passage of the phytates and the phytases into the aqueous medium. This hypothesis is supported by the proportion of phytase activity found in the soaking medium (23%) which is higher than the proportion found in the soaking medium of whole grains.

After millet flour was soaked for 8 h, 52% of the phytase activity and 53% of the Pi was found in the soaking medium with released inositol molecules (Fig. 2). This localization of high amounts of phytase activity and IP6 degradation products in the soaking medium indicates that milling facilitates the leaching of components. However, the soaking of flour for 8 h led to a lower IP6 degradation (-22%) than soaking of whole millet grains for 24 h (-29%). Consequently, it seems that there is another factor other element than hulls which limits IP6 degradation. This limitation can be attributed either to the low phytase activity of millet flour in the soaking conditions (125 mg $H_2PO_4/h/100gDM$ vs 988 for soybean flour) or to the slow leaching of IP6 molecules into the soaking medium as only a few IP6 (5%) are found there.

Thus, for millet, removal of hulls and application of conditions of long soaking times are conditions which favour phytate degradation.

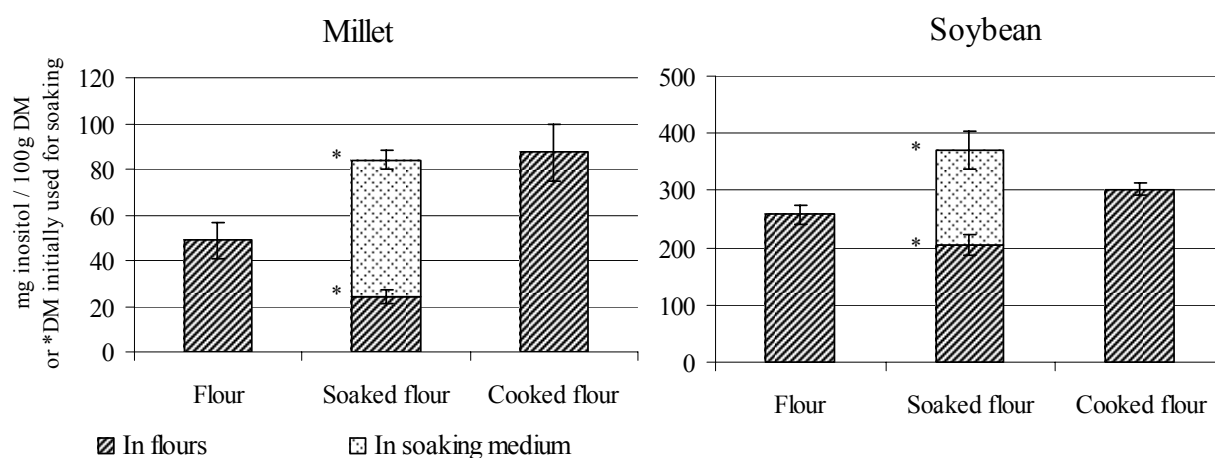


Figure 2. Effects of soaking and cooking of millet and soybean flours on inositol changes

Values are means of 3 determinations for flours and of 6 for others (3 determinations * 2 treatment replicates). Vertical bars represent standard deviation of the means.

Table 3. Effects of soaking of soybean whole seeds, dehulled seeds and flour on leaching of phytates and phytases and on phytate degradation

Samples	Whole seeds		Dehulled seeds		Flour	
	Raw ^a	Soaked ^b	Raw ^a	Soaked ^b	Soaked ^b	+ Cooked ^b
IP6						
In material	878 ± 130	671 ± 31	1270 ± 79	1001 ± 99	546 ± 82	1038 ± 106
In soaking medium ^c		3 ± 1 (0)		68 ± 5 (6)	73 ± 14 (12)	
Total	878 ± 130	674 ± 31	1270 ± 79	1069 ± 94	619 ± 85	1038 ± 106
% Total reduction ^d		- 23 %		- 16 %	- 51 %	- 18 %
Phytase activity						
In material	706 ± 15	695 ± 17	988 ± 31	769 ± 44	651 ± 42	
In soaking medium ^c		4 ± 0 (1)		113 ± 3 (13)	56 ± 9 (8)	
Total	706 ± 15	698 ± 17	988 ± 31	882 ± 46	707 ± 41	
% Total reduction ^d		- 1 %		- 11 %	- 28 %	
Pi						
In material	69 ± 1	94 ± 8	46 ± 4	109 ± 5	69 ± 5	103 ± 17
In soaking medium ^c		24 ± 1 (26)		50 ± 3 (32)	72 ± 7 (51)	
Total	69 ± 1	118 ± 7	46 ± 4	158 ± 6	141 ± 11	103 ± 17
rPi / dIP6 molar ratios ^e		1.6		3.6	1.0	1.6

Means ± SD of 3 determinations for raw whole seeds and dehulled seeds (^a IP6 and Pi expressed on mg/100g DM and phytase activity on mg released H₂PO₄ / h per 100g DM) and of 6 values (3 determinations * 2 treatment replicates) for soaked seeds, soaked flour and cooked flour (^b IP6 and Pi expressed on mg/100g DM initially used for soaking and phytase activity on mg released H₂PO₄ / h per 100g DM initially used for soaking).

^c Values in brackets are the percent of IP6, phytase activity and Pi found in the soaking medium

^d The percents of total reductions in IP6 and phytase activity are calculated on the basis of the material initially used for soaking

^e Molar ratios of released Pi to degraded IP6 are calculated from the differences between the total amounts of Pi and IP6 before and after soaking

3.2.2. Effects of soaking of soybean whole seeds, dehulled seeds and flour on phytate degradation

The soaking of whole soybean seeds for 24 h led to a 23% degradation of phytate ($P \leq 0.05$) with a rPi/dIP6 molar ratio of 1.6 (Table 3). There was only a small proportion of Pi (26% of total) and nearly no phytase activity (1%) found in the soaking medium. There was a lower IP6 degradation when dehulled seeds were soaked (-16%) than when whole seeds were soaked and only 32% of the Pi and 13% of the phytase activity leached into the soaking medium, where 6% of IP6 was present. These results seem to show that, for soybean, the leaching of IP6 and phytases into the aqueous medium is not an essential condition for phytate degradation which may, therefore, be limited by another element rather than presence or absence of hulls. However, soaking of dehulled seeds led to an increase of the rPi/dIP6 molar ratio (3.6) compared to soaking of whole seeds (1.6) which means that there was a stronger hydrolysis of *myo*-inositol molecules.

The soaking of soybean flour for 8 h led to a 51% degradation of phytate. Hence, degradation of phytate occurs much faster when flour is soaked than when whole or dehulled seeds are soaked. Nevertheless, there was still some non-degraded IP6 (12%) and a low proportion of phytase activity (8%) in the medium. Furthermore, soaking of flour allowed a greater number of IP6 molecules to be hydrolyzed, but with a smaller release of Pi than for soaking of whole seeds (rPi/dIP6 molar ratio = 1.0 vs 1.6).

As other enzymes, phytases need to be in a hydrated medium to react with phytates. Our results show that phytate degradation of soybean seems to occur mainly in material and not in the soaking medium. This is in contrast to millet, and hence the more the material is hydrated, the more the degradation is promoted.

3.2.3. Effects of soaking of millet and soybean whole seeds, dehulled seeds and flours on Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

Soaking of whole millet and soybean seeds led to significant losses ($P \leq 0.05$) in iron (-35% and -15%, respectively) while there was no significant loss in zinc (Table 4). The losses in iron are because of the leaching of iron ions into the soaking media (Saharan *et al.*, 2001).

With the soaking of dehulled seeds, we also noticed some differences related to the mineral and the kind of seeds. There were both iron and zinc losses for millet (-48% and -18%, respectively) while there was no significant variation for soybean. The important loss in iron of millet grains after soaking is because of its localization in the hulls. The lower leaching of zinc can be explained by the fact that zinc and iron are not located in the same place in the seeds nor linked with the same molecules.

The soaking of flour for 8 h did not lead to any significant loss in minerals in millet flour, but there was a significant reduction of both iron and zinc in soybean flour (-28% and -33%, respectively). Hence, the soaking of soybean flour results in a leaching into the soaking medium of iron and zinc ions quicker than when whole or dehulled seeds are soaked.

Soaking leads to losses in minerals, and particularly of iron, but in most of the cases these losses are balanced by phytate degradation, so that the Phy/Zn molar ratios after soaking decreased with all the treatments and the Phy/Fe molar ratios did not change to any great extent. For millet, soaking whole and dehulled grains was not efficient: Phy/Fe increased because leaching of iron was quicker than IP6 degradation. Conversely, the soaking of millet flour led to a decrease in the molar ratios of Phy/Fe (10.8 to 7.7) and of Phy/Zn (20.3 to 15.1). For soybean, the lower molar ratios were obtained after soaking of whole seeds (10.4 to 9.4 for Phy/Fe and 23.8 to 19.1 for Phy/Zn), whereas the soaking of flour was the most efficient treatment to degrade the phytates.

Table 4. Effects of soaking of millet and soybean whole seeds, dehulled seeds and flour on leaching of iron and zinc and the Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

	Sample	Iron ^c	Phy/Fe ^d	Zinc ^c	Phy/Zn ^d
Millet					
Whole seeds	Raw ^a	11.08 ± 0.68	5.8	3.66 ± 0.08	20.5
	Soaked ^b	7.25 ± 0.34 (- 35)	6.4	3.35 ± 0.09 (- 8)	16.0
Dehulled seeds	Raw ^a	5.44 ± 0.39	10.8	3.36 ± 0.14	20.3
	Soaked ^b	2.84 ± 0.25 (- 48)	12.4	2.76 ± 0.29 (- 18)	14.8
Flour	Soaked ^b	5.67 ± 0.29 (+ 4)	7.7	3.35 ± 0.30 (0)	15.1
	+ Cooked ^b	8.88 ± 0.35 (+ 63)	5.4	3.54 ± 0.10 (+ 5)	15.6
Soybean					
Whole seeds	Raw ^a	7.19 ± 0.18	10.4	3.64 ± 0.19	23.8
	Soaked ^b	6.09 ± 0.19 (- 15)	9.4	3.47 ± 0.14 (- 5)	19.1
Dehulled seeds	Raw ^a	5.02 ± 0.11	21.5	3.44 ± 0.22	36.4
	Soaked ^b	4.87 ± 0.33 (- 3)	18.2	3.44 ± 0.12 (0)	28.7
Flour	Soaked ^b	3.63 ± 0.19 (- 28)	16.6	2.32 ± 0.19 (- 33)	23.1
	+ Cooked ^b	5.11 ± 0.08 (+ 2)	17.2	3.54 ± 0.06 (+ 3)	28.9

Means ± SD of 3 determinations for raw whole seeds and dehulled seeds (^a expressed on mg/100g DM) and of 6 values (3 determinations * 2 treatment replicates) for soaked seeds, soaked flour and cooked flour (^b expressed on mg/100g DM initially used for soaking).

^c Values in brackets are the percent of variation in iron and zinc calculated on the basis of the material initially used for soaking

^d Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios are calculated on the basis of IP6 content and iron or zinc content of raw or soaked material

3.3. Effects of cooking of millet and soybean soaked flours on phytate degradation and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios

The cooking of flours in their soaking water did not increase the degradation rates of phytates. Several studies have shown that the cooking of sorghum (Mahgoub & Elhag, 1998) or quinoa (Valencia *et al.*, 1999) flours into gruel can result in a degradation of phytate by 29 and 20%, respectively. However, it is difficult to compare these results with ours because of the differences in the IP6 extraction and methods of determination and also differences in cooking conditions.

In cooked flour of millet, there was no significant IP6 variation ($P \leq 0.05$), but we noted a small release of Pi in relation to the Pi in soaked flour and soaking medium before cooking (Table 2). The rPi/dIP6 molar ratio was higher therefore indicating that there was degradation of other *myo*-inositol phosphate molecules.

There was more IP6 in cooked soybean flour ($P \leq 0.05$) than in soaked flour and soaking medium with a decrease in Pi (Table 3) and a decrease in inositol (Fig. 2). The high IP6 content of cooked flour could be because of a greater IP6 extraction in cooked flour than in raw or soaked flour. But all the results seem to show that IP6 molecules seem to be formed during the cooking process. It is possible that the increase in temperature during cooking allows activation of phosphoinositol kinases, enzymes that act during biosynthesis of phytates and create links between phosphate groups and inositol or *myo*-inositol phosphate molecules. Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase, whose temperature optimum is 42°C, has been purified from soybean seeds (Philippy *et al.*, 1994) and could hence be active at the beginning of the cooking. However, further study would be necessary to evaluate the reasons for this phenomenon in order to be able to avoid it.

In other respects, the cooking of soaked millet and soybean flours in their soaking medium allowed the recovery of the majority of iron and zinc (Table 4). We even noticed a significant increase ($P \leq 0.05$) in iron of cooked millet flour probably because of a release of iron ions by cooking utensils as has been reported earlier (Adish *et al.*, 1999). In this way, the molar ratios of cooked millet flour decreased as shown in table, while those of soybean decreased in a lesser extent, because of the phytate production during cooking.

Ours results confirm the advisability of using iron pots or other iron utensils for cooking, all the more as the released iron is reported to be highly bioavailable. Moreover, because of the leaching of minerals into the soaking medium, it is also of interest to keep the soaking water to allow recovery of the minerals and therefore improve the Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios despite the fact that there is no additional phytate degradation during cooking.

4. Conclusion

Soaking, dehulling/soaking and dehulling/milling/soaking are treatments which are commonly used to prepare gruels for infants in developing countries. Ours results showed that leaching, which occurs during soaking, affects most of the components involved in the bioavailability of minerals (phytates, phytases and minerals) which are found in the aqueous medium. Consequently, the Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios were slightly modified and the effects of treatments were different according to the kind of seeds and the mineral concerned. In millet, because of the distribution of phytates and phytases in the grain, dehulling and milling, introduced as steps before soaking, do have a positive effect on phytate degradation as they improve the contact between enzyme and substrate after their leaching. Conversely, in soybean seeds, phytates and phytases are both located in cotyledons and their leaching into the soaking medium does not appear to be essential to get degradation of phytate. However,

we noticed that soaking of soybean flour favoured phytate degradation probably, as the flour particles are hydrated and hydrolysis of phytates by phytases became easier.

This study also showed that cooking does not allow phytate degradation. Some *myo*-inositol hexaphosphates even seem to be produced during cooking of soybean flour. To balance this phenomenon we recommend cooking seeds or flours in iron pots with soaking water so as to recover the leached minerals.

Acknowledgements

The authors wish to thank C Picq for technical assistance with the determination of iron and zinc contents and M Chaurand for dehulling of seeds. Our thanks to S Chanliou and JP Guyot for their helpful advice.

This work is part of the Cerefer project (www.mpl.ird.fr/cerefer) funded by the European Commission contract N° ICA4-CT-2002-10047.

References

- Abdelrahman, A., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E. (1984) The proportions and chemical compositions of hand-dissected anatomical parts of pearl millet, *Journal of Cereal Science*, 2, 127-133.
- Adish, A.A., Esrey, S.A., Gyorkos, T.W., Jean-Baptiste, J. & Rojhani, A. (1999) Effect of consumption of food cooked in iron pots on iron status and growth of young children: A randomised trial, *The Lancet*, 353, 712-716.
- Alonso, R., Aguirre, A. & Marzo, F. (2000) Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans, *Food Chemistry*, 68(2), 159-165.
- Bergman, E.L., Autio, K. & Sandberg, A.S. (2000) Optimal conditions for phytate degradation, estimation of phytase activity, and localization of phytate in barley (*Cv. Blenheim*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4647-4655.
- Davies, N.T. & Olpin, S.E. (1979) Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats, *British Journal of Nutrition*, 41(3), 590-603.
- Duhan, A., Khetarpaul, N. & Bishnoi, S. (2002) Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods, *Food Chemistry*, 78(1), 9-14.
- Duncan, D.B. (1955) Multiple range and Multiple-F tests, *Biometrics*, 11,1.
- Frölich, W. (1995) Bioavailability of micronutrients in a fibre-rich diet, especially related to minerals, *European Journal of Clinical Nutrition*, 49(S3), 116-122.
- Gibson, R.S. (1994) Zinc nutrition in developing countries, *Nutrition Research Reviews*, 7, 151-173.
- Heinonen, J.K. & Lahti, R.J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase, *Analytical Chemistry*, 113, 313-317.
- Hotz, C. & Gibson, R.S. (2001) Assessment of home-based processing methods to reduce the phytate content and phytate/zinc molar ratio of white maize (*Zea mays*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 692-698.
- Konietzny, U., Greiner, R. & Jany, K.L.D. (1995) Purification and characterization of a phytase from spelt, *Journal of Food Biochemistry*, 18, 165-183.

- Laporte, J., Kovacsik, G. & Pinta, M. (1980) Milieux végétaux. In : *Spectrométrie d'absorption atomique, Tome 2: Applications à l'analyse chimique* (2nd édition, edited by M. Pinta). Pp. 378-421. Paris: Masson.
- Mahgoub, S.E.O. & Elhag, S.A. (1998) Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars, *Food Chemistry*, 61, 77-80.
- Marfo, E.K., Simpson, B.K., Idowu, J.S. & Oke, O.L. (1990) Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(7), 1580-1585.
- Philippy, B.Q., Ullah, A.H.J. & Ehrlich, K.C. (1994) Purification and some properties of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase from immature soybean seeds, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28393-28399.
- Reddy, N.R. (2002) Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: *Food phytates* (edited by N.R. Reddy & S.K. Sathe). Pp. 25-52. Boca Raton: CRC Press.
- Saha, P.R., Weaver, C.M. & Mason, A.C. (1994) Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2531-2535.
- Saharan, K., Khetarpaul, N. & Bishnoi, S. (2001) HCl-extractability of minerals from ricebean and fababean: influence of domestic processing methods, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(4), 323-325.
- Sandberg, A.S. & Svanberg, U. (1991) Phytate hydrolysis by phytase in cereals; effects on *in vitro* estimation of iron availability, *Journal of Food Science*, 56(5), 1330-1333.
- Sandstead, H.H. (1995) Is zinc deficiency a public health problem ?, *Nutrition*, 11, 87-92.
- Simwemba, C.G., Hosoney, R.C., Varriano-Marston, E. & Zeleznak, K. (1984) Certain B vitamin and phytic acid contents of pearl millet [*Pennisetum americanum* (L.) Leeke], *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(1), 31-34.
- Solomons, N.W. & Ruz, M. (1997) Zinc and iron interaction: Concepts and perspectives in the developing world, *Nutrition Research*, 17(1), 177-185.
- Tabekhia, M.M. & Luh, B.S. (1980) Effects of germination, cooking and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans, *Journal of Food Science*, 45, 406-408.
- Talamond, P., Gallon, G. & Trèche, S. (1998) Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food, *Journal of Chromatography A*, 805, 143-147.
- Valencia, S., Svanberg, U., Sandberg, A.S. & Ruales, J. (1999) Processing of quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd): effects on *in vitro* iron availability and phytate hydrolysis, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50(3), 203-211.
- Weaver, C.M. & Kannan, S. (2002). Phytate and mineral bioavailability. In: *Food phytates* (edited by N.R. Reddy & S.K. Sathe). Pp. 211-224. Boca Raton: CRC Press.
- WHO (1998). Energy required from complementary foods and factors affecting their intake. In: *Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge*. (Report WHO/NUT/98.1). Pp: 45-76. Geneva : WHO.
- WHO (2000). Battling iron deficiency anaemia. In: *Turning the tide of malnutrition responding to the challenge of the 21st century*. (Document WHO/NDH/00.7). Pp. 10-11. Geneva : WHO.

Chapitre IV

EFFETS DES MODES DE PRÉPARATION
TRADITIONNELS DES BOUILLIES DE MIL
FERMENTÉES SUR LES TENEURS EN
FACTEURS ANTI-NUTRITIONNELS
ET LA BIODISPONIBILITÉ *IN VITRO*
DU FER ET DU ZINC

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la préparation de farines et de bouillies, à base de céréales et de légumineuses, uniquement à partir de procédés technologiques simples, tels que le trempage, le décorticage, le broyage et la cuisson, modifiait peu les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn.

D'après la littérature, la germination (Maghoub et Elhag, 1998) et la fermentation (Marfo *et al.*, 1990) sont des procédés efficaces pour réduire les teneurs en facteurs anti-nutritionnels, avec notamment des taux de réduction des teneurs en phytates pouvant dépasser 80%. Parmi les procédés couramment utilisés pour la préparation d'aliments de complément à base de céréales et de légumineuses, il semble donc que ces procédés biologiques soient les seuls à pouvoir permettre une amélioration de la biodisponibilité des minéraux.

En raison de leur forte activité amylasique, les farines de grains germés ne peuvent être incorporées qu'en faible proportion dans les aliments de complément. Par ailleurs, la germination a déjà fait l'objet de recherches dans le but d'améliorer la densité énergétique de ces aliments au sein du laboratoire de Nutrition de l'IRD (Traoré *et al.*, 2004). En revanche, bien que la fermentation, en raison de sa large utilisation en Afrique, soit également un sujet de recherche développé à l'IRD, les potentialités de ce procédé à améliorer la biodisponibilité des minéraux dans les aliments de complément traditionnels n'ont pas encore été évaluées. Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc voulu développer cet aspect.

Ce travail a été réalisé à partir d'échantillons de bouillie de mil fermentée préparée de manière traditionnelle à Ouagadougou (Burkina Faso) (« *ben-saalga* » ou « *Ben-kida* ») collectés dans le cadre du projet Cerefer. Une enquête préliminaire a permis de montrer que ces bouillies étaient largement données à consommer aux jeunes enfants en tant qu'aliment de complément (Mouquet, 2003). Les diagrammes de fabrication de ces deux types de bouillie sont donnés dans l'introduction bibliographique (cf. paragraphe 1.6.3.3., Figure I-6). Ce mode de fabrication comprend un trempage des grains de mil d'une durée moyenne de 16 h, au cours duquel se déroule une première fermentation. Puis les grains subissent une mouture humide et la pâte obtenue est filtrée sur une mousseline afin d'en éliminer les drêches. Cette pâte filtrée est alors laissée à décanter pendant une durée moyenne de 11 h au cours de laquelle une seconde fermentation a lieu. Enfin, le surnageant de décantation est mis à chauffer jusqu'à ébullition, puis la pâte est ajoutée et cuite environ 10 min (Guyot *et al.*, 2003). Cette bouillie est appelée « *ben-saalga* », « *saalga* » signifiant lisse, en opposition au « *ben-kida* » qui traduit la présence de granules de farine de mil qui sont introduites dans la bouillie au moment de la cuisson.

Bien que ce mode de préparation puisse être reproduit en conditions contrôlées en laboratoire, les techniques traditionnelles auxquelles il fait appel nécessitent un savoir-faire et un environnement (équipements, matériels, microflore, température) difficilement reproductibles. Par ailleurs, il existe, au niveau des ateliers de production, des variantes des modes de préparation de ces bouillies qu'il est intéressant de prendre en compte dans une étude globale de leurs caractéristiques nutritionnelles (Guyot *et al.*, 2003). Pour ces raisons, il a été choisi d'effectuer cette étude sur des échantillons prélevés en milieu naturel dans différents ateliers de production de Ouagadougou.

Ce chapitre est composé de deux parties qui feront l'objet de deux publications ultérieures. Le « Matériels et méthodes » correspondants à ce chapitre se trouve donc dans le chapitre II de la thèse (matériels et méthodes général).

Les résultats de la première partie, qui a pour objectif de caractériser la variabilité de la qualité nutritionnelle des bouillies de mil fermentées produites à Ouagadougou au travers d'un échantillonnage réalisé sur environ un tiers des ateliers de production de la ville (48), sont issus d'un travail collectif.

La seconde partie s'intéresse aux variations des teneurs en FAN (phytates, tanins, fibres) et des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc pendant la transformation traditionnelle des grains de mil en bouillie fermentée. Il s'agit d'une étude préliminaire qui concerne pour le moment un nombre restreint d'ateliers (14) et qui sera complétée avant publication des résultats.

Chapitre IV-1

Variabilité de la qualité
nutritionnelle des bouillies de mil
fermentées produites à
Ouagadougou (Burkina Faso)

Variabilité de la qualité nutritionnelle des bouillies de mil fermentées produites à Ouagadougou (Burkina Faso) ¹

1. Caractéristiques physico-chimiques des bouillies de mil fermentées

Les distributions de fréquence du pH et de la teneur en matière sèche des 48 bouillies avant incorporation éventuelle de sucre, ainsi que les valeurs moyennes (\pm écart-types) sont données sur la figure IV-1.

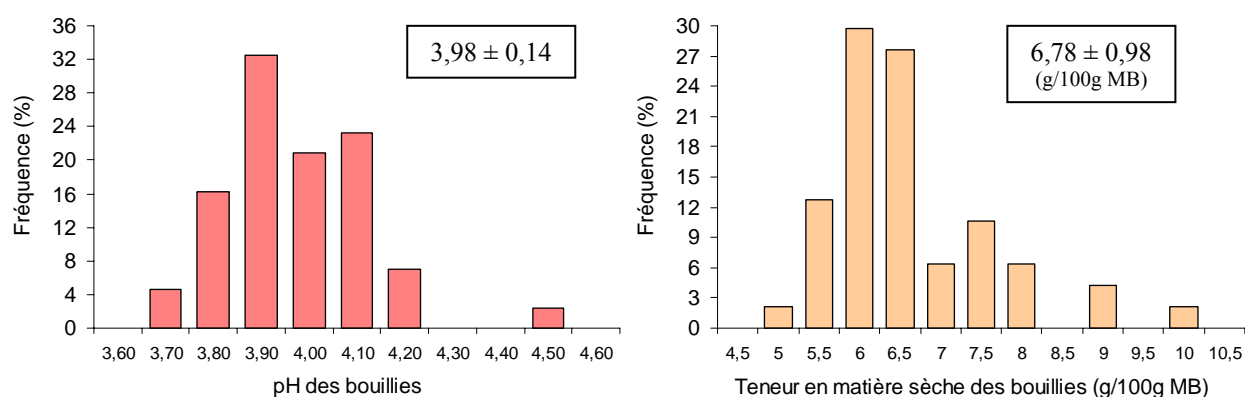


Figure IV-1. Distributions de fréquences du pH et de la teneur en matière sèche des échantillons de bouillie (n=47 pour le pH et n=48 pour la teneur en MS).

Toutes les bouillies étudiées ont un pH inférieur à 4,5 permettant de prévenir le développement de la majorité des micro-organismes pathogènes. Les pH des bouillies varient peu avec un coefficient de variation (CV) de 4%. Plus de 80% des échantillons étudiés ont un pH situé entre 3,8 et 4,1 avec une valeur moyenne de pH proche de 4,0.

Les teneurs en matière sèche des bouillies étaient très faibles puisque pratiquement toutes inférieures à 10 g/100g MB. La teneur moyenne en matière sèche (6,8 g/100g MB) correspond à une densité énergétique très faible d'environ 28 kcal/100 g de bouillie sans addition de sucre (1g de produit sec équivalent à 4,1 kcal, coefficient calculé en fonction des teneurs moyennes en protéines, lipides, fibres et cendres des 48 échantillons). Cette valeur est très éloignée du minimum de 80 kcal/100 g recommandé dans la version en cours de révision du Codex Alimentarius (2002), elle-même inférieure à celles préconisées par l'OMS (128 kcal/100g) ou par Dewey et Brown (84 kcal/100g) pour des enfants de 6-12 mois consommant deux repas de bouillies par jour et recevant respectivement des niveaux d'allaitement faibles et moyens (WHO, 1998 ; Dewey et Brown, 2003). L'augmentation de la densité énergétique de ces bouillies est donc un objectif à prendre en compte en priorité dans l'amélioration de leur qualité nutritionnelle.

¹ Les données restituées et discutées dans cette partie sont le résultat d'une étude collective qui fera l'objet d'une publication ultérieure (Mouquet et al.).

2. Composition en quelques macro- (protéines, lipides) et micro- (fer, zinc) nutriments des bouillies de mil fermentées

Les distributions de fréquences des teneurs en protéines et en lipides pour l'ensemble des 48 bouillies ainsi que les moyennes des teneurs (\pm écart-types) sont données sur la figure IV-2, tandis que celles des teneurs en fer et en zinc sont données sur la figure IV-3.

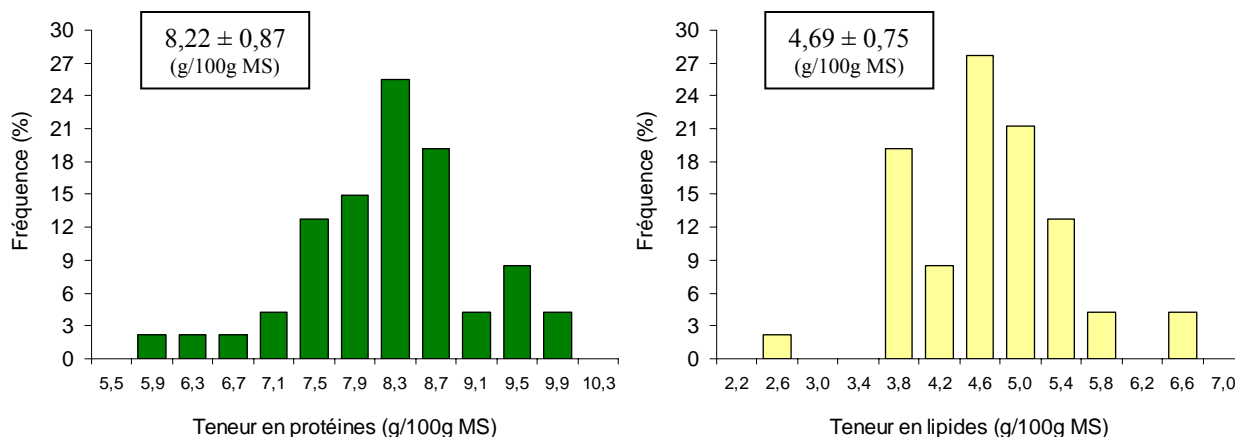


Figure IV-2. Distributions de fréquences des teneurs en protéines et en lipides des 48 échantillons de bouillie.

On observe des variabilités assez importantes des teneurs en protéines (CV=11%) et en lipides (CV=16%) au niveau de l'ensemble des bouillies étudiées. Ces variabilités peuvent être d'origine génotypique ou environnementales (lieux et conditions de culture, durée de stockage des grains...) ou liées aux modes de préparation des bouillies qui peuvent varier d'un atelier de production à l'autre.

D'après le Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2002d), la teneur en protéines brutes d'une farine infantile ne doit pas dépasser 5,5 g/100kcal ce qui équivaut à 22,6 g/100g MS. Les besoins en protéines digestibles pour des enfants de 6 à 23 mois varient entre 9,9 et 13,0 g/jour (FNB/IOM, 2002). Selon Lutter et Dewey (2003), afin de couvrir ces besoins, un aliment de complément doit apporter entre 6 et 11 g de protéines/100g MS. Pour que les besoins de l'ensemble des enfants de cette classe d'âge soient couverts, la teneur en protéines des bouillies devrait donc être supérieure ou égale à 11 g/100g MS (2,68 g/100kcal). Les bouillies « *ben-saalga* » et « *ben-kida* » sont fortement en deçà de cette recommandation puisque leurs teneurs en protéines varient entre 5,8 à 10,0 g de protéines/100g MS, avec environ 80% des échantillons ayant une teneur en protéines située entre 7 et 9 g/100g MS.

Concernant les apports en lipides, il est généralement admis que ceux-ci doivent représenter au moins 30% de l'apport total en énergie pour des enfants de 6 à 24 mois (Lutter et Dewey, 2003). Le lait maternel étant très riche en lipides, les apports en lipides de l'aliment de complément doivent être ajustés en fonction du niveau d'allaitement de l'enfant. Ainsi, pour que 30% de l'énergie totale apportée soit d'origine lipidique, Dewey et Brown (2003) ont évalué que les pourcentages apportés par l'alimentation complémentaire, devaient être de 19, 24 et 28%, respectivement pour des enfants de 6-8 mois, 9-11 mois et 12-23 mois recevant de faibles niveaux d'allaitement. Ces quantités d'énergie représentent des teneurs en lipides de 8,7 à 12,8 g/100g MS. Considérant les difficultés économiques et technologiques (broyage,

tamissage) à préparer des bouillies ayant des teneurs en lipides élevées, il semble adéquat de viser une teneur en lipides d'environ 10 g/100g MS (2,44 g/100kcal) correspondant à un apport en énergie de 22%. Les bouillies de mil fermentées sont loin de remplir cette exigence étant donné qu'elles ne contiennent qu'entre 2,6 à 6,6 g de lipides/100g MS, ne représentant que 6 à 15% de l'apport énergétique total de la bouillie.

Comme la densité énergétique, l'équilibre en macronutriments de ces bouillies est donc à corriger pour qu'elles correspondent aux recommandations internationales en ce qui concerne l'alimentation complémentaire du jeune enfant.

Comme le montre la figure IV-3, les teneurs en fer et en zinc varient respectivement de 3,8 à 15,2 mg/100g MS (CV=34%) et de 1,1 à 3,3 mg/100g MS (CV=25%). Contrairement à la distribution des teneurs en zinc, l'application des tests de normalité aux teneurs en fer ne permet pas d'assimiler leur distribution à une distribution normale (teneur médiane = 7,9 mg/100g MS). Les variabilités des teneurs en fer et en zinc sont donc encore plus importantes que celles des teneurs en protéines et lipides et peuvent également être attribuées aux changements de saison et/ou de mode de préparation. En particulier, la durée de trempage et l'étape de filtration de la farine humide, qui permet de retirer les drêches avant la décantation, peuvent représenter des sources de variabilités importantes des teneurs en minéraux. Mais ces teneurs dans les bouillies peuvent également varier en raison de contaminations au cours de la préparation. Les principales sources de contamination sont la poussière (terre rouge en suspension dans l'air à Ouagadougou) et les équipements ou ustensiles utilisés au cours de la préparation (moulin, marmite...). Ces facteurs de contamination peuvent avoir des répercussions particulièrement importantes sur les teneurs en fer des bouillies.

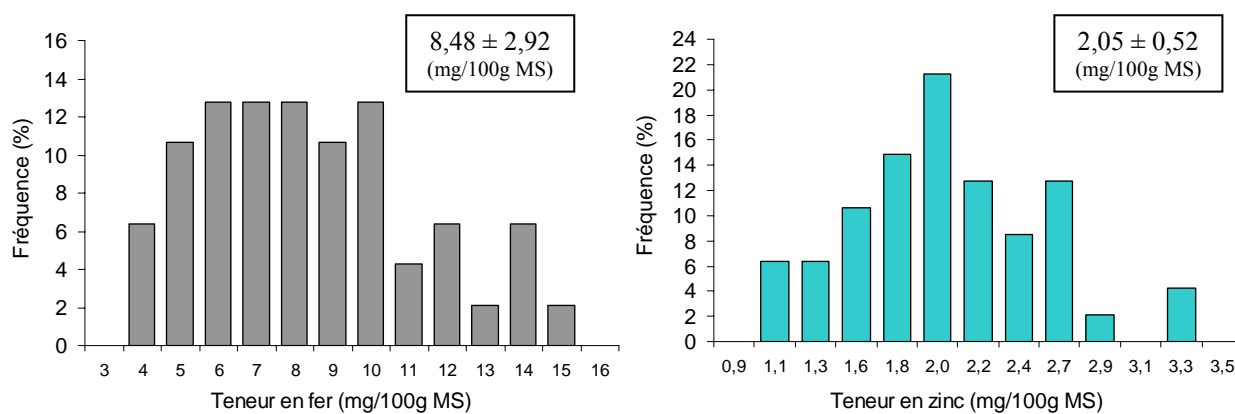


Figure IV-3. Distributions de fréquences des teneurs en fer et en zinc des 48 échantillons de bouillie.

Selon la FAO et l'OMS (FAO/WHO, 2002a,b), les besoins en fer et en zinc pour des enfants de 6 à 36 mois sont respectivement de 3,9 à 18,6 mg/jour et de 2,4 à 8,4 mg/jour, selon l'âge et la biodisponibilité de ces minéraux dans le régime (de 5 à 15% pour le fer et de 15 à 50% pour le zinc). Afin de couvrir ces besoins et en raison de la faible biodisponibilité de ces minéraux dans les aliments à base de céréales préparés dans les pays en développement, les teneurs recommandées pour des enfants de 6-11 mois (ayant proportionnellement les besoins les plus importants) sont de 27,5 mg de fer et de 10-12,5 mg de zinc /100g MS dans les aliments de complément (Lutter et Dewey, 2003). Avec des teneurs moyennes en fer et en zinc respectivement de 8,5 et 2,1 mg/100g MS, ces bouillies sont donc loin d'apporter les quantités de fer et de zinc nécessaires aux besoins des jeunes enfants. En effet, même si les

biodisponibilités du fer et du zinc dans ces bouillies étaient élevées (respectivement 15 et 50%), les teneurs minimales en fer et en zinc pour espérer couvrir les besoins des enfants de 6-8 mois seraient, respectivement, 9,3 et de 3,8 mg/100g MS, c'est-à-dire supérieures aux teneurs moyennes mesurées dans les bouillies.

3. Composition en facteurs anti-nutritionnels (fibres, phytates et tanins) des bouillies de mil fermenté

Les distributions de fréquences des teneurs en ces facteurs anti-nutritionnels ainsi que les moyennes des teneurs (\pm écart-types) pour l'ensemble des bouillies sont données sur la figure IV-4.

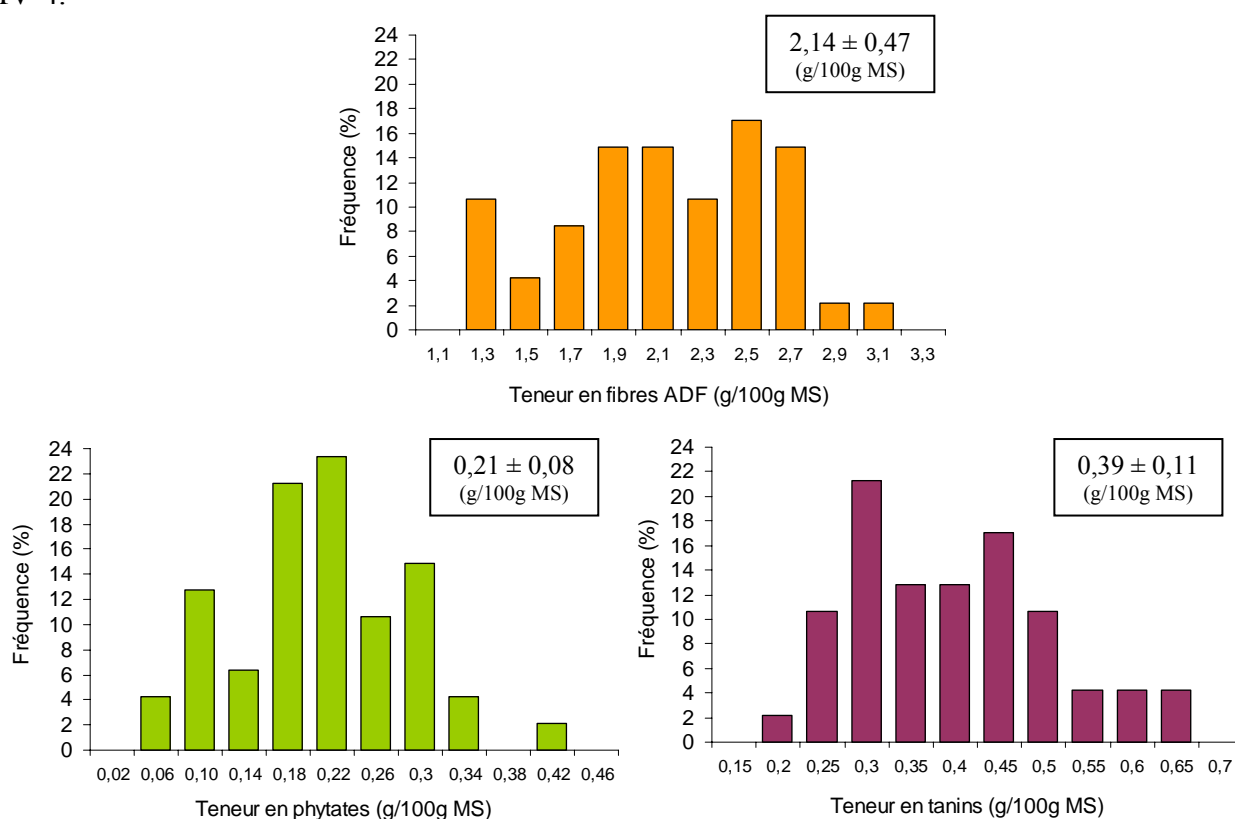


Figure IV-4. Distributions de fréquences des teneurs en facteurs anti-nutritionnels (fibres, phytates et tanins) des 48 échantillons de bouillie.

Comme les teneurs en nutriments, les teneurs en FAN présentent une grande variabilité. Concernant les teneurs en fibres variant de 1,27 à 3,18 g/100g MS (CV=22%), la principale source de variation est très probablement l'étape de filtration qui permet d'éliminer plus ou moins correctement les drêches dans lesquelles elles sont concentrées. Mais la qualité de cette étape est dépendante des procédés de trempage et de mouture qui la précèdent. En effet, le trempage permet d'attendrir les grains pour faciliter la mouture et la mouture va donner une farine humide plus ou moins fine qui ne se comportera donc pas de la même façon lors de la filtration.

Les teneurs en phytates et en tanins varient, respectivement, de 0,05 à 0,44 g/100g MS (CV=38%) et de 0,20 à 0,66 g/100g MS (CV=28%). Cette variabilité peut être due à des facteurs génotypiques dans la mesure où certains auteurs ont montré qu'il existait de grandes

différences de teneurs en phytates (de 0,18 à 0,99 g/100 g MS ; Reddy, 2002) et en tanins (de 0,59 à 1,06 g/100 g MS ; Bravo, 1998) au niveau des grains de mil bruts. Cependant, les variantes des modes de préparation de la bouillie en fonction de la saison ou des procédés utilisés dans les ateliers, peuvent également constituer une source de variabilité en provoquant des réductions des teneurs en phytates et en tanins plus ou moins fortes. En effet, les durées de trempage des grains (de 6 à 31 h) ou de décantation de la farine (de 2 à 20 h) ont certainement un effet important sur la réduction des teneurs en ces deux composés et leur optimisation est donc à envisager dans une démarche d'amélioration de ce procédé traditionnel.

4. Rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn des bouillies de mil fermenté

Les distributions de fréquences des rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn ainsi que les moyennes de ces rapports (\pm écart-types) pour l'ensemble des bouillies sont données sur la figure IV-5.

Les rapports molaires varient de 0,6 à 7,1 (CV=53%) et de 2,7 à 23,4 (CV=41%), respectivement pour Phy/Fe et Phy/Zn.

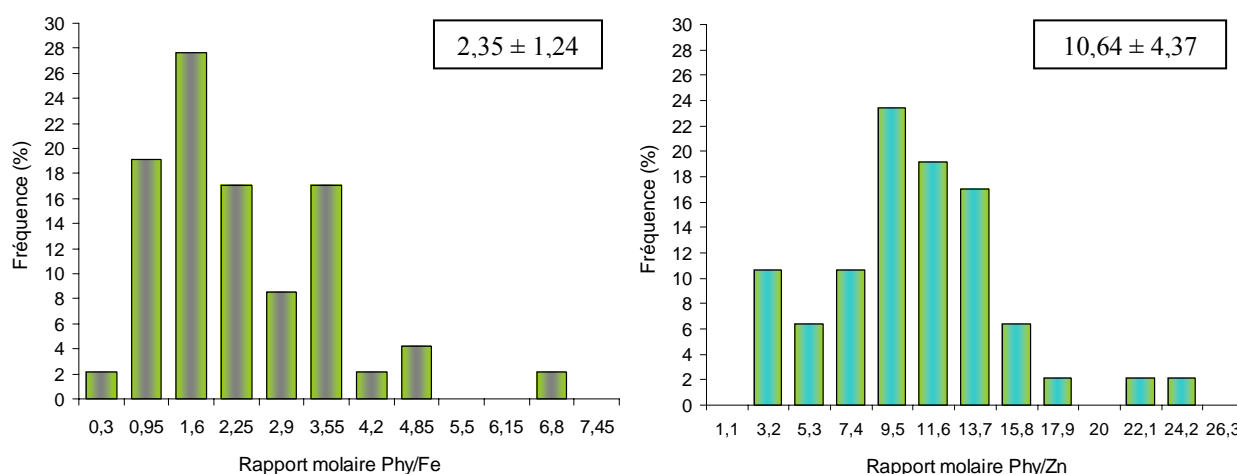


Figure IV-5. Distributions de fréquences des rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn des 48 échantillons de bouillie.

