

Influence du trempage, de la germination, de la fermentation et de l'ajout de phytases sur la biodisponibilité du fer et du zinc dans les farines de mil

**Icard-Vernière^{*1} Christèle, Greffeuille¹ Valérie,
Caporiccio² Bertrand, Trèche¹ Serge, Besançon² Pierre**

¹ UR 106 "Nutrition, Alimentation, Sociétés", IRD, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

² Laboratoire de Nutrition, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34060 Montpellier, France.

*Auteur correspondant: christele.verniere@mpl.ird.fr

- Résumé -

L'amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments de complément du jeune enfant nécessite une réduction de leur teneur en phytates, chélatants naturels du fer et du zinc. Des farines de mil ont été préparées au laboratoire après trempage des graines, fermentation, germination, trempage en présence de phytase. La biodisponibilité du fer et du zinc dans ces farines a été estimée selon plusieurs méthodes *in vitro* ou *ex vivo* (cultures cellulaires) dans le but de les comparer. Les pourcentages de réduction de la teneur en IP6 par rapport aux graines brutes sont respectivement, après trempage, germination, fermentation ou ajout de phytase de <1, 63, 99 et 95%. Après digestions *in vitro*, les pourcentages de fer et de zinc dialysés ou solubles après trempage sont équivalents à ceux des graines brutes (respectivement 5 et 19% pour le fer, 5 et 16 % pour le zinc). C'est après fermentation (25 et 31 % pour le fer, 34 et 33 % pour le zinc) et après ajout de phytase (21 et 26 % pour le fer, 25 et 32 % pour le zinc) que les pourcentages de minéral dialysés ou solubles sont les plus importants. Les effets de la germination sont beaucoup moins marqués: 14 et 22 % pour le fer, 19 et 27 % pour le zinc. Les extractabilités à l'HCl du fer et du zinc montrent une amélioration des estimations de la biodisponibilité après fermentation et ajout de phytase par rapport aux résultats obtenus sur les graines brutes, l'effet du trempage ou de la germination étant beaucoup plus faible. L'estimation de la biodisponibilité du fer et du zinc après cultures cellulaires donne des résultats analogues. Les 4 méthodes *in vitro* ou *ex vivo* ont des répétabilités proches et faibles.

Cette étude confirme que la biodisponibilité du fer et du zinc est très liée à la teneur en phytates dans les farines de mil. Elle est améliorée significativement après fermentation et ajout de phytase. L'estimation de la biodisponibilité des minéraux après digestions *in vitro* puis centrifugation est une méthode répétable, facile à mettre en œuvre et applicable au suivi d'opérations technologiques.

Mots-clés: Procédés traditionnels – Phytates – Fer – Zinc – Biodisponibilité.

- Abstract -

Influence of soaking, germination, fermentation and phytase addition on iron and zinc bioavailability in millet flours

Introduction: Complementary foods of young children contain few iron and zinc. The bioavailability of these minerals is reduced by phytates who bind them. The improvement of the nutritional quality of these foods goes with a reduction of phytate content and the possibility to evaluate mineral bioavailability.

Methods: Millet flours are prepared using different manufacturing processes: soaking of the seeds (15h, 30°C), fermentation (24h, 30°C), germination (96h, 30°C), soaking with phytase (17h, 55°C). The bioavailability of iron and zinc in these flours was estimated according three *in vitro* methods in order to compare them: HCl extractability, *in vitro* digestions followed by dialysis («dialyzed» mineral) or by a centrifugation («soluble» mineral). An attempt with the *ex vivo* method of cell cultures was realized: determinations of ferritin and zinc absorbed in Caco-II cells were realized for the respective evaluation of iron and zinc bioavailability. Phytate (IP6) contents were determined by ionic chromatography and minerals by atomic spectrophotometry after dry ashing.

Results: Reduction of IP6 contents, in percents, compared to whole seeds were respectively after soaking, germination, fermentation or phytase adding: <1, 63, 99 and 95%. In the same way, highest HCl extractabilities of iron were obtained after phytase adding (47%) and fermentation (40%), when it was only of 11 and 20% after soaking and germination, and 9% in whole seeds. For zinc, similar results were obtained: HCl extractabilities were respectively 82, 92, 67 and 71% for the above-cited processes and 70% in whole seeds. After *in vitro* digestions, dialyzed or soluble iron and zinc after soaking were the same in flours and in whole seeds (respectively 5 and 19% for iron, 5 and 16% for zinc). The most important quantities of dialyzed or soluble minerals were obtained after fermentation (25 and 31% for iron, 34 and 33% for zinc) and after phytase adding (21 and 26% for iron, 25 and 32% for zinc). The effects of germination were less important: 14 and 22% for iron, 19 and 27% for zinc. The estimates of iron and zinc bioavailability after cells cultures gave analogous results. The 4 *in vitro* or *ex vivo* methods have similar and small repeatability.