Pour les 48 bouillies étudiées, les rapports molaires Phy/Fe sont inférieurs à 10, avec une moyenne de 2,4. Si l'on se base sur les travaux de Saha *et al.* (1994), la biodisponibilité du fer dans ces bouillies devrait être relativement bonne étant donné que ceux-ci ont montré que, chez le rat nourri avec des régimes à base de farine de blé, l'absorption du fer était améliorée lorsque les rapports molaires Phy/Fe des régimes étaient inférieurs à 10-14.

En ce qui concerne les rapports molaires Phy/Zn, 87% des bouillies étudiées ont des rapports inférieurs à 15, avec une moyenne de 10,6. D'après les conclusions de Davies et Olpin (1979) la biodisponibilité du zinc dans ces échantillons de bouillies devrait être assez élevée.

5. Effets de la saison, du type de bouillie et de son pH sur les caractéristiques des bouillies fermentées

Le mois de prélèvement des échantillons, le type de bouillie (« *ben-saalga* » ou « *ben-kida* ») et la mesure du pH figuraient parmi les données recueillies au moment des prélèvements dans les ateliers. Dans l'hypothèse que des différences de saison de préparation, de type ou de pH des bouillies puissent influencer sur les modes de préparation, le déroulement de la fermentation et/ou sur les caractéristiques physico-chimiques des bouillies et leurs teneurs en macronutriments et surtout en facteurs anti-nutritionnels, des comparaisons des teneurs moyennes obtenues pour les différents niveaux de chacune de ces variables ont été réalisées par analyse de variance.

Deux saisons ont été différenciées en fonction des températures mensuelles moyennes du Burkina Faso : une saison « froide » de Août à Février (températures minimale de 15°C et maximale de 36°C, avec une moyenne de 26°C sur la saison) et une saison chaude de Mars à Juillet (températures minimale de 24°C et maximale de 41°C, avec une moyenne de 30°C sur la saison). Le nombre d'échantillons prélevés au cours de la saison froide était de 20, contre 28 au cours de la saison chaude.

Concernant les populations de bouillie séparées en fonction de leur nature, les effectifs sont plus déséquilibrés étant donné que seulement sept bouillies étaient de type « *ben-saalga* », ce qui s'explique par le fait que les bouillies de type « *ben-kida* » (n=41) sont plus appréciées du consommateur (Mouquet, 2003).

Enfin, concernant le pH des bouillies, qui peut être considéré comme un indicateur d'une fermentation plus ou moins longue ou plus ou moins poussée, deux classes de bouillies à peu près de même effectif ont été distinguées : les bouillies ayant des pH inférieurs à 4 (n=26) et les bouillies ayant des pH supérieurs ou égaux à 4 (n=21).

Les effets de la saison, de la nature de la bouillie et de son pH sur les caractéristiques des bouillies fermentées sont donnés dans le tableau IV-1.

Tableau IV-1. Effet de la saison, de la nature de la bouillie et de son pH sur les caractéristiques des bouillies fermentées

Caractéristiques des bouillies fermentées	Facteurs de variation		
	Saison ^a	Nature de la bouillie ^b	pH ^c
pH de la bouillie	ns	ns	/
Teneur en matière sèche	P ≤ 0,05 **	P ≤ 0,05 **	ns
Teneur en protéines	ns	ns	ns
Teneur en lipides	ns	ns	ns
Teneur en fer total	ns	ns	ns
Teneur en zinc total	ns	ns	ns
Teneur en fibres ADF	ns	P ≤ 0,005 *	P ≤ 0,05 *
Teneur en phytates	ns	ns	ns
Teneur en tanins	ns	ns	ns

^a Saison chaude (Mars-Juillet) (n=28) ou froide (Août-Février) (n=20)

^b *Ben-saalga* (n=7) ou *Ben-kida* (n=41)

^c pH inférieur à 4,0 (n=26) ou supérieur ou égal à 4,0 (n=21)

* Analyse de variance ANOVA.

** Test de Kruskal-Wallis de comparaison des médianes.

La saison ne semble ni influencer sur le pH des bouillies ni être significativement liée à des variations de teneurs en nutriments ou facteurs anti-nutritionnels. En revanche, il semble que la saison est un effet significatif sur la teneur en matière sèche des bouillies. En effet, la médiane des teneurs en matière sèche préparées en saison froide (6,9 g/100g MB) est significativement plus élevée que celle des bouillies préparées en saison chaude (6,3 g/100g MB). Il semble donc que la saison de préparation des bouillies ait peu d'influence sur leur qualité nutritionnelle. Ceci peut s'expliquer par le savoir-faire des productrices qui modifient leur mode de préparation selon la saison afin de s'adapter aux changements de température extérieure. En effet, en saison froide, certaines productrices effectuent le trempage des grains de mil dans de l'eau chaude, afin d'accélérer leur ramollissement avant la mouture. En saison chaude, en revanche, le trempage des grains s'effectue dans de l'eau non chauffée et il arrive qu'une partie du surnageant de décantation soit éliminé et remplacé par de l'eau propre, afin d'éviter l'apparition de mauvaises odeurs pouvant être dues au développement de souches microbiennes responsables de fermentations butyrique ou propionique.

Au niveau de l'effet du type de bouillie, on remarque à nouveau que seules les teneurs en matière sèche et en fibres ADF varient de manière significative. Ainsi, les bouillies « *ben-saalga* » avaient globalement des teneurs en matière sèche plus élevées (moyennes de 7,5 g/100g MB) et des teneurs en fibres ADF plus faibles (1,7 g/100g MS) que les bouillies « *ben-kida* » (teneur en matière sèche : 6,5 g/100g MB et teneur en fibres : 2,2 g/100g MS). La différence de teneurs en fibres ADF s'explique facilement en raison de l'ajout au moment de la cuisson des bouillies « *ben-kida* » de granules à base de farine de mil complète et donc plus riche en fibres que la pâte obtenue à l'issue de la filtration. En revanche, les différences de teneurs en matière sèche des bouillies sont plus surprenantes. En effet, nous aurions pu croire que cet ajout de granules engendrerait également des teneurs en matière sèche plus élevées dans les bouillies « *ben-kida* ». Ce résultat pourrait toutefois s'expliquer par le fait que les productrices préparant les bouillies « *ben-kida* » prépareraient volontairement des bouillies ayant des teneurs en matière sèche plus faibles avant ajout de granules que celles préparant les bouillies « *ben-saalga* », de manière à compenser le coût supplémentaire en matière première dû aux granules. Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution étant donné le nombre limité de bouillies « *ben-saalga* » analysées par rapport au nombre de bouillies « *ben-kida* ».

Concernant l'effet du pH de la bouillie, seules les moyennes des teneurs en fibres ADF présentent une différence significative. Les bouillies ayant des pH inférieurs à 4 ont des teneurs en fibres plus faibles que celles ayant des pH supérieurs ou égaux à 4 (2,0 vs 2,3 g/100g MS). Ceci semble indiquer qu'une fermentation plus poussée permettrait de réduire les teneurs en fibres insolubles des bouillies. Cette réduction peut être attribuée à l'action d'enzymes (cellulases, hémicellulases), soit endogènes aux grains de mil, soit produites par la microflore. En opposition à cela, le fait que les teneurs en phytates ne varient pas en fonction du pH de la bouillie suggère que la microflore présente au cours de cette fermentation ne dégrade pas ou peu les phytates. La microflore se développant au cours de la décantation de la farine de mil est une flore lactique principalement représentée par les espèces *Lactobacillus plantarum* et *L. fermentum* (Tou *et al.*, 2003a). Ce résultat n'est donc pas surprenant étant donné qu'aucune activité phytasique extracellulaire n'a encore été trouvée chez les bactéries lactiques (Fredrikson *et al.*, 2002). De plus, les conditions optimales de température et de pH des phytases intracellulaires de *L. plantarum* (65°C, pH 5,5), qui ont été déterminées par Zamudio *et al.* (2001), ne correspondent pas à celles rencontrées au cours du procédé traditionnel de décantation. De plus, Shirai *et al.* (1994) concluaient dans leur revue concernant les bactéries lactiques que, étant donné l'absence d'activité phytasique extracellulaire de ces bactéries, la réduction des teneurs en phytates au cours des

fermentations lactiques devait provenir de l'abaissement du pH qui permet l'activation des phytases endogènes des céréales.

Ceci serait cependant à vérifier car peu de données concernant l'activité phytasique des souches naturellement responsables des fermentations de ce type de bouillie traditionnelle existent pour le moment.

6. Conclusion

Les bouillies de mil fermentées produites à Ouagadougou sont des aliments de très faible valeur nutritionnelle, tant au niveau de leur densité énergétique, que de leur équilibre en macronutriments et leurs teneurs en fer et en zinc biodisponibles. Il est impératif de tenter d'améliorer ces différents aspects afin que ces bouillies puissent couvrir les besoins du jeune enfant.

Chapitre IV-2

Variations des teneurs en facteurs anti-nutritionnels et des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc pendant la transformation traditionnelle du mil en bouillie fermentée

Variations des teneurs en facteurs anti-nutritionnels et des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc pendant la transformation traditionnelle du mil en bouillie fermentée

Pour une première évaluation de l'effet de la transformation des grains de mil en bouillie fermentée sur les teneurs en FAN, fer et zinc totaux ainsi que sur les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, un nombre limité d'ateliers (14) a été sélectionné parmi les 48 étudiés en prenant en compte les teneurs en FAN déterminées dans les 48 échantillons de bouillie prélevés (cf. Chapitre II, paragraphe 2.2).

Il est prévu d'approfondir cette étude en analysant la totalité des échantillons prélevés dans les 48 ateliers. Les résultats présentés dans cette partie sont donc des résultats préliminaires qui n'ont pas encore fait l'objet d'analyse statistique.

1. Réductions des teneurs en facteurs anti-nutritionnels pendant la transformation traditionnelle du mil en bouillie fermentée

Les teneurs en fibres ADF (cellulose et lignine) et en hémicelluloses des grains de mil bruts et des quatorze bouillies sélectionnées correspondantes, ainsi que les taux de réduction dus aux modes de transformation sont donnés dans le tableau IV-2.

Les teneurs moyennes en fibres des grains bruts sont de 2,8 et 5,2 g/100g MS, respectivement, pour les teneurs en fibres ADF et en hémicelluloses. Les teneurs en hémicelluloses des grains bruts présentent une variabilité plus importante que celles en fibres ADF (CV=19% vs 14%) et varient entre 4 et 8 g/100g MS.

Pour les bouillies fermentées ces variabilités sont légèrement plus élevées (CV=38 et 22%, respectivement pour les teneurs en hémicelluloses et en fibres ADF), étant donné que les quatorze ateliers ont été sélectionnés pour offrir une gamme étendue de teneurs en FAN.

Pour tous les ateliers étudiés, on observe des réductions de teneurs en fibres, bien que les taux de réduction des teneurs en fibres ADF sont relativement faibles (moyenne de 25%). Cette faible réduction peut s'expliquer par le fait que la majorité des échantillons de bouillie sélectionnés était des bouillies de type « *ben-kida* », dans lesquelles les productrices ajoutent des granules de farine de mil complète. En effet, parmi les ateliers produisant des bouillies de type « *ben-kida* », les taux de réduction des teneurs en fibres ADF varient de 1 à 25%, excepté pour l'atelier J dans lequel le taux de réduction est de 58%. En revanche, si l'on considère les 3 bouillies de type « *ben-saalga* », on remarque que les taux de réduction des teneurs en fibres ADF sont beaucoup plus élevés avec des réductions de 43, 48 et 56%. La réduction des teneurs en fibres ADF est donc très probablement dépendante du taux d'incorporation de granules de farine de mil.

Tableau IV-2. Teneurs en fibres ADF et en hémicelluloses dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers

Atelier	Fibres ADF			Hémicelluloses *		
	Grains ^a	Bouillies ^a	% Réduction	Grains ^a	Bouillies ^a	% Réduction
A	3,06 ± 0,18	2,45 ± 0,12	20,1	4,83	4,25	12,1
B ^b	2,86 ± 0,06	1,27 ± 0,08	55,6	7,45	3,04	59,2
C	2,97 ± 0,29	2,60 ± 0,19	12,5	4,45	4,02	9,6
D	2,70 ± 0,13	2,17 ± 0,10	19,7	4,24	2,73	35,8
E ^b	3,42 ± 0,21	1,94 ± 0,19	43,4	4,35	3,22	26,0
F ^b	2,53 ± 0,23	1,30 ± 0,05	48,4	5,13	0,87	83,1
G	2,93 ± 0,25	2,42 ± 0,14	17,3	6,32	1,24	80,4
H	2,45 ± 0,14	2,42 ± 0,13	1,0	5,75	4,58	20,3
I	3,17 ± 0,22	2,38 ± 0,15	24,8	4,05	3,53	12,9
J	3,04 ± 0,22	1,28 ± 0,03	57,8	5,42	2,21	59,2
K	2,53 ± 0,13	2,41 ± 0,25	5,0	3,81	2,91	23,5
L	2,68 ± 0,25	2,00 ± 0,14	25,3	4,85	2,73	43,7
M	2,77 ± 0,03	2,37 ± 0,17	14,4	5,65	1,54	72,8
N	2,05 ± 0,10	1,86 ± 0,13	9,2	6,09	3,29	45,9
Moyenne (n=14) ^c	2,8 ± 0,4 (2,1-3,4)	2,07 ± 0,45 (1,27-2,60)	25,3 ± 18,6 (1,0-57,8)	5,2 ± 1,0 (3,8-7,5)	2,87 ± 1,10 (0,87-4,58)	41,8 ± 25,8 (9,6-83,1)

* Estimées par différence entre les teneurs en fibres NDF et ADF.

^a Moyennes de 3 déterminations ± ET (g/100g MS).

^b Atelier de production de bouillie de type « ben-saalga ».

^c Moyennes de 14 ateliers ± ET (valeurs minimales et maximales).

En revanche, concernant les teneurs en hémicelluloses, les taux de réduction sont plus élevés que ceux des teneurs en fibres ADF avec une moyenne de 42%. Ces taux de réduction étaient de 26, 59 et 83% pour les bouillies de type « ben-saalga » et variaient entre 10 et 80% pour les bouillies de type « ben-kida ». Il semble donc que ces taux de réduction soient moins dépendants de l'incorporation de granules de farine que ceux relatifs aux teneurs en fibres ADF. Le taux de réduction des teneurs en hémicelluloses est toutefois très variable d'un atelier à l'autre (CV=62%) et dépend probablement des modalités de préparation appliquées par les productrices (durée de trempage, filtration). La principale cause de réduction des teneurs en fibres au cours de ce mode de préparation est probablement la filtration qui permet de retirer les drêches de la farine avant décantation. Toutefois, il n'est pas exclu que des activités enzymatiques (e.g. cellulases, xylanases), endogènes ou exogènes, participent également à cette réduction (Kazanas et Fields, 1981).

Les teneurs en phytates et en tanins des grains de mil bruts et des quatorze bouillies sélectionnées correspondantes, ainsi que les taux de réduction dus aux modes de transformation sont donnés dans le tableau IV-3.

Dans les grains de mil bruts, les teneurs en phytates et en tanins varient respectivement entre 0,4 et 0,7 g/100g MS et entre 0,4 et 0,9 g/100g MS, avec des teneurs moyennes respectives de 0,44 et 0,69 g/100g MS. Les écarts de teneurs observés peuvent traduire une variabilité génotypique du mil utilisé par les productrices, mais les facteurs environnementaux et les conditions de culture peuvent également provoquer de grandes variations de teneurs en composés tels que les phytates au sein d'une même variété (Buerkert *et al.*, 1998).

Dans les bouillies, comme les teneurs en fibres, les teneurs en phytates et en tanins sont très variables (coefficients de variation de 32 et 41%, respectivement pour les teneurs en tanins et en phytates). Certaines bouillies présentent des teneurs en phytates très faibles (0,05, 0,12 et 0,13 g/100g MS, respectivement pour les bouillies des ateliers J, L et K), ce qui devrait se traduire par des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc élevées. En revanche, d'autres bouillies ont des teneurs en phytates proches des teneurs moyennes des grains bruts et leurs digestibilités *in vitro* ne devraient donc pas être améliorées (D, H et M).

Tableau IV-3. Teneurs en phytates et en tanins dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers

Atelier	Phytates *			Tanins		
	Grains ^a	Bouillies ^a	% Réduction	Grains ^a	Bouillies ^a	% Réduction
A	0,36 ± 0,04	0,26 ± 0,00	26,8	0,68 ± 0,06	0,34 ± 0,03	49,7
B ^b	0,39 ± 0,01	0,23 ± 0,01	41,6	0,53 ± 0,02	0,25 ± 0,02	51,5
C	0,39 ± 0,01	0,22 ± 0,03	42,9	0,91 ± 0,03	0,59 ± 0,01	35,0
D	0,48 ± 0,04	0,29 ± 0,00	39,0	0,75 ± 0,05	0,45 ± 0,01	40,7
E ^b	0,38 ± 0,00	0,26 ± 0,02	32,9	0,94 ± 0,01	0,60 ± 0,04	36,3
F ^b	0,36 ± 0,01	0,16 ± 0,01	56,3	0,75 ± 0,01	0,42 ± 0,03	44,9
G	0,39 ± 0,01	0,23 ± 0,01	41,6	0,65 ± 0,04	0,62 ± 0,00	5,2
H	0,54 ± 0,02	0,44 ± 0,01	17,8	0,43 ± 0,03	0,36 ± 0,03	15,3
I	0,50 ± 0,03	0,22 ± 0,01	56,0	0,57 ± 0,05	0,23 ± 0,01	59,8
J	0,37 ± 0,01	0,05 ± 0,00	86,3	0,74 ± 0,09	0,30 ± 0,00	60,0
K	0,57 ± 0,04	0,13 ± 0,01	77,9	0,58 ± 0,06	0,35 ± 0,03	40,1
L	0,37 ± 0,01	0,12 ± 0,01	68,9	0,66 ± 0,05	0,43 ± 0,01	34,8
M	0,46 ± 0,02	0,29 ± 0,01	36,3	0,57 ± 0,05	0,44 ± 0,00	21,9
N	0,65 ± 0,01	0,19 ± 0,02	71,5	0,84 ± 0,04	0,31 ± 0,03	63,2
Moyenne (n=14) ^c	0,44 ± 0,09 (0,36-0,65)	0,22 ± 0,09 (0,05-0,44)	49,7 ± 20,3 (17,8-86,3)	0,69 ± 0,15 (0,43-0,94)	0,41 ± 0,13 (0,23-0,62)	39,9 ± 17,1 (5,2-63,2)

^a Moyennes de 3 déterminations ± ET (g/100g MS).

^b Atelier de production de bouillie de type « ben-saalga ».

^c Moyennes des 14 ateliers ± ET (valeurs minimales et maximales).

Les taux de réduction des teneurs en phytates sont en moyenne de 50%. Ce résultat correspond à ceux habituellement reportés dans d'autres études concernant la fermentation du mil. Abdalla *et al.*, (1998b) et El Hag *et al.*, (2002), par exemple, ont montré que les teneurs en phytates du mil pouvaient être réduites, respectivement, de 44 et 53% après 14 h de

fermentation. Autant que les faibles effectifs permettent d'en juger, il ne semble pas y avoir de différence de réduction des phytates entre les bouillies « *ben-saalga* » (33-56%) et « *ben-kida* » (18-86%). Comme pour la réduction des teneurs en hémicelluloses, la forte variabilité des taux de réduction des teneurs en phytates (CV=41%) peut être attribuée aux modes de préparation qui diffèrent d'un atelier à l'autre (Guyot *et al.*, 2003). Les durées de trempage et de décantation appliquées par les productrices, par exemple, peuvent être des paramètres déterminants des taux de réduction des teneurs en phytates. L'étape de décantation participe certainement à cette réduction par dégradation enzymatique des phytates, soit par les phytases endogènes, soit par d'éventuelles phytases exogènes (microbiennes). Elyas *et al.* (2002) ont montré que les teneurs en phytates du mil étaient réduites de 12, 30 et 50%, respectivement après 12, 24 et 36 h de fermentation. Concernant le trempage, nous avons vu, dans le chapitre précédent, qu'il permettait de réduire les teneurs en phytates des grains de mil entiers de 28% en 24 h grâce à leur diffusion concomitante à celle des phytases endogènes (Lestienne *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est possible qu'une partie des phytates soit éliminée au cours de l'étape de filtration.

Les taux de réduction des teneurs en tanins, comme ceux des teneurs en phytates, sont très variables (de 5 à 63%, CV=43%) et il ne semble pas y avoir de différence notable entre les bouillies de type « *ben-saalga* » et les bouillies de type « *ben-kida* ». Les données de la littérature concernant les réductions de teneurs en tanins sont assez partagées. En effet, tandis que Elyas *et al.* (2002) n'ont montré aucune variation significative des teneurs en tanins après 12 à 36 h de fermentation du mil, Usha Antony et Chandra (1999) ont montré des réductions de 11 et 48% des teneurs en tanins de l'éleusine, respectivement après 18 et 48 h de fermentation. Ces réductions peuvent être attribuées (i) à une diffusion des tanins solubles dans l'eau au cours du trempage des grains, (ii) à des dégradations enzymatiques par des polyphénol oxydases, des peroxydases ou encore des laccases, endogènes ou exogènes, au cours du trempage ou de la décantation, ou (iii) à leur élimination au cours de la filtration.

2. Variations des teneurs en fer et zinc total pendant la transformation traditionnelle du mil en bouillie fermentée

Le tableau IV-4 donne les teneurs en fer et en zinc total des grains de mil bruts et des bouillies fermentées, ainsi que leurs variations relative et absolue dues aux modes de transformation traditionnels.

Tableau IV-4. Teneurs en fer et en zinc total dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers

Atelier	Zinc total				Fer total			
	Grains ^a	Bouillies ^a	Variation		Grains ^a	Bouillies ^a	Variation	
			Relative (%)	Absolue (mg/100gMS)			Relative (%)	Absolue (mg/100gMS)
A	2,74 ± 0,05	2,51 ± 0,08	- 8,2	- 0,2	21,6 ± 2,0	11,9 ± 0,3	- 45	- 9,7
B ^b	3,48 ± 0,03	1,88 ± 0,01	- 46,1	- 1,6	8,3 ± 0,8	5,5 ± 0,1	- 35	- 2,9
C	3,21 ± 0,13	2,01 ± 0,12	- 37,5	- 1,2	19,2 ± 1,7	8,8 ± 0,3	- 54	- 10,3
D	2,42 ± 0,12	2,16 ± 0,05	- 10,5	- 0,3	4,4 ± 0,5	14,2 ± 0,8	+ 221	+ 9,7
E ^b	2,63 ± 0,15	1,98 ± 0,14	- 24,7	- 0,7	5,5 ± 0,4	11,2 ± 0,2	+ 104	+ 5,7
F ^b	2,32 ± 0,00	1,29 ± 0,00	- 44,4	- 1,0	4,9 ± 0,1	10,4 ± 0,5	+ 114	+ 5,5
G	2,37 ± 0,06	2,05 ± 0,10	- 13,5	- 0,3	4,4 ± 0,4	12,0 ± 0,5	+ 176	+ 7,7
H	2,14 ± 0,01	1,86 ± 0,13	- 13,3	- 0,3	3,7 ± 0,2	5,2 ± 0,3	+ 43	+ 1,6
I	2,91 ± 0,01	2,15 ± 0,13	- 26,1	- 0,8	12,7 ± 0,7	15,2 ± 0,5	+ 19	+ 2,5
J	1,98 ± 0,10	1,56 ± 0,03	- 21,4	- 0,4	8,6 ± 0,5	3,9 ± 0,4	- 55	- 4,8
K	4,02 ± 0,12	3,28 ± 0,16	- 18,3	- 0,7	7,2 ± 0,5	9,7 ± 0,5	+ 34	+ 2,5
L	1,89 ± 0,02	1,76 ± 0,02	- 7,1	- 0,1	4,5 ± 0,1	6,1 ± 0,6	+ 35	+ 1,6
M	2,60 ± 0,06	2,15 ± 0,15	- 17,3	- 0,5	14,3 ± 0,5	6,7 ± 0,3	- 53	- 7,6
N	2,33 ± 0,19	2,49 ± 0,18	+ 6,9	+ 0,2	9,6 ± 0,4	10,2 ± 0,3	+ 6	+ 0,6
Moyenne (n=14) ^c	2,65 ± 0,59 (1,9 - 4,0)	2,08 ± 0,47 (1,3 - 3,3)	- 20 ± 15 (-46 - +7)	-0,6 ± 0,5 (-1,6 - +0,2)	9,2 ± 5,8 (3,7 - 21,6)	9,4 ± 3,5 (3,9 - 15,2)	+ 36 ± 88 (-55 - +221)	+ 0,2 ± 6,3 (-10 - +10)

^a Moyennes de 3 déterminations ± ET (mg/100g MS).

^b Atelier de production de bouillie de type « ben-saalga ».

^c Moyennes des 14 ateliers ± ET (valeurs minimales et maximales).

Les teneurs en zinc des grains de mil bruts présentent une variabilité du même ordre que celles des FAN (CV=22%), ce qui peut s'expliquer par des différences inter-variétales ou culturelles.

La teneur moyenne en zinc total des bouillies, quant à elle, est inférieure à celle des grains bruts (moyenne de 2,1 vs 2,7 mg/100g MS) et présente une variabilité similaire (CV=23%).

Les teneurs en zinc total des grains diminuent en moyenne de 20% après transformation en bouillie de mil fermentée, ce qui représente une perte moyenne de 0,6 mg/100g MS. Les pertes relatives en zinc varient entre 7 et 46%.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les pertes en zinc par diffusion au cours d'un trempage de 24 h de grains de mil entiers étaient d'environ 7% (Lestienne *et al.*, 2005),

mais il est possible que ce taux de perte par diffusion varie selon la variété de grains mis à tremper et la durée de trempage. La filtration peut également être une source de perte en zinc total étant donné qu'une partie du matériel est éliminée. Par ailleurs, on observe une augmentation relative de 7% de la teneur en zinc totale dans l'atelier N. Cette augmentation peut être attribuée, soit à une contamination extérieure, bien qu'aucun auteur n'ait mentionné ce genre de contamination dans les modes de préparation traditionnels, soit à l'ajout d'une quantité importante d'un ingrédient particulièrement riche en zinc au cours de la préparation (gingembre, menthe, piment...).

En ce qui concerne les teneurs en fer total dans les grains bruts, il semble que la variabilité observée (CV=63%) ne puisse pas être uniquement attribuée à des facteurs variétaux ou environnementaux étant donné que ces teneurs varient entre 4 et 22 mg/100g MS. Il est probable que certains de ces échantillons aient été contaminés par une source de fer extérieur, c'est-à-dire que les grains n'auraient pas été correctement lavés avant prélèvement. Ces contaminations en fer sont fréquentes dans les produits récoltés sur des marchés locaux. Hallberg et Bjorn-Rasmussen (1981) ont montré que la teneur en fer total d'un échantillon de teff acheté sur un marché en Ethiopie était de 39,7 mg/100g MS contre seulement 3,5 mg/100 g MS après nettoyage.

La teneur moyenne en fer total des bouillies fermentées est peu différente de celle des grains bruts (9,4 vs 9,2 mg/100g MS) et la variabilité de ces teneurs, bien qu'importante, est moins élevée que celle trouvée dans les grains bruts (CV=37% vs 63%).

Concernant les variations de teneurs en fer total, on observe des différences très importantes entre les différents ateliers. Deux groupes d'ateliers peuvent être distingués : ceux dans lesquels la teneur en fer total des grains de mil est réduite par la transformation (A, B, C, J et M) et ceux plus nombreux dans lesquels elle est augmentée (D, E, F, G, H, I, K, L et N).

Dans les cinq ateliers où les teneurs en fer sont réduites, les réductions observées varient de 35 à 55%, ce qui correspond à des pertes de 2,9 à 10,3 mg/100g MS. Ces réductions peuvent être attribuées à (i) une élimination du fer extrinsèque à l'aliment (contaminant) par le lavage des grains, (ii) une diffusion du fer intrinsèque au cours du trempage des grains (34% en 24 h ; Lestienne *et al.*, 2005) ou (iii) une perte de fer intrinsèque au cours de la filtration (élimination avec les drêches). Il est intéressant de noter que pour les cinq ateliers, les teneurs en fer total des grains bruts étaient assez élevées par rapport à celles des ateliers dans lesquels les teneurs en fer total ont été augmentées (respectivement 14,4 et 6,3 mg/100g MS en moyenne pour les deux groupes d'ateliers). Ainsi, il est possible que ces diminutions de teneurs soient principalement dues à une élimination du fer extrinsèque.

Les augmentations relatives de teneur en fer total des bouillies par rapport aux grains bruts varient de 6 à 221%, ce qui représente entre 0,6 et 9,7 mg/100g MS de fer supplémentaire dans la bouillie. Les contaminations à l'origine de ces augmentations peuvent provenir de sources diverses. Durant la préparation, du fer peut être amené au cours de la mouture du mil par abrasion des marteaux métalliques du moulin, ou au cours de la cuisson par libération de fer par le matériel de cuisson (marmite) (Kollipara et Brittin, 1996). La poussière, omniprésente à Ouagadougou, peut également contaminer la bouillie étant donné que, au cours de sa préparation, le matériel est souvent laissé à l'air libre (grains trempés en attendant la mouture, pâte non fermentée en attendant la filtration, granules de farine de mil en attendant la cuisson). Enfin, bien qu'un dosage de fer effectué sur un échantillon d'eau de Ouagadougou se soit révélé négatif, l'eau peut également être une source de contamination étant donné qu'elle n'a certainement pas la même composition dans toute la ville.

Ainsi, entre le fer extrinsèque présent dans les grains bruts et les différentes sources, à la fois, de réduction de la teneur en fer intrinsèque, mais aussi, de contamination par du fer

extrinsèque, au cours de la préparation de la bouillie, il est très difficile d'évaluer l'origine des variations observées.

3. Variations des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc pendant la transformation traditionnelle du mil en bouillie fermentée

Les digestibilités du fer et du zinc dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées, ainsi que leurs variations relative et absolue dues au mode de transformation traditionnel sont présentées dans le tableau IV-5.

Tableau IV-5. Digestibilités *in vitro* du fer et du zinc dans les grains de mil bruts et les bouillies fermentées prélevés dans les quatorze ateliers

Atelier	Digestibilité du zinc				Digestibilité du fer			
	Grains ^a	Bouillies ^a	Variation		Grains ^a	Bouillies ^a	Variation	
			Relative (%)	Absolue (Δd)*			Relative (%)	Absolue (Δd)*
A	22,2 ± 0,8	15,3 ± 1,6	- 31	- 6,9	11,9 ± 1,5	5,3 ± 0,9	- 55	- 6,6
B ^b	20,9 ± 2,6	12,6 ± 1,6	- 40	- 8,3	10,0 ± 1,5	18,8 ± 0,9	+ 87	+ 8,8
C	17,8 ± 1,2	11,4 ± 1,3	- 36	- 6,4	5,8 ± 1,0	7,3 ± 0,5	+ 26	+ 1,5
D	23,5 ± 2,0	13,0 ± 1,9	- 45	- 10,5	17,5 ± 2,4	11,0 ± 0,3	- 37	- 6,5
E ^b	22,4 ± 1,4	15,6 ± 2,2	- 30	- 6,8	14,4 ± 1,1	8,5 ± 0,7	- 41	- 5,9
F ^b	22,3 ± 0,3	16,8 ± 1,2	- 25	- 5,5	15,3 ± 1,6	6,6 ± 0,6	- 57	- 8,7
G	27,0 ± 2,1	12,1 ± 1,1	- 55	- 15,0	32,3 ± 1,7	9,2 ± 1,6	- 72	- 23,1
H	23,7 ± 2,9	9,5 ± 1,7	- 60	- 14,2	22,8 ± 2,3	10,9 ± 0,9	- 52	- 12,0
I	20,1 ± 2,0	11,6 ± 0,5	- 42	- 8,4	7,7 ± 0,9	4,2 ± 0,7	- 45	- 3,5
J	18,9 ± 0,8	19,7 ± 1,3	+ 5	+ 0,8	10,5 ± 1,7	16,7 ± 1,1	+ 59	+ 6,2
K	20,6 ± 0,9	10,4 ± 0,3	- 50	- 10,2	23,4 ± 0,6	10,2 ± 0,8	- 56	- 13,2
L	25,0 ± 1,3	11,8 ± 0,3	- 53	- 13,3	29,8 ± 2,0	15,7 ± 1,9	- 48	- 14,1
M	21,1 ± 1,2	13,2 ± 1,2	- 37	- 7,9	8,5 ± 0,3	14,5 ± 1,4	+ 71	+ 6,0
N	18,2 ± 1,6	11,1 ± 1,5	- 39	- 7,1	9,5 ± 1,4	14,1 ± 1,2	+ 47,9	+ 4,6
Moyenne (n=14) ^c	21,7 ± 2,6 (18 - 27)	13,1 ± 2,8 (10 - 20)	-38 ± 16 (-60 - + 5)	-8,5 ± 4,0 (-15 - +1)	15,7 ± 8,4 (6 - 32)	10,9 ± 4,5 (4 - 19)	-12 ± 57 (-72 - +87)	-4,7 ± 9,3 (-23 - +10)

^a Moyennes calculées à partir de 3 déterminations des teneurs en fer et en zinc digestibles ± ET (%).

^b Atelier de production de bouillie de type « ben-saalga ».

^c Moyennes des 14 ateliers ± ET (valeurs minimales et maximales).

* Différence de digestibilité (%).

Dans les grains bruts, la digestibilité du zinc varie de 18 à 27% (CV=12%) avec une valeur moyenne de 21,7%. Selon la FAO et l'OMS, les produits à base de céréales et de légumineuses ont des biodisponibilités en zinc situées autour de 15%, ce qui correspond à des biodisponibilités faibles, contrairement à des biodisponibilités en zinc moyennes et élevées

qui se situent respectivement autour de 30 et 50% (FAO/WHO, 2002b). Nos valeurs de digestibilité *in vitro* concordent donc relativement bien avec ces ordres de grandeur.

Les digestibilités du zinc dans les bouillies fermentées sont inférieures à celles des grains bruts (moyenne 13,1 vs 21,7%) et présentent une variabilité légèrement supérieure (CV=21%).

En moyenne pour les quatorze ateliers étudiés, la transformation des grains de mil en bouillie fermentée provoque donc une diminution relative de 38% de la digestibilité du zinc, ce qui correspond à une diminution absolue de la digestibilité de 8,5%. Cette diminution peut être attribuée en partie à la perte en zinc total due à la transformation et en particulier à la solubilisation au cours du trempage de zinc, par nature soluble et donc digestible. Cependant, la perte en zinc total étant seulement de 20% en moyenne, avec près de la moitié de ce zinc perdu par diffusion, cette explication ne suffit pas à expliquer l'ampleur de la réduction de digestibilité observée. Par ailleurs, on remarque une légère augmentation de la digestibilité du zinc dans l'atelier J.

Les digestibilités *in vitro* moyennes du fer sont, respectivement, de 15,7% dans les grains bruts et de 10,9% dans les bouillies. Les valeurs varient de 6 à 32% (CV=54%) pour les grains bruts et de 4 à 19% (CV=41%) pour les bouillies. Étant donné les quantités importantes de fer extrinsèque dans certains échantillons et les possibles différences de digestibilité entre le fer intrinsèque et extrinsèque, les valeurs de digestibilités mesurées ne sont probablement pas représentatives des digestibilités *in vitro* réelles du fer des grains de mil et des bouillies fermentées.

Au niveau des variations de digestibilité du fer, on peut toutefois noter qu'il existe de grandes différences entre ateliers (de -72% à +87%). Ainsi, comme pour les variations de fer total, il est possible de distinguer deux groupes d'ateliers : ceux pour lesquels on observe des augmentations de digestibilité du fer (B, C, J, M et N) et ceux pour lesquels on observe des diminutions (A, D, E, F, G, H, I, K et L). Les augmentations de digestibilité du fer sont très variables (de 26 à 87% d'augmentation relative, représentant des écarts positifs de digestibilité de 1,5 à 8,8%), de même que les diminutions (de 37 à 72%, représentant des écarts négatifs de digestibilité de 3,5 à 23,1%). On remarque que, excepté pour les ateliers A et N, il y a concordance entre les ateliers dans lesquels il y a eu une augmentation de la teneur en fer total et ceux dans lesquels il y a une diminution de la digestibilité du fer, ce qui semble indiquer que le fer extrinsèque ne serait pas digestible.

Il est habituellement reconnu que les procédés de fermentation améliorent la biodisponibilité des minéraux. Plusieurs éléments participent à cette amélioration au cours de la fermentation : la réduction des teneurs en FAN, la synthèse d'acides organiques (activateurs de l'absorption des minéraux) et l'abaissement du pH (favorisant la solubilisation des minéraux).

La transformation est responsable de dégradations de phytates, proportionnellement plus importantes que les réductions éventuelles de teneurs en fer et en zinc totales, ce qui se traduit par une diminution des rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn (Figure IV-6). Elle est également responsable de la réduction des teneurs en d'autres FAN.

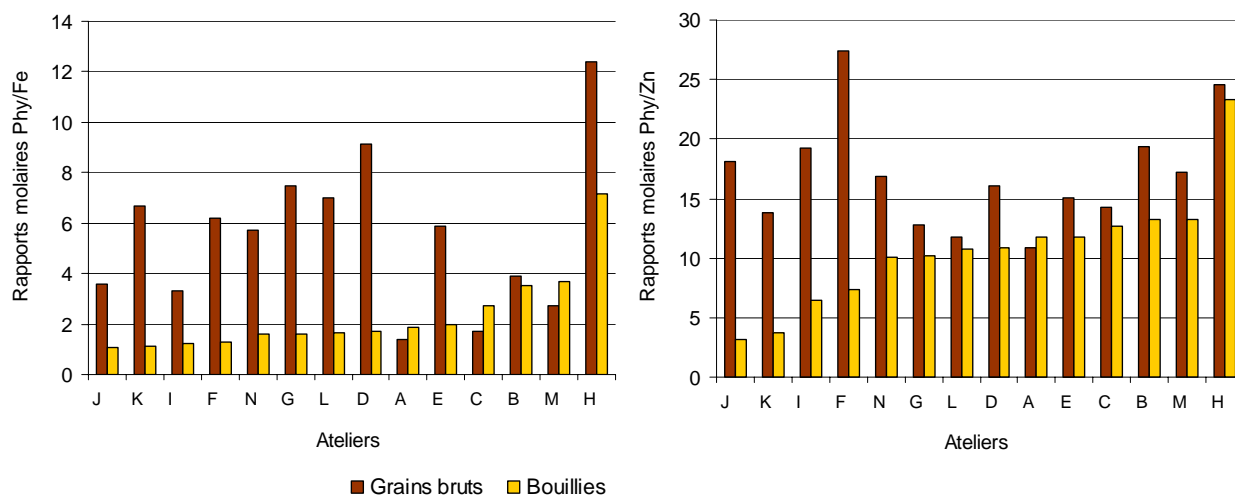


Figure IV-6. Rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn des grains bruts et des bouillies fermentées dans les quatorze ateliers sélectionnés.

Par ailleurs, le pH a été fortement diminué par la fermentation (moyenne de 4,0 pour les 14 bouillies) et des productions d'acides lactique et acétique ont également été montrées dans une étude précédente (Guyot *et al.*, 2003).

Cependant, malgré la réduction des teneurs en FAN et du pH et la production d'acides organiques, les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc sont globalement plus faibles dans les bouillies fermentées que dans les grains de mil bruts. Il semble donc que d'autres interactions que celles faisant intervenir uniquement les FAN et les minéraux interviennent au cours de ce mode de préparation. La cuisson, qui succède à l'étape de décantation, pourrait, par exemple, être à l'origine de la formation de complexes entre les minéraux et des composés de la matrice (protéines ou FAN n'ayant pas été dégradés). En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que des modifications chimiques pouvaient avoir lieu, avec notamment des augmentations des teneurs en IP6 au cours de la cuisson de la farine de soja. Il est donc possible que ce genre de réaction, en fin de préparation, entraîne la re-chélation du fer et du zinc libéré au cours de la fermentation et en fasse perdre ainsi tout le bénéfique. Par ailleurs, il a également été montré que la cuisson pouvait diminuer la solubilité des minéraux en modifiant leur valence (Koplik *et al.*, 2004).

4. Essais d'identification des déterminants des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc

Le nombre d'échantillons de grains bruts et de bouillies ayant pu être analysé jusqu'à maintenant étant insuffisant pour rechercher par des regressions multifactorielles des corrélations, entre, d'une part les teneurs en FAN, les teneurs en fer et zinc totales et le pH et, d'autre part, les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, nous nous sommes limités à rechercher les variables qui, avant ou après transformation, étaient le plus corrélées aux digestibilités *in vitro* du fer et du zinc. Nous nous contenterons donc de donner ici les variations des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc en fonction des variables qui y sont le plus corrélées afin de rechercher des éléments d'explication quant aux déterminants des faibles digestibilités observées.

4.1. Grains de mil bruts

4.1.1. Digestibilité du zinc

Aucune corrélation n'a été trouvée entre la digestibilité *in vitro* du zinc et les teneurs en FAN, en zinc total ou les rapports molaires Phy/Zn des grains de mil bruts. Ce résultat peut être attribué au fait que, même si les teneurs en phytates et en autres FAN varient entre les échantillons de grains, ces teneurs restent trop élevées pour être mises en rapport avec la digestibilité du zinc.

4.1.2. Digestibilité du fer

Aucune corrélation n'a été trouvée entre la digestibilité *in vitro* du fer et les teneurs en FAN ou les rapports molaires Phy/Fe. En revanche, on remarque (figure IV-7) que la digestibilité du fer semble être en relation étroite avec la teneur en fer total ($R^2=0,68$).

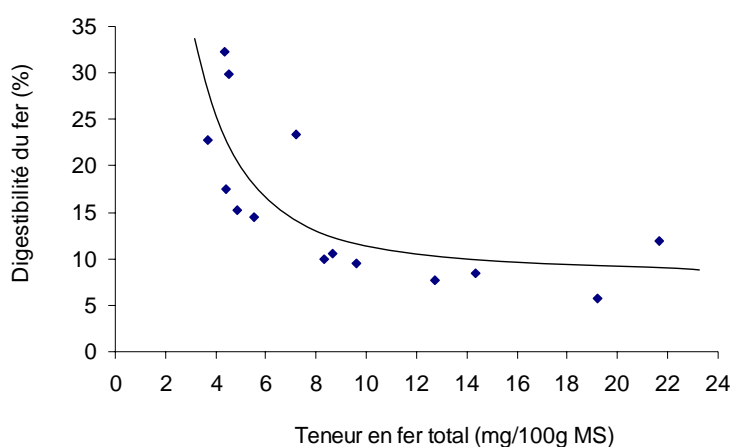


Figure IV-7. Variation de la digestibilité *in vitro* du fer des grains de mil prélevés dans les 14 ateliers en fonction de leur teneur en fer total.

Ainsi, dans les grains de mil ayant des teneurs en fer total élevées et qui sont donc probablement contaminés par du fer extrinsèque, les digestibilités du fer sont faibles. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Hallberg et Bjorn-Rasmussen (1981) qui ont montré par une méthode de digestion *in vitro* que le fer contenu dans un échantillon de terre rouge du Brésil (9,43 g/100g) présentait une biodisponibilité de 0% (fer non « échangeable » avec une source de fer marqué). Derman *et al.* (1980) ont également montré que l'oxyde et l'hydroxyde de fer, qui sont les principales formes de fer contaminant, étaient faiblement absorbés chez l'homme (respectivement, 0,01 et 1,5%). Par ailleurs, cette relation entre la teneur en fer total et la digestibilité du fer pourrait expliquer le fait qu'aucune corrélation n'ait été trouvée avec les teneurs en FAN.

4.2. Bouillies de mil fermentées

Dans les bouillies, des corrélations ont été recherchées entre les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, les teneurs en FAN ou les rapports molaires, mais aussi avec le pH de la bouillie.

4.2.1. Digestibilité du zinc

Les variables présentant des liaisons statistiquement significatives avec la digestibilité *in vitro* du zinc sont la teneur en phytates, la teneur en zinc total et le pH de la bouillie (Figure IV-8).

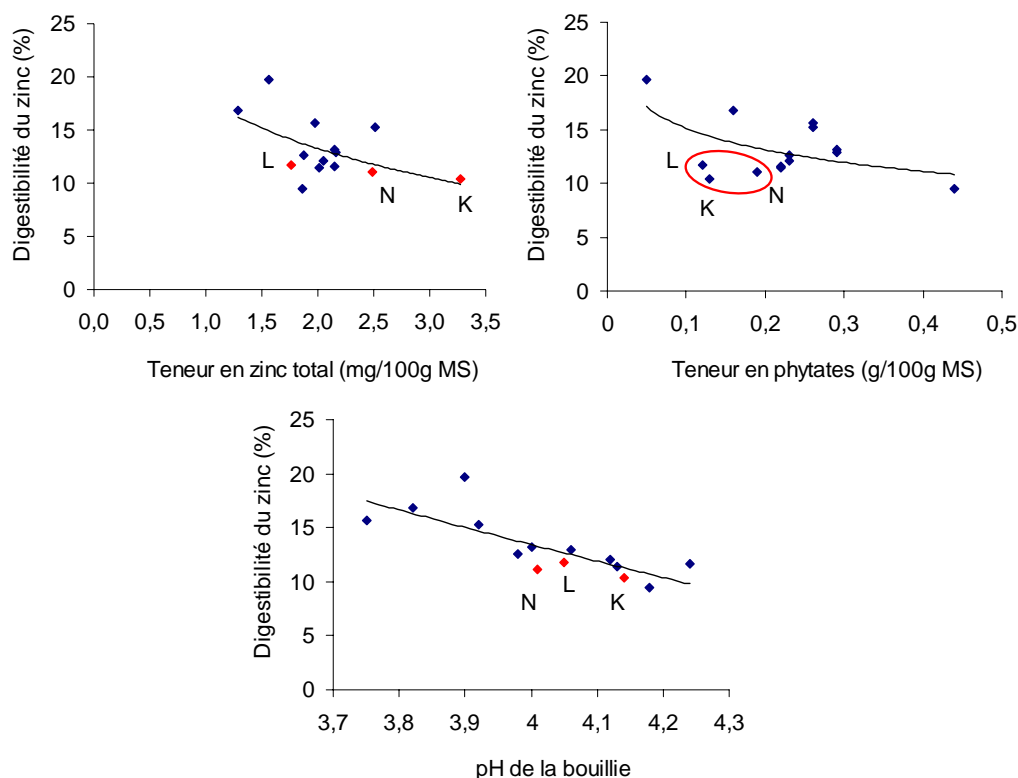


Figure IV-8. Variations de la digestibilité *in vitro* du zinc des bouillies de mil fermentées prélevées dans les 14 ateliers en fonction de leurs teneurs en phytates et en zinc total et du pH de la bouillie.

Les bouillies ayant les digestibilités les plus élevées sont celles ayant des teneurs en zinc total et en phytates faibles, ainsi que des pH bas (Figure IV-8).

Aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature concernant des sources de zinc contaminant qui, comme pour le fer, pourraient expliquer la relation trouvée entre la teneur en zinc total et la digestibilité du zinc. Toutefois, cette relation offre un coefficient de corrélation ($R_2=0,31$) nettement inférieur à celui de la relation entre la digestibilité *in vitro* du fer et la teneur en fer total et devrait donc être vérifiée en étudiant un nombre plus important d'échantillons.

La relation entre les teneurs en phytates des échantillons et les digestibilités *in vitro* du zinc, en revanche, concorde avec les résultats des nombreuses études mettant en évidence l'effet inhibiteur des phytates sur la solubilisation du zinc (Davies et Olpin, 1979 ; Lönnerdal *et al.*, 1988 ; Saha *et al.*, 1994). On note, cependant, que comme la relation entre la teneur en zinc total et la digestibilité du zinc, cette relation n'offre pas une bonne corrélation ($R_2=0,29$). Pour certains échantillons (K, L et N), bien que les teneurs en phytates soient faibles (inférieures à 0,2 g/100g MS), les digestibilités du zinc sont tout de même faibles (inférieures à 15%). Ceci indique que la teneur en phytates n'est probablement pas le seul facteur diminuant la digestibilité du zinc dans les bouillies de mil fermentées.

Enfin, la digestibilité du zinc semble liée au pH de la bouillie. La baisse du pH peut être considérée comme un facteur direct de l'amélioration de la digestibilité du zinc (Cheryan, 1980), mais elle peut également être un indicateur de l'intensité de la fermentation et donc de la dégradation des FAN. Si l'on considère les échantillons K, L et N mentionnés précédemment, le fait que leur pH soit supérieur à 4 pourrait être une explication de leur faible digestibilité du zinc malgré leur faible teneur en phytates.

4.2.2. Digestibilité du fer

Concernant la digestibilité *in vitro* du fer, quatre des facteurs étudiés ont permis d'expliquer une part significative de sa variabilité : la teneur en fer total, en hémicelluloses, en fibres ADF et le pH de la bouillie (Figure IV-9).

La teneur en fer total a à peu près le même effet sur la digestibilité *in vitro* du fer des bouillies fermentées que sur celle des grains de mil bruts. En supposant que les fortes teneurs en fer total sont dues à une contamination par la poussière, cette relation peut être expliquée comme précédemment par la faible biodisponibilité du fer d'origine tellurique. En revanche, si le fer extrinsèque a été libéré par les ustensiles au cours de la cuisson, il a été montré que sa biodisponibilité était supérieure à celle du fer non hémique des aliments (Martinez et Vannucchi, 1986). Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution. En effet, dans leur revue, Harvey *et al.* (2000) remettent en cause les résultats de ce genre d'études, qui ne prendraient pas en compte la complexité de la matrice alimentaire. Il semblerait qu'une partie du fer contaminant puisse rejoindre le pool de fer non hémique potentiellement absorbable, mais il n'existe pas, pour le moment, de donnée concernant les quantités de fer extrinsèque réellement absorbées ou les facteurs pouvant influencer sur son absorption (Harvey *et al.*, 2000). Parallèlement à cet effet de la teneur en fer total, nos résultats semblent indiquer que les fortes teneurs en hémicelluloses et en fibres ADF des bouillies réduisent la digestibilité *in vitro* du fer. Bien que l'effet des fibres sur la biodisponibilité des minéraux soit controversé dans la littérature, plusieurs études ont montré que la cellulose et les acides uroniques des hémicelluloses pouvaient interagir avec le fer (Reinhold *et al.*, 1975 ; Bagheri *et al.*, 1982). De plus, Thompson et Weber (1979) ont montré que cette capacité des fibres à se lier aux minéraux augmentait avec le pH, ce qui concorde également avec nos résultats.

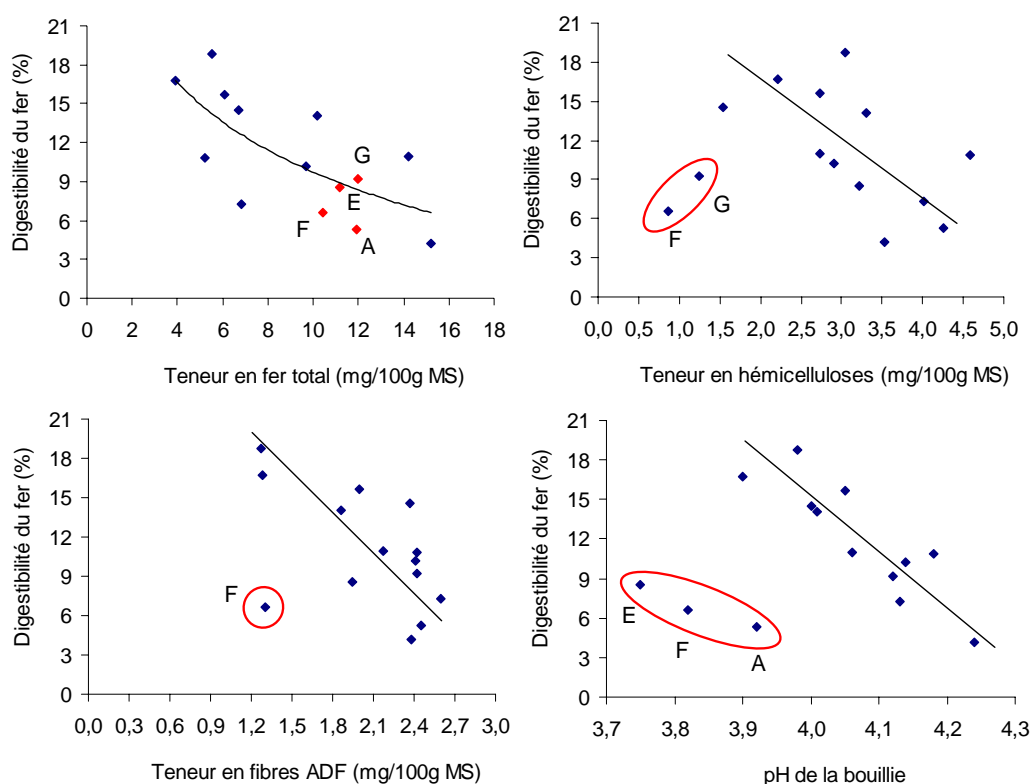


Figure IV-9. Variations de la digestibilité *in vitro* du fer des bouillies de mil fermentées prélevées dans les 14 ateliers en fonction de leurs teneurs en fer total, hémicelluloses, fibres ADF et du pH de la bouillie.

Il semble que la réunion de l'ensemble des quatre conditions (teneurs en fer total, en hémicelluloses et en fibres ADF faibles, ainsi qu'un pH bas) soit nécessaire pour que la digestibilité du fer de la bouillie soit élevée. En effet, si l'on considère, par exemple, le point correspondant à la bouillie F encerclé sur la figure IV-9, on remarque que, malgré des teneurs en fibres faibles et un pH bas, sa digestibilité est faible (6,6%). Ceci peut être attribué à une teneur en fer total élevée qui correspond certainement à la présence d'une quantité importante de fer extrinsèque étant donné que la teneur en fer de cette bouillie a augmenté de 114% par rapport à la teneur des grains bruts (+ 5,5 mg/100g MS). De même, les bouillies G, E et A présentent également de fortes teneurs en fer total qui limitent la digestibilité du fer.

5. Conclusion

Dans la mesure où elles sont en moyenne plus faibles que dans les grains bruts, les valeurs de digestibilité *in vitro* du fer et du zinc mettent en évidence la faible biodisponibilité de ces minéraux dans les bouillies de mil fermentées traditionnelles.

Ce travail a permis de mettre en évidence toute la complexité, d'une part, des interactions qui peuvent intervenir au sein d'une matrice alimentaire et, d'autre part, des modifications biochimiques (changement de composition, formation de nouveaux complexes) qui peuvent avoir lieu au cours des procédés technologiques.

Cette complexité risque de rendre extrêmement difficile l'amélioration de la biodisponibilité du fer et du zinc dans ces produits, car de simples réductions de teneurs en quelques FAN, bien que déjà difficiles à obtenir, sont insuffisantes. Il est à espérer que l'élargissement de cette étude à la totalité des 48 échantillons prélevés dans les ateliers permette une meilleure identification des éléments déterminants les variations de la digestibilité *in vitro* du fer et du zinc au cours de la transformation du mil en bouillie.

Chapitre V

FACTEURS LIMITANT LA BIODISPONIBILITÉ

IN VITRO DU FER ET DU ZINC

DANS LE GRAIN DE MIL

INTRODUCTION

Le chapitre IV a mis en évidence toute la complexité de la matrice alimentaire rendant difficile l'identification des déterminants de la biodisponibilité du fer et du zinc, à la fois dans les grains de mil bruts et dans les bouillies fermentées. En effet, malgré les réductions de teneurs en FAN résultant de la transformation et les faibles rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn dans les bouillies fermentées, les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc étaient faibles et souvent inférieures aux digestibilités dans les grains de mil bruts.

Plusieurs hypothèses ont été formulées en vue d'expliquer ce phénomène :

- ✓ certaines étapes de la transformation des grains de mil en bouillie fermentée, comme la cuisson, pourraient créer des interactions entre certains composés de la matrice alimentaire et les minéraux,
- ✓ bien que la transformation réduise fortement les teneurs en phytates, ces teneurs pourraient demeurer trop élevées pour permettre une amélioration de la digestibilité *in vitro* du fer et du zinc,
- ✓ les phytates ne seraient pas les principaux composés agissant sur la digestibilité *in vitro* du fer et du zinc dans le grain de mil et ses produits dérivés.

Ainsi, dans le cadre de ce dernier chapitre, il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier la contribution relative des phytates et des autres facteurs anti-nutritionnels (tanins, fibres) aux faibles biodisponibilités du fer et du zinc dans la farine de mil.

Pour cela, nous avons, tout d'abord, étudié la répartition de ces différents composés dans le grain de mil par décortilage abrasif. Bien que cette répartition soit connue dans le cas d'espèces céréalières telles que le blé ou le maïs, il existe peu de travaux de ce type concernant des espèces originaires d'Afrique comme le mil. Or, comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, la répartition des composés biochimiques dans le grain varie d'une espèce de céréale à l'autre. Ainsi, dans le grain de blé, les phytates sont majoritairement localisés dans la couche à aleurone (Antoine *et al.*, 2004), tandis que les phytates des grains de maïs sont majoritairement localisés dans le germe (Reddy, 2002). Les objectifs de cette étude étaient également, d'une part, d'évaluer les potentialités du décortilage à réduire les teneurs en FAN et, d'autre part, de disposer des données nécessaires à la préparation de fractions ayant des teneurs variables en phytates, tanins et fibres.

Puis, afin d'évaluer la contribution relative des phytates et des autres facteurs anti-nutritionnels (tanins, fibres) aux faibles digestibilités *in vitro* du fer et du zinc dans la farine de mil, nous avons combiné deux approches qui sont présentées sous forme de deux projets de publication. Nous avons utilisé des échantillons communs ayant des teneurs variables en phytates, tanins et fibres, qui ont été préparés par dégradation enzymatique des phytates et décortilage abrasif.

Dans la première approche, nous avons essayé de mettre en relation les caractéristiques de ces échantillons avec les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc.

Dans la seconde, nous avons voulu approfondir nos hypothèses concernant la capacité des fibres et des tanins à interagir avec le fer et le zinc, en travaillant sur les résidus insolubles de digestion *in vitro* et en essayant d'isoler les effets de chaque facteur.

Chapitre V-1

Répartition des nutriments et des
facteurs anti-nutritionnels
dans le grain de mil

(Article soumis le 12/08/2004 au
Journal of Cereal Science)

Pertes en nutriments et facteurs anti-nutritionnels au cours du décortilage abrasive de deux variétés de mil (*Pennisetum glaucum*)

Isabelle Lestienne^a, Marie Buisson^a, Valérie Lullien-Pellerin^b, Christian Picq^a, Serge Trèche^{a,*}

^a Centre IRD de Montpellier, UR 106 « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^b UMR Ingénierie des agropolymères et des technologies émergentes, ENSAM/INRA Montpellier, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

Résumé

Les taux de perte en nutriments tels que l'amidon, les lipides, les protéines, le fer et le zinc, ainsi qu'en activité phytasique et en composés dits anti-nutritionnels (fibres, tanins et phytates) ont été déterminés au cours du décortilage abrasif de grains de deux variétés de mil (Gampela et IKMP-5) du Burkina Faso. Dans les deux variétés, l'abrasion de l'albumen amylicé débutait quand environ 12% de la matière sèche des grains était éliminé ; les pertes en lipides et en protéines suivaient celles en matière sèche ; les pertes en zinc étaient inférieures aux pertes en fer, mais les pertes en ces deux minéraux étaient supérieures à celles en matière sèche, et les pertes en phytates étaient inférieures aux pertes en matière sèche. Le décortilage a entraîné des pertes importantes en fibres et en tanins avec des différences selon les variétés. Les variations d'activité phytasique étaient également différentes pour les deux variétés (respectivement, 42 et 11% de perte en activité phytasique dans les grains des variétés Gampela et IKMP-5 à 12% d'extraction). Le décortilage des grains de mil ne provoque pas de réduction des teneurs en lipides et en protéines, mais diminue considérablement les teneurs en certains facteurs anti-nutritionnels (fibres et tanins). Cependant, étant donné que les teneurs en minéraux, et notamment en fer, sont réduites tandis que les teneurs en phytates augmentent, le décortilage pourrait conduire à une diminution des teneurs en fer et en zinc biodisponible dans les grains de mil décortiqués par rapport aux grains entiers.

Mots-clés

Décortilage abrasif; Facteurs anti-nutritionnels; Répartition dans le grain; Mil.

**Losses of nutrients and anti-nutritional factors
during abrasive decortication of two pearl
millet cultivars (*Pennisetum glaucum*)**

Isabelle Lestienne^a, Marie Buisson^a, Valérie Lullien-Pellerin^b,

Christian Picq^a, Serge Trèche^{a,*}

^a Centre IRD de Montpellier, UR 106 « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^b UMR Ingénierie des agropolymères et des technologies émergentes, ENSAM/INRA Montpellier, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

Running headline

Decortication of Pearl Millet

Keywords

Abrasive decortication; Anti-nutritional factors; Distribution in grain; Pearl millet

Abbreviation

Dry Matter, DM

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 41 62 95; Fax: +33 4 67 41 63 30.
E-mail adress: treche@mpl.ird.fr

Abstract

Losses of nutrients such as starch, lipids, proteins, iron and zinc as well as phytase activity and of recognised anti-nutritional compounds (fibres, tannins and phytates) were determined during abrasive decortication of the grains of two pearl millet cultivars (Gampela and IKMP-5) from Burkina Faso. In both cultivars, abrasion of the starchy endosperm started when about 12% of the dry matter had been removed from grains; lipid and protein losses followed loss of dry matter; zinc loss was lower than iron loss but both were higher than dry matter losses, and phytate loss was lower than dry matter loss. Interestingly, decortication led to significant losses in fibres and tannins with some differences depending on the cultivar. Changes in phytase activity also differed in the two cultivars (respectively, 42% and 11% losses in phytase activity in the grains of Gampela and IKMP-5 cultivars for 12% of extraction). Hence, decortication of pearl millet grains does not decrease lipid and protein contents but does considerably decrease some anti-nutritional factors (fibres and tannins). However, as mineral contents and particularly iron content decreased while phytate content increased, decortication may lead to decrease in bioavailable Fe and Zn contents.

1. Introduction

Millets are indigenous African cereals that, unlike wheat or rice, are well adapted to African semi-arid and sub-tropical agronomic conditions. Millets grow under difficult ecological conditions and tolerate poor soils and a certain degree of drought better than any other cereal crops (Obilana, 2003). There are nine species of millet cultivated around the world and pearl millet (*Pennisetum glaucum*, synonyms: *P. americanum*, *P. typhoides*) is the most widely grown species in Africa. In 2001, 10.7 million tonnes of millet were produced in Sahelian Africa (Burkina Faso, Gambia, Mali, Niger, Nigeria, Senegal, and Chad). This represents in these countries an average of 495 kcal per person per day and up to 1014 and 609 kcal per person per day in Niger and Burkina Faso, respectively (FAO, 2004). Indeed, in many African countries, millet is often the main component of many meals and is essentially consumed as steam-cooked products (“couscous”), thick porridges (“Tô”), and thin porridges (“Ogi”) which can be used as complementary food for infants and young children, and is also used in beer making (Obilana, 2003).

Pearl millet is nutritionally better than most other cereals; it has high levels of calcium, iron, zinc, lipids and high quality proteins (Klopfenstein and Hosney, 1995). But, as in other cereal grains, nutritional quality is considerably lowered by the presence of anti-nutritional factors leading to poor digestibility of proteins, carbohydrates and minerals.

In developing countries, the low bioavailability of minerals (especially iron and zinc) in cereal-based foods is a crucial problem for infants and young children. The main anti-nutritional factors acting on iron and zinc bioavailability are phytates, tannins and certain fibres (Gilloly et al., 1984; Camara and Amaro, 2003).

Depending on their localization in cereal grain, the proportions of these anti-nutrients in diet can be reduced by decortication, a process which may also modify mineral content and bioavailability. Some of the traditional products cited above necessitate preliminary decortication of grains for either organoleptic or technological reasons (astringency, texture, etc.). Although distribution of biochemical components in the different structures of cereal grains is well known for certain species such as wheat, maize or rice (Godon and Laignelet, 1991), research on pearl millet is rare. Only two studies give some results on the proportions

of the anatomical parts of pearl millet grains and the distribution of some nutrients and phytates in these different parts (Abdelrahman et al., 1984; Simwemba et al., 1984).

The objective of this study was to characterise the distribution of some nutrients (starch, lipids, proteins, iron and zinc), anti-nutritional factors (certain fibres, tannins and phytates) and phytase activity in the grains of two pearl millet cultivars from Burkina Faso using abrasive decortication in order to evaluate its impact on the nutritional value of pearl millet.

2. Experimental

2.1. Millet grains

Grains of two millet cultivars (*Pennisetum glaucum*) were obtained from the Environmental and Agricultural National Research Institute (INERA) of Ouagadougou (Burkina Faso). The Gampela cultivar (yellow in colour) is usually grown and consumed locally, whereas IKMP-5 (green in colour) is the result of agronomic improvements and has a better yield and nutritional quality.

2.2. Decortication process and preparation of samples

The initial water content of Gampela and IKMP-5 was respectively 7.8% and 9.3%; the moisture content of the grain samples of the two millet cultivars was adjusted to 15% to facilitate decortication. Samples were tempered at 20°C in sealed plastic containers for 16 h in a rotary shaker (Reax 2, Heidolph, Schwabach, Germany) at 30 rpm. Grains were mechanically sieved to obtain grain samples with homogeneous diameters from 2.0 to 2.5 mm. Abrasive decortication was performed on 80 g of tempered samples with a laboratory huller (TM 050, Satake, Stockport, UK) at 750 rpm.

After determination of dry matter (DM) content, the decorticated grains were freeze-dried and milled with a laboratory mill (IKA M20, Labor Technik, Staufen, Germany), sieved to pass through a 0.5 mm screen and stored at 4°C for chemical analyses.

2.3. Analytical methods

Starch content was estimated by determination of glucose concentration using a colorimetric method (560 nm) after enzymatic degradation with α -amylase (EC 3.2.1.1) (Termamyl 120L, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) followed by amyloglucosidase (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 because they were only present in small quantities in raw cereal grains.

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

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

Total iron and zinc contents were determined by atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA 200, Varian, Victoria, Australia) after dry ashing as described by Laporte et al. (1980).

ADF fibre content, which corresponded approximately to cellulose and lignin contents, was determined according to the gravimetric method of Van Soest (1963) using a Dosi-fiber (Selecta, Barcelona, Spain).

Iron-binding phenolic compound content was determined according to the method of Brune et al. (1989) using a ferric ammonium sulphate reagent which enabled measurement of galloyl (expressed as tannic acid equivalents) and catechol (expressed as catechin equivalents) group contents at two wavelengths (578 and 680 nm, respectively).

Phytate contents were estimated by determination of *myo*-inositol hexaphosphate (IP6) content obtained by anion-exchange HPLC separation according to the method of Talamond et al. (1998) with slight modifications (centrifugation after extraction carried out at 4,500g, for 20 min at 4°C and dilution of the residue before injection in 2 ml of deionized water).

Phytase activity was estimated using colorimetric determination of phosphorus released during incubation of phytase extract in a sodium phytate solution. Phytase was extracted from 2 g of flour in 20 ml of buffer at 4°C according to the procedure of Konietzny et al. (1995) with buffer modification (0.1 M acetate buffer, pH 5.6). The samples were magnetically stirred for 2 h at 4°C and centrifuged at 10 000g for 30 min at 4°C. The supernatants were shaken for 10 min with 1 g of AG 1-X8 anion resin (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) to remove phosphorus and *myo*-inositol phosphates (Bergman et al., 2000) and centrifuged again. The supernatants were used as enzyme extracts. Two ml of crude enzyme extract were incubated for 1 h at 30°C with 2 ml of 2.5 mM sodium phytate solution (Sigma, P-8810) and 10 ml of 0.1 M acetate buffer at pH 5.6. The reaction was then stopped by adding 4 ml of 2 M HCl. Free Pi contents were measured by spectrophotometry on 0.25 ml of incubated solution according to the method of Heinonen and Lahti (1981). The results were calculated as mg of released Pi per hour by phytase extracted from 100 g DM of raw or decorticated grains, according to a standard range prepared with 5 mM KH₂PO₄ solution.

2.5. Calculation of extraction rates and component loss rates

Extraction rates of grain samples were calculated on a dry weight basis after each decortication experiment. Component loss rate was determined by subtracting to 100 the ratio (multiplied by 100) of the quantity of the component remaining after decortication on the quantity initially measured in the grains. For each component and each extraction rate, loss rates were calculated from each measurement (2 or 3 depending on the component) performed on decorticated grains in order to calculate means and their standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. Composition of the grains of pearl millet cultivars

Compositions of the grains of the two raw millet cultivars are given in Table 1.

The starch contents of Gampela and IKMP-5 grains were not significantly different (70.1 and 69.3 g/100g DM, respectively), nor were the lipid contents (5.58 and 5.77 g/100g DM, respectively). It is interesting to note that the lipid content in millet grains was noticeably higher than in some other cereal species such as wheat or barley (about 1.8 g or 2.1 g/100g DM respectively; Souci et al., 2000). By contrast, Duncan's test showed significant differences ($P \leq 0.05$) between protein, iron and zinc contents of the two cultivars. Indeed, IKMP-5 showed the highest values for all these nutrients, particularly iron (3.41 and 1.87 mg/100g DM for IKMP-5 and Gampela, respectively). These differences are perhaps due to the fact that the IKMP-5 cultivar is the result of varietal selection in agronomic stations. However, it is known that mineral contents are often more influenced by ecological conditions in the area where the crop is grown than by genetic factors as reported by Buerkert et al. (2001) in their study on variations in millet populations in Niger.

Table 1. Nutrient and anti-nutritional factor contents in whole grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars and calculated proportion removed after decortication to 12% of extraction

	Gampela		IKMP-5	
	Content or activity in whole grain	Proportion removed (%)	Content or activity in whole grain	Proportion removed (%)
Starch (g/100gDM) ^a	70.13 ± 0.68	3	69.30 ± 0.77	2
Protein (g/100gDM) ^a	8.73 ± 0.10	13	10.11 ± 0.11	13
Lipids (g/100gDM) ^a	5.58 ± 0.10	9	5.77 ± 0.09	10
Iron (mg/100gDM) ^a	1.87 ± 0.04	27	3.41 ± 0.10	32
Zinc (mg/100gDM) ^a	2.00 ± 0.02	18	2.57 ± 0.04	13
Fibre (g/100gDM) ^a	2.48 ± 0.03	40	4.23 ± 0.10	56
Tannin (g/100gDM) ^a	0.67 ± 0.02	51	0.37 ± 0.01	19
IP6 (g/100gDM) ^a	0.72 ± 0.04	4	0.80 ± 0.02	8
Phytase activity ^b	200 ± 8	42	168 ± 1	11

^a Mean ± standard deviation of 3 determinations (content expressed in g/100g DM).

^b Mean ± standard deviation of 3 determinations (phytase activity expressed in mg released H₂PO₄ / h per 100g DM).

Table 1 also shows some differences in fibre and tannin contents with 2.48 and 4.23 g ADF fibres/100g DM and 0.67 and 0.37 g tannins/100g DM for Gampela and IKMP-5, respectively. Phytate contents were nearly identical with 0.72 and 0.80 g/100g DM for the Gampela and IKMP-5 cultivars, respectively.

In our conditions (acetate buffer pH 5.6 at 30°C), phytase activity of raw grains of the Gampela cultivar was slightly higher than that of the IKMP-5 cultivar (200 and 168 mg released H₂PO₄/h per 100 g DM, respectively).

3.2. Starch loss rate during decortication

Fig. 1 shows changes in starch loss rates as a function of the decortication rate (extraction rate) of the grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars. The straight line (y=x) represents the expected theoretical loss of the nutrient, if it were equally distributed throughout the grain tissues, with respect to the decortication rate.

No starch loss was observed up to around 12% of DM extraction for both millet cultivars (Table 1). Abrasion of the starchy endosperm thus started only after the removal of about 12% DM. From 12% of extraction on, starch losses progressed linearly indicating that starch was uniformly removed from the grains.

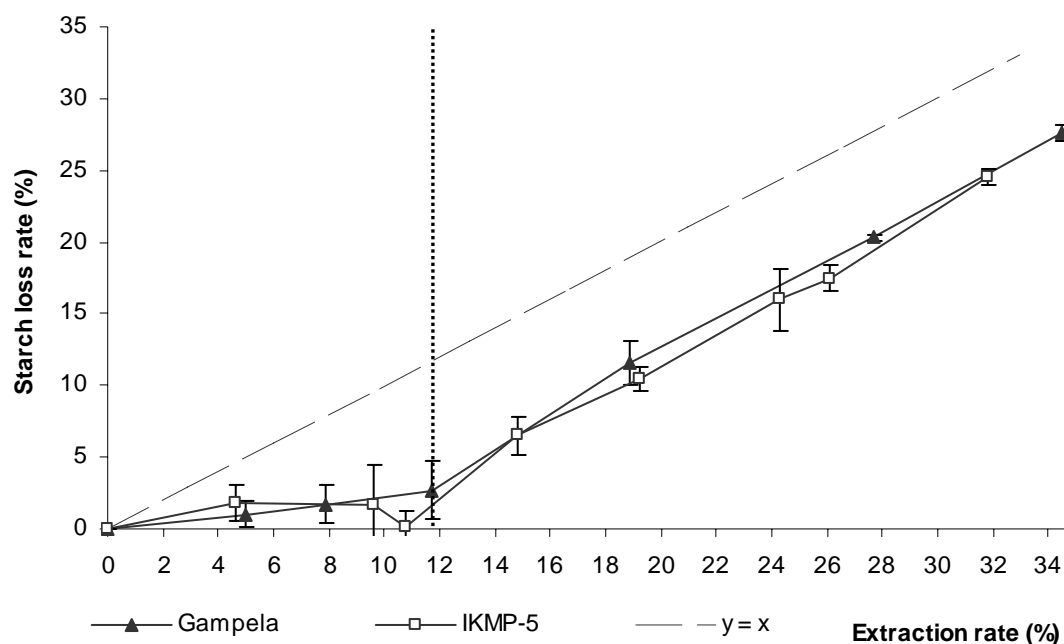


Fig. 1. Changes in starch loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars.

Vertical bars represent standard deviations of the means based on three measurements. The straight vertical line represents the 12 % extraction rate corresponding to the beginning of abrasion of the starchy endosperm.

The very limited loss in starch at the beginning of decortication is in agreement with the observations of De Francisco et al. (1982) in their study about decortication of grains of pearl millet and sorghum cultivars. These authors showed that the pericarp of millet grains was removed in small flakes detached at the junction between the endosperm and the aleurone layer, whereas that of sorghum was removed in large flakes detached from the starch containing mesocarp. This characteristic of the millet pericarp may be due to the fact it is thicker than that of sorghum. Furthermore, it is also recognised that grains with highly vitreous endosperm yield the highest endosperm recovery, whereas grains with floury endosperm yield the highest percent of broken grains (Murty and Kumar, 1995). The data shown in Fig. 1 indicates that the grains of the two pearl millet cultivars studied presented a thick pericarp and might contain a high amount of vitreous endosperm.

3.3. Lipid and protein loss rates during decortication

The curves of lipid (Fig. 2-A) and protein (Fig. 2-B) loss rates of both cultivars were both found proportional to DM losses with a slight increase from around 12% of extraction, particularly for protein losses. Thus, as observed for starch, no difference was found between lipid and protein loss rates in the two cultivars.

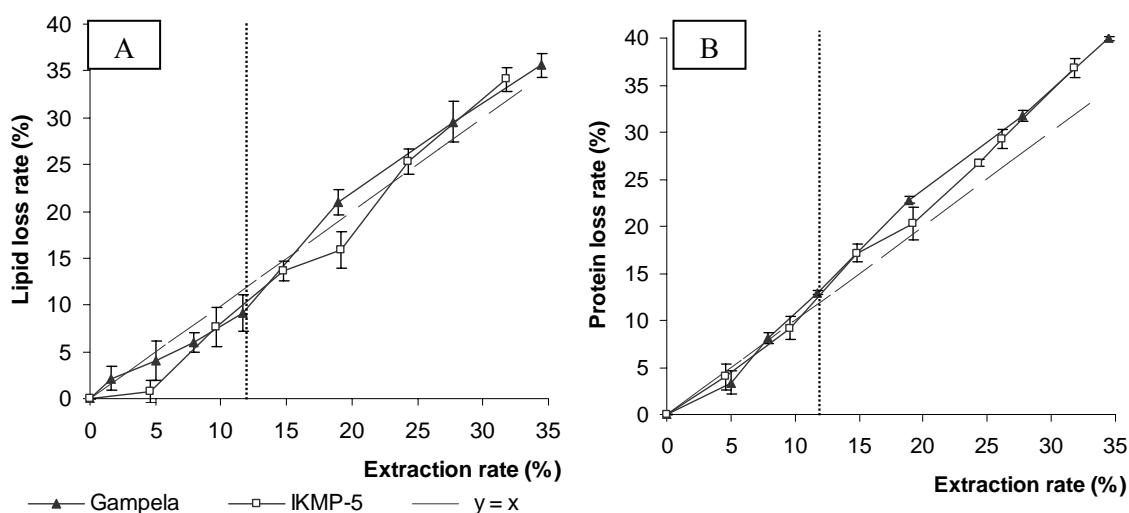


Fig. 2. Changes in lipid (A) and protein (B) loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars.

Vertical bars represent standard deviations of the means based on two measurements. The straight vertical line represents the 12 % extraction rate corresponding to the beginning of abrasion of the starchy endosperm.

At 12% of DM loss, which corresponds to the weight grain removed before that the starchy endosperm started to be abraded, 13% of total protein and 10% of total lipid contents had been removed from grains of both cultivars (Table 1). Abdelrahman et al. (1984) reported that bran (pericarp and aleurone), which corresponded to about 8.4% of the grain weight in the American pearl millet cultivars studied, contained respectively 9.4 and 5.9 % of total protein and lipid content of grains. Hence, it appears that part of the germ probably started to be abraded along with the hulls. Indeed, even if the cultivars in our study and that of Abdelrahman et al. were not the same it was difficult to find around 3.6% variation in the weight of hulls. Moreover, visual observation of decorticated grains showed an abrasion of germ and the differences in protein (13 vs 9.4, 3.6%) and lipid (10 vs 5.9, 4.1%) contents of the removed non starch containing part can also be explained by the presence of germ which contains higher amounts of lipids than the hulls. The loss of germ at the beginning of decortication can be explained by the ovoid shape of the grains which makes the lower part of the germ vulnerable to abrasion. However, this loss appeared to be rather low and changes in starch loss rates showed that decortication as performed in our study allows the hulls to be satisfactorily separated from the rest of the grain. This can be attributed to the tempering of grains which has already been reported to allow easier decortication (Sheuring et al., 1982), and to the recovery of most of the protein and ash in mechanically abraded sorghum grains (Lochte-Watson et al., 2000).

3.4. Iron and zinc loss rates during decortication

Changes in iron and zinc loss rates during decortication of the grains of the two millet cultivars are shown in Fig. 3.

At the beginning of decortication, iron losses were higher than zinc losses for both cultivars and subsequently became more or less proportional to DM losses.

At 12% of extraction, 27 and 32% of iron and 18 and 13% of zinc were lost from Gampela and IKMP-5 grains, respectively (Table 1). After removing the hulls, the iron loss was a little higher for the IKMP-5 cultivar than for Gampela. Because the iron content of IKMP-5 raw grains was about twice as high as Gampela (3.41 and 1.87 mg/100g DM, respectively), the

additional iron in grains of the IKMP-5 cultivar is probably distributed in the same way as in Gampela grains.

Thus, at least a quarter of the iron is located in hulls of pearl millet grains. Zinc is more uniformly distributed in the different structures of the grains of both cultivars. Indeed, zinc is found in a large number of enzymes and other proteins (Vallee, 1995), where it plays an important structural role and must therefore be linked to protein losses which were already found proportional to DM losses.

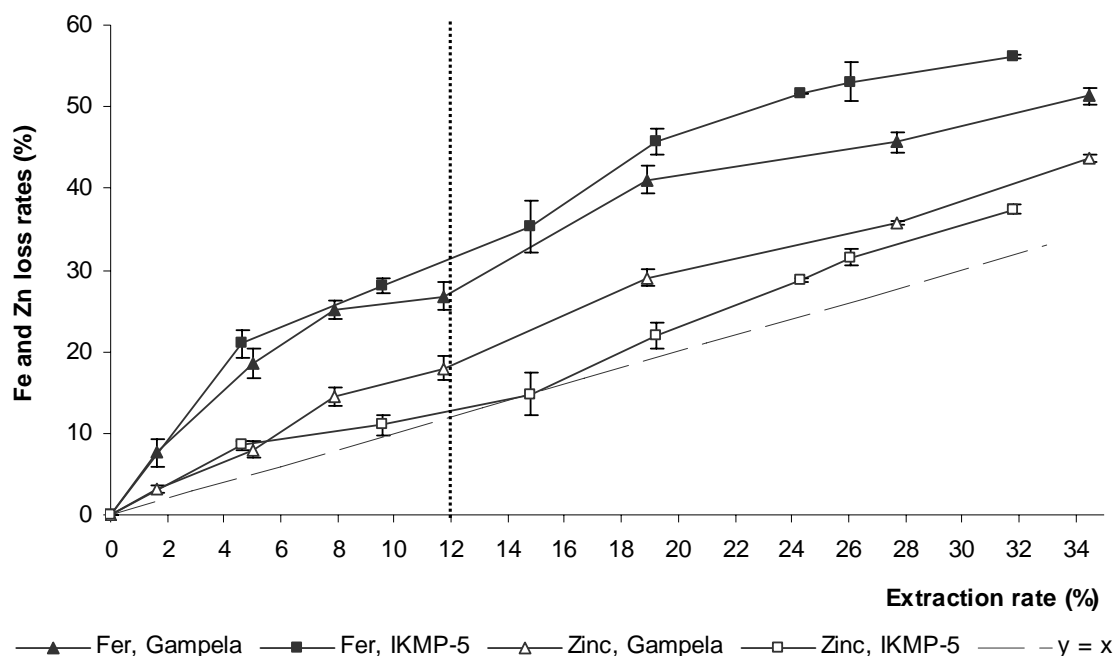


Fig. 3. Changes in iron and zinc loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars.

Vertical bars represent standard deviations of the means based on two measurements. The straight vertical line represents the 12 % extraction rate corresponding to the beginning of abrasion of the starchy endosperm.

3.5. Fibre and tannin loss rates during decortication

The curves of ADF fibre loss rates (Fig. 4-A) show that half can be eliminated by decortication of grains to 10-20% of extraction. ADF fibres were eliminated slightly faster from IKMP-5 grains than from Gampela grains, but the shape of the two curves is nearly identical. By contrast, the curves representing tannin loss rates (Fig. 4-B) show more differences. Tannin loss in grains of the IKMP-5 cultivar was low at the beginning of decortication and increased between around 5 and 15% of extraction to become proportional to DM loss. The tannin loss rate in the grains of the Gampela cultivar was very high at the beginning of decortication but slowed down from around 8% of extraction.

Decortication at 12% of extraction had resulted in 56 and 40% losses in ADF fibre and in 19 and 51% losses in tannin for the IKMP-5 and Gampela cultivars, respectively (Table 1). These differences may be due to the different composition of the two cultivar hulls which in turn is probably due to differences in component contents of raw grains. Indeed, ADF fibre content of IKMP-5 was higher than that of Gampela (4.23 vs 2.48 g/100g DM) and part of this additional quantity of fibre was located in the hulls. Tannin content of the Gampela cultivar was higher than that of IKMP-5 (0.67 vs 0.37 g/100g DM) and a higher loss in tannin was observed during abrasion of the hulls of grains of the Gampela cultivar.

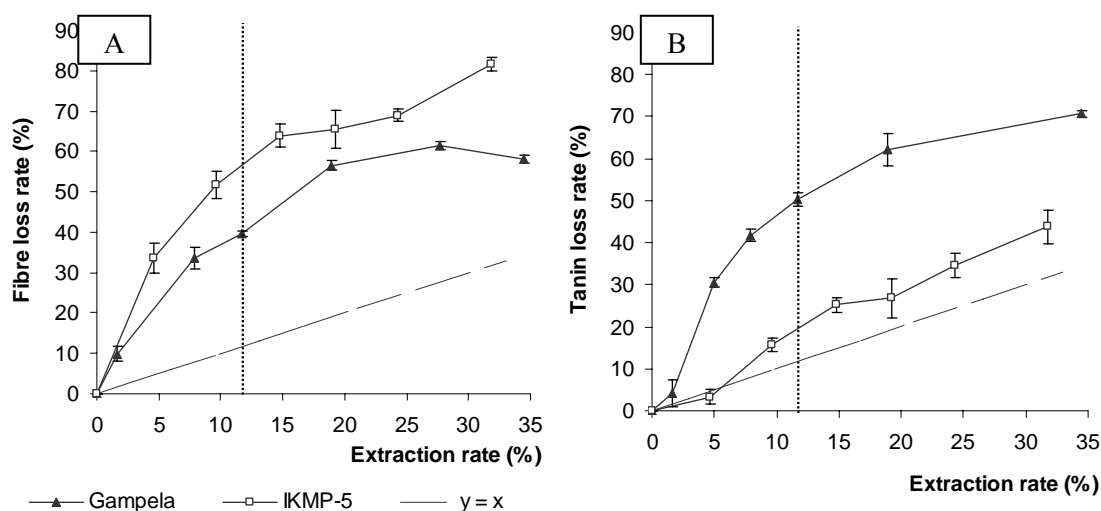


Fig. 4. Changes in ADF fibre (A) and tannin (B) loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars.

Vertical bars represent standard deviations of the means based on three and two measurements, respectively. The straight vertical line represents the 12 % extraction rate corresponding to the beginning of abrasion of the starchy endosperm.

Our results agree with those of Serna-Saldivar et al. (1994) who reported that decortication of pearl millet led to a high reduction in insoluble fibre content (from 6.30 to 3.55 g/100g DM after decortication at 17.5% of extraction). Concerning tannin losses, El Hag et al. (2002) already showed the effect of decortication on total polyphenol content of grains of two pearl millet cultivars from Sudan and found that decortication led to 22.4 to 26.4% of reduction. However, the extraction rate was not measured in this case.

Thus, although fibres and tannins seem to be distributed in the same way in grains of the two cultivars, their quantity differed. Furthermore, it appears that, in pearl millet grains; tannins are not always associated with fibres as their proportions in peripheral parts of the grains were different in the two cultivars.

3.6. Phytate and phytase loss rates during decortication

Fig. 5-A shows changes in phytate loss rates in the grains of the two cultivars during decortication. Phytate loss rates in the grains of Gampela cultivar were very low at the beginning of decortication and became proportional to DM loss rates when starchy endosperm began to be abraded. Therefore, it seems that, in the Gampela grains, phytates are mainly distributed in starchy endosperm and germ. Phytate loss rates in the grains of the IKMP-5 cultivar were slightly higher than in Gampela at the beginning of decortication. Subsequently phytate losses slowed down to reach around 18% and then increased to reach the straight line $y=x$ at around 32% of extraction. This inflation of the curve indicates that, in this millet cultivar, the germ contains a smaller quantity of phytate than the other grain structures and, at 12% of extraction, only 4 and 8% of the phytates had been removed from the grains of Gampela and IKMP-5 cultivars, respectively (Table 1). Simwemba et al. (1984) showed that phytate content of millet germ was 752 mg/100g against 86 and 278 mg/100g for endosperm and bran, respectively. If we bring these values to those reported by Abdelrahman et al. (1984) for the proportions of the different grain structures, about 60% of the phytates appeared to be located in germ, 30% in the endosperm and 10% in the bran fraction. Some differences between these results and our results (see Fig. 5-A) can be attributed to the nature of the cultivars studied as well as to cultivation conditions, given that in the study cited above

American cultivars were used, whereas our study concerned African cultivars. El Hag et al. (2002) also studied the effect of decortication on phytate contents of pearl millet and found reductions of 43.9 and 49.8% in the grains of the two Sudanese cultivars which confirms phytate distribution may differ with the geographical origin of the cultivar.

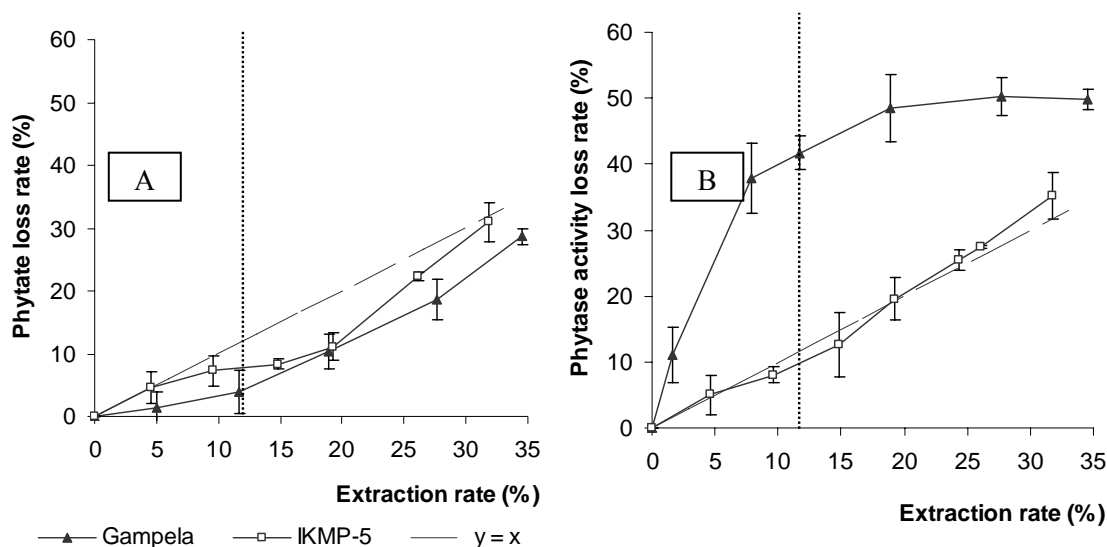


Fig. 5. Changes in phytate (IP6) (A) and phytase activity (B) loss rates during decortication of grains of Gampela and IKMP-5 millet cultivars.