Conclusion: This work confirms that mineral bioavailability is strongly linked to phytate content. Mineral bioavailability is significantly improved after fermentation, phytase adding and germination. The estimate of iron and zinc bioavailability after *in vitro* digestions followed by a centrifugation is a method with a good repeatability, easy-to-use and adapted to technological process studies. Cell cultures could be a more accurate tool, but its use is limited by the cost and the time needed for its implementation.

Key words: Traditional processes – Phytates – Iron – Zinc – Bioavailability.

INTRODUCTION

Dans les pays du Sud, les aliments de complément du jeune enfant sont généralement des bouillies à base de céréales ou de racines et tubercules. Les micronutriments y sont souvent en quantité insuffisante pour couvrir les besoins des enfants et leur biodisponibilité y est très faible. En effet, des facteurs antinutritionnels comme les phytates, naturellement présents dans ces plantes, peuvent chélater les minéraux comme le fer et le zinc, et donc limiter leur absorption et leur utilisation par l'organisme. L'amélioration de la qualité nutritionnelle de ces aliments nécessite donc une réduction maximale des teneurs en phytates au cours des procédés traditionnels de préparation. De nombreuses études ont déjà mesuré les réductions des teneurs en phytates au cours de différents traitements technologiques, comme la fermentation, la germination, le trempage, l'extrusion¹. Cependant, peu d'entre elles ont tenté de mettre en relation les diminutions de teneurs en phytates avec la biodisponibilité des minéraux étudiés, excepté par le biais de rapports molaire Phytates/Fer, Phytates/Zinc ou Phytates*Calcium/Zn². Il existe cependant trois principaux types d'évaluation de la biodisponibilité des minéraux: méthode chimique (extractabilité HCl), méthodes *in vitro* (digestions *in vitro*, cultures cellulaires) ou méthodes *in vivo* (dosages isotopiques).

Le but de la présente étude est donc d'évaluer l'influence de procédés traditionnels africains utilisés entre autres pour la fabrication de farines infantiles (trempage, germination, fermentation et ajout de phytases) sur la biodisponibilité du fer et du zinc dans des farines de mil. Les résultats des estimations de la biodisponibilité du fer et du zinc, obtenus avec différentes méthodes *in vitro* ou *ex vivo*, seront comparés entre eux et avec les teneurs en phytates des produits.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nature, préparation et conditionnement des échantillons

Cette étude a été réalisée sur un lot de graines de mil (*Pennisetum glaucum*) provenant du Burkina Faso auquel ont été appliqués plusieurs procédés technologiques (figure 1). La fermentation proprement dite est réalisée dans une étuve à 30°C après filtration dans une mousseline dont la maille est inférieure à 250 µm de façon à reproduire en laboratoire la fabrication artisanale du *Ben-saalga* burkinabè³. Pour la germination, les graines préalablement lavées à l'eau de Javel (10% v/v) sont étalées sur du coton hydrophile recouvert de papier absorbant maintenu humide, dans une étuve à 30°C. Le traitement par la phytase correspond au protocole de Shen⁴: 50 g de farine et 60 mg de phytase (de blé, Sigma P1259) sont incubés dans du tampon acétate à pH 5,15 pendant une nuit à 55°C. L'activité phytasique est ensuite stoppée par acidification à pH 2 par ajout de HCl 5N.

Méthodes d'estimation des minéraux biodisponibles

Extractabilité HCl

1 g de farine est hydrolysé *in vitro* dans 50 ml de HCl 0,03N à 37°C pendant 3h puis filtré sur papier Whatman n°42 avant dosage des minéraux par spectrométrie d'absorption atomique.

Digestions *in vitro*

Ces méthodes comprennent deux étapes principales: reproduction de la digestion gastrique par l'addition de pepsine à pH 2 puis simulation de la digestion intestinale

par ajustement du pH à 7 et addition d'un mélange de pancréatine et d'extrait de bile. Le pourcentage de minéraux «biodisponibles» est ensuite déterminé après centrifugation en fin de digestion intestinale pour évaluer la quantité de minéraux solubles présente dans le surnageant (% minéral soluble).