Vertical bars represent standard deviations of the means based on two and three measurements, respectively. The straight vertical line represents the 12 % extraction rate corresponding to the beginning of abrasion of the starchy endosperm.

Significant differences in phytase activity loss rates (Fig. 5-B) were observed in the two millet cultivars in our study. In the grains of the Gampela cultivar, the loss in phytase activity was high at the beginning of decortication, i.e. reached 42% at 12% of DM extraction (Table 1) and subsequently slowed down. This result suggests that phytases are mainly located in hulls of the grains of the Gampela cultivar. Conversely, in grains of the IKMP-5 cultivar, the losses in phytase activity were proportional to the loss in DM from 0 to 32% of extraction and thus mirror protein losses. This indicates differences in the distribution of phytase activity in the grains of the two cultivars. However, as the level of phytase activity of Gampela grains was higher than that of IKMP-5, the activity of the decorticated grains was about the same for the two cultivars at 12 % of DM extraction. A different distribution of phytase activity between the different parts of the grains was also shown in barley by Bergman et al. (2000). Indeed, these authors showed that degradation of phytates was higher in the scutellum cells of the germ than in the aleurone layer, a result that had been already found in wheat grain by Peers (1953). However, according to our results, phytase activity in pearl millet grains does not appear to be higher in the germ than in the other parts of the grain.

In this study, we showed that although similar distribution of phytates was observed for the grains of the two millet cultivars, phytase activity was differently distributed in grains. In the grains of the Gampela cultivar, a large proportion of the phytase activity was located in the hulls, whereas in those of the IKMP-5 cultivar phytase activity was more uniformly distributed in the grain and was removed in the same proportion as DM during decortication. However, the precise location of phytates in millet grain tissues remains to be determined using fluorescence microscopy, and their degradation by endogenous phytases during hydrothermal treatment needs to be tracked before any further conclusions can be drawn.

3.7. Effect of decortication on the nutritional value of pearl millet

Table 1 summarizes the losses of each of the nutritional component analysed in this study at 12% of DM extraction. Protein and lipid contents were not changed by decortication what was shown by the protein and lipid losses close to DM losses. As far as minerals are concerned, though zinc content did not change to any great extent, particularly in the grains of the IKMP-5 cultivar, iron content decreased significantly by about one third. At the same time, phytate content increased as a result of decortication as only 4 and 8% of phytate was removed from the grains of Gampela and IKMP-5 cultivars, respectively. Consequently, the molar ratios of phytate to iron (Phy/Fe) and phytate to zinc (Phy/Zn), for which values higher than 10-15 have been reported to decrease iron and zinc absorption (Saha et al., 1994; Davies and Olpin, 1979), increased after decortication (Phy/Fe: from 33 to 44 and 20 to 25, Phy/Zn: 35 to 42 and 30 to 32 for Gampela and IKMP-5 cultivars, respectively). However, ADF fibres and tannins have also been reported to inhibit mineral absorption (Gilloly et al., 1984) and their contents were clearly reduced by decortication. Thus, as the relative contribution of these anti-nutritional factors (phytates, fibres, tannins) in reducing iron and zinc bioavailability has not been clearly established for millet grains, it is difficult to conclude about the ability of decortication to improve mineral bioavailability in millet grain. Furthermore, a decrease in phytase activity was also observed in the grains of one of the two cultivars, which suggests it will be more difficult to improve mineral bioavailability by conventional processes applied after decortication, such as soaking or fermentation, which usually enable phytate degradation by endogenous phytases.

4. Conclusion

Abrasive decortication of pearl millet grains after tempering to 15% of water content led to efficient separation of the hulls from the starchy endosperm and to a slight abrasion of the lower part of the germ in both the cultivars studied. Abrasion of starchy endosperm started after 12% of DM of grains had been removed. The hulls of the grains of both cultivars were high in ADF fibres and iron and those of the grains of Gampela cultivar also contained a high proportion of tannins and phytase activity. Protein, lipid and zinc contents were not changed to a great extent by decortication and appeared to be uniformly distributed in pearl millet grains. However, phytate content of grains of both cultivars increased after decortication at 12% of extraction and phytates appear to be located in germ and endosperm. Thus, the effect of decortication on pearl millet nutritional value, and particularly on iron and zinc bioavailability requires further experimentation, as it did allow removal of fibres and tannins but very few of the phytates.

Acknowledgements

The authors wish to thank INERA of Ouagadougou for providing grains of pearl millet cultivars, M. Chaurand (INRA, Montpellier) and I. Rochette for technical assistance with laboratory hulling and HPIC analyses of phytate, respectively. Our thanks to C. Icard-Vernière and J.P. Guyot for their advice.

This work is part of the Cerefer project (www.mpl.ird.fr/cerefer) funded by the European Commission contract N° ICA4-CT-2002-10047.

References

- Abdelrahman, A., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E., 1984. The proportions and chemical compositions of hand-dissected anatomical parts of pearl millet. *Journal of Cereal Science* 2, 127-133.
- AFNOR, 1970. Directives générales pour le dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl (produits agricoles alimentaires). Norme NF V 03-050.
- Batey, I.L., 1982. Starch analysis using thermostable α -amylase. *Starch* 4, 125-128.
- Bergman, E.L., Autio, K., Sandberg, A.S., 2000. Optimal conditions for phytate degradation, estimation of phytase activity, and localization of phytate in barley (*Cv. Blenheim*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4647-4655.
- Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., 1989. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *European Journal of Clinical Nutrition* 43, 547-57.
- Buerkert, A., Moser, M., Kumar, A. K., Furst, P. and Becker, K. 2001. Variation in grain quality of pearl millet from Sahelian West Africa. *Field Crops Research* 69, 1-11.
- Camara, E., Amaro, M.A., 2003. Nutritional aspect of zinc availability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54, 143-151.
- Davies, N.T., Olpin, S.E., 1979. Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *British Journal of Nutrition* 41, 590-603.
- De Francisco, A., Shepherd, A.D., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E., (1982). Decorticating pearl millet and grain sorghum in a laboratory abrasive mill. *Cereal Chemistry* 59, 1-5.
- El Hag, M.E., El Tinay, A.H., Yousif, N.E., 2002. Effect of fermentation and dehulling on starch, total polyphenols, phytic acid content and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry* 77, 193-196.
- FAO, 2004. Agricultural data : FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/faostat/default.jsp> (accessed 05 July 2004).
- Gilloly, M., Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Torrance, J.D., Bezwoda, W.R., Mac Phail, A.P., Derman, D.P., Novelli, L., Morral, D., Mayet, F., 1984. Factors affecting the absorption of iron from cereals. *British Journal of Nutrition* 51, 37-46.
- Godon, B., Laignelet, B., 1991. Composition biochimique des céréales, in: Godon, B., Willm, C. (Eds.), *Les industries de première transformation des céréales*. Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp. 77-104.
- Heinonen, J.K., Lahti, R.J., 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Chemistry* 113, 313-317.
- Holmes, J., Björck, I., Drews, A., Asp, N.G., 1986. A rapid method for the analysis of starch. *Starch* 38, 224-226.
- Klopfenstein, C.F., Hosney, R.C., 1995. Nutritional properties of sorghum and the millets, in: Dendy, D.A.V. (Eds.), *Sorghum and millets: Chemistry and Technology*. American association of cereal chemists Inc., St Paul, pp. 125-168.
- Konietzny, U., Greiner, R., Jany, K.L.D., 1995. Purification and characterization of a phytase from spelt. *Journal of Food Biochemistry* 18, 165-183.
- Laporte, J., Kovacsik, G., Pinta, M., 1980. Milieux végétaux, in: Pinta, M. (Eds., 2nd edition), *Spectrométrie d'absorption atomique, Tome 2: Applications à l'analyse chimique*. Masson, Paris, pp. 378-421.
- Lochte-Watson, K.R., Weller, C.L., Jackson, D.S., 2000. Fractionation of grain sorghum using abrasive decortication. *Journal of Agricultural and Engineering Research* 77, 203-208.

- Murty, D.S., Kumar, K.A., 1995. Traditional uses of sorghum and millets, in: Dendy, D.A.V. (Eds.), Sorghum and millets: Chemistry and Technology. American association of cereal chemists Inc., St Paul, pp. 185-222.
- Obilana, A.B., 2003. Overview: Importance of millets in Africa. <http://www.afripro.org.uk> (accessed 05 July 2004). In: Belton, P.S., Taylor, J.R.N. (Eds.), Proceeding of the Workshop on the proteins of sorghum and millets: Enhancing nutritional and functional properties for Africa. 2-4 April 2003, Pretoria, South Africa.
- Peers, F.G., 1953. The phytase of wheat. Biochemistry Journal 53, 102-110.
- Saha, P.R., Weaver, C.M., Mason, A.C., 1994. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. Journal of Agricultural Food Chemistry 42, 2531-2535.
- Scheuring, J.F., Sidibe, S., Rooney, L.W., Earp, C.F., 1983. Sorghum pericarp thickness and its relation to decortication in a wooden mortar and pestle. Cereal Chemistry 60, 86-89.
- Serna-Saldivar, S.O., Clegg, C., Rooney, L.W., 1994. Effects of Parboiling and Decortication on the Nutritional Value of Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.). Journal of Cereal Science 19, 83-89.
- Simwemba, C.G., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E., Zeleznak, K., 1984. Certain B vitamin and phytic acid contents of pearl millet [*Pennisetum americanum* (L.) Leeke]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32, 31-34.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., 2000. Cereal and cereal flours, in: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching b. München (6th Eds.), Food composition and nutrition tables. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 523-597.
- Talamond, P., Gallon, G., Trèche, S., 1998. Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. Journal of Chromatography A 805, 143-147.
- Vallee, B.E., 1995. The function of metallothionein. Neurochemistry International 1, 23-33.
- 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.

Chapitre V-2

Contribution relative
des différents facteurs
anti-nutritionnels à la faible
biodisponibilité *in vitro* du fer et
du zinc dans le grain de mil

(Article soumis en novembre 2004 au
Journal of Agriculture and Food chemistry)

Digestibilité *in vitro* du fer et du zinc dans des farines de mil (*Pennisetum glaucum*) à teneurs variables en phytates, tanins et fibres

Isabelle Lestienne^a, Pierre Besançon^b, Bertrand Caporiccio^b, Valérie Lullien-Péllierin^c,
Serge Trèche^{a,*}

^a Centre IRD de Montpellier, UR 106, « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^b Equipe « Nutrition et Aliments », EA 3762, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

^c UMR « Ingénierie des Agropolymères et des Technologies Emergentes », ENSAM/INRA Montpellier, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

Résumé

Des simulations de digestion gastro-intestinale, permettant d'estimer les disponibilités *in vitro* du fer et du zinc, ont été réalisées dans deux séries d'échantillons : (i) des échantillons de farine de mil entière à teneur réduite en phytates et (ii) des échantillons non-déphytinisés ou déphytinisés issus de fractions de grain de mil, une fraction de grains décortiqués à teneurs faibles en fibres et en tanins et une fraction de sons à teneurs élevées en fibres et en tanins. Les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc de la farine de mil entière ont été significativement améliorées par la dégradation des phytates, même lorsque les IP6 n'étaient pas totalement dégradés. La déphytinisation totale de la fraction de grains décortiqués a entraîné de fortes augmentations des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, tandis que celle de la fraction de sons n'a eu aucun effet sur ces digestibilités. Bien que les phytates soient fortement impliqués dans la réduction des disponibilités *in vitro* du fer et du zinc de la farine de mil, les fibres et les tanins jouent également un rôle important en chélatant de grandes proportions du fer et du zinc présents dans les enveloppes du grain.

Mots-clés

Biodisponibilité du fer et du zinc, Digestion *in vitro*, Phytates, Fibres, Tanins, Mil chandelle, Fractions de grain.

Iron and zinc *in vitro* digestibility in pearl millet flours (*Pennisetum glaucum*) with varying phytate, tannin and fiber contents

Isabelle Lestienne^a, Pierre Besançon^b, Bertrand Caporiccio^b,
Valérie Lullien-Péllierin^c, Serge Trèche^{a,*}

^a Centre IRD de Montpellier, UR 106, « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^b Equipe « Nutrition et Aliments », EA 3762, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

^c UMR « Ingénierie des Agropolymères et des Technologies Emergentes », ENSAM/INRA Montpellier, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

Keywords

Iron and zinc bioavailability; *in vitro* digestion; phytates; fibers; iron binding phenolic compounds; pearl millet; grain fractions.

Abbreviations

ADF Acid detergent fiber

DGF Decorticated grain fraction

DM Dry matter

IP6 *Myo*-inositol 6-phosphate

NDF Neutral detergent fiber

PPF Peripheral part fraction

SD Standard deviation

WGF Whole grain flour

* Corresponding author: Tel: (33) 4 67 41 62 95
Fax: (33)4 67 41 63 30
e-mail: treche@mpl.ird.fr

Abstract

Simulations of gastro-intestinal digestion, used to estimate *in vitro* iron and zinc availability, were performed on two kinds of samples: (i) samples with decreased phytate contents from whole pearl millet flour and (ii) non-dephytinized or dephytinized samples from two pearl millet grain fractions, a decorticated fraction with low fiber and tannin contents and a bran fraction with high fiber and tannin contents. *In vitro* iron and zinc digestibilities of whole pearl millet flour were significantly improved by phytate degradation, even if the IP6 were not all degraded. Total dephytinization of decorticated fraction led to a marked increase in iron and zinc digestibilities, but that of bran fraction had no effect on either iron or zinc digestibility. Even if phytates are involved in reducing *in vitro* iron and zinc availability in pearl millet flour, fibers and tannins play an important role by chelating a high proportion of iron and of zinc in grain hulls.

1. Introduction

In developing countries, because of limited access to animal products (meat, fish, eggs) that provide high intakes of heme-iron and zinc, the main dietary sources of iron and zinc are cereals and legumes. In some countries in Sahelian Africa, millets, and particularly pearl millet (*Pennisetum glaucum*), can represent more than 75% of the total cereal production (1). This cereal thus represents an important proportion of dietary intakes for millions of people. Unfortunately, the iron and zinc in cereal-based foods are poorly bioavailable due to factors that reduce their intestinal absorption, resulting in high rates of iron and zinc deficiency, especially in infants, children and women of child-bearing age (2). For instance, in Burkina Faso, Mali and Niger, where millet contributes to more than 20% of the available food energy, prevalence of iron deficiency anaemia is estimated at 83, 77 and 57%, respectively, in children under five years and around 48% in women of child-bearing age (3). Furthermore, mineral absorption is also influenced by the level of mineral contents and by factors that enhance their absorption in the diet, as well as by the physiological status of the subjects, such as age, disease or stores of mineral (4, 5). Over the years, many *in vivo* (6, 7, 8, 9) or *in vitro* (10, 11) studies have reported the negative effects of phytates, fibers and tannins on iron or zinc bioavailability or *in vitro* availability. The overall conclusion of these studies shows that the effects of anti-nutritional factors on mineral availability are highly dependent on the food matrix. Moreover, results of different studies have differed considerably depending on the method used to estimate mineral bioavailability.

Because of their cost and complexity, radio-isotopic measurements of mineral absorption in animals or humans are often impractical and consequently little used. One approach to address this problem has been the development of *in vitro* or *ex vivo* measurements of food mineral bioavailability, such as digestible minerals (12, 13) or mineral uptakes in the Caco-2 cell culture model (11). These techniques are reproducible, reliable and sensitive to changes due to processes (14). As *ex vivo* measurements are longer, more complicated and more expensive than *in vitro* measurements, for our first approach, we used *in vitro* simulation of gastro-intestinal digestion to measure iron and zinc bioavailability.

The purpose of the present investigation was to assess the effect of phytates on iron and zinc *in vitro* digestibility in pearl millet grain. We first investigated the effect of phytate degradation in pearl millet flour on iron and zinc *in vitro* digestibility, in some tests only degraded by endogenous phytases and in other tests degraded by both endogenous and exogenous phytases. As fibers and tannins are also known to chelate minerals, their effects on

iron and zinc digestibility of pearl millet grain fractions with or without dephytinization were subsequently investigated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Two kinds of samples were prepared: samples with different levels of phytates, and samples with high and low fiber and tannin contents. Figure 1 summarizes their preparation as well as their nomenclature.

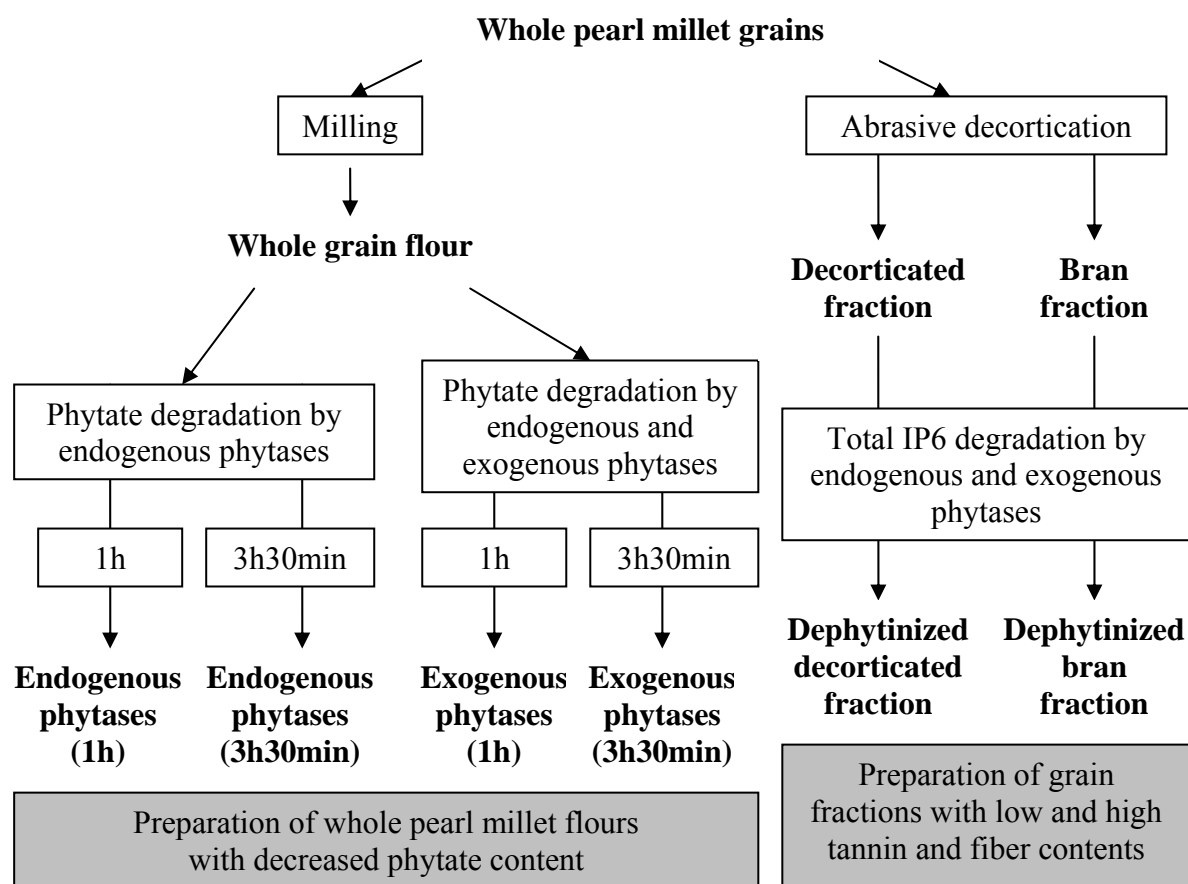


Figure 1. Sample preparation and nomenclature

2.1.1. Millet flours with decreased phytate content

Grains of pearl millet (*Pennisetum glaucum*, sp. Gampela) were obtained from the “Institut National de l’Environnement et de la Recherche Agronomique” (INERA) of Ouagadougou (Burkina Faso). The Gampela cultivar (yellow in color) is grown locally and consumed in Burkina Faso. The grains were milled using a laboratory mill (IKA M20 Labortechnik, Staufen, Germany) and sieved to pass through a 0.5 mm screen to obtain whole grain flour. Samples with decreased phytate contents were obtained by incubating whole grain flour in 0.1 M acetate buffer pH 5.0 (1/2, p/p), with or without exogenous phytases, for a short or a long period, at 37°C under low shaking (60 rpm) in an incubator (New Brunswick scientific Co.,

Inc., Edison, USA). Incubation in acetate buffer allowed moderate phytate degradation by endogenous phytases, while addition of exogenous phytases allowed a greater degree of degradation. Two different exogenous phytases were used, one plant phytase from wheat (Sigma, P-1259) and one microbial phytase from *Aspergillus ficuum* (Sigma, P-9792). These two phytases were used simultaneously in order to obtain maximal hydrolysis products from two different pathways. The pH and temperature conditions for incubations (pH 5.0, 37°C) were fixed after confirmation that they permitted to each kind of phytases to be active given their different pH and temperature optima (pH 6.0 and 24-40°C for pearl millet, pH 5.0 and 55°C for wheat and pH 2.5 and 37°C for *Aspergillus ficuum*). The same conditions were used for incubations with both endogenous and exogenous phytases because pH and temperature may influence leaching phenomena. The concentrations of the enzyme preparations were first determined on a sodium phytate solution (Sigma, P-8810) to ensure equivalent activities for both exogenous phytases in the incubating conditions. Phytases were mixed in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0 at 144 u/l for phytases from wheat, and at 516 u/l for microbial phytases. Next, millet flour was incubated for a short period (1h) and for a long period (3h30min) to obtain samples containing different levels of residual phytates, and in a further case, to achieve total *myo*-inositol 6 phosphate (IP6) degradation in the sample incubated for the long period with exogenous phytases. At the end of the incubation period, the mixtures were cooled to 4°C and centrifuged at 2 600g for 15 min. The pellets were then freeze-dried and milled with a laboratory pestle and mortar.

2.1.2 Grain fractions with low and high fiber and tannin contents

Two grain fractions were prepared by abrasive decortication to obtain on the one hand a fraction with low fiber and tannin contents, and on the other hand a fraction with high fiber and tannin contents. The moisture content of the grains was adjusted to 15% to help decortication as their initial water content was 7.8%. The grains were tempered at 20°C in closed plastic containers for 16 h in a rotary shaker (Reax 2, Heidolph, Schwabach, Germany) at 30 rpm. Grains were then mechanically sieved to obtain grain samples with homogeneous diameters from 2.0 to 2.5 mm (68% of the grain population). Abrasive decortication was performed on 80 g of the tempered sample with a laboratory huller (TM 050, Satake, Stockport, UK) at 750 rpm. The decorticated grain fraction, composed of endosperm and germ, was obtained after a decortication experiment at a 35% extraction rate. The bran fraction was reconstituted by mixing bran from 3 decortication experiments, one at a 35% and two at a 12% of extraction rate, which corresponds to the removal of the non-starch containing part of pearl millet grains. The fractions were freeze-dried and milled using a laboratory mill (IKA M20 Labortechnik, Staufen, Germany) and sieved to pass through a 0.5 mm screen.

2.1.3. Dephytinized grain fractions

Thirty grams of each fraction were incubated with the previously described exogenous phytase solution for 3h30min at 37°C under low shaking (60 rpm) in an incubator to obtain total IP6 degradation. At the end of incubation period the mixtures were cooled to 4°C and centrifuged at 2 600g, for 15 min. The pellets were then freeze-dried and milled with a laboratory pestle and mortar.

2.2. Analytical methods

Acid and neutral detergent fiber contents were determined according to the gravimetric methods of Van Soest (15) and Van Soest and Wine (16) using a Dosi-fiber (Selecta, Barcelona, Spain). These measurements correspond approximately to the determination of cellulose and lignin content for the ADF and of cellulose, lignin and hemicellulose content for the NDF, which are the most likely compounds of fiber to chelate minerals.

Iron binding phenolic compound content was determined according to the method of Brune *et al.* (17) using a ferric ammonium sulfate reagent that allowed measuring galloyl (expressed as tannic acid equivalents) and catechol group contents (expressed as catechin equivalents) at two wavelengths (578 and 680 nm, respectively).

Phytate content was estimated by determination of *myo*-inositol hexaphosphate (IP6) content obtained by anion-exchange HPLC separation after phytate extraction according to the method of Talamond *et al.* (18). Separation was achieved using an Ion Pac AS11 anion-exchange column (4 x 250 mm, Dionex) equipped with an Ion Pac AG11 (4 x 50 mm) precolumn and an anion suppressor (AMMS-III 4 mm). The separation was performed by gradient elution using NaOH 0.2 M solution and deionized water as eluents.

Total iron and zinc contents were determined by atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA 200, Varian, Victoria, Australia) after dry ashing as described by Laporte *et al.* (19).

Estimation of iron and zinc in vitro digestibility. *In vitro* availability of iron and zinc was estimated by their digestibility under simulated physiological conditions using a method based on the one proposed by Lönnerdal *et al.* (20) with modifications according to other authors (13, 21, 22). Prior to *in vitro* digestion, pepsin solution (Sigma, P-7000 ; 14900 u/ml in 0.1 M HCl) and pancreatin (Sigma, P-1750 ; 1.85 mg/ml) - bile extract solution (Sigma, B-8631 ; 11 mg/ml in 0.1 M NaHCO₃) were shaken for 30 min with Chelex-100 resin (Bio-Rad, 142-2842) to remove cations and filtered on ashless Whatman filter n°41 (21). About 2 g of dry sample were precisely weighed in an Erlenmeyer and suspended in 20 ml of distilled water. After 10 min of conditioning in a shaking water bath at 37°C, pH was adjusted to 2.0 with 1 M HCl solution under magnetic stirring. Then 1.0 ml of the pepsin solution was added and the mixture was incubated for 1 h. The pH was then increased to about 4.0 with 0.15 mM PIPES (piperazine-N,N'-bis-[2-ethansulfonic acid]) buffer (Sigma, P-1851), 5.0 ml of the pancreatin - bile extract solution was added and pH adjusted to 7.0 with the PIPES buffer which allows minimizing pH variation (22). The mixture was incubated for 2 h under low magnetically stirring. The suspension was then centrifuged at 10 000g for 30 min at 4°C (13). The supernatant was recovered in a silica cap, evaporated on a hot-plate under a range hood and dry ashed in the same way as for total mineral contents. The supernatant was analyzed using atomic absorption spectrophotometry (19) for *in vitro* digestible iron and zinc, including soluble free ionizable iron and zinc and soluble complexes of iron and zinc, what represents iron and zinc which have crossed the first essential, but not sufficient, step to become available for absorption.

2.3. Statistical analysis

Values were calculated per 100 g dry matter (DM). Chemical analyses (determination of phytate, iron binding phenolic compound, fiber and total iron and zinc content) were carried

out in triplicate and data are presented as means \pm standard deviation (SD). *In vitro* digestions were carried out in triplicate and digestible iron and zinc contents were determined on each digest. Iron and zinc digestibilities are presented as means \pm standard deviation (SD) of 3 values calculated from each determination of digestible mineral content divided by the mean of total mineral content and multiplied by 100.

Data were assessed by analysis of variance (ANOVA) using Duncan's multiple range tests to separate means with significance of differences at 5% level. For samples with decreased phytate contents, two-way analyses of variance were also performed to investigate the effect of added exogenous phytases and of the length of the incubation period, as well as their interaction. For grain fractions, two-way analyses of variance were performed to investigate the effect of dephytinization and of the nature of the fraction, as well as their interaction. All statistical analyses were performed using Statgraphics Plus 5.0 v.

3. Results and discussion

3.1. Anti-nutritional factors in samples

Phytate and iron binding phenolic compound (catechol and galloyl group) contents of millet flours are presented in Figure 2. In whole pearl millet flour, phytate and iron binding phenolic compound contents were both around 0.60 g/100g DM, which corresponds to data usually reported for pearl millet (23, 24). Fiber contents were 3.08 and 6.22 g/100g DM for acid detergent fibers (cellulose and lignin) and neutral detergent fibers (cellulose, lignin and hemicelluloses), respectively (results not shown).

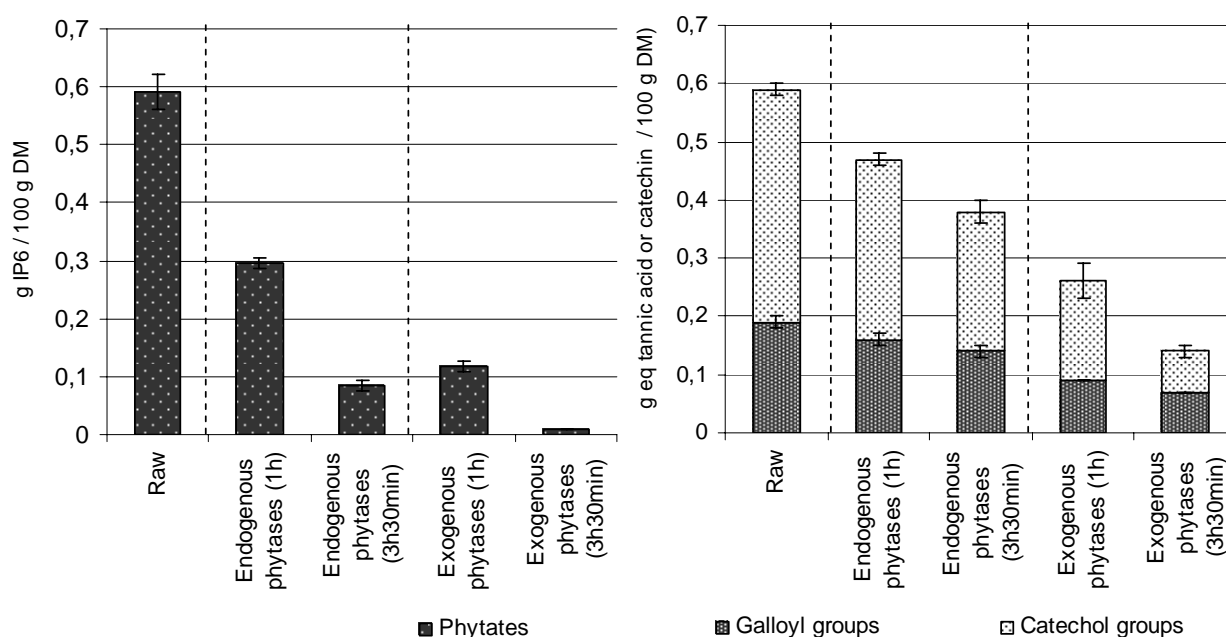


Figure 2. Phytate and iron binding phenolic compound contents (g/100g DM) of whole pearl millet flours with decreased phytate content. Values are means \pm SD of 3 determinations.

In the incubated samples, phytases allowed phytate content to be reduced from 50% to 99% depending on the conditions. The reduction in phytate content was significantly improved by an increase in the length of incubation ($P < 0.0001$) and by the addition of exogenous phytases ($P < 0.0001$). The incubation conditions, with or without addition of exogenous enzymes, also

led to a decrease in the apparent iron binding phenolic compound content of millet flour. In millet flour incubated without exogenous phytase, the decreases in iron binding phenolic compound content (23 and 39% after 1h and 3h30min of incubation, respectively) can be attributed to leaching of soluble tannins into the medium. Alonso *et al.* (25) also reported leaching of tannins throughout soaking stage in legume seeds. In samples incubated with added exogenous phytases, the iron binding phenolic compound content was reduced by 57 and 77% depending on the length of incubation, which cannot be attributed only to leaching. This additional decrease was probably due to complexation phenomena either with proteins added by enzyme preparation (26) or with hydrolysis products released by phytases (i.e., phosphate groups, cations). Indeed, some phenolic compounds are known to link proteins and iron because of their ionic groups (23), and these interactions could hinder their quantification by colorimetric reagents (27).

The phytate, iron binding phenolic compound and fiber contents of grain fractions are presented in Figures 3 and 4.

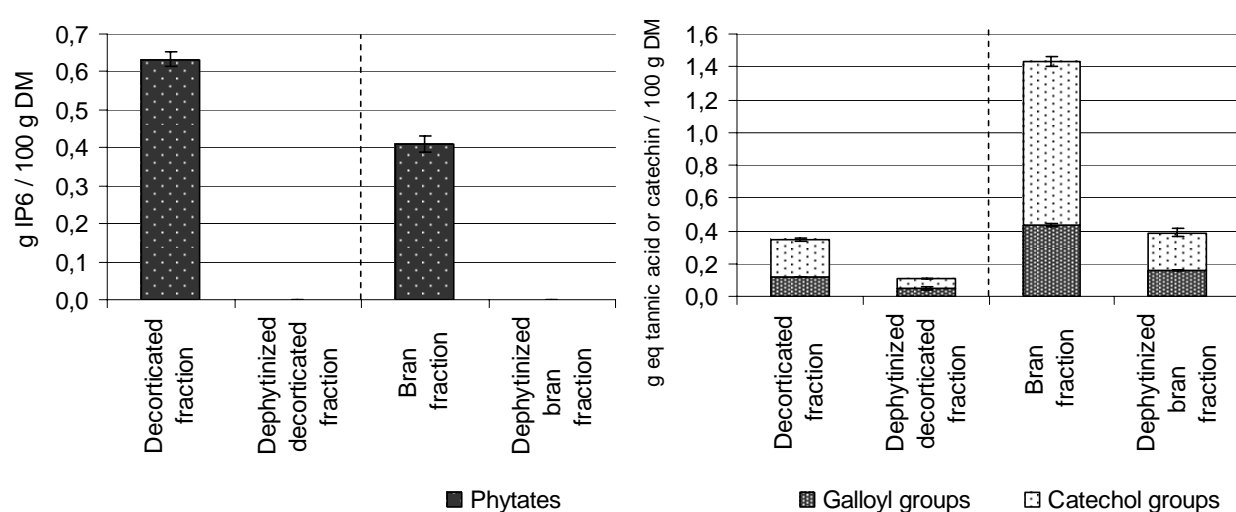


Figure 3. Phytate and iron binding phenolic compound contents (g/100g DM) of pearl millet grain fractions. Values are means \pm SD of 3 determinations.

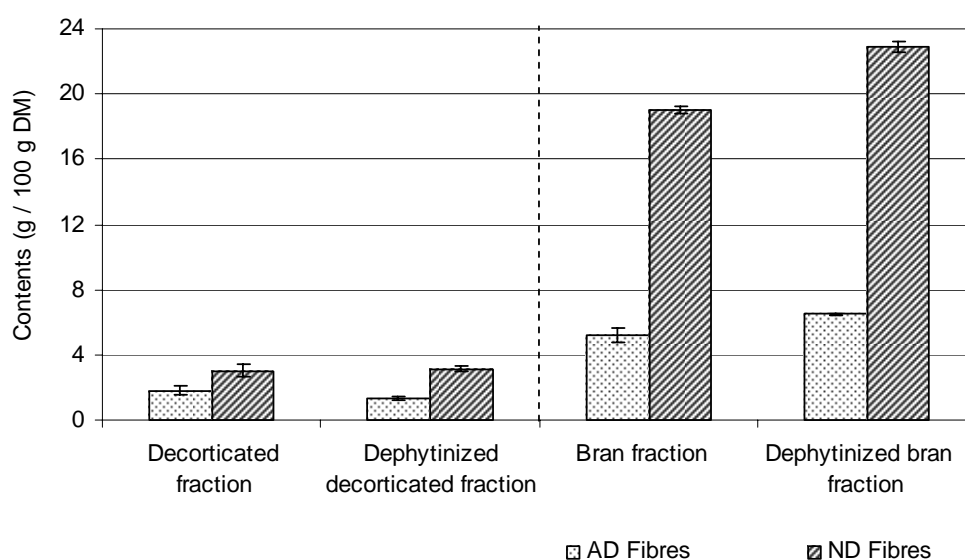


Figure 4. Fiber contents (g/100g DM) of pearl millet grain fractions. Values are means \pm SD of 3 determinations.

As expected, bran fraction showed much higher iron binding phenolic compound (1.43 vs 0.36 g/100gDM) and fiber contents (5.16 vs 1.80 g/100gDM for ADF and 19.05 vs 3.04 g/100gDM for NDF) than decorticated fraction because of the localization of these compounds in the hulls of millet grains. Conversely, the phytate content of bran fraction was lower than that of decorticated fraction (0.409 vs 0.633 g/100gDM) because phytate of pearl millet are mainly located in the germ (28). In both fractions, the treatment with exogenous phytases led to total phytate (IP6) degradation and to a reduction in catechol and galloyl group contents because of their leaching and complexation with the added proteins or hydrolysis products. Fiber contents of grain fractions increased slightly as a result of the treatment. These passive increases can be explained by loss of soluble matter during incubation.

3.2. Effect of phytate degradation on *in vitro* iron and zinc digestibility of pearl millet flour

3.2.1. *In vitro* iron digestibility

Table 1 presents the total and digestible iron contents, as well as iron digestibility and molar ratios of phytate to iron (Phy/Fe) of whole grain and incubated millet flours.

Table 1. Total and digestible iron contents (mg/100g DM), iron digestibility (%) and Phy/Fe molar ratios of whole pearl millet flours with decreased phytate content

Whole pearl millet flours	Total Fe ¹	Digestible Fe ²	% Fe digestible	Phy/Fe molar ratio
Raw	3.15 ± 0.17 a	0.31 ± 0.05 b	9.9 ± 1.4 d	15.9
Endogenous phytases (1h)	2.84 ± 0.19 b	0.63 ± 0.12 a	22.1 ± 4.1 ab	8.8
Endogenous phytases (3h30min)	2.86 ± 0.04 b	0.69 ± 0.02 a	24.1 ± 0.7 a	2.5
Exogenous phytases (1h)	3.07 ± 0.05 ab	0.55 ± 0.05 a	17.7 ± 1.5 c	3.3
Exogenous phytases (3h30min)	3.25 ± 0.04 a	0.70 ± 0.10 a	21.4 ± 2.9 ab	0.2

¹ Values are means ± SD of 3 determinations.

² Values are means ± SD of 3 determinations performed on 3 independent digests.

Values with no common letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$) as assessed by Duncan's multiple range test.

The treatments without exogenous enzymes significantly decreased ($P \leq 0.05$) the total iron content of millet flour from 3.15 to 2.84 mg/100gDM because of iron leaching into the medium (29). By contrast, when exogenous phytases were added, the total iron content was apparently less affected, which could mean that iron is impounded by the added proteins in the same way as tannins are complexed.

In whole pearl millet flour, 9.9% of iron was found to be digestible *in vitro* in a gastrointestinal digestion simulation. This value is quite high related to values of *in vitro* soluble or accessible iron, from 3.0 to 4.0%, usually found in the literature for cereals as finger millet, sorghum, rye or oat after *in vitro* digestion and centrifugation (26, 30). In return, this result is close to values of ionizable iron obtained with the method of Rao and Prabhavathi (31) (from

7.1% for pearl millet to 15.0% for rice) which have been shown to correlate highly with percent iron absorption observed in humans.

Each treatment reduced the Phy/Fe molar ratio from 15.9 to 0.2 and significantly increased *in vitro* iron digestibility as shown by Duncan's test ($P \leq 0.05$). Phytate hydrolysis may result in the production of lower inositol phosphates. Some of them may inhibit *in vitro* iron availability (32) as well as absorption (33), but our results do not allow us to conclude on this subject because these degradation products have not been quantified.

The increase in *in vitro* iron digestibility after Phy/Fe molar ratio reduction is in accordance with the results of Saha *et al.* (34) who showed that absorption of radio-labeled iron increased significantly when rats were fed test meals with Phy/Fe molar ratios lower than 14. However, in terms of phytate content, we noticed that a reduction in IP6 content of pearl millet flour from 592 to 296 mg/100g DM led to a doubled *in vitro* digestibility of iron which was not more improved by stronger IP6 content reductions (up to 8 mg/100g DM). This is not in agreement with the dose-dependent inhibitory effect of phytate reported by Hallberg *et al.* (35) on human iron absorption by adding 2 to 250 mg of sodium phytate to wheat rolls. Our results also differ from those of Brune *et al.* (36), as well as Hurrell *et al.* (37), who showed that even low total inositol phosphate amounts strongly inhibit iron absorption in humans fed cereal bread and soy isolates, respectively. Furthermore, a recent study (38) showed that reduction of phytate content of a complementary cereal-based food (from 1150 to 660 mg/100g DM) led to an increase in *in vitro* iron solubility (from 4.8 to 18.8%) but had no effect on hemoglobin status of infants from 6-12 months of age. So, an increase in *in vitro* iron solubility after incomplete phytate degradation does not guarantee an increase in iron absorption and therefore in iron status of humans consuming phytate containing foods. These discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies may be attributed to absence of simulation of the intestinal absorption and/or its physiologic regulation mechanisms in the *in vitro* digestion systems. *In vitro* studies are useful to provide knowledge on mineral and anti-nutritional factor interactions, or on efficiency of a technological process related to another in improving mineral solubility, but they can not be substituted for *in vivo* studies.

Two-way analysis of variance did not show an effect either of the addition of exogenous phytases or of the length of the incubation period on iron digestibility of millet flour. This is explained by the slight variation in iron digestibility at low phytate contents. Therefore, it seems that the addition of exogenous enzyme preparation led to interactions between phytases, phenolic compounds and iron. This could be the reason why *in vitro* digestibility of iron is lower in this case, in spite of the stronger phytate degradation, than in the case of incubation just with buffer.

3.2.2. *In vitro* zinc digestibility

Total and digestible zinc contents, as well as zinc digestibility and molar ratios of phytate to zinc (Phy/Zn) of whole and incubated millet flours are presented in Table 2.

Both treatments (with or without exogenous phytases) had the same effect on total zinc content of millet flour, which was reduced by 22 and 38% after a short and long incubation period, respectively. Hence, contrary to what was observed for iron, addition of exogenous enzymes had no effect on total zinc content, whereas the longer incubation period significantly reduced it ($P < 0.0001$) because of gradual zinc leaching into the medium (29).

Zinc digestibility of whole grain millet flour was 14.2% with a Phy/Zn molar ratio of 23.2. Concerning phytate degradation by endogenous phytases, zinc digestibility was increased to 23.8 and 27.4% after incubation for 1h and 3h30min, respectively. These results agree with those of Davies and Olpin (39) or Saha *et al.* (34) who showed in rat that a decrease in the molar ratio Phy/Zn to values below 15 improved zinc absorption. Nävert *et al.* (40) also

observed an increase in zinc absorption from 9.6 to 19.8% in their study on human subjects fed wheat rolls containing phytate contents of 0.66 to 0.15% (decreasing Phy/Zn molar ratios from 17 to 4). However, in millet flours treated with exogenous phytases, a decrease in the Phy/Zn molar ratio from 23.2 to 6.0 did not allow an improvement in zinc digestibility. This result was confirmed by the significant interaction ($P < 0.05$) found between the addition of exogenous phytases and the length of the incubation period according to results of two-way analysis of variance. Thus, as for iron, it appears that the added proteins interact with the zinc in the millet flour and prevent its solubilization in spite of phytate degradation. This can be explained by the fact that zinc is known to catalyze a lot of enzymatic activities among which the activity of many phosphatases (41). A review by Matsui (42), already reported that zinc bioavailability was not increased by addition of exogenous phytases in a number of animal studies. Conversely, after the longer incubation period with exogenous phytases, an improvement in zinc digestibility (from 17.1 to 31.0%) was observed. This can be explained by the fact that, in this case, in spite of the presence of exogenous proteins, all the inositol phosphates (inositol hexaphosphate but also the lower inositol phosphates) were degraded, as it could be noted from the chromatographic profile which did not present any peak. Some of the hydrolysis products of IP6, particularly IP5 and maybe IP4 and IP3, also participate indeed in the inhibition of zinc availability (43, 44, 45). Furthermore, it is interesting to note that this improvement was not significantly higher than that obtained after phytate degradation by endogenous phytases (27.4%). Hence, our results agree with the conclusions of Hurrell (46) that incomplete degradation of phytate (IP6) is an effective way to double the digestibility of zinc.