Modèle cellulaire Caco-2

L'obtention et la culture des cellules ont suivi les protocoles décrits par Puyfouhloux et al.⁵, ceux des digestions *in vitro* précédant le dépôt des digestas sur les cellules celui de Glahn et al.⁶

Estimation de l'absorption du fer

Pour ces expériences, les cellules sontensemencées dans les plaques de six puits à raison de 300.000 cellules par puits et utilisées 21 jours après ensemencement. La digestion est effectuée dans un insert placé au-dessus des cellules, formant ainsi un système à deux chambres avec les cellules dans la partie inférieure. La chambre supérieure est constituée par l'insert au fond duquel est fixée une membrane de dialyse (seuil de coupure 15000PM, Spectra/Por 2.1, Spectrum Laboratories Inc., Los Angeles) grâce à un anneau en téflon. L'insert contenant la membrane de dialyse est placé au-dessus des cellules et un aliquote de 1,5 ml du digesta intestinal est déposé à l'intérieur. Les cellules ainsi mises en contact avec le digesta par diffusion à travers la membrane de dialyse sont incubées pendant 2 h, à 37°C avec une agitation faible. Les inserts sont ensuite retirés et le milieu de la chambre inférieure, additionné de 1ml de MEM dans chaque puits, est laissé en contact avec les cellules pendant 22 h supplémentaires. Les cellules sont ensuite récoltées pour la détermination des teneurs en ferritine, proportionnelles à celle du fer intracellulaire⁷. L'absorption du fer contenu dans les échantillons est comparée avec celle du FeSO₄ et celle d'une solution de fer et d'acide ascorbique (2:1 mol/mol).

Transport et rétention du zinc et du fer

Pour les mesures de transport du zinc et du fer, les cellules sontensemencées sur des inserts en polycarbonate dans des plaques de six puits à raison de 300.000 cellules par insert et utilisées 18 jours après ensemencement. Les cellules se trouvent donc dans la chambre supérieure du système à deux compartiments. 2 ml de MEM sont déposés dans la chambre inférieure. Les plaques de cultures sont ensuite incubées 2 h, à 37°C sous agitation douce. Le milieu de la chambre inférieure est ensuite collecté dans des tubes afin de doser la quantité de zinc et de fer ayant traversé la couche cellulaire. Cette mesure permet d'évaluer les quantités de fer et de zinc effectivement absorbées par les cellules. De plus, les cellules sont récoltées selon la même procédure que pour les mesures de ferritine (3 rinçages et sonication) afin de doser la quantité de minéral présente dans les cellules après digestion. Cette mesure permet d'évaluer la quantité totale de minéraux prélevée dans le milieu contenant le digesta. Le transport et la rétention du fer et du zinc contenus dans les échantillons sont comparés avec ceux du sulfate de fer (FeSO₄) et du sulfate de zinc (ZnSO₄). De plus un 'blanc' ne contenant que les enzymes utilisées pour la digestion est déposé sur deux puits. Les valeurs obtenues pour le blanc sont retranchées aux valeurs obtenues avec les échantillons.