Table 2. Total and digestible zinc contents (mg/100g DM), zinc digestibility (%) and Phy/Zn molar ratios of whole pearl millet flours with decreased phytate content

Whole pearl millet flours	Total Zn ¹	Digestible Zn ²	% Zn digestible	Phy/Zn molar ratio
Raw	2.51 ± 0.01 a	0.36 ± 0.08 ab	14.2 ± 3.0 c	23.2
Endogenous phytases (1h)	1.96 ± 0.01 b	0.47 ± 0.07 a	23.8 ± 3.7 b	14.9
Endogenous phytases (3h30min)	1.57 ± 0.01 c	0.43 ± 0.04 ab	27.4 ± 2.3 ab	5.3
Exogenous phytases (1h)	1.95 ± 0.01 b	0.32 ± 0.02 b	17.1 ± 0.6 c	6.0
Exogenous phytases (3h30min)	1.56 ± 0.07 c	0.48 ± 0.07 a	31.0 ± 4.6 a	0.5

¹ Values are means ± SD of 3 determinations.

² Values are means ± SD of 3 determinations performed on 3 independent digests.

Values with no common letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$) as assessed by Duncan's multiple range test.

3.3. Effect of total phytate degradation on *in vitro* iron and zinc digestibility of pearl millet fractions with low and high tannin and fiber contents

3.3.1. *In vitro* iron digestibility

Table 3 presents total and digestible iron contents, as well as iron digestibility and molar ratios of phytate to iron (Phy/Fe) of non-dephytinized and dephytinized grain fractions.

Table 3. Total and digestible iron contents (mg/100g DM), iron digestibility (%) and Phy/Fe molar ratios of pearl millet grain fractions

Pearl millet grain fractions	Total Fe ¹	Digestible Fe ²	% Fe digestible	Phy/Fe molar ratio
Decorticated fraction	1.91 ± 0.09 c	0.26 ± 0.08 c	13.8 ± 4.2 b	28.1
Dephytinized decorticated fraction	1.55 ± 0.12 d	0.57 ± 0.03 b	36.8 ± 1.3 a	0.1
Bran fraction	4.64 ± 0.27 b	0.66 ± 0.12 b	14.3 ± 2.7 b	7.5
Dephytinized bran fraction	5.72 ± 0.10 a	0.94 ± 0.21 a	16.4 ± 3.7 b	0.0

¹ Values are means ± SD of 3 determinations.

² Values are means ± SD of 3 determinations performed on 3 independent digests.

Values with no common letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$) as assessed by Duncan's multiple range test.

Because of the high iron content of the hulls of pearl millet grains, total iron content of bran fraction was significantly higher than that of decorticated fraction (4.64 vs 1.91 mg/100g DM). After incubation with exogenous phytases, this difference was still greater as decorticated fraction total iron content decreased to 1.55 mg/100g DM, while that of bran fraction increased to 5.72 mg/100g DM. Consequently, part of the iron of decorticated fraction must leach into the medium during incubation, while iron of bran fraction seems to be impounded in the material what leads to an apparent increase in the total iron content because of the concomitant loss in soluble components. This result agrees with the fact that total iron content of whole grain millet flour was not decreased by leaching when exogenous phytases were added for the incubation. As bran fraction displayed high catechol and galloyl group and fiber contents, these components are potential candidates for such iron impoundment.

This assumption was confirmed by studies of iron digestibility of non-dephytinized and dephytinized fractions. Although the molar ratios of Phy/Fe of non-dephytinized fractions were very different (28.1 and 7.5 for decorticated and bran fraction, respectively), no difference was observed in their iron digestibility, which was around 14%. Moreover, dephytinization of grain fractions led to a considerable increase in iron digestibility of decorticated fraction (from 13.8 to 36.8%), while that of bran fraction was not significantly changed according to Duncan's test ($P \leq 0.05$). This was confirmed by two-way analysis of variance that revealed a significant interaction between the nature of the fraction and dephytinization ($P < 0.0005$). These results can be attributed to the negative effects of iron binding phenolic compounds or fibers present in large amounts in bran fraction. In their study on human subjects fed low- and high-tannin sorghum porridges, Hurrell *et al.* (7) showed that, after dephytinization, iron absorption was increased almost two-fold in comparison with low-tannin porridge, while no significant change was noted in high-tannin porridge. Indeed, as seen in the first part of this work and reported by other studies, phenolic compounds are able to link with metal cations through their carboxyl and hydroxyl groups (17, 47) and have an inhibitory effect on iron bioavailability (9, 48). Concerning fibers, Olivares *et al.* (10) reported their significant effect on *in vitro* iron bioavailability in complementary foods which was low when total fiber content was high. However, several other studies rather attribute the observed effect of fibers on mineral absorption to phytates which occur together with fibers in fiber-rich diets (36, 49).

Our results showed that iron digestibility of bran fraction was not only limited by phytate but also by the other anti-nutritional factors, and both iron binding phenolic compounds and fibers could be responsible for the inhibition of iron digestibility. This also pointed out that the

molar ratio of Phy/Fe was not a sufficient indicator of iron bioavailability if the levels of anti-nutritional factors other than phytate were high.

3.3.2. *In vitro* zinc digestibility

Total and digestible zinc contents, as well as zinc digestibility and molar ratios of phytate to zinc (Phy/Zn) of non-dephytinized and dephytinized grain fractions are presented in Table 4.

Table 4. Total and digestible zinc contents (mg/100g DM), zinc digestibility (%) and Phy/Zn molar ratios of pearl millet grain fractions

Pearl millet grain fractions	Total Zn ¹	Digestible Zn ²	% Zn digestible	Phy/Zn molar ratio
Decorticated fraction	1.99 ± 0.03 b	0.33 ± 0.06 c	16.4 ± 2.8 c	31.3
Dephytinized decorticated fraction	1.02 ± 0.02 c	0.46 ± 0.04 b	45.2 ± 3.0 a	0.1
Bran fraction	2.95 ± 0.05 a	0.66 ± 0.07 a	22.5 ± 2.4 b	13.7
Dephytinized bran fraction	1.99 ± 0.06 b	0.45 ± 0.10 bc	22.7 ± 4.9 b	0.0

¹ Values are means ± SD of 3 determinations.

² Values are means ± SD of 3 determinations performed on 3 independent digests.

Values with no common letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$) as assessed by Duncan's multiple range test.

As for total iron content, the total zinc content of bran fraction was higher than that of decorticated fraction but to a lesser extent (2.95 and 1.99 mg/100g DM, respectively), as zinc is distributed more uniformly than iron in pearl millet grain. For both fractions, treatment with phytases led to significant decreases in total zinc contents by leaching into the medium, as has already been observed in millet flours.

In non-dephytinized grain fractions, zinc digestibility of bran fraction was significantly higher ($P \leq 0.05$) than that of decorticated fraction with 22.5 and 16.4%, respectively. This difference may be related to the high molar ratio of Phy/Zn of decorticated fraction (31.3) compared with that of bran fraction which is slightly lower than 15. This result indicates that phytates play an important role in reducing zinc bioavailability in the core of pearl millet grain, what was confirmed by the increase from 16.4 to 45.2% in zinc digestibility observed after dephytinization of decorticated fraction. As for iron, a significant interaction between the nature of the fraction and dephytinization ($P < 0.0001$) was observed as zinc digestibility of bran fraction was not significantly changed after dephytinization. Few studies have investigated the effect of tannins on zinc absorption, but they appear to have little influence (50). On the other hand, the inhibitory effect of certain fibers such as hemicelluloses, cellulose or wheat bran has been reported (8, 51), although there is no consensus about the effect of fibers. Indeed, a beneficial effect on zinc absorption was found by Hara *et al.* (52) after the addition of fibers from corn husk in rat diets.

Thus, in peripheral parts of pearl millet grain, zinc digestibility also appears limited by other compounds than phytate and the effect of fibers and iron binding phenolic compounds on zinc digestibility should be further examined.

4. Conclusion

Phytate degradation occurring during incubation allows *in vitro* iron and zinc digestibilities of pearl millet flour to be doubled. The addition of exogenous phytases did not lead to additional improvement in iron and zinc digestibility compared to that obtained after action of endogenous phytases. A reduction of iron and zinc digestibilities was even observed in some cases indicating that this protein addition may affect mineral accessibility by changing molecule interactions in the food matrix. Furthermore, phytate are not the only components that reduce iron and zinc bioavailability in pearl millet grain. A large proportion of iron and zinc located in the core of the millet grain are chelated to phytate, but iron and zinc located in the hulls appear to be more closely linked to fibers and/or to iron binding phenolic compounds. To further investigate the effects of anti-nutritional factors on iron and zinc bioavailability, *in vitro* studies using a more specific enzymatic approach should be undertaken and will likely provide interesting results about mineral and chelator interactions. In the longer term, a study taking into account the complex physiological conditions of gastric digestion, followed by the simulation of intestinal absorption using Caco-2 cell culture model, could be performed in order to confirm these anti-nutritional factor and mineral interactions.

Acknowledgements

The authors wish to thank the INERA station of Kamboincé (CNRST, Burkina Faso) for providing pearl millet grains, M. Chaurand (INRA, Montpellier) and I. Rochette for technical assistance with laboratory hulling and HPIC analyses of phytate, respectively. Our thanks to J.P. Guyot, C. Icard-Vernière and M. Moursi for their help.

This work is part of the Cerefer project (www.mpl.ird.fr/cerefer) funded by the European Commission contract N° ICA4-CT-2002-10047.

References

- (1) FAO. Agricultural data: FAOSTAT. **2004**, <http://faostat.fao.org/faostat/default.jsp> (accessed July 2004).
- (2) Sandstead, H.H. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J. Nutr.* **2000**, 130, 347S-349S.
- (3) The micronutrient initiative and UNICEF. Vitamin and mineral deficiency: A global progress report. **2004**, http://www.micronutrient.org/reports/reports/Full_e.pdf (accessed January 2005).
- (4) Monsen, E.R.; Hallberg, G.L.; Layrisse, M.; Hegsted, D.M.; Cook, J.D.; Mertz, W.; Finch, C.A. Estimation of available dietary iron. *Am. J. Clin. Nutr.* **1978**, 31, 134-141.
- (5) Manary, M.J.; Hotz, C.; Krebs, N.F.; Gibson, R.S.; Westcott, J.E.; Arnold, T.; Broadhead, R.L.; Hambidge, K.M. Dietary phytate reduction improves zinc absorption in Malawian children recovering from tuberculosis but not in well children. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2959-2964.
- (6) Larsson, M.; Rossander-Hultén, L.; Sandström, B.; Sandberg, A.S. Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *Br. J. Nutr.* **1996**, 76, 677-688.

- (7) Hurrell, R.F.; Reddy, M.B.; Juillerat, M.A.; Cook, J.D. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1213-1219.
- (8) Bagheri, S.; Fontaine, N.; Pointillard, A.; Guéguen, L. Influence des fibres et des phytates sur l'utilisation des minéraux chez le Porc. In *Physiologie digestive chez le Porc*; Laplace, J.P., Corring, T., Rerat, A., Eds.; Institut National de la Recherche Agronomique : Paris, France, 1982, pp. 247-260.
- (9) Gilloly, M.; Bothwell, T.H.; Charlton, R.W.; Torrance, J.D.; Bezwoda, W.R.; Mac Phail, A.P.; Derman, D.P.; Novelli, L.; Morral, D.; Mayet, F. Factors affecting the absorption of iron from cereals. *Br. J. Nutr.* **1984**, *51*, 37-46.
- (10) Olivares, A.B.; Martinez, C.; Lopez, G.; Ros, G. Influence of the design of a product on *in vitro* mineral availability of homogenized weaning foods. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2001**, *2*, 181-187.
- (11) Glahn, R.P.; Wortley, G.M.; South, P.K.; Miller, D.D. Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl₂: Studies using an *in vitro* digestion / Caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 390-395.
- (12) Miller, D.D.; Schrickler, B.R.; Rasmussen, R.R.; Van Campen, D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, *34*, 2248-2256.
- (13) Bermejo, P.; Pena, E.M.; Dominguez, R.; Bermejo, A.; Cocho, J.A.; Fraga, J.M. Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an *in vitro* method. *Food Chem.* **2002**, *77*, 361-369.
- (14) Forbes, A.L.; Adams, C.E.; Arnaud, M.J.; Chichester, C.O.; Cook, J.D.; Harrison, B.N.; Hurrell, R.F.; Kahn, S.G.; Morris, E.R.; Tanner, J.T.; Whittaker, P. Comparison of *in vitro*, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *49*, 225-238.
- (15) Van Soest, P.S. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II- A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1963**, *46*, 829-835.
- (16) Van Soest, P.S.; Wine, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV- Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1967**, *50*, 50-55.
- (17) Brune, M.; Rossander, L.; Hallberg, L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. [Eur. J. Clin. Nutr.](#) **1989**, *43*, 547-57.
- (18) Talamond, P.; Doulebeau, S.; Rochette, I.; Guyot, J.P.; Trèche, S. Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *J. Chromatogr. A* **2000**, *871*, 7-12.
- (19) Laporte, J.; Kovacsik, G.; Pinta, M. Milieux végétaux. In *Spectrométrie d'absorption atomique*, 2nd edition; Pinta, M., Ed.; Masson ORSTOM: Paris, France, 1980, Vol. 2, pp. 378-421.
- (20) Lönnerdal, B.; Yuen, M.; Glazier, C.; Litov, R. Magnesium bioavailability from human milk, cow milk, and infant formula in suckling rat pups. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *58*, 392-397.
- (21) Glahn, R.P.; Rassier, M.; Goldman, M.I.; Lee, O.A.; Cha, J. A comparison of iron availability from commercial iron preparations using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 62-68.
- (22) Wolfgor, R.; Drago, S.R.; Rodriguez, V.; Pellegrino, N.R.; Valencia, M.E. *In vitro* measurement of available iron in fortified foods. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 85-90.
- (23) Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317-333.

- (24) Reddy, N.R. Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In *Food phytates*; Reddy, N.R., Sathe, S.K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2002, pp. 25-51.
- (25) Alonso, R.; Aguirre, A.; Marzo, F. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.* **2000**, *68*, 159-165.
- (26) Matuschek, E.; Towo, E.; Svanberg, U. Oxidation of polyphenols in phytate-reduced high-tannin cereals: effect on different phenolic groups and on *in vitro* accessible iron. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5630-8.
- (27) Papadopoulou, A.; Frazier, R. A. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 186-190.
- (28) Simwemba, C.G.; Hosoney, R.C.; Varriano-Marston, E.; Zeleznak, K. Certain B vitamin and phytic acid contents of pearl millet [*Pennisetum americanum* (L.) Leeke]. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 31-34.
- (29) Lestienne, I.; Icard-Vernière, C.; Mouquet, C.; Picq, C.; Trèche, S. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chem.* **2005**, *89*, 421-425.
- (30) Sandberg, A.S.; Svanberg, U. Phytate hydrolysis by phytase in cereals: effects on *in vitro* estimation of iron availability. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 1330-1333.
- (31) Rao, N.B.S.; Prabhavathi, T. An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from foods. *Am. J. Clin. Nutr.* **1978**, *31*, 169-175.
- (32) Sandberg, A.S.; Carlsson, N.G.; Svanberg, U. Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates on *in vitro* estimation of iron availability. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 159-186.
- (33) Sandberg, A.S.; Brune, M.; Carlsson, N.G.; Hallberg, L.; Skoglund, E.; Rossander-Hulthen, L. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 240-246.
- (34) Saha, P.R.; Weaver, C.M.; Mason, A.C. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2531-2535.
- (35) Hallberg, L.; Brune, M.; Rossander, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *49*, 140-144.
- (36) Brune, M.; Rossander-Hulten, L.; Hallberg, L.; Gleerup, A.; Sandberg, A.S. Iron absorption from bread in humans: Inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.* **1992**, *122*, 442-449.
- (37) Hurrell, R.F.; Juillerat, M.A.; Reddy, M.B.; Lynch, S.R.; Dassenko, S.A.; Cook, J.D. Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**, *56*, 573-578.
- (38) Mamiro, P.S.; Kolsteren, P.W.; van Camp, J.H.; Roberfroid, D.A.; Tatala, S.; Opsomer, A.S. Processed complementary food does not improve growth or hemoglobin status of rural Tanzanian infants from 6-12 months of age in Kilosa district, Tanzania. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1084-1090.
- (39) Davies, N.T.; Olpin, S.E. Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *Br. J. Nutr.* **1979**, *41*, 590-603.
- (40) Nävert, B.; Sandström, B.; Cederblad, A. Reduction of phytate content of bran by leavening in bread and its effects on zinc absorption in man. *Br. J. Nutr.* **1985**, *53*, 47-53.
- (41) Coleman, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 441-483.

- (42) Matsui, T. Relationship between mineral bioavailabilities and dietary phytate in animals. *Anim. Sci. J.* **2002**, 73, 21-28.
- (43) Lönnerdal, B.; Sandberg, A.S.; Sandström, B.; Kunz, C. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nutr.* **1989**, 119, 211-214.
- (44) Sandström, B.; Sandberg, A.S. Inhibitory effects of inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **1992**, 6, 99-103.
- (45) Han, O.; Failla, M.L.; Hill, A.D.; Morris, E.R.; Smith, J.C. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *J. Nutr.* **1994**, 124, 580-587.
- (46) Hurrell, R.F. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr.* **2003**, 133, 2973S-2977S.
- (47) Khokhar, S.; Apenten, R.K.O. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem.* **2003**, 81, 133-140.
- (48) Siegenberg, D.; Baynes, R.D.; Bothwell, T.H.; Macfarlane, B.J.; Lamparelli, R.D.; Car, N.G.; Macphail, P.; Schmidt, U.; Tal, A.; Mayet, F. Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, 53, 537-541.
- (49) Martinez, C.; Ros, G.; Periago, M.J.; Ortuno, J.; Lopez, G.; Rincon, F. *In vitro* protein digestibility and mineral availability of green beans (*Phaseolus vulgaris L*) as influenced by variety and pod size. *J. Sci. Food Agri.* **1998**, 77, 414-420.
- (50) Ganji, V.; Kies, C.V. Zinc bioavailability and tea consumption. Studies in healthy humans consuming self-selected and laboratory-controlled diets. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1994**, 46, 267-276.
- (51) Persson, H.; Nair, B.M.; Frolich, W.; Nyman, M.; Asp, N. Binding of mineral elements by some dietary fiber components. *In vitro* (II). *Food Chem.* **1987**, 26, 139-148.
- (52) Hara, H.; Hayashi, K.; Aoyama, Y. Intestinal absorption of zinc is promoted by low-level intake but inhibited by high-level intake of corn husk fiber in rats. *Nutr. Res.* **2001**, 21, 627-637.

**Contribution relative des phytates, des fibres et des tanins
à la faible solubilité *in vitro* du fer et du zinc
de la farine de mil (*Pennisetum glaucum*)**

**Isabelle Lestienne^a, Bertrand Caporiccio^b, Pierre Besançon^b,
Isabelle Rochette^a, Serge Trèche^{a,*}**

^a Centre IRD de Montpellier, UR 106 « Nutrition, Alimentation, Sociétés », BP 64501, 911, Avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^b Équipe « Nutrition et Aliments », EA 3762, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Mots-clés

Complexes – Facteurs anti-nutritionnels – Fer – Zinc – Mil – Approche enzymatique.

* Corresponding author: Tel: (33) 4 67 41 62 95
Fax: (33)4 67 41 63 30
e-mail: treche@mpl.ird.fr

Résumé

Des digestions *in vitro* ont été effectuées sur des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates, ainsi que sur deux fractions de grain de mil, déphytinisées ou non, l'une étant une farine de grains décortiqués (DGF), constituée d'endosperme et de germe et ayant des teneurs faibles en fibres et en tanins, et l'autre une farine composée de parties périphériques du grain de mil (PPF) ayant des teneurs fortes en fibres et en tanins. Les résidus insolubles de ces digestions ont ensuite été incubés dans du tampon ou dans des solutions enzymatiques (xylanases et/ou phytases). Les quantités de fer et de zinc non-digestibles libérables par ces différents traitements ont ensuite été déterminées. Près de 43% du fer de la farine de mil a pu être solubilisé par digestion *in vitro* et action simultanée des xylanases et des phytases, contre environ 24% lorsque la digestion était suivie du traitement avec le tampon ou seulement l'une des deux enzymes, indiquant la probable chélation du fer par des complexes fibres-phytates. En revanche, le zinc est apparu être principalement chélaté par les phytates, dans la mesure où plus ils étaient dégradés avant digestion, plus la solubilité du zinc était importante. Toutefois, dans les échantillons à faibles teneurs en phytates, la dégradation des fibres a permis d'augmenter la solubilisation du zinc. Par ailleurs, le peu d'effet de l'action des phytases, non seulement sur la solubilité du fer, mais aussi sur celle du zinc, des parties périphériques du grain de mil (PPF), a permis de mettre en évidence, dans le cas de teneurs élevées en tanins et en fibres, la prépondérance de l'effet de ces composés sur celui des phytates.

1. Introduction

La biodisponibilité d'un nutriment contenu dans un aliment est la proportion de ce nutriment qui est effectivement utilisable pour assurer les fonctions de l'organisme. Trois mécanismes entrent en jeu : (i) l'absorption par les cellules de l'intestin, (ii) le transport vers les organes et (iii) l'utilisation par l'organisme. Dans les produits à base de céréales ou de légumineuses, les disponibilités du fer et du zinc à être absorbé sont faibles en raison de la présence de facteurs anti-nutritionnels (FAN) dans les grains. Les phytates, les tanins, ainsi que certaines fibres insolubles, sont les principaux composés pouvant interagir avec le fer et le zinc (Gilloly *et al.*, 1984 ; Camara et Amaro, 2003). La présence, sur ces molécules, de groupements chargés négativement leur permet de former des complexes, le plus souvent insolubles, avec les cations divalents, qui ne sont donc plus absorbables au cours de la digestion intestinale. Ces complexes peuvent être constitués de deux, voir de plusieurs composés. En effet, il peut s'agir soit, de complexes FAN-minéral simples, soit de complexes mettant en jeu des FAN interagissant entre eux ou avec d'autres composés de la matrice. Certains auteurs reportent que les phytates et les fibres, par exemple, sont associés dans les grains de céréales (Reddy, 2002). La dernière définition des fibres proposée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) inclut, d'ailleurs, les phytates dans le terme « fibres » en tant que constituants associés aux fibres (Champ, 2003). Il existe donc des complexes fibres-phytates capables de chélater les minéraux, donnant ainsi des complexes fibres-phytates-minéral. Par ailleurs, les FAN, en particulier les phytates (Wise, 1995) et les tanins fortement polymérisés (Bravo, 1998), sont connus pour leur capacité à complexer les protéines. Les phytates se complexent avec les protéines soit directement, si le pH est inférieur aux pH isoélectriques des protéines, soit indirectement, par le biais d'un cation si le pH est supérieur. Différents types de complexes avec les phytates vont donc exister en fonction du pH. En revanche, cet effet du pH sur la nature des complexes tanins-protéine ou tanins-minéral-protéine n'a pas été mis en évidence.

Dans une étude précédente, nous avons montré que la dégradation totale des phytates permettait de doubler les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc de la farine de mil complète, mais qu'elle n'avait aucun effet, en revanche, sur les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc des parties périphériques du grain de mil (Lestienne *et al.*, Chapitre V-3). Les enveloppes du grain étant particulièrement riches en tanins, en fibres et en minéraux, les biodisponibilités du fer et du zinc dans ces parties sont donc probablement réduites par la présence de complexes entre ces différents composés.

L'objectif de cette étude était de tenter d'identifier la nature des complexes entre les facteurs anti-nutritionnels du grain de mil et le fer et le zinc. Pour cela, nous avons évalué l'effet de l'action d'enzymes dégradant les fibres et/ou les phytates sur la solubilisation du fer et du zinc des résidus insolubles de digestion *in vitro*, dans un premier temps, d'échantillons de farine de mil à teneurs variables en phytates et, dans un second temps, dans des fractions de grain de mil à teneurs faibles ou fortes en tanins et en fibres, après dégradation totale ou non des phytates.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Deux types d'échantillons ont été utilisés : (i) des échantillons issus d'une farine de mil complète contenant des teneurs en phytates réduites par traitement enzymatique et (ii) des échantillons, déphytinisés ou non, issus de deux fractions de grain de mil : une fraction de grains décortiqués (DGF) à teneurs faibles en tanins et en fibres et une fraction constituée de parties périphériques du grain (PPF) à teneurs fortes en tanins et en fibres. La préparation de ces échantillons, ainsi que leurs teneurs en fer et zinc totaux et leurs digestibilités en fer et en zinc, sont donnés dans un article précédent (Lestienne *et al.*, Chapitre V-3).

Les teneurs en facteurs anti-nutritionnels de ces échantillons sont rappelées dans le tableau 1.

Table 1. Teneurs en phytates, tanins et fibres (ADF et NDF) des échantillons (g/100g DM)^a

	Phytates ^b	Tanins ^b	ADF fibres	NDF fibres
WGF	0.592 ± 0.032	0.602 ± 0.011	3.08 ± 0.28	6.22 ± 0.17
WGF ps	0.296 ± 0.006 (-50)	0.464 ± 0.010 (-23)	2.51 ± 0.23	7.48 ± 0.08
WGF pl	0.084 ± 0.006 (-86)	0.368 ± 0.008 (-39)	2.72 ± 0.04	8.36 ± 0.36
WGF Ps	0.118 ± 0.008 (-80)	0.258 ± 0.022 (-57)	2.23 ± 0.06	6.82 ± 0.04
WGF Pl	0.008 ± 0.000 (-99)	0.140 ± 0.013 (-77)	2.18 ± 0.07	6.86 ± 0.15
DGF	0.633 ± 0.021	0.361 ± 0.01	1.80 ± 0.30	3.04 ± 0.39
DGF Pl	0.002 ± 0.000 (-100)	0.117 ± 0.01 (-70)	1.31 ± 0.11	3.14 ± 0.13
PPF	0.409 ± 0.019	1.427 ± 0.03	5.16 ± 0.39	19.05 ± 0.21
PPF Pl	0.000 ± 0.000 (-100)	0.392 ± 0.01 (-73)	6.54 ± 0.07	22.91 ± 0.34

^a Les valeurs sont les moyennes ± ET de 3 déterminations

^b Les valeurs entre parenthèses sont les pourcentages de réduction des teneurs en phytates ou en tanins dus aux traitements par les phytases endogènes (WGF ps et WGF pl) ou endogènes et exogènes (WGF Ps, WGF Pl, DGF Pl et PPF Pl).

2.2. Teneurs en fer et en zinc totales

Le fer et le zinc ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique (SpectrAA 200, Varian, Victoria, Australia) selon la méthode de Laporte *et al.* (1980). Deux grammes d'échantillon ont été minéralisés par voie sèche pendant 3 h à 530°C dans une capsule en silice. Les cendres ont ensuite été fixées par ajout de 3 ml de solution de HNO₃ évaporé sur plaque chauffante, puis solubilisées dans 25 ml d'HCl 0,5 N. Lorsque les cendres n'étaient pas suffisamment blanches après évaporation de l'acide nitrique, la capsule était remise au four à 530°C pendant 1 h afin de compléter la minéralisation. Les teneurs en fer et en zinc totales ont été déterminées en triple.

2.3. Digestion *in vitro*

Les biodisponibilités du fer et du zinc ont été estimées par leur digestibilité en conditions physiologiques simulées *in vitro* à l'aide d'une méthode basée sur celle de Lönnerdal *et al.* (1993) avec des modifications proposées par différents auteurs dans des travaux plus récents. Juste avant l'utilisation, une solution de pepsine (Sigma, P-7000 ; 14900 u/ml) et une solution de pancréatine (Sigma, P-1750 ; 1.85 mg/ml) – extrait de bile (Sigma, B-8631 ; 11 mg/ml) ont été agitées pendant 30 min avec de la résine Chelex-100 (Bio-Rad, 142-2842) afin d'éliminer les cations présents (Glahn *et al.*, 2000). Les résines ont ensuite été éliminées par filtration sur papier filtre sans cendre Whatman n°41.

Dans un erlenmeyer préalablement nettoyé à l'acide nitrique, environ 2 g de farine ont été dissous dans 20 ml d'eau millipore. Le mélange a été conditionné dans un bain marie à 37°C placé sur un agitateur magnétique multi-poste pendant 5 à 10 min. Le pH a été ajusté à 2 avec une solution de HCl 1 M avant d'ajouter 1 ml de solution de pepsine. Le mélange a été incubé pendant 1 h sous légère agitation. Puis, le pH du digesta gastrique a été augmenté à environ 4,5 avec du tampon PIPES (piperazine-N, N'-bis-[acide 2-ethanesulfonique]) 0,15 mM, avant ajout de 5 ml de la solution de pancréatine–extrait de bile (Wolfgor *et al.*, 2002). Le pH a ensuite été ajusté à 7 avec le même tampon PIPES et le mélange incubé pendant 2 h à 37°C toujours sous légère agitation. Le mélange a ensuite été placé dans la glace jusqu'à refroidissement, puis transvasé en totalité dans un tube et centrifugé à 10000g, pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré dans une capsule en silice, évaporé à 95°C, puis traité comme pour la détermination des teneurs en fer et zinc totales.

2.4. Traitements appliqués aux résidus insolubles de digestion *in vitro*

Afin d'identifier les facteurs responsables de l'inhibition de l'absorption intestinale du fer et du zinc, les résidus insolubles de digestion *in vitro* ont été incubés en présence d'enzymes dégradant les phytates et les fibres. Cette méthode a été inspirée de l'étude de Hocquelliet et L'Hotelier (1997) avec plusieurs modifications.

Des solutions de xylanases (Fluka, 95595 ; 12000 u/l), de phytases (Sigma, P 9792 ; 516 u/l - Sigma, P 1259 ; 144 u/l) et de xylanases et phytases (contenant les mêmes quantités d'enzymes que les solutions précédentes) ont été préparées dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,0. De même que pour la préparation des solutions de pepsine et de pancréatine utilisées pour la digestion gastro-intestinale, ces solutions ont été préparées juste avant utilisation et agitées avec de la résine Chelex-100 (Bio-Rad, 142-2842).

Les différents traitements appliqués aux résidus insolubles de digestion d'un même échantillon sont résumés dans la figure 1.

Douze digestions gastro-intestinales indépendantes ont été réalisées par échantillon de façon à obtenir 12 résidus insolubles sur lesquels ont pu être réalisées 3 répliques de chacun des 4

traitements : incubation dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,0 sans enzyme, dans la solution de xylanases, dans la solution de phytases ou dans la solution de xylanases et phytases. Chaque résidu a été solubilisé dans 20 ml de solution. Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés sous agitation magnétique (100 rpm) dans un bain-marie à 37°C pendant 16 h. Les suspensions ont ensuite été centrifugées à 10000g pendant 30 min à 4°C. Les surnageants ont été récupérés dans des capsules en silice et traités de la même manière que les digesta gastro-intestinaux afin de déterminer les quantités de fer et de zinc libérées par chaque traitement.

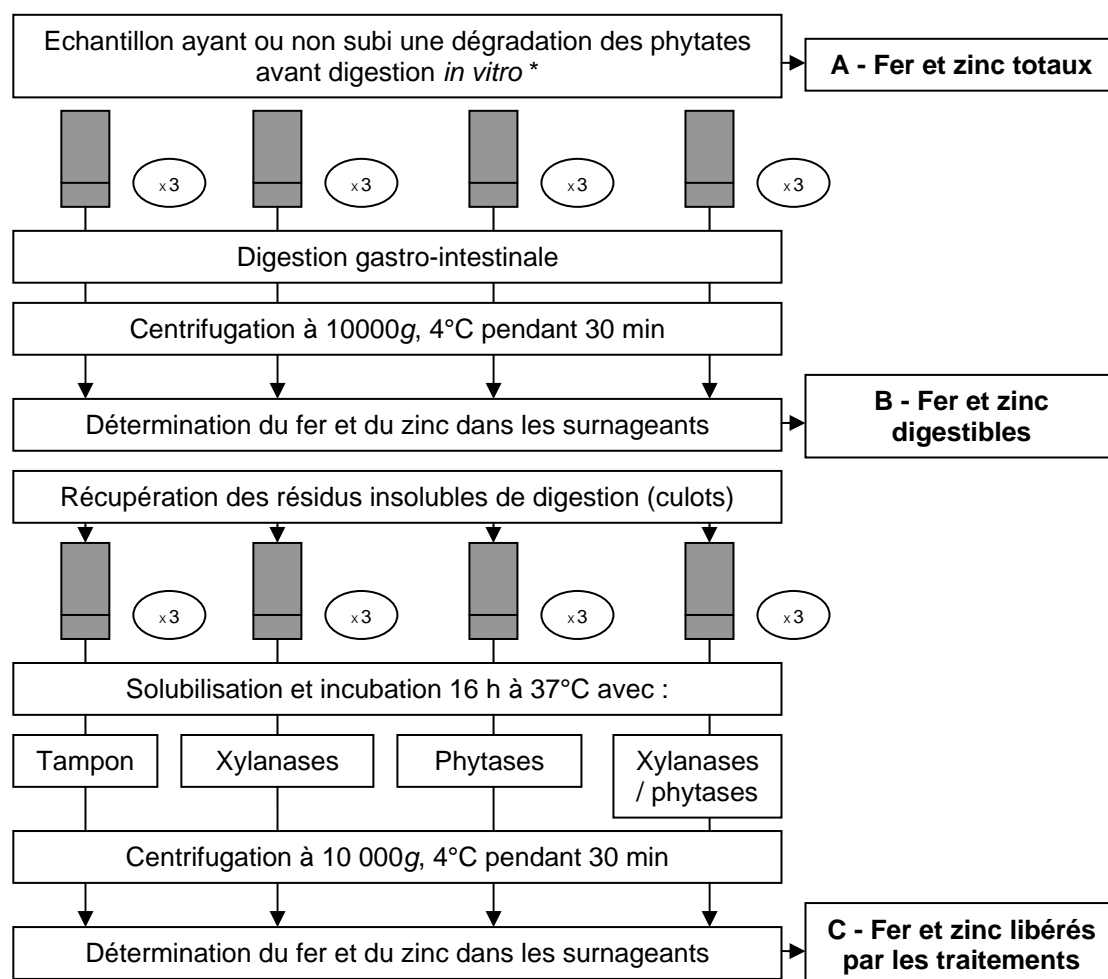


Figure 1. Protocole expérimental

* Pour les échantillons totalement déphytinisés (WGF Pl, DGF Pl et PPF Pl), seuls les traitements avec le tampon et la solution de xylanases ont été réalisés.

2.5. Expression des résultats et analyses statistiques

Les quantités de fer et de zinc totales (A), digestibles (B) et libérées par les différents traitements (C) ont été exprimées en pourcentages par rapport à la matière sèche. Les données présentées sont des moyennes de solubilité \pm écart-type, calculées à partir des quantités de fer libérées, déterminées après 3 répétitions de chaque traitement.

Deux types de représentation ont été utilisés pour présenter les résultats : (i) des histogrammes représentant les solubilités du fer ou du zinc des résidus insolubles après les différents

traitements et (ii) des tableaux donnant les solubilités du fer ou du zinc après l'effet cumulé de la digestion gastro-intestinale et du traitement des résidus insolubles.

Les solubilités présentées sous forme d'histogrammes ont été calculées en divisant la quantité de fer ou de zinc libérée par un traitement (C), par la différence entre la quantité moyenne de fer ou de zinc totale de l'échantillon (A) et la quantité de fer ou de zinc solubilisée lors de la digestion ayant précédé le traitement (B), le tout multiplié par 100. Elles rendent compte de l'effet propre de chacun des traitements appliqués aux résidus insolubles. En revanche, les solubilités présentées dans les tableaux prennent en compte l'effet du traitement appliqué au résidu, ainsi que celui de la digestion gastro-intestinale qui l'a précédé. Elles ont été calculées en divisant la somme des quantités de fer ou de zinc digestible (B) et libérée par un traitement (C) par la quantité moyenne de fer ou de zinc totale de l'échantillon (A) et multiplié par 100.

Des analyses de variance (ANOVA), réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.0 v en utilisant le test de Duncan à un niveau de signification de 95%, ont permis de séparer les moyennes de solubilité présentées dans les tableaux.

3. Résultats et discussion

3.1. Effets des différents facteurs anti-nutritionnels sur la solubilité du fer

3.1.1 Effets des phytates

La figure 2 donne les pourcentages de fer des résidus insolubles des farines de mil rendus solubles après les différents traitements enzymatiques.

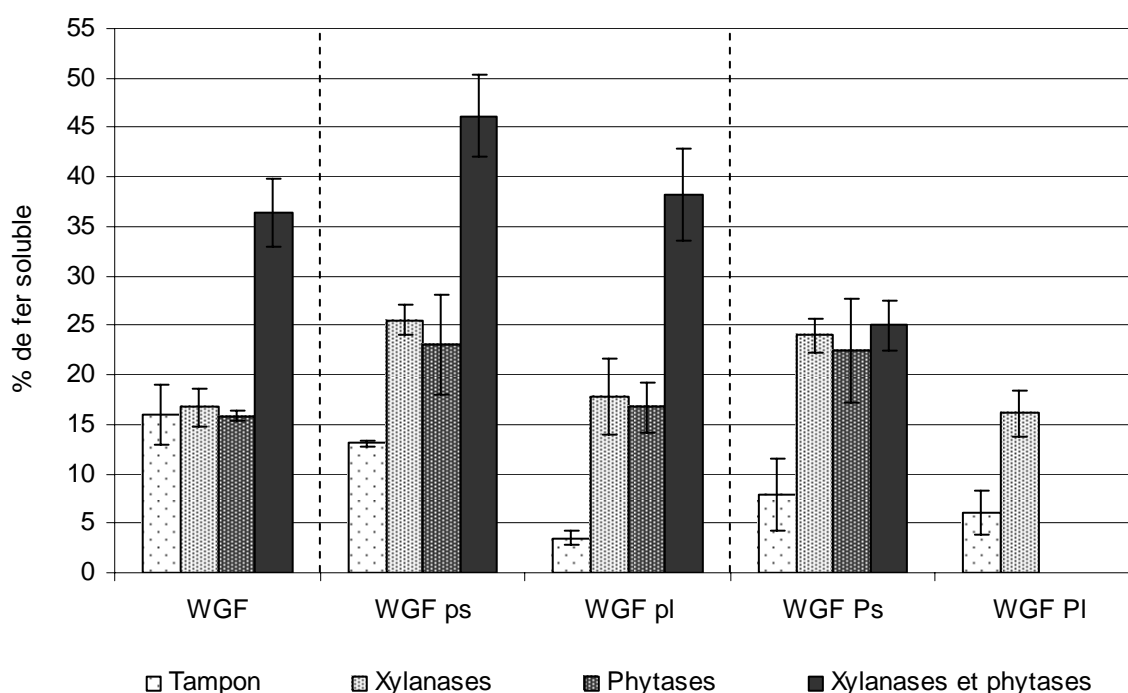


Figure 2. Solubilité du fer non-digestible des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates après traitement des résidus insolubles de digestion.

Les données représentées sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir des quantités de fer digestibles et libérées, déterminées après 3 réplifications de chaque traitement.

Dans le résidu insoluble de digestion de la farine de mil (WGF), la dégradation des fibres ou des phytates ne permet pas de libérer plus de fer que le traitement avec le tampon. En revanche, l'action simultanée des xylanases et des phytases permet de libérer environ 20% de fer en plus de celui libéré avec le traitement sans enzyme. Ainsi, seule la dégradation simultanée des fibres et des phytates permet encore de rendre soluble du fer, ce qui semble indiquer qu'une partie du fer non digestible serait liée à des complexes fibres-phytates.

Dans les échantillons à teneurs réduites en phytates après action des phytases endogènes (WGF ps et pl), la dégradation des fibres ou des phytates permet de solubiliser en moyenne 12% de fer en plus de celui solubilisé par le traitement avec le tampon, tandis que l'action simultanée des 2 enzymes permet toujours de libérer 20% de fer supplémentaire. La dégradation des phytates avant digestion *in vitro* permet donc de faciliter la solubilisation du fer par les phytases et/ou les xylanases. Cependant, l'action prolongée des phytases endogènes ne permet pas de libérer une quantité supérieure de fer et semble même diminuer la quantité de fer soluble dans la farine incubée 3h30 (WGF pl) par rapport à celle incubée 1 h (WGF ps). Une hypothèse pour expliquer cela serait la recomplexation du fer libéré par l'hydrolyse prolongée des phytates par d'autres composés de la matrice comme les tanins ou les protéines qui, en formant de nouveaux complexes avec le fer, diminuerait sa solubilité durant les différents traitements (Macfarlane *et al.*, 1988 ; Brune *et al.*, 1989).

En ce qui concerne les échantillons à teneurs réduites en phytates après action des phytases endogènes et exogènes (WGF Ps et Pl), la dégradation des fibres ou des phytates permet également de solubiliser une quantité plus importante de fer que le traitement avec le tampon, mais l'action simultanée des 2 enzymes, en revanche, ne permet pas une libération supplémentaire de fer. Ainsi, il est possible que les protéines ajoutées participent à la formation de complexes avec le fer qui ne serait donc plus libérable ni par action des xylanases, ni par action des phytases.

Les données du tableau 2, qui présente les résultats de solubilité totale du fer après effet cumulé de la digestion *in vitro* et du traitement des résidus insolubles, montrent également une inhibition de la solubilisation du fer dans les échantillons traités avec les phytases exogènes avant digestion. En effet, dans ces échantillons, les proportions de fer solubilisé après digestion et traitement par les xylanases et par les phytases pour WGF Ps (qui contenait encore des phytates avant digestion) sont plus faibles (38 et 34%) que pour les autres farines de mil après digestion et traitement par les xylanases et les phytases (entre 43 et 58%).

Tableau 2. Solubilité du fer (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates

	Digestion + tampon	Digestion + xylanases	Digestion + phytases	Digestion + xylanases et phytases
WGF	24.4 ± 1.6 b	24.9 ± 2.4 c	24.2 ± 0.8 b	42.7 ± 2.3 c
WGF ps	32.3 ± 3.7 a	42.0 ± 2.4 a	40.2 ± 2.2 a	58.2 ± 2.5 a
WGF pl	26.8 ± 0.7 b	37.6 ± 2.3 b	36.8 ± 1.4 a	53.1 ± 3.1 b
WGF Ps	24.4 ± 1.7 b	37.6 ± 0.7 b	36.4 ± 3.1 a	38.4 ± 2.8 c
WGF Pl	26.2 ± 4.2 b	34.2 ± 1.2 b	/	/

Les valeurs sont les moyennes de solubilité ± ET calculées à partir de la somme des quantités de fer digestibles (3 digestions) et libérées (3 réplifications de chaque traitement appliqué aux résidus insolubles de digestion). Les moyennes ne portant pas la même lettre dans une même colonne sont significativement différentes à $P \leq 0.05$ d'après le test de Duncan.

En résumé, environ 43% du fer de la farine de mil (WGF) peut être solubilisé après digestion *in vitro* et action simultanée des xylanases et des phytases, contre environ 24% seulement après action de l'une ou l'autre des deux enzymes. Une grande partie du fer de la farine de mil semble donc être liée à des complexes fibre-phytate. La dégradation partielle des phytates par action des phytases endogènes avant digestion *in vitro* permet d'augmenter la proportion de fer solubilisable. En revanche, le traitement de la farine de mil par ajout de phytases avant digestion *in vitro* diminue cette proportion de fer solubilisable, probablement en raison d'interactions entre les protéines ajoutées et d'autres composés de la matrice susceptibles de chélater le fer.

3.1.2. Effets des fibres et des tanins

La figure 3 donne les pourcentages de fer contenus dans les résidus insolubles de digestion des fractions de mil à teneurs faibles et fortes en fibres et en tanins rendus solubles après les différents traitements enzymatiques.

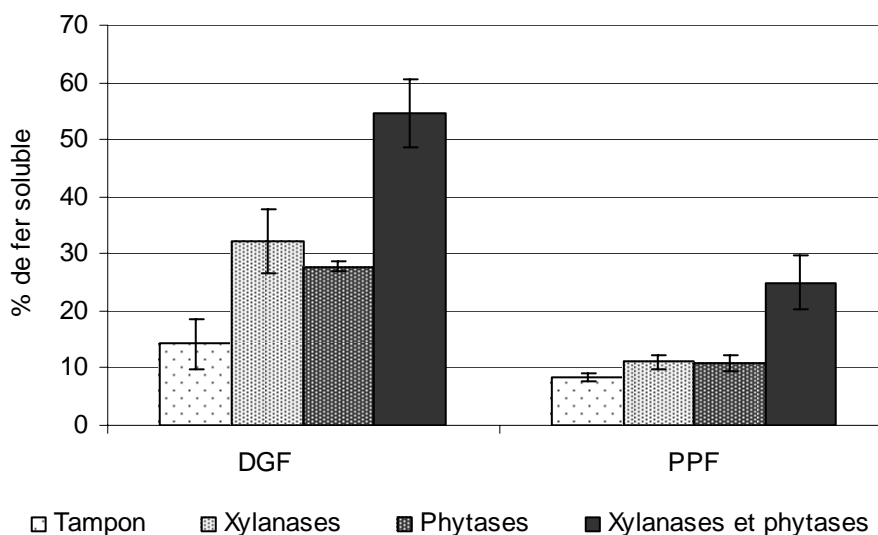


Figure 3. Solubilité du fer non-digestible des fractions de mil à teneurs faibles (DGF) et fortes (PPF) en fibres et en tanins après traitement des résidus insolubles de digestion

Les données représentées sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir des quantités de fer digestibles et libérées, déterminées après 3 répliques de chaque traitement.

L'action des xylanases ou des phytases sur les résidus insolubles de digestion de la fraction à teneurs faibles en fibres et en tanins (DGF) provoque une libération plus importante de fer que le traitement sans enzyme (environ +16% de fer solubilisé). Concernant les résidus de la fraction à teneurs élevées en fibres et en tanins (PPF), on constate également une augmentation de solubilité du fer après action des xylanases ou des phytases, mais de manière beaucoup moins marquée (moins de 3%). Quant à l'action combinée des deux enzymes, elle permet de libérer plus de 20% de fer supplémentaire du résidu de DGF et plus de 15% de celui de PPF.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur les résidus des fractions déphytinisées (Figure 4), puisque, pour les deux fractions, la quantité de fer libérée par le traitement avec le tampon est très faible, tandis que l'action des xylanases permet de libérer respectivement plus de 40 et de 20% du fer des résidus de DGF PI et de PPF PI.

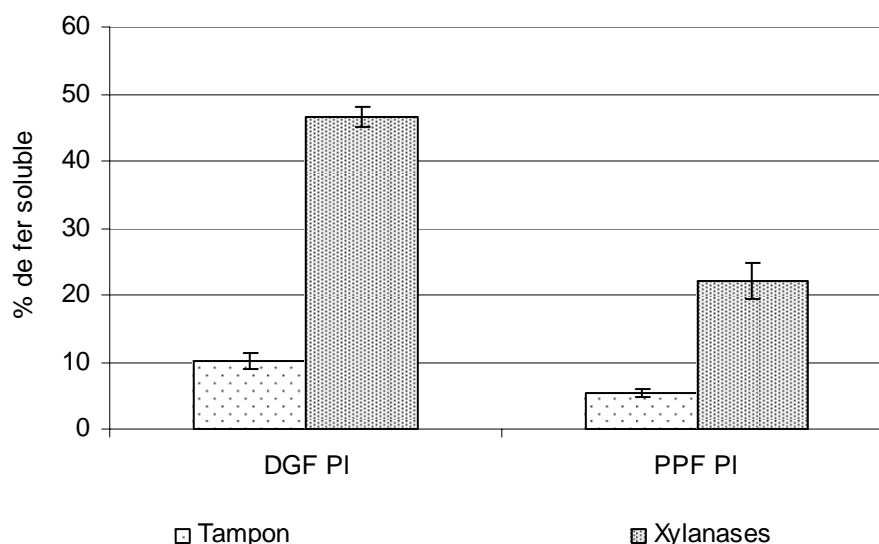


Figure 4. Solubilité du fer non-digestible des fractions de mil déphytinisées après traitement des résidus insolubles de digestion

Les données représentées sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir des quantités de fer digestibles et libérées, déterminées après 3 réplifications de chaque traitement.

Ainsi, il semble qu'il n'y ait pas de grande différence concernant la nature des complexes majoritairement présents dans les parties centrales et périphériques du grain de mil, étant donné que, dans les deux fractions, le fer apparaît comme étant principalement insolubilisé par des complexes faisant intervenir à la fois les phytates et les fibres.

Si l'on additionne les quantités de fer digestible et libérable (Tableau 3), on remarque que l'action simultanée des xylanases et des phytases permet de solubiliser 61% du fer de DGF et 36% du fer de PPF. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après traitement par les xylanases des résidus insolubles des fractions déphytinisées (66% et 35%, respectivement pour DGF PI et PPF PI). La grande différence de solubilité du fer entre les deux fractions après ces traitements peut être attribuée à la teneur en tanins beaucoup plus importante dans PPF que dans DGF (1,43 vs 0,36 g/100g MS). En effet, des études ont déjà montré que l'effet inhibiteur des tanins sur l'absorption du fer était dépendant de la concentration en tanins (Siegenberg *et al.*, 1991 ; Glahn *et al.*, 2002).

Tableau 3. Solubilité du fer (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des fractions de mil non-déphytinisées et déphytinisées

	Digestion + tampon	Digestion + xylanases	Digestion + phytases	Digestion + xylanases et phytases
DGF	26.1 \pm 2.3 b	41.6 \pm 2.5 b	37.6 \pm 3.7 a	60.8 \pm 5.5 a
PPF	21.4 \pm 3.0 b	23.8 \pm 1.8 d	23.5 \pm 1.6 b	35.7 \pm 3.3 b
DGF PI	43.2 \pm 1.7 a	66.2 \pm 0.4 a	/	/
PPF PI	21.0 \pm 3.8 b	34.9 \pm 1.4 c	/	/

Les valeurs sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir de la somme des quantités de fer digestibles (3 digestions) et libérées (3 réplifications de chaque traitement appliqué aux résidus insolubles de digestion). Les moyennes ne portant pas la même lettre dans une même colonne sont significativement différentes à $P \leq 0.05$ d'après le test de Duncan.

Ainsi, la dégradation enzymatique des phytates et des fibres permet de rendre soluble autour de 63 et 35% du fer contenu, respectivement, dans les parties centrales (endosperme et germe) et périphériques du grain de mil, contre environ les 2/3 après action de l'une ou l'autre des deux enzymes (autour de 41 et 23%, respectivement pour DGF et PPF). Les résultats de l'étude de ces fractions tendent donc à confirmer la présence de complexes fibre-phytate-fer dans le grain de mil et semblent montrer également l'existence de complexes tanin-fer rendant insolubles la majorité du fer contenu dans les parties périphériques du grain.

3.2. Effets des différents facteurs anti-nutritionnels sur la solubilité du zinc

3.2.1. Effets des phytates

La figure 5 donne les pourcentages de zinc des résidus insolubles des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates rendus solubles après les différents traitements.

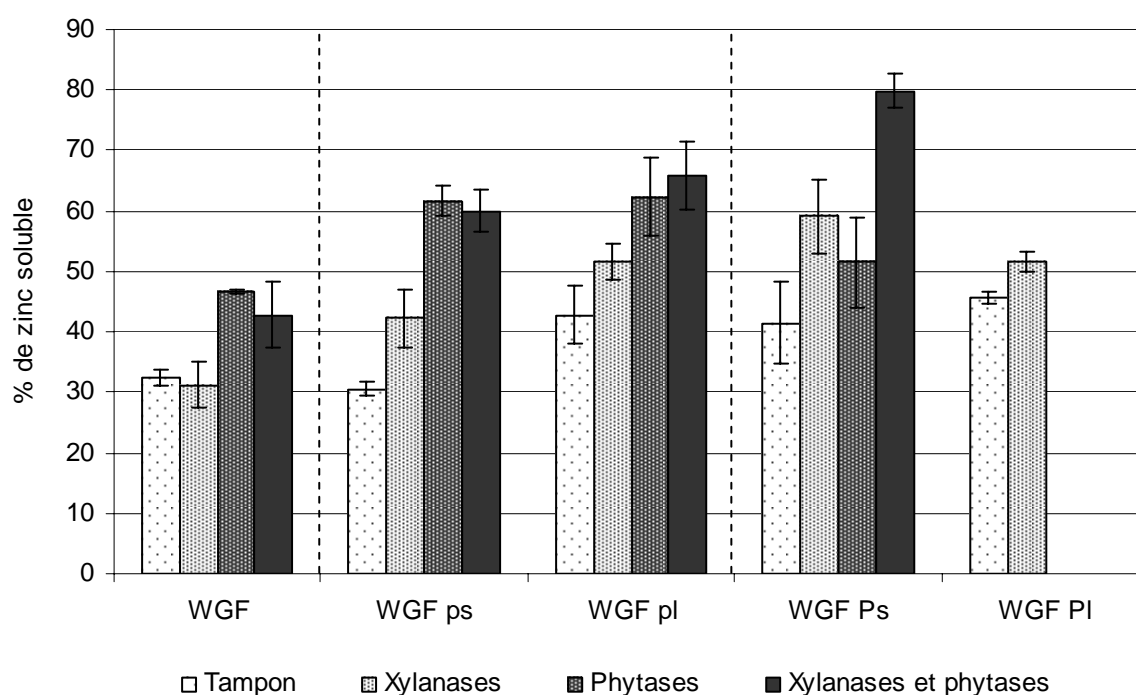


Figure 5. Solubilité du zinc non-digestible des échantillons de farine de mil après traitement des résidus insolubles de digestion

Les données représentées sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir des quantités de zinc digestibles et libérées déterminées après 3 répliques de chaque traitement.

Dans le résidu insoluble de digestion de la farine de mil (WGF), la dégradation des fibres ne permet pas de libérer plus de zinc que le traitement avec le tampon. En revanche, la dégradation des phytates permet de libérer environ 14% de zinc en plus de celui libéré par le traitement avec le tampon, tandis que l'action simultanée des xylanases et des phytases ne libère pas plus de zinc que l'action des phytases seules. Il semble donc que les phytates soient responsables de l'inhibition de la solubilisation du zinc.

L'étude des échantillons de farine de mil ayant subi des réductions de teneur en phytates avant digestion *in vitro* permet de confirmer ce premier résultat. En effet, dans les échantillons à teneurs réduites en phytates par action des phytases endogènes (WGF ps et pl), plus la dégradation des phytates est importante, plus la quantité de zinc libéré par les différents traitements est importante. Ceci peut être attribué à une hydrolyse plus poussée des

molécules de phytates qui passeraient de 6 ou 5 phosphates à moins de 5 phosphates (IP4, IP3, IP2, IP1) qui, d'après Lönnerdal *et al.* (1989), n'ont pas d'effet négatif sur la biodisponibilité du zinc. Par ailleurs, on remarque que, dans ces échantillons, le traitement par les xylanases permet de libérer légèrement plus de zinc que le traitement avec le tampon. Il semble donc que les fibres jouent un rôle dans la chélation du zinc de la farine de mil et que ce rôle mineur ne soit décelable que lorsque la majorité des phytates a été dégradée.

L'étude des échantillons à teneurs réduites en phytates après action des phytases endogènes et exogènes (WGF Ps et Pl) semble confirmer ce rôle des fibres. En effet, la dégradation des fibres ou des phytates dans les résidus insolubles de WGF Ps permet de solubiliser légèrement plus de zinc que le traitement avec le tampon, tandis que l'action simultanée des 2 enzymes a un effet beaucoup plus important et permet de libérer environ 80% du zinc contenu dans le résidu insoluble de digestion.

Le tableau 4, qui donne les valeurs de solubilités totales du zinc après action cumulée de la digestion *in vitro* et du traitement des résidus insolubles, permet de relativiser ces effets des phytates et des fibres. Ainsi, lorsque les phytates sont partiellement dégradés par les phytases endogènes avant digestion *in vitro*, les pourcentages de zinc soluble après digestion et incubation avec le tampon passent de 42 à 47 et 59% pour des échantillons contenant respectivement 0,59, 0,30 et 0,08 g d'IP6/100g MS (Tableau 1). Par ailleurs, après action des xylanases, les solubilités de ces échantillons à teneurs réduites en phytates passent de 47 à 56% pour WGF ps et de 59 à 65% pour WGF pl, ce qui traduit l'effet des fibres sur la solubilité du zinc.

Tableau 4. Solubilité du zinc (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des échantillons de farine de mil à teneurs réduites en phytates

	Digestion + tampon	Digestion + xylanases	Digestion + phytases	Digestion + xylanases et phytases
WGF	42.2 ± 1.4 c	41.1 ± 1.7 c	54.3 ± 1.4 b	51.1 ± 3.3 d
WGF ps	47.0 ± 3.4 bc	56.0 ± 1.3 b	70.8 ± 2.2 a	69.6 ± 1.5 c
WGF pl	58.5 ± 2.5 a	64.8 ± 2.8 a	72.7 ± 4.2 a	75.2 ± 3.5 b
WGF Ps	51.2 ± 5.3 b	65.9 ± 4.9 a	64.7 ± 6.9 a	83.2 ± 2.1 a
WGF Pl	62.5 ± 2.1 a	66.6 ± 2.4 a	/	/

Les valeurs sont les moyennes de solubilité ± ET calculées à partir de la somme des quantités de zinc digestibles (3 digestions) et libérées (3 répliques de chaque traitement appliqué aux résidus insolubles de digestion). Les moyennes ne portant pas la même lettre dans une même colonne sont significativement différentes à $P \leq 0.05$ d'après le test de Duncan.

Enfin, on remarque qu'après dégradation totale des phytates avant digestion *in vitro* (WGF Pl) et dégradation des fibres dans le résidu insoluble, la quantité de zinc libérée n'est pas aussi importante que lorsque les deux enzymes agissent simultanément après dégradation seulement partielle des phytates (67 vs 83%). Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence, dans la farine de mil sans IP6 (WGF Pl), de molécules d'IP5 et/ou d'IP4 qui inhiberaient la solubilité du zinc.

3.2.2. Effets des fibres et des tanins

Les pourcentages de zinc, contenus dans les résidus insolubles de digestion des fractions de mil à teneurs faibles et fortes en fibres et en tanins, rendus solubles après les différents traitements sont représentés dans la figure 6.

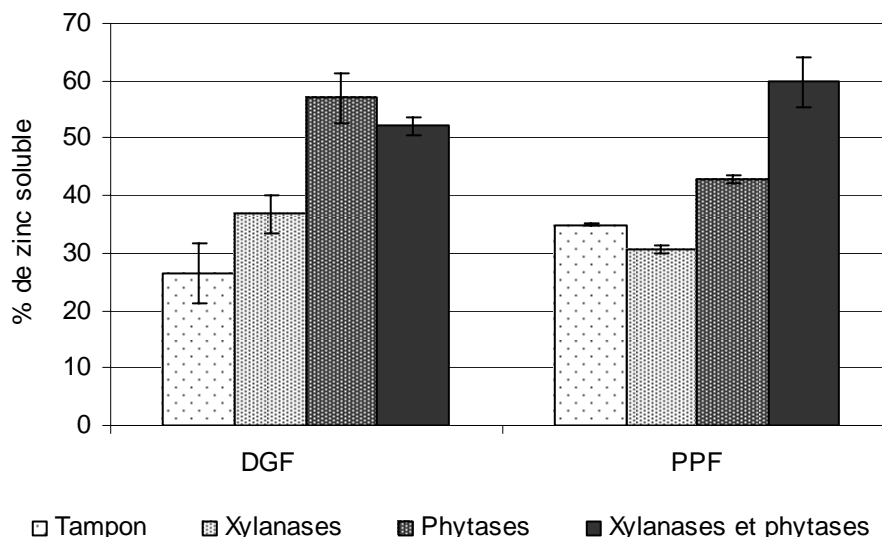


Figure 6. Solubilité du zinc non-digestible des fractions de mil à teneurs faibles (DGF) et fortes (PPF) en fibres et en tanins après traitement des résidus insolubles de digestion

Les données représentées sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir des quantités de zinc digestibles et libérées déterminées après 3 répétitions de chaque traitement.

L'action séparée des xylanases et des phytases sur les résidus insolubles de digestion de la fraction à teneurs faibles en fibres et en tanins (DGF) provoque une libération plus importante de zinc que le traitement sans enzyme (respectivement + 10 et + 30%). En revanche, l'action simultanée des deux enzymes ne permet pas de libérer plus de zinc que l'action des phytases seules. Concernant la fraction à teneurs élevées en fibres et en tanins (PPF), l'action des xylanases n'amène pas de libération supplémentaire de zinc comparé au traitement sans enzyme. En revanche, l'action des phytases permet de solubiliser environ 8% de zinc en plus, de même que l'action simultanée des deux enzymes qui permet de libérer environ 25% de zinc supplémentaire par rapport au traitement sans enzyme.

Ces résultats indiquent que la nature des complexes entre zinc et facteurs anti-nutritionnels est probablement différente entre les parties centrales et périphériques du grain. Le zinc des parties centrales serait principalement chélaté par les phytates et peu par les fibres, tandis que celui des parties périphériques serait majoritairement lié à des complexes fibre-phytate.

En ce qui concerne les fractions déphytinisées, le traitement des résidus insolubles par les xylanases conduit à des résultats différents de ceux obtenus sur les fractions non déphytinisées par action simultanée des 2 enzymes et ce pour les 2 fractions (Figure 7).

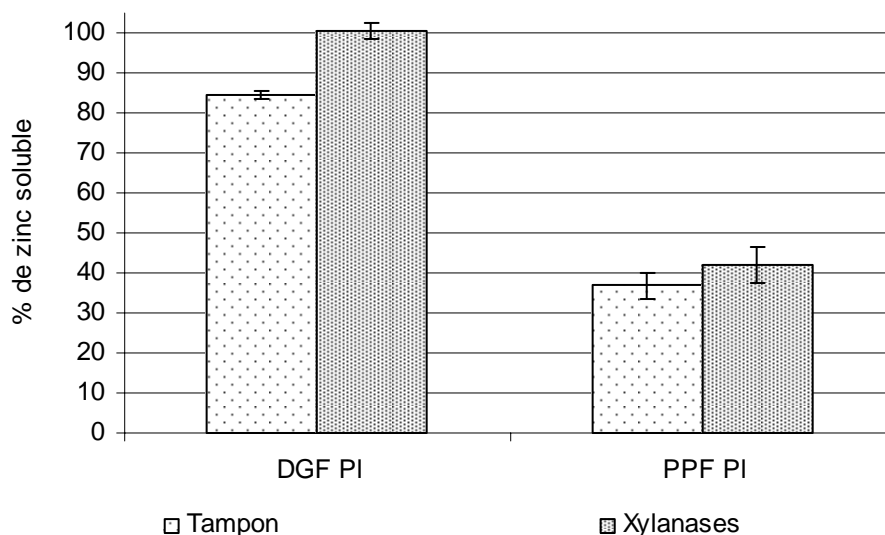


Figure 7. Solubilité du zinc non-digestible des fractions de mil déphytinisées après traitement des résidus insolubles de digestion

Les données représentées sont les moyennes de solubilité \pm ET calculées à partir des quantités de zinc digestibles et libérées déterminées après 3 réplifications de chaque traitement.

Pour DGF, la dégradation préalable des phytates permet de libérer plus de 80% du zinc restant dans le résidu uniquement par incubation dans du tampon et le reste du zinc peut être libéré par l'action des xylanases. On retrouve donc les mêmes conclusions au niveau de la nature des complexes, avec une majorité de complexes phytates-zinc et une faible proportion de complexes fibres-zinc, pour les fractions déphytinisées ou non, mais les proportions de zinc libérées sont différentes. En effet, la totalité du zinc peut être libérée avec l'action des phytases suivie des xylanases, tandis que 40% du zinc demeure insoluble dans le cas de l'action simultanée des deux enzymes. Ce résultat est à rapprocher des résultats obtenus précédemment sur les échantillons de farine de mil, qui montraient que plus la dégradation des phytates était poussée avant digestion *in vitro*, plus la quantité de zinc libérable par les différents traitements était importante, ce qui pourrait très probablement traduire le rôle majeur des IP5 et éventuellement des IP4 dans la complexation du zinc.

Pour la fraction PPF, en revanche, la proportion de zinc soluble après action des xylanases sur les résidus de la fraction déphytinisée est plus faible que dans le cas de l'action simultanée des xylanases et des phytases sur ceux de la fraction non-déphytinisée (environ 40% vs 60%). Ceci semble indiquer que, comme le fer, le zinc contenu dans les parties périphériques du grain serait plutôt lié à des complexes fibre-phytate, dont l'hydrolyse nécessiterait l'action combinée des xylanases et des phytases.

Par ailleurs, si l'on considère les données du tableau 5, qui donne les résultats de solubilité totale après digestion *in vitro* et traitement des résidus insolubles, on peut également soupçonner la présence d'autres complexes dans ces parties périphériques. En effet, seulement 69% du zinc des parties périphériques du grain ont pu être libérés au maximum par les différents traitements, contre 100% pour les parties centrales. Il pourrait s'agir de complexes tanins-zinc ou encore protéine-zinc. Il semble que ce type de complexes n'ait pas encore été évoqué dans la littérature, mais nos résultats tendent à en prouver l'existence. L'absence d'information sur ces éventuels complexes peut s'expliquer par le fait que la contribution particulièrement importante des phytates à la faible biodisponibilité du zinc doit masquer ces interactions entre le zinc et les autres composés chélateurs de la matrice.

Tableau 5. Solubilité du zinc (%) après digestion gastro-intestinale et traitement des résidus insolubles des fractions de mil non-déphytinisées et déphytinisées

	Digestion + tampon	Digestion + xylanases	Digestion + phytases	Digestion + xylanases et phytases
DGF	38.7 ± 2.3 c	47.2 ± 1.8 c	64.2 ± 2.5 a	60.0 ± 0.3 b
PPF	49.6 ± 1.4 b	46.2 ± 2.2 c	55.7 ± 1.0 b	68.9 ± 2.5 a
DGF PI	91.5 ± 1.0 a	100.3 ± 1.0 a	/	/
PPF PI	51.2 ± 1.5 b	55.2 ± 2.4 b	/	/

Les valeurs sont les moyennes de solubilité ± ET calculées à partir de la somme des quantités de zinc digestibles (3 digestions) et libérées (3 réplifications de chaque traitement appliqué aux résidus insolubles de digestion). Les moyennes ne portant pas la même lettre dans une même colonne sont significativement différentes à $P \leq 0.05$ d'après le test de Duncan.

Ainsi, la seule dégradation enzymatique des phytates de la partie centrale du grain de mil (endosperme et germe) permet de rendre soluble entre 64 et 92% du zinc, selon le type de traitement appliqué, confirmant la contribution majeure des phytates à la faible biodisponibilité du zinc. Cependant, l'étude des parties périphériques du grain a permis de mettre en évidence que la dégradation des phytates seule ne permettait pas d'augmenter la solubilité du zinc de ces parties, indiquant donc l'existence d'autres complexes. Le zinc contenu dans les enveloppes du grain de mil serait donc en partie lié à des complexes fibres-phytates et il est également possible qu'il soit partiellement chélaté par les tanins ou par des protéines de la matrice.

4. Conclusion

Le fer de la farine de mil est majoritairement chélaté par des complexes mettant en jeu les fibres et les phytates, de sorte que ce fer peut être solubilisé par l'action simultanée de phytases et de xylanases. Cependant, au niveau des parties périphériques du grain, qui contiennent de fortes teneurs en fibres, tanins et aussi en fer, il semble que la majorité de ce fer soit complexé aux tanins. Ainsi, tant les phytates, que les fibres et les tanins diminuent la biodisponibilité du fer de la farine de mil.

En ce qui concerne le zinc de la farine de mil, il est principalement lié aux phytates et au plus la dégradation des phytates est poussée avant digestion *in vitro*, au plus la quantité de zinc libérable est importante. Par ailleurs, les fibres, et probablement également les tanins ou certaines protéines, pourraient former des complexes avec le zinc au niveau des parties périphériques du grain. Il semble également que des intermédiaires de dégradation des phytates (IP5, IP4) contribuent de manière importante à la faible biodisponibilité du zinc de la farine de mil et il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en déterminant les teneurs résiduels en ces composés aux différentes étapes de notre protocole expérimental.

Références

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L. (1989). Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *European Journal of Clinical Nutrition* 43, 547-57.
- Camara, E., Amaro, M.A. (2003). Nutritional aspect of zinc availability. *International Journal of Food Science and Nutrition* 54, 143-151.
- Champ, M. (2003). Les fibres alimentaires : définitions et aspects analytiques. *La Lettre Scientifique de l'IFN*, 91.
- Gilloly, M., Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Torrance, J.D., Bezwoda, W.R., Mac Phail, A.P., Derman, D.P., Novelli, L., Morral, D., Mayet, F. (1984). Factors affecting the absorption of iron from cereals. *British Journal of Nutrition* 51, 37-46.
- Glahn, R.P., Rassier, M., Goldman, M.I., Lee, O.A., Cha, J. (2000). A comparison of iron availability from commercial iron preparations using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 62-68.
- Glahn, R.P., Wortley, G.M., South, P.K., Miller, D.D. (2002). Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl₂ : studies using an in vitro digestion / Caco-2 cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 390-395.
- Hocquellet, P., L'Hotellier, M.D. (1997). Bioavailability and speciation of mineral micronutrients: the enzymolysis approach. *Journal of AOAC International* 80, 920-927.
- Laporte, J., Kovacsik, G., Pinta, M. (1980). Milieux végétaux, in: Pinta, M. (Eds., 2nd edition), *Spectrométrie d'absorption atomique, Tome 2: Applications à l'analyse chimique*. Masson, Paris, pp. 378-421.
- Lönnerdal, B., Sandberg, A.S., Sandström, B., Kunz, C. (1989). Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal of Nutrition* 119, 211-214.
- Lönnerdal, B., Yuen, M., Glazier, C., Litov, R. (1993). Magnesium bioavailability from human milk, cow milk, and infant formula in suckling rat pups. *American Journal of Clinical Nutrition* 58, 392-397.
- Macfarlane, B.J., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Schmidt, U., Mayet, F., Friedman, B.M. (1988). Effects of lupines, a protein-rich legume, on iron absorption. *European Journal of Clinical Nutrition* 42, 683-687.
- Reddy, N.R. (2002). Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: *Food phytates*, (edited by Reddy, N.R., Sathé, S.K.), pp. 25-51. Boca Raton: CRC Press.
- Siegenberg, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Macfarlane, B.J., Lamparelli, R.D., Car, N.G., Macphail, P., Schmidt, U., Tal, A., Mayet, F. (1991). Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, 537-541.
- Wise, A. (1995). Phytate and zinc bioavailability. *International Journal of Food Science and Nutrition* 46, 53-63.
- Wolfgor, R., Drago, S.R., Rodriguez, V., Pellegrino, N.R., Valencia, M.E. (2002). In vitro measurement of available iron in fortified foods. *Food Research International* 35, 85-90.

Chapitre VI

DISCUSSION

ET CONCLUSION GÉNÉRALES

Discussion et conclusion générales

L'étude des effets de procédés technologiques simples et traditionnels, reproduits en laboratoire ou réalisés en milieu naturel, sur les teneurs en facteurs anti-nutritionnels et les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc a permis d'appréhender leurs limites quant à l'amélioration de la biodisponibilité de ces minéraux dans les produits à base de céréales et de légumineuses utilisables en tant qu'aliments de complément du jeune enfant. Afin d'essayer de comprendre ce qui limite les effets favorables de ces procédés sur la biodisponibilité des minéraux, une étude des facteurs anti-nutritionnels du grain de mil, dans laquelle nous avons tenté d'évaluer leur contribution relative aux faibles digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, a été réalisée. L'objectif de ce chapitre est de reprendre brièvement les principaux éléments apparus lors de ces travaux en les resituant par rapport aux perspectives qu'ils permettent d'ouvrir, d'un point de vue fondamental, mais également en terme de recommandations pratiques.

EFFETS DE PROCÉDÉS TECHNOLOGIQUES SIMPLES UTILISABLES POUR LA PRÉPARATION D'ALIMENTS DE COMPLÉMENT

Le trempage et la préparation de bouillies non fermentées

Étant donné l'effet négatif des phytates sur la biodisponibilité du fer et du zinc des produits à base de céréales et de légumineuses généralement reporté dans la littérature, la première partie de notre étude concernant les effets des procédés technologiques s'est focalisée sur la réduction des teneurs en phytates et sur l'évolution des rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn. Des trempages de 24 h à 30°C de grains de maïs, mil, riz, sorgho, ambérique, niébé et soja ont conduit à des réductions des teneurs en fer et dans une moindre mesure en zinc par diffusion dans le milieu de trempage. De ce fait, malgré l'obtention de réductions significatives de 17 à 28% des teneurs en phytates dans les grains de certaines espèces (mil, maïs, riz et soja), les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn ne variaient que légèrement et le trempage de grains entiers de céréales et de légumineuses ne semble donc pas être efficace pour améliorer les biodisponibilités du fer et zinc.

En vue de réduire davantage les teneurs en phytates et de diminuer les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn, les effets du trempage en combinaison avec d'autres procédés technologiques simples (décorticage, broyage, cuisson) ont été étudiés en essayant de comprendre les mécanismes de réduction des teneurs en phytates en milieu aqueux afin de pouvoir les optimiser. Pour cela, la dégradation et la diffusion des phytates, ainsi que la diffusion de l'activité phytasique, du fer et du zinc dans les milieux de trempage ont été étudiés après trempage de grains entiers, décortiqués et de farines d'une espèce de céréale (mil) et d'une espèce de légumineuse (soja).

Les modalités de dégradation des phytates se sont révélées être différentes selon le type de grains. Dans le cas du mil, en raison de différences de localisation des phytates et des phytases dans le grain, le décorticage et le broyage des grains avant trempage permettent d'augmenter la dégradation des phytates en facilitant la diffusion des composés dans le milieu. En revanche, dans le cas du soja, la localisation des phytates et des phytases dans les cotylédons des graines permet une hydrolyse des phytates dans le matériel grâce à son

hydratation. Le décortilage et le broyage avant trempage sont donc moins efficaces pour favoriser la dégradation des phytates dans le cas du soja que dans du mil.

Par ailleurs, en raison de réductions de teneurs en phytates relativement limitées (de 22 à 39% et de 16 à 51%, respectivement pour le mil et le soja) et des importantes modifications de teneurs en phytates, fer et zinc dues au décortilage, les rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn sont peu diminués suite à ces combinaisons de procédés.

Enfin, la préparation de bouillie par cuisson des farines trempées de mil et de soja ne permet pas de dégradation supplémentaire des phytates et, dans le cas du soja, la teneur en *myo*-inositol 6-phosphates (IP6) s'est même trouvée significativement augmentée suite à ce procédé.

Les modes de préparation traditionnels de bouillie de mil fermentée

La caractérisation de la valeur nutritionnelle de 48 bouillies de mil fermentées (« *ben-saalga* » et « *ben-kida* ») prélevées dans différents ateliers de production de la ville de Ouagadougou (Burkina Faso) a permis de mettre en évidence l'ampleur de leur inadéquation à couvrir les besoins nutritionnels du jeune enfant. Ces bouillies, pourtant traditionnellement données aux jeunes enfants en tant qu'aliment de complément, ne répondent à aucune des recommandations internationales. Leur densité énergétique moyenne (sans ajout de sucre) n'est que de 28 kcal/100g de bouillie contre les 80 kcal/100g préconisés au minimum. Leurs teneurs moyennes en protéines (8,2 g/100gMS), mais surtout en lipides (4,7 g/100gMS), sont également insuffisantes par rapport aux teneurs minimales d'environ 10 g/100gMS recommandées. Enfin, en supposant que la biodisponibilité du fer et du zinc dans ces bouillies est comparable à celle généralement attribuée aux aliments à base de céréales, les teneurs en fer et en zinc totales moyennes (respectivement de 8,5 et 2,1 mg/100gMS) devraient être multipliées au minimum par trois pour le fer et par six pour le zinc pour pouvoir couvrir les besoins des enfants de six mois.

Une étude, au niveau de quatorze ateliers de production, des variations des teneurs en FAN (fibres, phytates et tanins), en fer et zinc totales, ainsi que des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, pendant la transformation du mil en bouillie fermentée nous a permis d'évaluer la variabilité de cette biodisponibilité, estimée par la digestibilité *in vitro*, dans les bouillies et d'en rechercher les déterminants. Les modes de préparation de bouillie fermentée permettent de réduire les teneurs en FAN, en moyenne, de 25% pour les fibres ADF (cellulose+lignine), 40% pour les tanins, 42% pour les hémicelluloses et 50% pour les phytates. Cependant, les taux de réduction se sont révélés très variables d'un atelier à l'autre de sorte que, dans certains ateliers les teneurs en phytates étaient réduites de moins de 20%, tandis que dans d'autres les taux de réduction pouvaient dépasser 80%.

Les teneurs en zinc totales sont également réduites au cours de la préparation (de 20% en moyenne). Par ailleurs, la digestibilité *in vitro* du zinc dans les bouillies fermentées (13% en moyenne) est plus faible que celle mesurée dans les grains bruts correspondants (22% en moyenne). Dans les grains de mil bruts, aucune corrélation permettant d'expliquer les variations de digestibilités *in vitro* du zinc n'a été trouvée entre la digestibilité *in vitro* du zinc et les teneurs en FAN, probablement en raison de teneurs en FAN trop élevées. En revanche, dans les bouillies fermentées, des relations statistiquement significatives ont été trouvées : les bouillies présentant les digestibilités en zinc les plus fortes étaient celles ayant les pH les plus bas et les teneurs en zinc total et en phytates les plus faibles.

Concernant le fer, notre étude a révélé d'importantes contaminations par du fer extrinsèque, d'une part, dans les grains de mil bruts, ce fer étant probablement d'origine tellurique et, d'autre part, dans les bouillies fermentées, ce fer pouvant alors soit avoir la même origine, soit

résulter de contaminations à partir des équipements ou ustensiles utilisés au cours de la préparation de la bouillie. Ainsi, les digestibilités *in vitro* du fer, qui sont, respectivement, de 16 et 11% en moyenne dans les grains et les bouillies, ne correspondent pas aux digestibilités du fer intrinsèque de ces produits. Les recherches des déterminants de ces digestibilités du fer dans les grains de mil, comme dans les bouillies fermentées, ont révélé qu'elles étaient significativement reliées aux teneurs en fer total. Le fait que la digestibilité *in vitro* du fer soit faible dans les produits ayant de fortes teneurs en fer total semble indiquer que le fer extrinsèque serait moins biodisponible que le fer intrinsèque. Dans les grains bruts, la teneur en fer total était la seule variable significativement corrélée à la digestibilité *in vitro* du fer, tandis que, dans les bouillies fermentées, cette dernière était également corrélée négativement au pH de la bouillie ainsi qu'aux teneurs en hémicelluloses et en fibres ADF.

Ainsi, malgré les réductions de teneurs en FAN au cours de la transformation et les relativement faibles rapports molaires Phy/Fe et Phy/Zn, les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc dans les bouillies fermentées sont faibles et souvent inférieures aux digestibilités dans les grains de mil avant transformation.

Le décortilage abrasif des grains de mil

Le suivi des taux de perte en différents constituants de deux variétés de grains de mil du Burkina Faso (Gampela et IKMP-5) au cours de leur décortilage abrasif en laboratoire (jusqu'à 35% d'extraction) nous a permis, d'une part, de localiser ces constituants dans le grain et, d'autre part, d'évaluer les effets du décortilage, en tant que procédé utilisable au cours de la préparation d'aliments de complément, sur la qualité nutritionnelle du mil.

Le conditionnement des grains de mil à 15% d'eau pendant une nuit avant décortilage a permis de séparer correctement les enveloppes de l'albumen amylicé des grains des deux variétés et a entraîné une légère abrasion de la partie inférieure du germe.

Concernant la répartition des composés dans le grain, cette étude a montré que :

- l'albumen amylicé des grains de mil représentait 88% de la teneur en matière sèche (MS) totale des grains,
- les pertes en lipides et en protéines étaient proportionnelles aux pertes en MS,
- les pertes en zinc étaient inférieures aux pertes en fer (respectivement, autour de 15 et 30% après un décortilage à 12% d'extraction),
- les pertes en phytates étaient inférieures aux pertes en MS totales des grains indiquant que les phytates sont plutôt localisés dans les parties centrales du grain de mil,
- les pertes en fibres ADF ainsi que les pertes en tanins étaient très importantes avec des différences notables entre les deux variétés (40 et 56% pour les fibres, 51 et 19% pour les tanins après un décortilage à 12% d'extraction)
- les pertes en activité phytasique étaient également différentes pour les deux variétés (42 et 11%, respectivement pour Gampela et IKMP-5, à 12% d'extraction).

Ainsi, le décortilage abrasif des grains de mil à 12% d'extraction permet d'éliminer les enveloppes des grains. Il ne diminue pas leurs teneurs en protéines et en lipides, mais entraîne des pertes en minéraux, particulièrement en fer. Les facteurs antinutritionnels (tanins, fibres, phytates) ne sont pas localisés dans les mêmes fractions du grain de mil et cette localisation peut être différente selon les variétés. Les fibres et les tanins sont majoritairement localisés dans les enveloppes du grain, tandis que les teneurs en phytates sont légèrement plus élevées dans les grains décortiqués que dans les grains bruts.

Il est donc difficile d'évaluer, à ce stade, si le décortilage a un effet positif ou négatif sur la biodisponibilité du fer et du zinc.

CONTRIBUTION RELATIVE DES PHYTATES, DES FIBRES ET DES TANINS AUX FAIBLES « BIODISPONIBILITÉS » *IN VITRO* DU FER ET DU ZINC DANS LE GRAIN DE MIL

Les phytates

Afin d'évaluer l'effet des phytates sur la biodisponibilité du fer et du zinc, des digestions *in vitro* ont été effectuées sur des échantillons de farine de mil (var. Gampela) à teneurs réduites en phytates par action, soit des phytases endogènes, soit de phytases endogènes et exogènes. La dégradation partielle des phytates (-86%) de la farine de mil par les phytases endogènes permet d'augmenter les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, respectivement, de 10 à 24% et de 14 à 27%, mettant ainsi en évidence l'effet négatif des phytates sur la biodisponibilité de ces minéraux.

Des digestions *in vitro* ont également été réalisées sur deux fractions de grain de mil, déphytinisées ou non, l'une étant une farine de grains décortiqués (DGF), constituée d'endosperme et de germe et ayant des teneurs faibles en fibres et en tanins, et l'autre une farine composée de parties périphériques du grain de mil (PPF) ayant des teneurs fortes en fibres et en tanins. Après déphytinsation de la fraction DGF, les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc ont augmenté, respectivement, de 14 à 37% et de 16 à 45%, confirmant l'effet négatif des phytates sur la biodisponibilité de ces minéraux. En revanche, aucun changement significatif des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc n'a été constaté après déphytinsation de la fraction PPF, traduisant la présence d'autres composés chélateurs dans les parties périphériques du grain.

L'incubation avec du tampon ou des solutions enzymatiques (xylanases et/ou phytases) des résidus insolubles de digestion des farines de mil à teneurs variables en phytates a ensuite permis de confirmer que les phytates n'étaient pas les seuls facteurs limitant les digestibilités du fer et du zinc. En effet, bien que l'action des phytases ait permis, d'une manière générale, de rendre soluble des quantités de fer et de zinc supérieures à l'incubation avec le tampon seul, l'action simultanée des phytases et des xylanases avait un effet nettement plus marqué. Notons toutefois que ce phénomène était nettement plus marqué pour le fer que pour le zinc. En effet, les phytates sont apparus comme les principaux agents chélateurs du zinc dans la mesure où plus ils étaient dégradés avant digestion *in vitro*, plus la solubilité du zinc était importante.

Ainsi, dans le grain de mil, les phytates semblent influencer de manière plus importante sur la biodisponibilité du zinc que sur celle du fer. Ce résultat concorde, d'une part, avec le fait que l'acide phytique forme des complexes plus stables avec le zinc qu'avec le fer (Cheryan, 1980) et, d'autre part, avec la localisation dans les parties centrales du grain de la majorité des phytates et d'une importante proportion du zinc, tandis que le fer est plutôt localisé dans les enveloppes.

Les fibres

L'évaluation de l'effet des fibres a été réalisée, d'une part, sur la farine de mil et les deux fractions de grain DGF et PPF à teneurs minimale et maximale en fibres et, d'autre part, en incubant les résidus insolubles de digestion *in vitro* avec des xylanases. De plus, afin de distinguer l'effet des fibres de celui des phytates, les phytates ont été dégradés, soit dans les échantillons avant digestion *in vitro*, soit dans les résidus insolubles après digestion.

Dans la farine de mil, près de 43% du fer a pu être solubilisé par digestion *in vitro* suivie de l'action simultanée des xylanases et des phytases, contre environ 24% lorsque la digestion était suivie par un traitement avec le tampon ou seulement l'une des deux enzymes. Ceci indique que le fer est très probablement chélaté par des complexes mettant en jeu les fibres et

les phytates. En revanche, l'action des xylanases, seules ou en combinaison avec les phytases, n'a pas permis de solubiliser plus de zinc que l'action des phytases seules, excepté dans les échantillons à faibles teneurs en phytates. La digestibilité du fer serait donc majoritairement limitée par certaines fibres associées aux phytates, tandis que celle du zinc ne serait que légèrement diminuée par la présence de ces complexes « fibres-phytates ».

Ces hypothèses ont été vérifiées par l'étude des résidus insolubles des fractions DGF et PPF. La présence de complexes « fibres-phytates-minéraux » a été mise en évidence dans les parties centrales et périphériques du grain de mil pour le fer et uniquement dans les parties périphériques pour le zinc.

Ainsi, les fibres qui sont associées aux phytates ont un effet chélateur sur les minéraux. Ces complexes présents dans l'albumen du grain de mil semblent chélater des quantités considérables de fer mais ne semblent pas interagir avec le zinc, tandis que ceux situés dans les enveloppes du grain ont un effet chélateur à la fois sur le fer et sur le zinc.

Les tanins

Bien que les tanins et les fibres n'aient pas pu être séparés mécaniquement au niveau du grain de mil et que nous n'ayons pas cherché à dégrader les tanins par voie enzymatique, leur effet chélateur peut être déduit des résultats précédents. Deux constatations sont apparues particulièrement révélatrices de l'effet négatif des tanins sur les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc dans le grain de mil.

La première constatation est relative, d'une part, à l'existence de quantités non négligeables de fer et de zinc non libérées après action des phytases et des xylanases sur les résidus insolubles de digestion et, d'autre part, au fait que les quantités de fer et de zinc rendues solubles par les phytases et les xylanases sont beaucoup plus importantes dans les parties centrales du grain que dans les parties périphériques plus riches en tanins. Ainsi, 66% et 35% du fer et 100% et 69% du zinc appartenant, respectivement, aux parties centrales et périphériques du grain de mil sont solubilisés après application des traitements enzymatiques visant à dégrader les phytates et les fibres dans les résidus de digestion. Il est donc très probable que les proportions de zinc non solubilisées soient chélatées par les tanins, en particulier dans les parties périphériques du grain de mil où les tanins sont présents en quantité très importante.

La seconde constatation concerne les différences de variations de teneurs et de digestibilité du fer et du zinc observées entre les échantillons incubés avec ou sans phytases exogènes. En effet, lorsque les échantillons étaient incubés sans ajout de phytases, nous avons observé : (i) des pertes en fer total par diffusion dans le milieu, (ii) des pertes en tanins par diffusion des tanins solubles (iii) des dégradations de phytates par les phytases endogènes et (iv) des augmentations de la digestibilité *in vitro* du fer. En revanche, lorsque les échantillons étaient incubés avec des phytases exogènes, (i) les teneurs en fer total n'ont diminué que dans le cas de la fraction DGF (à faible teneur en tanins), n'ont pas varié dans le cas des farines et ont augmenté dans le cas de la fraction PPF, (ii) les teneurs en tanins ont diminué de manière plus importante que lors de l'incubation sans phytases, indiquant que les groupements réactifs des tanins (permettant leur dosage colorimétrique) ont participé à la formation de complexes très probablement avec les protéines ajoutées, (iii) les dégradations de phytates ont été plus fortes que lors de l'incubation sans phytases et (iv) les augmentations de digestibilité *in vitro* du fer ont été plus faibles que lors de l'incubation sans phytases. A partir de ces éléments, nous pouvons émettre l'hypothèse que, lors de l'ajout de phytases, le fer est séquestré dans le matériel par le biais des complexes formés entre tanins et protéines, d'où une moindre amélioration de la digestibilité *in vitro* du fer, en dépit de la plus forte dégradation des phytates. Le fer ainsi séquestré peut, en partie, provenir du fer libéré par l'hydrolyse des

phytates, mais il est vraisemblable de penser que ce fer était déjà chélaté par les tanins dans la farine avant son incubation.

Il est donc très probable qu'au même titre que les fibres et les phytates, les tanins jouent un rôle important dans la diminution de la biodisponibilité du fer et, dans une moindre mesure, du zinc.