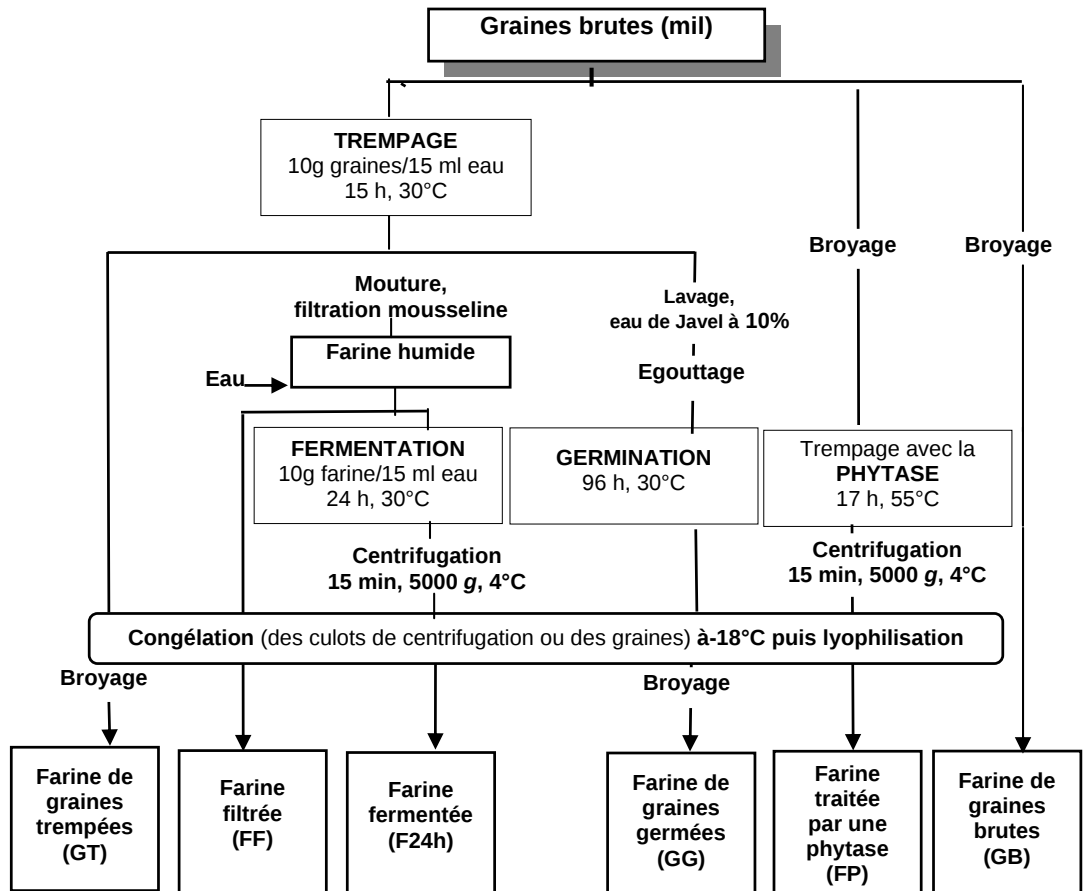


Figure 1: Protocole d'obtention et nomenclature des échantillons.

Méthodes de dosage

Les phytates (IP6) ont été dosés par chromatographie ionique à haute performance⁸, sur colonne Omnipac Pax-100 (DIONEX, 4500i, Sunnyvale, USA). Les minéraux ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique (VARIAN, SpectrAA 200, Australie) après minéralisation par voie sèche pendant 2 h à 530°C. Les solutions prélevées au cours des expériences avec les cellules Caco-2 contenant des quantités très faibles de minéraux, les dosages ont été réalisés par spectrométrie d'absorption en plasma induit. La ferritine a été dosée avec le kit ferritine-CT (CIS bio international, France), les protéines dans les cellules avec le kit DC ProteinAssay (BioRad).

Analyses statistiques

Les résultats obtenus par les différentes méthodes ont été analysés à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Plus, version 5.0 (Manugistic, Inc., Rockville, EU).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La biodisponibilité du fer et du zinc a été estimée dans les graines brutes et dans les farines obtenues après trempage, filtration, fermentation, germination et trempage en présence de phytase.

Influence des procédés technologiques sur la dégradation des phytates et sur la biodisponibilité des minéraux

L'évolution de la biodisponibilité du fer dans les produits de transformation du mil est donnée dans le tableau 1. Les trois méthodes étudiées mettent en évidence des différences significatives entre les valeurs obtenues pour la biodisponibilité du fer entre les graines germées, la farine fermentée et la farine traitée avec la phytase mais aucune ne met en évidence des différences significatives entre les graines brutes et les graines trempées. Par ailleurs, seuls le traitement par de la phytase et la fermentation permettent d'obtenir une augmentation importante de la biodisponibilité du fer par les méthodes *in vivo*. La mesure de la ferritine est la seule méthode qui ne met pas en évidence une augmentation de la biodisponibilité du fer à l'issue de la germination. Après filtration de la farine à l'aide d'une mousseline, seule l'extractibilité HCl est augmentée de manière significative par rapport à l'extractibilité dans les graines trempées.

Tableau 1: Comparaison de la biodisponibilité du fer dans les produits de transformation du mil par différentes méthodes *in vitro* et *ex vivo*.

Echantillons	% fer extractible HCl	% fer soluble après digestion <i>in vitro</i>	% ferritine formée par rapport au FeSO ₄
Graines brutes	9 ^a	19 ^a	5,1 ^a
Farines obtenues après trempage	11 ^a	20 ^{a,b}	nd
Farines obtenues après filtration	17 ^b	17 ^{a,b}	nd
Farines obtenues après germination	20 ^c	22 ^b	5,9 ^a
Farines obtenues après trempage en présence de phytase	47 ^d	26 ^c	11,7 ^b
Farines obtenues après fermentation	40 ^e	31 ^d	16,2 ^c

Les estimations de biodisponibilité suivies d'une lettre identique ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.

nd= non déterminé.