RECOMMANDATIONS PRATIQUES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

A propos du trempage

Le trempage diminue peu les teneurs en phytates et les modalités de dégradation de ces composés diffèrent selon l'espèce à laquelle appartiennent les grains. Les phytates sont dégradés, soit dans le milieu de trempage après diffusion (cas du mil), soit dans le matériel (cas du soja) et le trempage entraîne des diminutions des teneurs en fer et en zinc par lixiviation. D'un point de vue pratique, afin de limiter les pertes en minéraux, il est donc recommandable d'utiliser l'eau de trempage pour la cuisson des grains ou des farines trempées. Par ailleurs, dans le cas du mil et probablement des autres céréales, nos résultats ont montré la nécessité de favoriser la diffusion des phytates dans le milieu de trempage. Cette diffusion semble favorisée par décorticage et/ou le broyage des grains avant trempage, mais les effets d'autres procédés pouvant la favoriser, en particulier le chauffage préalable des eaux de trempage susceptible d'augmenter l'activité des phytases, devrait être étudié.

La diffusion des minéraux est également à prendre en compte et il serait intéressant de réaliser des cinétiques de diffusion des minéraux, parallèlement à des cinétiques de dégradation des phytates au cours de différents types de trempage, afin de déterminer les conditions optimales de réalisation du trempage. Concernant la préparation de bouillie par cuisson des farines trempées, l'augmentation des teneurs en phytates observée serait également un point à approfondir, d'autant plus que d'autres auteurs ont montré que la cuisson pouvait diminuer les solubilités du fer et du zinc.

A propos des modes de préparation traditionnels de bouillie de mil fermentée

L'amélioration de la qualité nutritionnelle des bouillies de mil fermentées doit passer par deux étapes avec, dans un premier temps, une augmentation de leur densité énergétique et de leurs teneurs en macronutriments, et, dans un second temps, une augmentation de leurs teneurs en micronutriments et de la biodisponibilité des minéraux.

Des essais de modification du mode de fabrication de ces bouillies de mil traditionnelles ont déjà été réalisés afin de répondre au premier objectif. La densité énergétique peut être améliorée par ajout de malt d'orge et d'inoculum au niveau de l'étape de décantation (Tou *et al.*, 2003b), quant à, l'amélioration de l'équilibre en macronutriments, elle implique que le mil soit mélangé à une légumineuse (arachide) afin d'obtenir des bouillies ayant des teneurs suffisantes en protéines et en lipides.

Concernant le deuxième objectif, il semble que l'incorporation d'un complément minéral et vitaminique soit indispensable compte tenu des faibles teneurs en minéraux totaux dans les bouillies. Mais étant donné la complexité, d'une part, des interactions qui peuvent intervenir au sein de la matrice alimentaire et, d'autre part, des modifications biochimiques qui peuvent avoir lieu au cours des procédés technologiques, des travaux complémentaires devront être menés afin d'évaluer la biodisponibilité des minéraux ajoutés. En effet, les minéraux ajoutés peuvent être complexés par les mêmes facteurs que les minéraux propres à l'aliment. Il est donc probable que, même dans le cas d'un enrichissement, la dégradation des FAN au cours

de la préparation des bouillies fermentées nécessite d'être favorisée. Les résultats de l'étude de la contribution relative des phytates, des fibres et des tanins à la faible biodisponibilité du fer et du zinc dans le grain de mil semblent indiquer que chacun de ces composés a un rôle chélateur important. Pour espérer obtenir des bouillies ayant des biodisponibilités en fer et en zinc élevées, il est donc nécessaire d'optimiser la réduction des teneurs en ces différents composés et non uniquement en phytates. Pour cela, le décorticage des grains avant trempage semble être une solution intéressante étant donné qu'il permet, à la fois, de faciliter la dégradation des phytates par les phytases et d'éliminer des quantités importantes de fibres et de tanins. En revanche, l'ajout de phytases exogènes ne semble pas être une solution adaptée pour améliorer la biodisponibilité des minéraux. En effet, il a été constaté que ces protéines perturbaient le système en créant des complexes qui limitent la solubilisation du fer et du zinc au cours de la digestion *in vitro*.

Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer les effets de chaque étape de la préparation de bouillie sur les digestibilités *in vitro* du fer et du zinc afin d'identifier la ou les étape(s) induisant les plus fortes diminutions de digestibilité et ainsi tenter d'y remédier.

Enfin, dans le cas où les teneurs en FAN ne pourraient pas être réduites de manière suffisante, il est également envisageable d'incorporer au complément vitaminique et minéral des composés favorisant l'absorption des minéraux tel que l'acide ascorbique, l'acide citrique ou certains acides aminés.

A propos des facteurs limitant la biodisponibilité du fer et du zinc

Les travaux réalisés permettent d'identifier la nature probable des principales interactions entre FAN et minéraux (fer et zinc) dans le grain de mil en évaluant la biodisponibilité de ces minéraux par une méthode de digestion *in vitro*. Cependant cette méthode ne permet pas d'explicitier de manière approfondie les mécanismes qui influent sur la biodisponibilité des minéraux.

Parmi les perspectives de recherche envisageables à l'issue de cette thèse, nous pouvons proposer :

- d'adopter la même approche, basée sur l'étude d'échantillons ayant des teneurs variables en phytates, fibres et tanins, mais en utilisant une méthode de digestion *in vitro* modifiée afin, par exemple, d'évaluer l'effet de la présence d'une α -amylase ou d'un pH plus élevé au cours de la digestion gastrique simulée,
- de vérifier si la simulation de l'absorption intestinale par le modèle cellulaire Caco-2 conduirait aux mêmes conclusions,
- de prendre en compte les composés intermédiaires de la dégradation des phytates (IP5, IP4, IP3...) afin d'évaluer leur contribution notamment à la réduction de la digestibilité du zinc,
- d'identifier la nature des fibres associées au phytates et qui participent à la réduction de la digestibilité du fer et du zinc,
- de vérifier si la contribution relative des différents FAN mise en évidence dans le grain de mil est identique dans les grains d'autres espèces de céréales, en particulier celles qui comme le maïs, le riz ou le sorgho sont couramment utilisées dans les pays du sud pour la préparation d'aliments de complément, en appliquant le protocole d'étude utilisé (fractionnement, déphytinisation et dégradation enzymatiques dans les résidus insolubles de digestion *in vitro*).

Alors que la plupart des travaux publiés concernant la biodisponibilité des minéraux dans les aliments consommés par les groupes de population vulnérables dans les pays du sud se

limitent trop souvent encore à étudier l'effet de traitements isolés réalisés en conditions de laboratoire sur tel ou tel FAN, nous espérons avoir contribué à montrer la nécessité de prendre simultanément en compte non seulement l'ensemble des composés susceptibles d'influer sur la biodisponibilité des minéraux mais aussi les interactions entre les effets des différents procédés intervenant au cours de la préparation des aliments. Ce n'est qu'en combinant les études en laboratoire et des observations rigoureuses de terrain qu'il est possible de définir des solutions réellement transférables susceptibles de contribuer à la réduction des formes de malnutrition liées à des ingérés insuffisants en micronutriments.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd Allah, M.A., Mahmoud, R.M., El-Kalyoubi, M.H., Abou Arab, A.A. (1987). Physical properties of starches isolated from pearl millet, yellow corn, sorghum, sordan and pearl millet. *Starch/Staerke* 39, 9-12.
- Abdalla, A.A., El Tinay, A.H., Mohamed, B.E., Abdalla, A.H. (1998a). Proximate composition, starch, phytate and mineral contents of 10 pearl millet genotypes. *Food Chemistry* 63, 243-246.
- Abdalla, A.A., El Tinay, A.H., Mohamed, B.E., Abdalla, A.H. (1998b). Effect of traditional processes on phytate and mineral content of pearl millet. *Food Chemistry* 63, 79-84.
- Abdelrahman, A., Hosoney, R.C., Varriano-Marston, E. (1983). Milling process to produce low-fat grits from pearl millet. *Cereal Chemistry* 60, 189-191.
- Abdelrahman, A., Hosoney, R.C., Varriano-Marston, E. (1984). The proportions and chemical compositions of hand-dissected anatomical parts of pearl millet. *Journal of Cereal Science* 2, 127-133.
- Abrams, S.A., Griffin, I.J., Herman, S. (2002). Using stable isotopes to assess the bioavailability of minerals in food fortification programs. *Food Nutrition Bulletin* 23, 158-65.
- Adish, A.A., Esrey, S.A., Gyorkos, T.W., Jean-Baptiste, J., Rojhani, A. (1999). Effect of consumption of food cooked in iron pots on iron status and growth of young children: A randomised trial. *The Lancet* 353, 712-716.
- AFNOR. (1970). Directives générales pour le dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl (produits agricoles alimentaires). Norme NF V 03-050.
- Agett, P.J., Favier, A. (1993). Zinc. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 63, 247-316.
- Agte, V.V., Gokhale, M.K., Chiplonklar, S.A. (1997). Effect of natural fermentation on in vitro zinc bioavailability in cereal-legume mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 29-32.
- Ahmad, T., Rasool, S., Sarwar, M., Haq, A., Hasan, Z. (2000). Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 83, 103-114.
- Akpanunam, M., Achinewu, S. (1985). Effects of cooking, germination and fermentation on the chemical composition of nigerian cowpea. *Plant Foods for Human Nutrition* 35, 353-358.
- Ali, H.I., Harland, B.F. (1991). Effects of fibre and phytate in sorghum flour on iron and zinc in weanling rats: a pilot study. *Cereal Chemistry* 68, 234-238.
- Ali, M.A.M., El Tinay, A.H., Abdalla, A.H. (2003). Effect of fermentation on the in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry* 80, 51-54.
- Allen, L.H., Ahluwalia, N. (1997). Improving iron status through diet: The application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations. USAID/OMNI, Washington, DC.

- Al-Mamary, M., Molham, A.H., Abdulwali, A.A., Al-Obeidi, A. (2001). *In vivo* effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. *Nutrition Research* 21, 1393-1401.
- Alonso, R., Orue, E., Marzo, F. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chemistry* 63, 505-512.
- Alonso, R., Aguirre, A., Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry* 68, 159-165.
- Alonso, R., Rubio, L. A., Muzquiz, M., Marzo, F. (2001). The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney seed meals. *Animal Science and Technology* 94, 1-13.
- Anjum, F.M., Butt, M.S., Ahmad, N., Ahmad, I. (2002). Phytate and mineral content in different milling fractions of some Pakistani spring wheats. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 13-17.
- Antoine, C., Peyron, S., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., Rouau, X. (2004). Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers. *Journal of Cereal Science* 39, 387-393.
- Arnaud, J. (1995). Zinc. Dans : *Dossier Scientifique de l'IFN n°7, Les minéraux*, pp 59-64. Paris : Institut Français pour la Nutrition.
- Ashworth, A., Draper, A. (1992). The potential of traditional technologies for increasing the energy density of weaning foods: A critical review of existing knowledge with particular reference to malting and fermentation, *WHO/CDD/EDP/92.4*, pp. 1-50.
- Avallone, S., Brault, S., Mouquet, C., Tréche, S. (2003). Identification des principaux aliments sources de fer, zinc et vitamine A dans l'alimentation des enfants de 1 à 5 ans dans l'aire sanitaire de Ouaregou (Burkina Faso). *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*.
- Bagheri, S., Fontaine, N., Pointillard, A., Guéguen, L. (1982). Influence des fibres et des phytates sur l'utilisation des minéraux chez le Porc. *Physiologie digestive chez le Porc, INRA Publication Versailles*, 247-260.
- Bailey, A.V., Sumrell, G. (1979). Pentosans in pearl millet. *Cereal Chemistry* 56, 295-298.
- Batey, I.L. (1982). Starch analysis using thermostable α -amylase. *Starch* 4, 125-128.
- Baynes, R.D., Macfarlane, B.J., Bothwell, T.H., Siegenberg, D., Bezwoda, W.R., Schmidt, U., Lamparelli, R.D., Mayet, F., MacPhail, A.P. (1990). The promotive effect of soy sauce on iron absorption in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 44, 419-424.
- Beard, J.L., Dawson, H., Pinero Domingo, J. (1996). Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutrition Reviews* 54, 295-317.
- Beaumont, C. (2004). Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer. *Médecine Sciences* 20, 68-72.
- Beleia, A., Varriano-Marston, E., Hosoney, R.C. (1980). Characterization of starch from pearl millets. *Cereal Chemistry* 57, 300-303.

- Benito, P., Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability. *Nutrition Research* 18, 581-603.
- Berger, J. (2003). Enrichissement des aliments en micronutriments : Elément d'une stratégie intégrée de lutte contre les carences en micronutriments dans les pays en développement. *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*
- Bergman, E.L., Autio, K., Sandberg, A.S. (2000). Optimal conditions for phytate degradation, estimation of phytase activity, and localization of phytate in barley (*Cv. Blenheim*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4647-4655.
- Bermejo, P., Pena, E.M., Dominguez, R., Bermejo, A., Cocho, J.A., Fraga, J.M. (2002). Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an *in vitro* method. *Food Chemistry* 77, 361-369.
- Bertolo, R.F.P., Bettger, W.J., Atkinson, S.A. (2001). Divalent metals inhibit and lactose stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 12, 73-80.
- Besançon, P. (1994). Innocuité et biodisponibilité des nutriments dans les aliments de complément. Dans: *L'alimentation de complément du jeune enfant*, (édité par Trèche, S., De Benoist, B., Benbouzid, D., Verster, A., Delpuech, F), pp.105-121. Paris: ORSTOM Editions.
- Bezançon, G., Renno, J-F., Anand Kumar, K. (1999). Plate-forme espèces tropicales et méditerranéennes : Le mil (*Pennisetum glaucum*). BRG. (consulté en juillet 2004). http://www.brg.prd.fr//brg/ecrans/rgvPi_mil.htm
- Bjorn-Rasmussen, E., Hallberg, L. (1979). Effect of animal proteins on the absorption of food iron in man. *Nutrition Metabolism* 23, 192-202.
- Black, M.M. (1998). Zinc deficiency and child development. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 464S-508S.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36, 527-543.
- Boccio, J., Salgueiro, J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Caro, R., Antoine, J., Weill, R. (2002). Zinc and iron interactions evaluated between different mineral sources in different nutritional matrixes. *Food Nutrition Bulletin* 23, 195-8.
- Borigato, E.V. M., Martinez, F.E. (1992). Iron incorporation in Brazilian infant diets cooked in iron utensils. *Nutrition research* 12, 1065-1073.
- Bosscher, D., Liu, Z., Janssens, G., Van Caillie-bertrand, M., Robberecht, H., De Rycke, H., De Wilde, R., Deelstra, H. (2001a). *In vitro* availability of zinc from infant foods with increasing phytic acid contents. *British Journal of Nutrition* 86, 241-247.
- Bosscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., Deelstra, H. (2001b). Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formula. *Nutrition* 17, 614-618.
- Bosscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., Van Cauwenbergh, R., Deelstra, H. (2003). Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition* 19, 641-645.

- Bothwell, T.H., Baynes, R.D., Macfarlane, B.J., Macphail, A.P. (1989). Nutritional iron requirements and food iron absorption. *Journal of Internal Medicine* 226, 357-365.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L. (1989). Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *European Journal of Clinical Nutrition* 43, 547-557.
- Brune, M., Rossander-Hulten, L., Hallberg, L., Glerup, A. and Sandberg, A. S. (1992). Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *The Journal of Nutrition* 122, 442-449.
- Buerkert, A., Haake, C., Ruckwied, M., Marschner, H. (1998). Phosphorus application affects the nutritional quality of millet grain in the Sahel. *Field Crops Research* 57, 223-235.
- Buerkert, A., Moser, M., Kumar, A. K., Furst, P. and Becker, K. (2001). Variation in grain quality of pearl millet from Sahelian West Africa. *Field Crops Research* 69, 1-11.
- Camara, E., Amaro, M.A. (2003). Nutritional aspect of zinc availability. *International Journal of Food Science and Nutrition* 54, 143-151.
- Capdevila, F.V.B; Marti-Henneberg, C (1998). Implications of the weaning pattern on macronutrient intake, food volume and energy density in non-breastfed infants during the first year of life. *Journal of the American College of Nutrition* 17, 256-262.
- Casey, P., Lorenz, K. (1977). Millet – Functional and nutritional properties. *Bakers Digest* 51, 45-51.
- Champ, M. (2003). Les fibres alimentaires : définitions et aspects analytiques. *La Lettre Scientifique de l'IFN*, 91.
- Champagne, E.T., Philippy, B.Q. (1989). Effects of pH on calcium, Zinc, and phytate solubilities and complexes following *in vitro* digestions of soy protein isolate. *Journal of Food Science* 54, 587-592.
- Chandrasekher, G., Raju, D.S., Pattabiraman, T.N. (1981). Natural plant enzyme inhibitors α -amylase inhibitors in millets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 9-16.
- Chandrasekher, G., Raju, D.S., Pattabiraman, T.N. (1982). Natural plant enzyme inhibitors protease inhibitors in millets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33, 447-450.
- Chau, C.F., Cheung, P.C.K., Wong, Y.S. (1997). Effects of cooking on content of amino acids and antinutrients in three Chinese indigenous legume seeds. *Journal the Science of Food and Agriculture* 75, 447-452.
- Chavan, J.K., Kadam, S.S. (1989). Nutritional improvement of cereals by sprouting. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28, 401-37.
- Chavan, J.K., Kadam, S.S., Salunkhe, D.K. (1981). Changes in tannin, free amino acids, reducing sugars and starch during seed germination of low- and high-tannin cultivars of sorghum. *Journal of Food Science* 46, 638-639.
- Chavan, U., Chavan, J., Kadam, S. (1988). Effects of fermentation of soluble proteins and *in vitro* protein digestibility of sorghum, green gram and sorghum-green gram blends. *Journal of Food Science* 53, 1574-1575.

- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 297-335.
- Cissé, D., Guiro, A.T., Diaham, B., Souané, M., Doumbouya, N.T.S., Wade, S. (1998). Effect of food processing on iron availability of African pearl millet weaning foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 49, 375-381.
- Cohen, N.L., Keen, C.L., Lönnerdal, B., Hurley, L.S. (1985). Effects of varying dietary iron on the expression of copper deficiency in the growing rat: Anemia, ferroxidase I and II, tissue trace elements, ascorbic acid, and xanthine dehydrogenase. *Journal of Nutrition* 115, 633-649.
- Coleman, J.E. (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21, 441-483.
- Cook, J.D., Dassenko, S.A., Whittaker, P. (1991). Calcium supplementation: Effect on iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, 106-111.
- Cook, J.D., Monsen, E.R. (1976). Food iron absorption in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 29, 859-867.
- Cook, J.D., Reddy, M.B. (2001). Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 93-98.
- Cook, J.D., Reddy, M.B., Burri, J., Juillerat, M.A., Hurrell, R.F. (1997). The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *American Journal of Clinical Nutrition* 65, 964-969.
- Cordain, L. (1999). Cereal grains: Humanity's double-edged sword. *World Review of Nutrition and Dietetics* 84, 19-73.
- Davidsson, L. (2003). Approaches to improve iron bioavailability from complementary foods. *Journal of Nutrition* 133, 1560S-1562S.
- Davidsson, L., Galan, P., Cherouvrier, F., Kastenmayer, P., Juillerat, M.A., Hercberg, S., Hurrell, R.F. (1997). Bioavailability in infants of iron from infant cereals: Effect of dephytinization. *American Journal of Clinical Nutrition* 65, 916-920.
- Davidsson, L., Mackenzie, J., Kastenmayer, P., Rose, A., Golden, B.E., Aggett, P.J., Hurrell, R.F. (1996). Dietary fiber in weaning cereals: a study of the effect on stool characteristics and absorption of energy, nitrogen, and minerals in healthy infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 22, 167-179.
- Davies, N.T., Olpin, S.E. (1979). Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *British Journal of Nutrition* 41, 590-603.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobbetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology* 87, 259-270.
- De Francisco, A., Shepherd, A.D., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E. (1982). Decorticating pearl millet and grain sorghum in a laboratory abrasive mill. *Cereal Chemistry* 59, 1-5.
- De Mayer, E., Adiels-Tegman, M., Raystone, E. (1985). The prevalence of anemia in the world. *World Health Stat Q* 38, 302-316.

- Delisle, H. (2003). La diversification alimentaire, stratégie potentiellement efficace mais encore négligée : Pourquoi ? *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*.
- Dendy, D.A.V. (1995). Sorghum and the millets: Production and Importance. Dans: *Sorghum and millets: Chemistry and Technology* (édité par Dendy D.A.V.), pp. 11-26. St Paul: American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Derman, D., Sayers, M., Lynch, S.R., Charlton, R.W., Bothwell, T.H. (1977). Iron absorption from a cereal-based meal containing cane sugar fortified with ascorbic acid. *British Journal of Nutrition* 38, 261-269.
- Derman, D.P., Ballot, D., Bothwell, T., MacFarlane, B.J., Baynes, R.D., MacPhail, A.P., Gillooly, M., Bothwell, J.E., Bezwoda, W.R., Mayet, F.G.H. (1987). Factors influencing the absorption of iron from soya-bean products. *British Journal of Nutrition* 57, 345-353.
- Derman, D.P., Bothwell, T.H., Torrance, J.D., Bezwoda, W.R., MacPhail, A.P., Kew, M.C., Sayers, M.H., Disler, P.B., Charlton, R.W. (1980). Iron absorption from maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum vulgare*) beer. *British Journal of Nutrition* 43, 271-279.
- Desrosiers, T., Clydesdale, F. (1989). Effectiveness of organic chelators in solubilizing calcium and zinc in fortified cereals under simulated gastrointestinal pH conditions. *Food Processing Preservation* 13, 307-319.
- Dewey, K.G., Brown, K.H. (2003). Uptake on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin* 24, 5-28.
- Du, S., Zhai, F., Wang, Y., Popkin, B.M. (2000). Current Methods for Estimating Dietary Iron Bioavailability Do Not Work in China. *Journal of Nutrition* 130, 193-198.
- Duhan, A., Chauhan, B., Punia, D., Kapoor, A.C. (1989). Phytic acid content of chickpea (*Cicer arietum*) and black gram (*Vigna mungo*): varietal differences and effects of domestic processing and cooking methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 49, 445-449.
- Duhan, A., Khetarpaul, N., Bishnoi, S. (1999). Effect of various domestic processing and cooking methods on phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron of pigeonpea. *Nutrition and Health* 13, 161-169.
- Duhan, A., Khetarpaul, N., Bishnoi, S. (2002). Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chemistry* 78, 9-14.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and Multiple-F tests. *Biometrics* 11, 1.
- Eastwood, D., Laidman, D.L. (1971). The mobilization of macronutrient elements in the germinating wheat grain. *Phytochemistry* 10, 1275-1284.
- Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M., Johansson, L. (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry* 80, 165-170.
- El Hag, M.E., El Tinay, A.H., Yousif, N.E. (2002). Effect of fermentation and dehulling on starch, total polyphenols, phytic acid content and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry* 77, 193-196.

- Elsheik, E.A.E., El Tinay, A.H., Fadul, I.A. (1999). Effect of nutritional status of faba bean on proximate composition, anti-nutritional factors and in vitro protein digestibility (IVPD). *Food Chemistry* 67, 379-383.
- El-Tinay, A.H., Abdel Gadir, A.M., El-Hidai, M. (1979). Sorghum fermented *kisra* bread. I. Nutritive value of *kisra*. *Journal of Science of Food and Agriculture* 30, 859- .
- Elyas, S.H.A., El Tinay, A.H., Yousif, N.E., Elsheikh, E.A.E. (2002). Effect of natural fermentation on nutritive value and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chemistry* 78, 75-79.
- Englyst, H.N., Cummings, J.H. (1988). An improved method for the measurement of dietary fibre as the non starch polysaccharides in plant foods. *Journal of AOAC* 71, 808-814.
- Erdman, J.W. (1979). Oilseed phytates: Nutritional Implications. *Journal of American Oil Chemistry and Society* 56, 736-741.
- Evers, A.D., Blakeney, A.B., O'Brien, L. (1999). Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 629-650.
- Fairweather-Tait, S. (1995). Bioavailability of iron. Proceedings of Interventions for child survival (édité par Penelope Nestel). 17-18 May. London, United Kingdom (consulté en septembre 2004) <http://www.jsi.com/intl/omni/ironmain.htm>
- Fairweather-Tait, S., Fox, T., Wharf, S.G., Eagles, J. (1995). The bioavailability of iron in different weaning foods and the enhancing effect of a fruit drink containing ascorbic acid. *Pediatric Research* 37, 389-394.
- FAO (1981). *Teneur des aliments en acides aminés*. Rome : FAO.
- FAO (1995). Le sorgho et les mil dans la nutrition humaine. Rome, FAO. (consulté en juillet 2004) <http://www.fao.org/docrep/T0818F/T0818F00.htm>
- FAO (2004). Agricultural data : FAOSTAT. (consulté en juillet 2004) <http://faostat.fao.org/faostat/default.jsp>
- FAO/OMS/UNU (1986). *Besoins énergétiques et besoins en protéines*. Genève: OMS.
- FAO/WHO. (1988). *Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12*. Rome : FAO.
- FAO/WHO. (1994) Codex Alimentarius, Vol 4, 2^{ème} édition.
- FAO/WHO. (2002a). Iron. Dans : *Human vitamin and mineral requirements, Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand*, pp 195-222. Rome : FAO.
- FAO/WHO. (2002b). Zinc. Dans : *Human vitamin and mineral requirements, Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand*, pp 257-270. Rome : FAO.
- FAO/WHO. (2002c). Food-based approaches to meeting vitamin and mineral needs. Dans : *Human vitamin and mineral requirements, Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand*, pp 7-26. Rome : FAO.
- FAO/WHO. (2002d). Codex Alimentarius. *Report of the 24th session of the Codex committee on nutrition and foods for special dietary uses*. 4-8 November. Berlin, Germany.
- Favier, J.C. (1989). Valeur nutritive et comportement des céréales au cours de leurs transformations. Dans: *Céréales en régions chaudes* (édité par John Libbey Eurotext), pp. 285-297. Paris : AUPELF-UREF.

- Ferguson, E.L., Gibson, R.S., Thompson, L.U., Ounpuu, S. (1989). Dietary calcium, phytate, zinc intakes and the calcium, phytate and zinc molar ratios of the diets of a selected group of East African children. *American Journal of Clinical Nutrition* 50, 1450-1456.
- FNB/IOM (2002). Proteins and amino acids. Dans : *Dietary reference intakes for energy, Carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids*, (édité par Institute of Medicine), 465-608, Washington D.C : National Academy Press. (Consulté en Septembre 2004) <http://books.nap.edu/books/0309085373/html/465.html#pagetop>
- Forbes, A.L., Adams, C.E., Arnaud, M.J., Chichester, C.O, Cook, J.D., Harrison, B.N., Hurrell, R.F., Kahn, S.G., Morris, E.R., Tanner, J.T., Whittaker, P. (1989). Comparison of *in vitro*, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 49, 225-238.
- Fordyce, E.S., Forbes, R.M., Fobbins, K.R., Erdman; J.W. (1987). Phytate x calcium/zinc molar ratios: Are they predictive of zinc bioavailability ? *Journal of Food Science* 52, 440-444.
- Fredlund, K., Asp, N.G., Larsson, M., Marklinder, I., Sandberg, A.S. (1997). Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oats after hydrothermal treatment. *Journal of Cereal Science* 25, 83-91.
- Fredrikson, M., Andlid, T., Haikara, A., Sandberg, A.S. (2002). Phytate degradation by micro-organisms in synthetic media and pea flour. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1-6.
- Frölich, W. (1995) Bioavailability of micronutrients in a fibre-rich diet, especially related to minerals. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, S116-S122.
- Gahlawat, P., Sehgal, S. (1994). In vitro starch and protein digestibility and iron availability in weaning foods as affected by processing methods. *Plant Foods for human Nutrition* 45, 165-173.
- Gangloff, M.B., Glahn, R.P., Miller, D.D., Van Campen, D.R. (1996). Assessment of iron availability using combined in vitro digestion and Caco-2 cell culture. *Nutrition Research* 16, 479-487.
- Ganji, V., Kies, C.V. (1994). Zinc bioavailability and tea consumption. Studies in healthy humans consuming self-selected and laboratory-controlled diets. *Plant Foods for Human Nutrition* 46, 267-276.
- Gargova, S., Roshkova, Z., Vancheva, G. (1997). Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology Techniques* 11, 221-224.
- Gibson, R.S. (1994). Zinc nutrition in developing countries. *Nutrition Research Reviews* 7, 151-173.
- Gibson, R.S., Ferguson, E.L. (1996). Food processing methods for improving the zinc content and bioavailability of home-based and commercially available complementary foods. *Proceedings of the workshop ILSI, Micronutrient interactions: Impact on child health and Nutrition*. pp 3-10. 29-30 July. Washington DC, USA.
- Gibson, R.S., Ferguson, E.L. (1998a). Assessment of dietary zinc in population. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, S430-S434.
- Gibson, R.S., Ferguson, E.L. (1998b). Nutrition intervention strategies to combat zinc deficiency in developing countries. *Nutrition Research Reviews* 11, 115-131.

- Gibson, R.S., Ferguson, E.L., Lehrfeld, J. (1998). Complementary foods for infant feeding in developing countries: their nutrient adequacy and improvement. *European Journal of Clinical Nutrition* 52, 764-770.
- Gibson, R., Hötz, C. (2001). Dietary diversification/modification strategies to enhance micronutrient content and bioavailability of diets in developing countries. *British Journal of Nutrition* 85, S159-S166.
- Gilloly, M., Bothwell, T.H., Torrance, J.D. (1983). The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *British Journal of Nutrition* 49, 331-335.
- Gilloly, M., Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Torrance, J.D., Bezwoda, W.R., Mac Phail, A.P., Derman, D.P., Novelli, L., Morral, D., Mayet, F. (1984). Factors affecting the absorption of iron from cereals. *British Journal of Nutrition* 51, 37-46.
- Glahn, R.P., Lee, O.A., Yeung, A., Goldman, M.I., Miller, D.D. (1998). Caco-2 cell ferritin formation predicts non radiolabeled food iron availability in an *in vitro* digestion / Caco-2 cell culture model. *Journal of Nutrition* 128, 1555-1561.
- Glahn, R.P., Rassier, M., Goldman, M.I., Lee, O.A., Cha, J. (2000). A comparison of iron availability from commercial iron preparations using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 62-68.
- Glahn, R.P., Wortley, G.M., South, P.K., Miller, D.D. (2002). Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl₂ : studies using an *in vitro* digestion / Caco-2 cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 390-395.
- Godon, B., Laignelet, B. (1991). Composition biochimique des céréales. Dans: *Les industries de première transformation des céréales* (édité par Godon, B., Willm, C.), pp. 77-104. Paris : Lavoisier APRIA.
- Grefeuille, V. (2002). Comparaison de méthodes d'évaluation *in vitro* de la biodisponibilité du fer et du zinc : application aux produits de transformation du mil. *Mémoire de DEA*. Université Montpellier II.
- Greiner, R., Konietzny, U. (1998). Endogenous phytate-degrading enzymes are responsible for phytate reduction while preparing beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Processing and Preservation* 29, 321-331.
- Greiner, R., Konietzny, U. (1999). Improving enzymatic reduction of *myo*-inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans (*Phaseolus vulgaris* var. preto). *Journal of Food Processing Preservation* 23, 249-261.
- Guyot, J.P., Mouquet, C., Tou, E.H., Counil, E., Traore, A.S., Trèche, S. (2003). Etude de la transformation du mil (*Pennisetum glaucum*) en *ben-saalga*, une bouillie fermentée traditionnelle du Burkina Faso. *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*.
- Habiba, R.A. (2002). Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry* 77, 187-192.
- Hadimani, N.A., Muralikrishna, G., Tharanathan, R.N. and Malleshi, N.G. (2001). Nature of carbohydrates and proteins in three pearl millet varieties varying in processing characteristics and kernel texture. *Journal of Cereal Science* 33, 17-25.

- Hagerman, A.E, Butler, L.G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 4494-4497.
- Hallberg, L., Bjorn-rasmussen, E. (1981). Measurement of iron absorption from meals contaminated with iron. *American Journal of Clinical Nutrition* 34, 2808-2815.
- Hallberg, L., Rossander, L. (1984). Improvement of iron nutrition in developing countries: Comparison of adding meat, soy protein, ascorbic acid, citric acid, and ferrous sulphate on iron absorption from a simple Latin American-type of meal. *American Journal of Clinical Nutrition* 39, 577-583.
- Hallberg, L., Brune, M., Rossander, L. (1986). Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of cereals. *Human Nutrition - Applied Nutrition* 40A, 97-113.
- Hallberg, L., Brune, M., Rossander, L. (1989). Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *American Journal of Clinical Nutrition* 49, 140-144.
- Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune, M., Glerup, A. (1992a). Calcium and iron absorption: Mechanism of action and nutritional importance. *European Journal of Clinical Nutrition* 46, 317-327.
- Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune, M., Glerup, A. (1992b). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *British Journal of Nutrition* 69, 533-527.
- Hallberg, L., Hulthen, L. (2002). Perspectives on iron absorption. *Blood Cells Molecules and Diseases* 29, 562-573.
- Hara, H., Hayashi, K., Aoyama, Y. (2001). Intestinal absorption of zinc is promoted by low-level intake but inhibited by high-level intake of corn husk fiber in rats. *Nutrition Research* 21, 627-637.
- Harland, B.F., Morris, E.R. (1995). Phytate: a good or a bad food component? *Nutrition Research* 15, 733-754.
- Harvey, P.W., Dexter, P. B., Darnton-Hill, I. (2000). The impact of consuming iron from non-food sources on iron status in developing countries. *Public Health Nutrition* 3, 375-383.
- Haslam, E. (1974). Polyphenol-Protein interactions. *Biochemistry Journal* 139, 285-288.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heinonen, J.K., Lahti, R.J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Chemistry*, 113, 313-317.
- Hercberg, S. (1995). Fer. Dans : *Dossier Scientifique de l'IFN n°7, Les minéraux*, pp 45-55. Paris : Institut Français pour la Nutrition.
- Hercberg, S., Preziosi, P., Galan, P. (1991) Le fer. Dans : *Les oligoéléments en médecine et en biologie* (édité par Tec et Doc), pp. 313-346. Paris : Lavoisier.
- Hernandez, M., Sousa, V., Moreno, A., Villapando, S., Lopez-Alarcon, M. (2003). Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *Journal of Nutrition* 133, 154-159.

- Hocquellet, P., L'Hotellier, M.D. (1997). Bioavailability and speciation of mineral micronutrients: the enzymolysis approach. *Journal of AOAC International* 80, 920-927.
- Holm, P.B., Kristiansen, K.N., Pedersen, H.B. (2002). Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *Journal of Nutrition* 132, 514S-516S.
- Holmes, J., Björck, I., Drews, A., Asp, N.G. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch* 38, 224-226.
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, J.F., Gorecki, R. (1998). Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und - Forschung A* 206, 279-283.
- Hoover, R., Swamidas, G., Kok, L.S., Vasanthan, T. (1996). Composition and physicochemical properties of starch from pearl millet grains. *Food Chemistry* 56, 355-367.
- Hoover, R., Vasanthan, T. (1994). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, legume and tuber starches. *Carbohydrate Research* 252, 33-53.
- Hötz, C., Gibson, R.S. (2001). Assessment of home-based processing methods to reduce the phytate content and phytate/zinc molar ratio of white maize (*Zea mays*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 692-698.
- Hötz, C., Gibson, R.S., Temple, L. (2001). A home-based method to reduce phytate content and increase zinc bioavailability in maize-based complementary diets. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52, 133-142.
- House, L.R. (1995). Sorghum and millets: History, taxonomy, and distribution. Dans: *Sorghum and millets: Chemistry and Technology* (édité par Dendy D.A.V.), pp. 1-10. St Paul : American Association of Cereal Chemists, Inc.
- House, W.A. (1999). Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field Crops Research* 60, 115-141.
- Hunt, J.R. (2001). How important is dietary iron bioavailability? *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 3-4.
- Hurrell, R.F. (1984). Bioavailability of different iron compounds used to fortify formulas and cereals: Technological problems. Dans : *Iron nutrition in infancy and childhood*, (édité par Stekel A.), pp. 147-178. New York : Raven Press.
- Hurrell, R.F., Lynch, S.R., Trinidad, T.P., Dassenko, S.A., Cook, J.D. (1988). Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *American Journal of Clinical Nutrition* 47, 102-107.
- Hurrell, R.F., Juillerat, M.A., Reddy, M.B., Lynch, S.R., Dassenko, S.A., Cook, J.D. (1992). Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 56, 573-578.
- Hurrell, R.F. (2002). Fortification: overcoming technical and practical barriers. *Journal of Nutrition* 132, S806-S812.
- Hurrell, R.F. (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *Journal of Nutrition* 133, S2973-S2977.

- Hurrell, R.F., Reddy, M.B., Juillerat, M.A., Cook, J.D. (2003). Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 1213-1219.
- Ibrahim, S., Fisher, C., Alaily, H.E., Soloman, H., Anwar, A. (1988). Improvement of the nutritional quality of Egyptian and Sudanese sorghum grains by the addition of phosphates. *British Journal of Poultry Science* 29, 721-728.
- Ikemefuna, C., Obizoba, C., Egbuna, H.I. (1991). Effect of germination and fermentation on the nutritional quality of bambara nut and its product (milk). *Plant foods for human Nutrition* 42, 13-23.
- International Food Policy Research Institute (IFPRI). (2002). Biofortification: Harnessing agricultural technology to improve the health of the poor (consulté en juillet 2004) www.ifpri.org/themes/grp06/papers/biofort.pdf.
- Iqbal, T.H., Lewis, K.O., Cooper, B.T. (1994). Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut* 35, 1233-1236.
- Jackman, H., Black, C.A. (1951). Solubility of iron, aluminium, calcium, and magnesium inositol phosphates at different pH values. *Soil Science* 72, 179-186.
- Jansman, A.J.M., Enting, H., Verstegen, M.W.A., Huisman, J. (1994). Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. *British Journal of Nutrition* 71, 627-641.
- Jenab, M., Thompson, L.U. (2002). Role of phytic acid in cancer and other diseases. Dans: *Food phytates*, (édité par N.R., Sathe, S.K.), pp. 225-248. Boca Raton : CRC Press.
- Kamath, M.V., Belavady, B. (1980). Unavailable carbohydrates of commonly consumed Indian foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31, 194-202.
- Kane, A.P., Miller, D.D. (1984). *In vitro* estimation of the effects of selected proteins on non bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 39, 393-401.
- Kaur, M., Kawatra, B.L. (2002). Effect of domestic processing on zinc bioavailability from ricebean (*Vigna umbellata*) diets. *Plant Foods for Human Nutrition* 57, 307-318.
- Kazanas, N., Fields, M.L. (1981). Nutritional improvement of sorghum by fermentation. *Journal of Food Science* 46, 819-821.
- Kennedy, G., Nantel, G., Shetty, P. (2003). The scourge of "hidden hunger": global dimensions of micronutrient deficiencies. *Food, Nutrition and Agriculture* 32, 8-16.
- Khetarpaul, N., Chauchan, B.M. (1989). Effect of germination and pure culture fermentation on HCl-extractability of minerals of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *International Journal of Food Sciences and Technology* 24, 327-331.
- Khetarpaul, N., Chauhan, B.M. (1990). Effect of germination and fermentation on *in vitro* and protein digestibility of pearl millet. *Journal of Food Science* 55, 883-884.
- Khokhar, S., Apenten, R.K.O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chemistry* 81, 133-140.
- Kivisto, B., Andersson, H., Cederblad, G., Sandberg, A.S., Sandstrom, B. (1986). Extrusion cooking of a high-fiber cereal product. 2. Effects on apparent absorption of zinc, iron, calcium, magnesium, and phosphorus in humans. *British Journal of Nutrition* 55, 255-260.

- Klopfenstein, C.F., Hosney, R.C. (1995). Nutritional properties of sorghum and the millets. Dans : *Sorghum and millets: Chemistry and Technology* (édité par Dendy, D.A.V.), pp. 125-168. St Paul : American association of cereal chemists Inc.
- Knuckles, B.E. (1988). Effect of phytate and other *myo*-inositol phosphate esters on lipase activity. *Journal of Food Science* 53, 250-252.
- Knuckles, B.E., Kuzmicky, D., Betschart, A.A. (1985). Effect of phytate and partially hydrolysed phytate on *in vitro* protein digestibility. *Journal of Food Science* 50, 1080-1082.
- Kollipara, U.K., Brittin, H.C. (1996). Increased iron content of some Indian foods due to cookware. *Journal of the American Dietetic Association* 96, 508-510.
- Konietzny, U., Greiner, R., Jany, K.L.D. (1994). Characterisation of a Phytase From Spelt. Dans : *Bioactive Substances in Food Plant Origin*, (édité par Kozłowska H., Fornal, J., Zdunczyk, Z.), pp. 335-339. Olsztyn : Polish Academy of Sciences.
- Konietzny, U., Greiner, R., Jany, K.L.D. (1995). Purification and characterization of a phytase from spelt, *Journal of Food Biochemistry*, 18, 165-183.
- Konietzny, U., Greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science and Technology* 37, 791-812.
- Koplik, R., Mestek, O., Kominkova, J., Borkova, M., Suchanek, M. (2004). Effect of cooking on phosphorus and trace elements species in peas. *Food Chemistry* 85, 31-39.
- Kristensen, L., Purslow, P.P. (2001). The effect of processing temperature and addition of mono- and di-valent salts on the heme- nonheme-iron ratio of meat. *Food Chemistry* 73, 433-439.
- Kumari, M., Gupta, S.K., Lakshmi, A.J., Prakash, J. (2004). Iron bioavailability in green leafy vegetables cooked in different utensils. *Food Chemistry* 86, 217-222.
- Kutos, T., Golob, T., Kac, M., Plestenjak, A. (2003). Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chemistry* 80, 231-235.
- Lai, C.C., Varriano-Marston, E. (1980). Lipid content and fatty acid composition of free and bound lipids in pearl millets. *Cereal Chemistry* 57, 271-274.
- Laporte, J., Kovacsik, G., Pinta, M. (1980). Milieux végétaux. Dans : *Spectrométrie d'absorption atomique, Tome 2: Applications à l'analyse chimique* (2nde édition, édité par M. Pinta), pp. 378-421. Paris: Masson.
- Larsson, M. (1994). Bioprocessing of oats: Influence on phytate hydrolysis and mineral bioavailability. *Doctoral dissertation*. Chalmers University of Technology, Sweden.
- Larsson, M., Rossander-Hultén, L., Sandström, B., Sandberg, A.S. (1996). Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *British Journal of Nutrition* 76, 677-688.
- Latta, M., Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 1313-1315.
- Latunde Dada, G.O. (1997). Sources and forms of iron in Nigerian foods and effects of processing on availability. *Food and Nutrition Bulletin* 18, 84-89.

- Layrisse, M., Martinez-Torres, C., Leets, I., Taylor, P., Ramirez, J. (1984). Effects of histidine, cysteine, glutathione, or beef on iron absorption in humans. *Journal of Nutrition* 114, 217-223.
- Lestienne, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C., Trèche, S. (2005). Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry* 89, 421-425.
- Levrat-Verny, M.-A., Coudray, C., Bellanger, J., Lopez, H.W., Demigné, C., Rayssiguier, Y., Rémésy, C. (1999). Wholewheat flour ensures higher mineral absorption and bioavailability than white wheat flour in rats. *British Journal of Nutrition* 82, 17-21.
- Lochte-Watson, K.R., Weller, C.L., Jackson, D.S. (2000). Fractionation of grain sorghum using abrasive decortication. *Journal of Agricultural and Engineering Research* 77, 203-208.
- Lombardi-Boccia, G., De Santis, N., Di Lullo, G., Carnovale, E. (1995). Impact of processing on Fe dialysability from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 53, 191-195.
- Longstaff, M.A., McNab, J.M. (1991). The effect of concentration of tannin-rich bean hulls (*Vicia faba* L.) on activities of lipase (EC 3.1.1.3) and α -amylase (EC 3.2.1.1) in digesta and pancreas and on the digestion of lipid and starch by young chicks. *British Journal of Nutrition* 66, 139-147.
- Lönnerdal, B. (1996). Iron-zinc-copper interactions. *Proceedings of the workshop ILSI, Micronutrient interactions: Impact on child health and Nutrition*. pp 3-10. 29-30 July. Washington DC, USA.
- Lönnerdal, B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of Nutrition* 130, S1378-S1383.
- Lönnerdal, B., Bell, J.G., Hendrickx, A.G., Burns, R.A., Keen, C.L. (1988). Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula. *American Journal of Clinical Nutrition* 48, 1301-1306.
- Lönnerdal, B., Sandberg, A.S., Sandström, B., Kunz, C. (1989). Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal of Nutrition* 119, 211-214.
- Lönnerdal, B., Yuen, M., Glazier, C., Litov, R. (1993). Magnesium bioavailability from human milk, cow milk, and infant formula in suckling rat pups. *American Journal of Clinical Nutrition* 58, 392-397.
- Lopez, H.W., Krespine, V., Guy, C., Messenger, A., Demigné, C., Rémésy, C. (2001). Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2657-2662.
- Loréal, O., Brissot, P. (2003). L'hépcidine : petite molécules, grands desseins. *La revue de Médecine Interne* 24, 213-215.
- Loria, A., Medal, L.S., Elizondo, J. (1962). Effect of sorbitol on iron absorption in man. *American Journal of Clinical Nutrition* 10, 124-127.
- Lucca, P., Hurrell, R., Potrykus, I. (2002). Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *Journal of the American College of Nutrition* 21, S184-S190.
- Lukaski, H.C., Bolonchuk, W.W., Klevay, L.M., Milne, D.B., Sandstead, H.H. (1984). Changes in plasma zinc content after exercise in men fed a low zinc diet. *American Journal of Physiology* 247, 88-93.

- Lutter, C.K., Dewey, K.G. (2003). Proposed nutrient composition for fortified complementary foods. *Journal of Nutrition* 133, 3011S-3020S.
- Lykken, G.I., Mahalko, J., Johnson, P.E., Milne, D., Sandstead, H.H., Garcia, W.J., Dintzis, F.R., Inglett, G.E. (1986). Effects of browned and unbrowned corn products intrinsically labelled with ⁶⁵zinc on absorption of ⁶⁵zinc in humans. *Journal of Nutrition* 116, 795-801.
- MacDonough, C.M., Rooney, L.W. (1989). Structural characteristics of *Pennisetum americanum* using scanning electron and fluorescence microscopies. *Food Microstructure* 89, 137-149.
- MacFarlane, S.B.J. (1995). A universal growth reference or fool's gold. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, 745-753.
- Macfarlane, B.J., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Schmidt, U., Mayet, F., Friedman, B.M. (1988). Effects of lupines, a protein-rich legume, on iron absorption. *European Journal of Clinical Nutrition* 42, 683-687.
- Macfarlane, B.J., Van Der Riet, W.B., Bothwell, T.H., Baynes, R.D., Siegenberg, D., Schmidt, U., Tal, A., Taylor, J.R.N., Mayet, F. (1990). Effect of traditional oriental soy products on iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 51, 873-880.
- Maenz, D.D., Engele-Schaan, C.M., Newkirk, R.W., Classen, H.L. (1999). The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Animal Feed Science and Technology* 81, 177-192.
- Mahgoub, S.E.O., Elhag, S.A. (1998). Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chemistry* 61, 77-80.
- Mallesh, N.G., Desikachar, H.S.R. (1986). Nutritive value of malted millet flours. *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition* 36, 191-196.
- Mallesh, N.G., Desikachar, H.S.R. (1988). Reducing the paste viscosity (dietary bulk) of roller dried weaning foods using malt flour or fungal amylase. *Journal of Food Science and Technology of India* 25, 1-3.
- Mamiro, P.R.S., Van Camp, J., Mwikya, S.M., Huyghebaert (2001). *In Vitro* extractability of calcium, iron, and zinc in finger millet and kidney beans during processing. *Food Chemistry and Toxicology* 66, 1-5.
- Manary, M.J., Hotz, C., Krebs, N.F., Gibson, R.S., Westcott, J.E., Arnold, T., Broadhead, R.L., Hambidge, K.M. (2000). Dietary phytate reduction improves zinc absorption in Malawian children recovering from tuberculosis but not in well children. *Journal of Nutrition* 130, 2959-2964.
- Marero, L.M., Payumo, E.M., Aguinaldo, A.R., Homma, S. (1988). Nutritional characteristics of weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. *Journal of food science* 55, 1399-1402.
- Marfo, E.K., Simpson, B.K., Idowu, J.S., Oke, O.L. (1990). Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1580-1585.

- Marklinder, I.M., Larsson, M., Fredlund, K., Sandberg, A.S. (1995). Degradation of phytate by using varied sources of phytases in an oat-based nutrient solution fermented by *Lactobacillus plantarum* strain 299 V. *Food Microbiology* 12, 487-495.
- Martinez, C., Ros, G., Periago, M.J., Ortuno, J., Lopez, G., Rincon, F. (1998). *In vitro* protein digestibility and mineral availability of green beans (*Phaseolus vulgaris* L) as influenced by variety and pod size. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 414-420.
- Martinez, F.E., Vannucchi, H. (1986). Bioavailability of iron added to the diet by cooking food in an iron pot. *Nutrition Research* 6, 421-428.
- Martinez, I., Santaella, M., Ros, G., Periago, M.J. (1998). Content and *in vitro* availability of Fe, Zn, Ca, and P in homogenized fish-based weaning foods after bone addition. *Food Chemistry* 63, 299-305.
- Martinez-Torres, C., Layrisse, M. (1970). Effect of amino acids on iron absorption from a staple vegetable food. *Blood* 35, 669-682.
- Matsui, T. (2002). Relationship between mineral bioavailabilities and dietary phytate in animals. *Animal Science Journal* 73, 21-28.
- Matuschek, E., Towo, E., Svanberg, U. (2001). Oxidation of polyphenols in phytate-reduced high-tannin cereals: effect on different phenolic groups and on *in vitro* accessible iron. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49, 5630-5638.
- Mbithi-Mwikya, S., Van Camp, J., Yiru, Y., Huyghebaert (2000). Nutrient and antinutrient changes in Finger millet (*Eleusine coracana*) during sprouting. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 33, 9-14.
- Miller, D.D. (1996). Effects of cooking and food processing on the content of bioavailable iron in foods. *Proceedings of the workshop ILSI, Micronutrient interactions: Impact on child health and Nutrition*. pp 58-68. 29-30 July. Washington DC, USA.
- Miller, D.D., Schriker, B.R., Rasmussen, R.R., Van Campen, D. (1981). An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition* 34, 2248-2256.
- Monsen, E.R., Hallberg, G.L., Layrisse, M., Hegsted, D.M., Cook, J.D., Mertz, W., Finch, C.A. (1978). Estimation of available dietary iron. *American Journal of Clinical Nutrition* 31, 134-141.
- Mosha, A.C., 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. (2003). Processes and quality variability of cereal food products. Dans: *Meeting consumer requirements for cereal based fermented foodstuffs with improved nutritional and sanitary quality and shelf-life in Africa*, (Annual report INCO Cerefer) pp.2-14.
- Mouquet, C., Guyot, J.P., Trèche, S. (2001). Changes in phytate content during traditional processing of cereal into fermented gruels in west-African small scale units. *Annals of Nutrition & Metabolism of the 17th International congress of Nutrition*. 27-31 August. Vienna, Austria.
- Muñoz, J.M., Harland, B.F. (1993). Overview of the effects of dietary fiber on the utilization of minerals and trace elements. Dans: *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*, (édité par Spiller, G.A.), pp245-252. Boca Raton : CRC press.

- Murty, D.S., Kumar, K.A. (1995). Traditional uses of sorghum and millets. Dans: *Sorghum and millets: Chemistry and technology* (édité par Dendy D.A.V.), pp. 185-222. St Paul : American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Nävert, B., Sandström, B., Cederblad, A. (1985). Reduction of phytate content of bran by leavening in bread and its effects on zinc absorption in man. *British Journal of Nutrition* 53, 47-53.
- Nestares, T., Barrionuevo, M., Urbano, G., Lopez-Frias, M. (1999). Effect of processing methods on the calcium, phosphorus, and phytic acid contents and nutritive utilization of Chickpea (*Cicer arietum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2807-2812.
- Nout, M.J.R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International* 27, 291-298.
- Nout, M.J.R., Ngoddy, P.O. (1997). Technological aspects of preparing affordable fermented complementary foods*1. *Food Control* 8, 279-287.
- Nout, M.J.R., Sarkar, P.K. (1999). Lactic acid food fermentation in tropical climates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 395-401.
- Nyman, E.M.G.L., Svanberg, S.J M. (2002). Modification of physicochemical properties of dietary fibre in carrots by mono- and divalent cations. *Food Chemistry* 76, 273-280.
- O'Dell, B.L., Savage, J.E. (1960). Effect of phytic acid on zinc availability. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 103, 304-306.
- O'Dell, B.L., De Boland, A.R., Koirtyohann, S.R. (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 718-721.
- Obilana, A.B. (2003). Overview: Importance of millets in Africa. *Workshop on the proteins of sorghum and millets: Enhancing nutritional and functional properties for Africa*. (édité par Belton, P.S., Taylor, J.R.N.). 2-4 April. Pretoria, South Africa. (consulté en juillet 2004) <http://www.afripro.org.uk>
- Olivares, M., Pizarro, F., Walter, T., Arredondo, M., Hertrampf, E. (1999). Bioavailability of iron supplements consumed daily is not different from that of iron supplements consumed weekly. *Nutrition Research* 19, 179-190.
- Olivares, A.B., Martinez, C., Lopez, G., Ros, G. (2001). Influence of the design of a product on *in vitro* mineral availability of homogenized weaning foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 181-187.
- Ologhobo, A.D., Fetuga, B.L. (1984). Distribution of phosphorus and phytate in some Nigerian varieties of legumes and some effects of processing. *Journal of Food Science* 49, 199-201.
- OMS. (1985). Energy and protein requirements. *Report of a joint FAO/OMS/UNU expert consultation*.
- OMS. (1998). Energy required from complementary foods and factors affecting their intake. Dans: *Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge*. (Report WHO/NUT/98.1), pp. 45-76. Geneva : WHO.
- OMS. (1998). Protein and micronutrients required from complementary foods. Dans : *Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge*. (Report WHO/NUT/98.1), pp. 79-108. Geneva : WHO.

- OMS. (2001). Global strategy for infant and young child feeding: The optimal duration of exclusive breastfeeding. *Document A54/INF.DOC./4*.
- Osagie, A.U., Kates, M. (1984). Lipid composition of millet (*Pennisetum americanum*) seeds. *Lipids* 19, 958-965.
- Oski, F.A., Landaw, S.A. (1980). Inhibition of iron absorption from human milk by baby food. *American Journal of Disease in Childhood* 134, 459-460.
- Osman, A.K., Fatah, A.A. (1981). Factors other than iodine deficiency contributing to the endemicity of goitre in Darfur province, Sudan. *Journal of Human Nutrition* 35, 302-309.
- Pallauf, J., Rimbach, G. (1997). Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives of Animal Nutrition* 50, 301-319.
- Panasiuk, O., Bills, D.D. (1984). Cyanide content of sorghum sprouts. *Journal of Food Science* 49, 791-793.
- Papadopoulou, A., Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology* 15, 186-190.
- Parkkila, S., Niemela, O., Britton, R.S., Fleming, R.E., Waheed, A., Baçon, B.R., Sly, W.S. (2001). Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 121, 1489-1496.
- Pattabiraman, T.N. (1985). Trypsin/chymotrypsin inhibitors from millets. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 199, 439-448.
- Peers, F.G. (1953). The phytase of wheat. *Biochemistry Journal* 53, 102-110.
- Persson, H., Nair, B.M., Frolich, W., Nyman, M., Asp, N. (1987). Binding of mineral elements by some dietary fibre components. *In vitro* (II). *Food Chemistry* 26, 139-148.
- Perten, H. (1983). Practical experience in processing and use of millet and sorghum in Senegal and Sudan. *Cereal Foods World* 28, 680-683.
- Phillippy, B.Q., Ullah, A.H.J., Ehrlich, K.C. (1994). Purification and some properties of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase from immature soybean seeds, *The Journal of Biological Chemistry* 269, 28393-28399.
- Phillippy, B.Q. (1999). Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* phytases to inactivation by gastrointestinal enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1385-1388.
- Pinto, M., Robin-Leon, S., Appay, M., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assman, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaun, A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 47, 323-330.
- Planes, P., Rouanet, J.M., Laurent, C., Baccou, J.C., Besançon, P., Caporiccio, B. (2002). Magnesium bioavailability from magnesium-fortified spirulina in cultured human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry* 77, 213-218.
- Price, M.L., Butler, L.G., Featherston, W.R., Rogler, J.C. (1978). Detoxification of high tannin sorghum grain. *Nutrition Reports International* 17, 227-236.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., Devries, J.W., Furda, I. (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. *Journal of AOAC* 71, 1017-1023.

- Purchas, R.W., Simcock, D.C., Knight, T.W., Wilkinson, B.H.P. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 827-837.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., Ohta, Y. (2001). Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92, 154-160.
- Reddy, N.R. (2002). Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. Dans: *Food phytates*, (édité par Reddy, N.R., Sathe, S.K.), pp. 25-51. Boca Raton: CRC Press.
- Reddy M.B., Cook, J.D. (1991). Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in human and rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 723-728.
- Reddy M.B., Hurrell R.F., Cook J.D. (2000) Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 937-943.
- Reeves, P.G., Briske-Anderson, M., Johnson, L.A. (2001). Pre-treatment of Caco-2 cells with zinc during the differentiation phase alters the kinetics of zinc uptake and transport. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 12, 674-684.
- Reichert, R.D., Mwasaru, M.A., Mukuru, S.Z. (1988). Characterization of coloured sorghum lines and identification of high-tannin lines with good dehulling characteristics. *Cereal chemistry* 65, 165-170.
- Reichert, R.D., Youngs, C.G. (1977). Dehulling cereal grains and grain legumes for developing countries. II. Chemical composition of mechanically and traditionally dehulled sorghum and millet. *Cereal Chemistry* 54, 174-178.
- Reinhold, J.G. (1971). High phytate content of rural Iranian bread: a possible cause of human zinc deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition* 24, 1204-1206.
- Reinhold, J.G., Ismail, B.F., Faradji, F. (1975). Fibre vs phytate as determinant of the availability of calcium, zinc and iron of breadstuffs. *Nutrition Reports International* 12, 75-85.
- Rohrbach, D.D. (2003). Improving the commercial viability of sorghum and pearl millet in Africa. *Workshop on the proteins of sorghum and millets: Enhancing nutritional and functional properties for Africa*. (édité par Belton, P.S., Taylor, J.R.N.). 2-4 April. Pretoria, South Africa. (consulté en juillet 2004) <http://www.afripro.org.uk>
- Rossander-Hultén, L., Brune, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., Hallberg, L. (1991). Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 54, 152-156.
- Rossander-Hultén, L., Gleerup, A., Hallberg, L. (1990). Inhibitory effect of oat products on nonheme iron absorption in man. *European Journal of Clinical Investigation* 44, 783-791.
- Rubio, L.A., Grant, G., Bardocz, S., Dewey, P., Pusztai, A. (1992). Mineral excretion of rats fed on diets containing faba beans (*Vicia faba* L) or faba bean fractions. *British Journal of Nutrition* 67, 295-302.
- Ruel, M.T., Harimond, M. (2003). Diversification alimentaire, couverture des besoins nutritionnels et croissance des enfants : Connaissances actuelles et recherches nécessaires. *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*.

- Ruel, M.T., Levin, C.E. (2000). Assessing the potential for food-based strategies to reduce vitamin A and iron deficiencies: A review of recent evidence. *Food Consumption and Nutrition Division* (Discussion paper N°92, consulté en Mai 2003) <http://www.ifpri.org/divs/fcnd/dp/papers/fcndp92.pdf>.
- Rutgersson, A., Bergman, E.-L., Lingnert, H., Sandberg, A.-S. (1997). Optimization of temperature, time, and lactic acid concentration to inactivate lipoxygenase and lipase and preserve phytase activity in barley (*cv. Blenheim*) during soaking. *Cereal Chemistry* 74, 727-732.
- Saarinen, U.M., Siimes, M.A., Dallman, P.R. (1977). Iron absorption in infants: High bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsig tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *Journal of Pediatrics* 91, 36-39.
- Saha, P.R., Weaver, C.M., Mason, A.C. (1994). Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42, 2531-2535.
- Saharan, K., Khetarpaul, N., Bishnoi, S. (2001). HCl-extractability of minerals from ricebean and fababean: influence of domestic processing methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 323-325.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J. (2000). Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutrition Research* 20, 737-755.
- Salunkhe, D.K., Jadhav, S.J., Kadam, S.S., Chavan, J.K. (1982). Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereal and legumes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 17, 277-305.
- Salunkhe, D.K., Jadhav, S.J., Kadam, S.S., Chavan, J.K. (1990). Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 17, 277-305.
- Sandberg, A.S. (2002). *In vitro* and *in vivo* degradation of phytate. Dans: *Food phytates*, (édité par Reddy, N.R., Sathe, S.K.), pp 139-155. Boca Raton : CRC Press.
- Sandberg, A.F., Andersson, H., Carlsson, N.G., Sandstrom, B. (1987). Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *The Journal of Nutrition* 117, 2061-2065.
- Sandberg, A.S., Andersson, H. (1988). Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. *The Journal of Nutrition* 118, 469-473.
- Sandberg, A.S., Carlsson, N.G., Svanberg, U. (1989). Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates on *in vitro* estimation of iron availability. *Journal of Food Science* 54, 159-186.
- Sandberg, A.S., Svanberg, U. (1991). Phytate hydrolysis by phytase in cereals: effects on *in vitro* estimation of iron availability. *Journal of Food Science* 56, 1330-1333.
- Sandberg, A.S., Larsen, T., Sandström, B. (1993). High dietary calcium level decrease colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet. *The Journal of Nutrition* 123, 559-566.
- Sandstead, H.H. (1995). Is zinc deficiency a public health problem ?. *Nutrition*, 11, 87-92.
- Sandstead, H.H. (2000). Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *Journal of Nutrition* 130, S347-S349.

- Sandstead, H.H., Smith, J.C. (1996). Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *Journal of Nutrition* 126, S2410-S2418.
- Sandström, B. (1992). Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. *Proceedings of the Nutrition Society* 51, 211-218.
- Sandström, B. (1997). Bioavailability of zinc. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 17S-19S.
- Sandström, B., Davidsson, L., Cederblad, A., Lönnerdal, B. (1985). Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. *Journal of Nutrition* 115, 411-414.
- Sandström, B., Sandberg, A.S. (1992). Inhibitory effects of inositol phosphates on zinc absorption in humans. *Journal of Trace elements and Electrolytes Health Diseases* 6, 99-103.
- Sandström, B., Bügel, S., McGaw, B.A., Price, J., Reid, M.D. (2000). A high oat-bran intake does not impair zinc absorption in humans when added to a low-fiber animal protein-based diet. *The Journal of Nutrition* 130, 594-599.
- Sathe, S.K., Deshpande, S.S., Reddy, N.R., Goll, D.E., Salunkhe, D.K. (1983). Effects of germination on proteins, raffinose, oligosaccharides and anti-nutritional factors in the great northern Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* 48, 1796-1800.
- Scheeman, B.O. (1986). Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effects. *Food Technology* 40, 104-110.
- Scheuring, J.F., Sidibe, S., Rooney, L.W., Earp, C.F. (1983). Sorghum pericarp thickness and its relation to decortication in a wooden mortar and pestle. *Cereal Chemistry* 60, 86-89.
- Schlemmer, U., Muller, H., Jany, K.D. (1995). The degradation of phytic acid in legumes prepared by different methods. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, 207-210.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.
- Schricker, B.R., Miller, D.D., Rasmussen, R.R., Van Campen, D. (1981). A comparison of *in vivo* and *in vitro* methods for determining availability of iron from meals. *American Journal of Clinical Nutrition* 34, 2257-2263.
- Sehgal, A.S., Kawatra, A. (1999). Reduction of polyphenol and phytic acid content of pearl millet grains by malting and blanching. *Plant Foods for Human Nutrition* 53, 93-98.
- Serna-Saldivar, S., Rooney, L.W. (1995). Structure and Chemistry of sorghum and millets. Dans: *Sorghum and millets: Chemistry and technology*, (édité par Dendy D.A.V.), pp. 69-124. St Paul : American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Serna-Saldivar, S.O., Clegg, C., Rooney, L.W. (1994). Effects of parboiling and decortication on the nutritional value of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Journal of Cereal Science* 19, 83-89.
- Shah, B.G., Malcolm, S., Belonje, B., Trick, K.D., Brassard, R., Mongeau, R. (1991). Effect of dietary cereal brans on the metabolism of trace elements in a long-term rat study. *Cereal Chemistry* 68, 190-194.
- Shankar, A.H., Prasad, A.S. (1998). Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, S447-S463.

- Sharma, A., Khetarpaul, N. (1997). Effect of fermentation with whey on the HCl extractability of minerals from rice-dehulled blackgram blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2258-2261.
- Shen, X., Weaver, C.M., Kempa-Steczko, A., Martin, B.R., Phillippy, B.Q., Heaney, R.P. (1998). An inositol phosphate as a calcium absorption enhancer in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 9, 298-301.
- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G. (2004). Phytate from edible beans: Chemistry, processing and health benefits. *Food, Agriculture and Environment* 2, 32-37.
- Shirai, K., Revah-Moiseev, S., Garcia-Garibay, M., Marshall, V.M. (1994). Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Letters in Applied Microbiology* 19, 366-369.
- Siegenberg, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Macfarlane, B.J., Lamparelli, R.D., Car, N.G., Macphail, P., Schmidt, U., Tal, A., Mayet, F. (1991). Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, 537-541.
- Siimes, M.A., Salmenpera, L., Perheentupa, J. (1984). Exclusive breast feeding for nine months: A risk of iron deficiency. *Journal of Pediatrics* 104, 196-199.
- Siljeström, M., Westerlund, E., Björck, I., Holm, J., Asp, N.G., Theander, O. (1986). The effects of various thermal processes on dietary fibre and starch content of whole grain wheat and white flour, *Journal of Cereal Science* 4, 315-323.
- Simmer, K., Khanum, S., Carlsson, L., Thompson, R.P.H. (1988). Nutritional rehabilitation in Bangladesh – The importance of zinc. *American Journal of Clinical Nutrition* 47, 1036-1040.
- Simon, O., Igbasan, F. (2002). *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 813-822.
- Simwemba, C.G., Hosoney, R.C., Varriano-Marston, E., Zeleznak, K. (1984). Certain B vitamin and phytic acid contents of pearl millet [*Pennisetum americanum* (L.) Leeke]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 31-34.
- Singh, M., Krikorian, A.D. (1982). Inhibition of trypsin activity *in vitro* by phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, 799-800.
- Singh, P., Singh, U., Eggum, B.O., Kumar, K.A., Andrews, D.J. (1987). Nutritional evaluation of high protein genotypes of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke), *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38, 41-48.
- Solomons, N.W., Jacob, R.A. (1981). Studies on the bioavailability of zinc in humans: Effect of heme and nonheme iron on the absorption of zinc. *American Journal of Clinical Nutrition* 34, 475-482.
- Solomons, N.W., Ruz, M. (1997). Zinc and iron interaction: Concepts and perspectives in the developing world. *Nutrition Research* 17, 177-185.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. (2000). Cereal and cereal flours. Dans : *Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching b. München, Food composition and nutrition tables*. (6ème édition). pp. 523-597. Stuttgart : Medpharm Scientific Publishers.
- South, P.K., Miller, D.D. (1998). Iron binding by tannic acid: Effects of selected ligands. *Food Chemistry* 63, 167-172.

- Southgate, D.A.T. (1995). The diet as a source of dietary fiber. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, S22-S26.
- Sripriya, G., Usha Antony, Chandra, T.S. (1997). Changes in carbohydrate, free amino acids, organic acids, phytate and HCl extractability of minerals during germination and fermentation of finger millet (*Eleusine coracana*). *Food Chemistry* 58, 345-350.
- Stekel, A., Olivares, M., Pizzaro, F., Amar, M., Chadud, P., Cayazzo, M., Llaguno, S., Vega, V., Hertrampf, E. (1985). The role of ascorbic acid in the bioavailability of iron from infant foods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 27, 167-175.
- Subramanian, V., Suryaprakash, S. (1981). Sugars of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). *Journal of Food Science* 46, 1614-1615.
- Sudarmaji, S., Markakis, P. (1977). The phytate and phytase of soybean tempeh. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 381-383.
- Svanberg, U., Lorri, W., Sandberg, A.S. (1993). Lactic fermentation of non-tannin and high tannin cereals: effects on *in vitro* estimation of iron availability and phytate hydrolysis. *Journal of Food Science* 58, 408-412.
- Swain, J.H., Tabatabai, L.B., Reddy, M.B. (2002). Histidine content of low-molecular-weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition* 132, 245-251.
- Tabekhia, M.M., Luh, B.S. (1980). Effects of germination, cooking and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans. *Journal of Food Science* 45, 406-408.
- Talamond, P., Gallon, G. & Trèche, S. (1998). Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *Journal of Chromatography A*, 805, 143-147.
- Talamond, P., Doulebeau, S., Rochette, I., Guyot, J.P., Trèche, S. (2000). Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *Journal of Chromatography A* 871, 7-12.
- Tapiero, H., Gaté, L., Tew, K.D. (2001). Iron: Deficiencies and requirements. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 55, 324-332.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen Ba, G., Mathé, G. (2002). Polyphénols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56, 200-207.
- Thompson, L.U., Yoon, J.M. (1984). Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science* 49, 1128-1229.
- Thompson, S.A., Weber, C.W. (1979). Influence of pH on the binding of copper, zinc and iron in six fiber sources. *Journal of Food Science* 44, 752-754.
- Torre, M., Rodriguez, A.R., Saura-Calixto, F. (1991). Effects of dietary fiber and phytics acid on mineral availability. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 1, 1-22.
- Tou, E.H., Kelebe, S., Mouquet, C., Traoré A.S., Guyot, J.P. (2003a). Caractérisation préliminaire de la microflore lactique des pâtes fermentées de mil servant à la préparation du « ben-saalga », une bouillie traditionnelle burkinabé. *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*.

- Tou, E.H., Mouquet, C., Guyot, J.P., Traoré, A.S., Trèche, S. (2003b). Essai de modification des procédés traditionnels de fabrication des bouillies de mil fermenté « *ben-saalga* » en vue d'augmenter leur densité énergétique. *Proceedings of the 2nd international workshop, Food-based approaches for a healthy nutrition in West Africa: The role of food technologists and nutritionists*. 23-28 November. Ouagadougou, Burkina Faso. *In press*
- Traoré, T., Mouquet, C., Icard-Verniere, C., Traoré, A. S., Trèche, S. (2004). Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α -amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chemistry* 88, 105-114.
- Trèche, S. (1995). Techniques pour augmenter la densité énergétique des bouillies. Dans: *L'alimentation de complément du jeune enfant* (édité par Trèche, S., De Benoist, B., Benbouzid, D., Verster, A., Delpeuch, F.), pp. 123-146. Paris : ORSTOM Editions.
- Trèche, S., Mbome, I. (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.
- Trowell, H., Southgate, D.A.T., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Gassull, M.A., Jenkins, D.J.A. (1976). Dietary fibre redefined. *Lancet* 1, 967.
- Tseng, M., Chakraborty, H., Robinson, D.T., Mendez, M., Kohlmeier, L. (1997). Adjustment of iron intake for dietary enhancers and inhibitors in population studies: Bioavailable iron in rural and urban residing Russian women and children. *Journal of Nutrition* 127, 1456-1468.
- Türk, M., Sandberg, A.S. (1992). Phytate degradation during breadmaking: effects of phytase addition. *Journal of Cereal Science* 15, 281-294.
- Türk, M., Carlsson, N.G., Sandberg, A.S. (1996). Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making: effect of yeast and wheat phytases. *Journal of Cereal Science* 23, 257-264.
- Turnlund, J.R., King, J.C., Keyes, W.R., Gong, B., Michel, M.C. (1982). A stable isotope study of zinc absorption in young men: effect of phytates and α -cellulose. *American Journal of Clinical Nutrition* 40, 1071-1077.
- Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Hudson, C.A., Betschart, A.A., Kretsch, M.J., Sauberlich, H.E. (1991). A stable isotope study of zinc, copper and iron absorption and retention by young women fed vitamin B6-deficient diets. *American Journal of Clinical Nutrition* 54, 1059-1064.
- Udayasekhara, R.P., Deosthale, Y.G. (1988). *In vitro* availability of iron and zinc in white and coloured ragi (*Eleusine coracana*): role of tannin and phytate. *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition* 38, 35-41.
- Usha Antony, Chandra, T.S. (1998). Antinutrient reduction and enhancement in protein, starch, and mineral availability in fermented flour of finger millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2578-2582.
- Usha Antony, Chandra, T.S. (1999). Enzymatic treatment and use of starters for the nutrient enhancement in fermented flour of red and white varieties of finger millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2016-2019.
- Vaintraub, I.A., Lapteva, N.A. (1988). Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts and the products of their processing. *Analytical Biochemistry* 175, 227-230.

- Valencia, S. (1997). Effect of lactic acid fermentation on the *in vitro* availability of iron in quinoa. *Instituto de Investigacion Tecnologica, Escuela Politecnica Nacional*.
- Valencia, S., Svanberg, U., Sandberg, A.S., Ruales, J. (1999). Processing of quinoa (*Chenopodium quinoa*, Wild): effects on *in vitro* iron availability and phytate hydrolysis. *International Journal of Food Science and Nutrition* 50, 203-211.
- Vallee, B.E. (1995). The function of metallothionein. *Neurochemistry International* 1, 23-33.
- Van Dokkum, W. (1992). Significance of iron bioavailability for iron recommendations. *Biological Trace Element Research* 35, 1-11.
- 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 Soest, P.S., Wine, R.H. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV- Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry* 50, 50-55.
- Vijayakumari, K., Siddhuraju, P., Pugalenti, M., Janardhanan, K. (1998). Effect of soaking and heat processing on the levels of antinutrients and digestible proteins in seeds of *Vigna aconitifolia* and *Vigna sinensis*. *Food Chemistry* 63, 259-264.
- Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., Lozano, A. (2000). Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4009-40013.
- Walker, K.A. (1974). Changes in phytic acid and phytase during early development of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 116, 91-98.
- Walsh, C.T., Sandstead, H.H., Prasad, A.S., Newberne, P.M., Fraker, P.J. (1994). Zinc: Health effects and research priorities for the 1990s. *Environmental Health Perspectives* 102, S5-S45.
- Watzke, H.J. (1998). Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends in Food Science and Technology* 9, 320-327.
- Weaver, C.M. & Kannan, S. (2002). Phytate and mineral bioavailability. Dans: *Food phytates* (édité par N.R. Reddy, S.K. Sathe). pp. 211-224. Boca Raton : CRC Press.
- Welch, R.M. (2002). Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally. *Journal of Nutrition* 132, S495-S499.
- WHO (1998). Energy required from complementary foods and factors affecting their intake. Dans: *Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge*. (Report WHO/NUT/98.1). pp: 45-76. Geneva : WHO.
- WHO (2000). Battling iron deficiency anaemia. Dans: *Turning the tide of malnutrition responding to the challenge of the 21st century*. (Document WHO/NDH/00.7). pp. 10-11. Geneva : WHO.
- Wise, A. (1995). Phytate and zinc bioavailability. *International Journal of Food Science and Nutrition* 46, 53-63.
- Wolfgor, R., Drago, S.R., Rodriguez, V., Pellegrino, N.R., Valencia, M.E. (2002). *In vitro* measurement of available iron in fortified foods. *Food Research International* 35, 85-90.

- Wolters, M.G. E., Schreuder, H.A.W., Van Den Heuvel, G., Van Lonkhuijsen, H.J., Hermus, R.J.J., Voragen, A.G.J. (1993). A continuous in vitro method for estimation on the bioavailability of minerals and trace element in foods: Application to breads varying in phytic acid content. *British Journal of Nutrition* 69, 849-861.
- Yeung, A.C., Glahn, R.P., Miller, D.D. (2001). Dephosphorylation of sodium caseinate, enzymatically hydrolyzed casein and casein phosphopeptides by intestinal alkaline phosphatase: implications for iron availability. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 12, 292-299.
- Yip, R. (1997). The challenge of improving iron nutrition: limitations and potentials of major intervention approaches. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, S16-S24.
- Yonekura, L., Suzuki, H. (2003). Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed a phytic acid-containing diet. *Nutrition Research* 23, 343-355.
- Yonekura, L., Tamura, H., Suzuki, H. (2003). Chitosan and resistant starch restore zinc bioavailability, suppressed by dietary phytate, through different mechanisms in marginally zinc-deficient rats. *Nutrition Research* 23, 933-944.
- Zamudio, M., Gonzalez, A., Medina, J.A. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology* 32, 181-4.
- Zhou, Y.D., Brittin, H.C. (1994). Increased iron content of some Chinese foods due to cooking in steel woks. *Journal of American Dietetic Association* 94, 1153-1156.
- Ziegler, E.E., Serfass, R.E., Nelson, S.E., Figueroa-Colón, R., Edwards, B.B., Houk, R.S., Thompson, J.J. (1989). Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by infants studied with ⁷⁰Zn as extrinsic tag. *Journal of Nutrition* 119, 1661-1669.

Annexes

ANNEXE 1

Exemples de décortiqueurs abrasifs utilisés dans certains pays d'Afrique Sahélienne

Décortiqueur n°1



Décortiqueur n°2

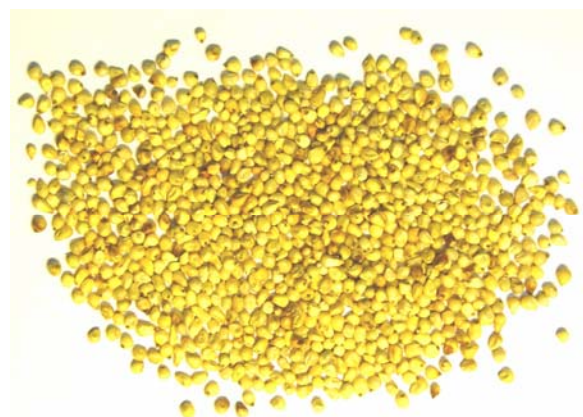


ANNEXE 2

Grains de céréales



Mais



Mil



Riz



Sorgho

Graines de légumineuses



Ambérique



Niébé



Soja

ANNEXE 3

Etude préliminaire pour la détermination des conditions permettant d'obtenir une dégradation totale des phytates de la farine de mil

Deux phytases commerciales ont été utilisées, une phytase microbienne d'*Aspergillus ficuum* (EC 3.13.8, Sigma) et une phytase végétale de blé (EC 3.1.3.26, Sigma). La première étape a été de déterminer la quantité de chaque enzyme nécessaire à l'obtention de la même activité dans les conditions d'incubation choisies (tampon acétate 0,1 M, pH 5 à 37°C avec une proportion farine / tampon de 5 g pour 7,5 ml), puis de déterminer la durée d'incubation nécessaire à la dégradation totale des IP6 de la farine de mil dans ces conditions.

➤ Détermination des concentrations en phytases végétales et microbiennes

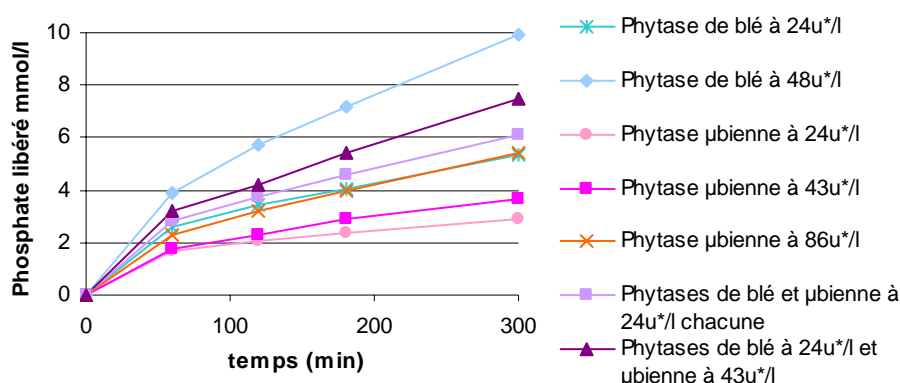
Cette détermination des quantités d'enzymes à utiliser a été effectuée sur une solution de phytate de sodium de concentration de 7,2 mM correspondant à la concentration en phytates du mélange farine / tampon prévue pour la préparation des échantillons.

Les quantités d'enzymes utilisées lors du premier essai étaient de 24 u/l, ce qui devait permettre la dégradation de la totalité des phytates de la solution en 5 h dans les conditions d'activité décrites dans le catalogue Sigma. Cette concentration correspondait à 1,2 mg de phytase microbienne (A) et 280 mg de phytase végétale (B), pour 25 ml de tampon acétate (solution concentrée 7 fois en raison du facteur de dilution lors du mélange réactionnel).

Des essais à 43 et 86 u/l pour la phytase A et à 48 u/l pour la phytase B ont ensuite été réalisés et chaque mélange réactionnel (contenant 1 ml de solution enzymatique (A et/ou B), 1 ml de solution de phytate et 5 ml de tampon) a été incubé de 0 à 5 h. A la fin de chaque incubation 2 ml de HCl 2 M ont été ajoutés au mélange pour arrêter la réaction.

Les solutions ont été diluées 2 à 5 fois avant ajout du réactif et dosage au spectrophotomètre des phosphores inorganiques libérés.

Les résultats de cette mise au point sont présentés sur la figure 1-1.



* Unité d'activité telle que décrites dans le catalogue Sigma

Figure 1-1. Cinétique de libération des Pi de la solution de phytate de Na à 7,2 mM pour les phytases de blé et d'*Aspergillus ficuum* à pH 5.0 et 37°C

➤ *Détermination de la durée d'incubation*

Des essais sur la farine de mil ont été réalisés, avec les phytases A et/ou B aux concentrations préalablement déterminées et la dégradation enzymatique a été vérifiée par dosage des phytates résiduels par colorimétrie après des durées d'incubation de 0 à 7 h.

Les incubations ont été réalisées dans des tubes Falcon de 50 ml dans un four à hybridation assurant une légère agitation au mélange. A la fin du temps d'incubation, les réactions enzymatiques ont été stoppées en plaçant les tubes à 4°C avant centrifugation à 2600g, pendant 15 min, à 4°C. Les culots ont ensuite été congelés, lyophilisés, puis broyés au mortier et au pilon avant analyse.

Les cinétiques de dégradation des phytates sont données en figure 1-2.

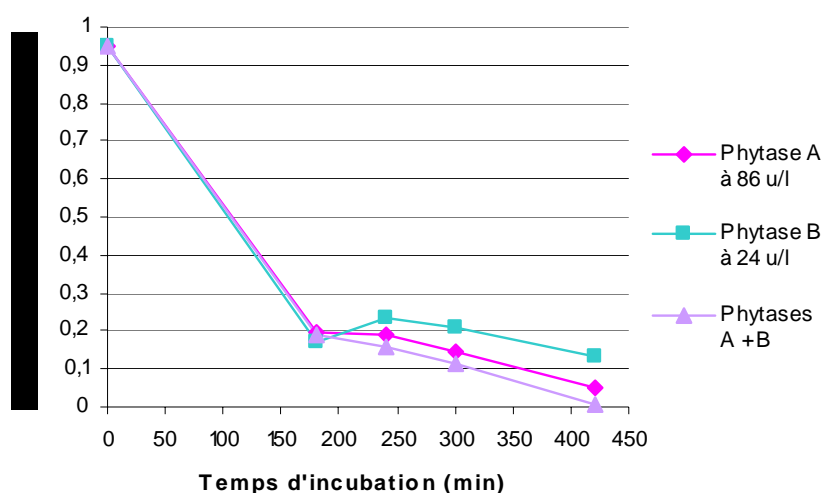


Figure 1-2. Cinétiques de dégradation des phytates de la farine de mil par les phytases de blé et/ou d'*Aspergillus ficuum* à pH 5,0 et 37°C

La durée de 7 h permettant d'obtenir la dégradation totale des phytates de la farine de mil ayant été jugé trop longue, il a été décidé d'augmenter les concentrations en enzymes.

Une solution de phytases contenant 144 u/l de phytases de blé et 516 u/l de phytases microbiennes a donc été préparée et un dernière essai d'incubation avec la farine de mil a permis de déterminer que 3 h était nécessaire à la dégradation totale des phytates de la farine.

Afin de s'assurer d'une dégradation totale pour tous les échantillons, il a été décidé d'incuber les échantillons avec cette solution de phytases concentrée pendant 3h30.

ANNEXE 4

Préparation des solutions de xylanases et/ou de phytases pour l'étude de la contribution relative des différents FAN

➤ *Solution de xylanases*

Avant utilisation, une solution de xylanases a été préparée en dissolvant 0,35 g de xylanases de *Trichoderma viride* (Fluka, 95595) dans 10 ml de tampon acétate 0,1 M pH 5,0 et additionnés de 5 g de résine Chelex-100 (ref 142-2842, Bio-Rad, Hercules, CA), puis agités 30 min. Le mélange a ensuite été filtré et le filtre rincé avec le tampon acétate de manière à obtenir 70 ml de solution enzymatique à 12000 u/l.

➤ *Solution de phytases*

Une solution de phytases a été préparée de la même manière, mais avec 0,67 g de phytases de blé (Sigma, P 1259) et 10,5 mg de phytases d'*Aspergillus ficuum* (Sigma, P 9792) et, qui sont des quantités permettant d'obtenir les mêmes activités phytasiques dans les conditions opératoires utilisées (respectivement 144 u/l et 516 u/l selon les définitions des unités indiquées par les fournisseurs, cf Annexe 1). Ces enzymes ont été solubilisées dans 15 ml de tampon, puis les mélanges agités pendant 30 min avec 7,5 g de résine Chelex-100, filtrés et le filtre a été rincé de manière à obtenir à nouveau 70 ml de solution enzymatique.

➤ *Solution de xylanases et de phytases*

Une dernière solution contenant des xylanases et des phytases a été préparée de la même manière et avec les mêmes quantités que précédemment (xylanases, 0,35 g ; phytases microbiennes, 10,5 mg ; phytases de blé, 0,67 g) dissoutes dans 20 ml de tampon acétate et agités avec 10 g de résine Chelex-100. Le volume final de solution était à nouveau de 70 ml.

RESUME

Les effets sur la biodisponibilité du fer et du zinc de procédés technologiques (trempage, décortilage, mouture, fermentation) traditionnellement utilisés en Afrique pour préparer des aliments de complément à base de céréales et de légumineuses ont été étudiés sur des échantillons préparés en laboratoire ou prélevés dans des unités de production au Burkina Faso. Ces procédés, seuls ou en combinaison, réduisent de manière plus ou moins importante les teneurs en facteurs antinutritionnels (phytates, fibres et tanins). Cependant, ils ne permettent pas d'augmenter les teneurs en fer et en zinc biodisponibles, en partie en raison des pertes en minéraux qu'ils occasionnent.

Afin d'essayer de comprendre les autres éléments qui limitent les effets favorables de ces procédés, la contribution relative des différents facteurs antinutritionnels à la faible disponibilité *in vitro* du fer et du zinc dans le grain de mil (*Pennisetum glaucum*) a été évaluée. Les phytates créent des complexes avec le fer, mais surtout avec le zinc, et leur dégradation partielle permet de doubler les digestibilités *in vitro* de ces minéraux. Cependant, au niveau des parties périphériques du grain, les fibres, notamment celles associées aux phytates, et les tanins jouent un rôle majeur dans la réduction des digestibilités *in vitro* du fer et du zinc, de sorte que la dégradation totale des phytates ne permet pas de libérer ces minéraux.

Ainsi, pour définir des solutions efficaces d'amélioration de la biodisponibilité du fer et du zinc, il est primordial de prendre en compte, d'une part, l'ensemble des composés susceptibles de modifier les quantités de minéraux biodisponibles et, d'autre part, les modifications de la matrice alimentaire induites par les différents procédés intervenant au cours de la préparation de l'aliment.

Title Contribution to the study of iron and zinc bioavailability in pearl millet grain and conditions for improving complementary foods.

ABSTRACT

This paper describes the effects of technological processes (soaking, decortication, milling, fermentation) traditionally used in Africa to prepare cereal and legume based complementary foods on iron and zinc bioavailability. The effects were studied on samples prepared in the laboratory or sampled in production units in Burkina Faso. These processes, alone or in combination, reduce anti-nutritional factors (phytates, fibres and tannins) to a greater or lesser degree. However, they do not allow an increase in bioavailable iron and zinc contents, partly because of the mineral losses that they cause.

In order to try and understand the other elements which limit the favourable effects of these processes, the relative contribution of different anti-nutritional factors to the limited bioavailability of iron and zinc in pearl millet grain (*Pennisetum glaucum*) were investigated. Phytates form complexes with iron, and above all with zinc; and partial degradation of phytates allows *in vitro* mineral digestibility to be doubled. However, in peripheral parts of the grain, fibres, and especially those which are associated with phytates and also tannins, play an important role in the reduction in iron and zinc *in vitro* digestibility, so that total phytate degradation does not allow minerals to be released.

To define some efficient solutions for the improvement of iron and zinc bioavailability, it is thus essential to take into account, on the one hand, all the components likely to modify the levels of bioavailable minerals and, on the other hand, changes in the food matrix resulting from the different processes that occur throughout the preparation of food.

Key words: *In vitro* iron and zinc digestibility, Phytates, Tannins, Fibres, Fractionation, Technological processes, Fermented gruel, Enzymatic approach.

DISCIPLINE : SCIENCES DES ALIMENTS

Mots-clés : Digestibilité *in vitro* du fer et du zinc, Phytates, Tanins, Fibres, Fractionnement, Procédés technologiques, Bouillie fermentée, Approche enzymatique.