Pour le zinc (tableau 2), aucune méthode ne met en évidence une augmentation significative de la biodisponibilité par simple trempage. Seule la méthode de digestion *in vitro* montre une augmentation significative de la biodisponibilité dans les graines germées. Les trois méthodes classent dans le même ordre de biodisponibilité croissante les échantillons de graines brutes, de graines germées, la farine fermentée et la farine traitée par la phytase. Les valeurs obtenues par extractibilité HCl et digestion *in vitro* sont beaucoup plus élevées que celles obtenues avec la méthode utilisant le modèle cellulaire; en revanche, les variations relatives qui peuvent être mises en évidence avec cette dernière sont beaucoup plus importantes que celles qui peuvent être observées avec les deux premières.

Phytates et indicateurs de biodisponibilité du fer et du zinc

L'importance de la dégradation des phytates est donnée dans le tableau 3 en pourcentage de la teneur initiale dans les graines brutes pour les différents échantillons étudiés. Le trempage n'a pas d'effet significatif sur la dégradation des phytates. En revanche, la filtration à travers la mousseline, la germination, le traitement par la phytase ainsi que la fermentation induisent des diminutions des teneurs en phytates croissantes et toutes significativement différentes les unes des autres. Cependant, seuls le traitement par la phytase et la fermentation permettent une réduction de plus de 95% des teneurs en phytate. L'ordre dans lequel se classent les échantillons selon l'importance croissante de la réduction des phytates est identique à celui dans lequel ils se classent en fonction de l'estimation de leur biodisponibilité par les différentes méthodes (tableaux 1 et 2) sauf pour les échantillons de farine fermentée et de farine traitée par la phytase. L'analyse de variance met cependant en évidence une forte interaction entre les méthodes de dosage et les échantillons, c'est-à-dire que selon la méthode utilisée, les écarts entre les valeurs obtenues pour chaque échantillon sont différents: par exemple, si on considère les échantillons de graines brutes et de graines germées, le pourcentage de dégradation des phytates est très différent (0 à 63%) dans ces deux échantillons mais leur extractibilité HCl du fer et du zinc sont proches et les pourcentages de minéraux solubles après digestion *in vitro* sont quasiment égaux.

Tableau 2: Comparaison de la biodisponibilité du zinc dans les produits de transformation du mil par différentes méthodes *in vitro* et *ex vivo*.

Echantillons	% zinc extractible HCl	% zinc soluble après digestion <i>in vitro</i>	% zinc transporté à travers la couche cellulaire
Graines brutes	70 ^{a,b}	16 ^a	0,4 ^a
Farines obtenues après trempage (GT)	67 ^a	15 ^a	nd
Farines obtenues après filtration	77 ^{b,c}	16 ^a	nd
Graines germées	71 ^{a,b,c}	27 ^b	3,6 ^{a,b}
Farines traitée par la phytase	82 ^c	32 ^c	6,9 ^b
Farine fermentée	92 ^d	33 ^c	12,6 ^c

Les estimations de biodisponibilité suivies d'une lettre identique ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5%.
nd = non déterminé.

Tableau 3: Comparaison des teneurs en phytates dans les produits de transformation du mil.

Echantillons	Phytates dégradés (%)
Graines brutes	0 ^a
Farines obtenues après trempage	0,7 ^a
Farines obtenues après filtration	13 ^b
Graines germées	63 ^c
Farine traitée par la phytase	95 ^d
Farine fermentée	99 ^e

Les pourcentages de dégradation suivis d'une lettre identique ne sont pas statistiquement différents au seuil de 5%.

En mettant en relation l'estimation de la biodisponibilité du fer et du zinc (figures 2a et 2b) avec la diminution de la teneur en phytates dans les produits de transformation du mil, on observe que:

- quelle que soit la méthode utilisée pour l'estimer, la biodisponibilité du fer et celle du zinc varie peu dans les échantillons dont la teneur en phytates a été faiblement réduite (graines brutes et trempées, farine filtrée);
- la dégradation importante des phytates observée dans les graines germées se traduit par une augmentation notable de la biodisponibilité lorsqu'elle est estimée par les méthodes d'extractibilité HCl (pour le fer) et de digestion *in vitro* (pour le fer et le zinc). En revanche, cette réduction semble être insuffisante pour que des répercussions soient observées au niveau de l'estimation de la quantité de fer et de zinc absorbée par les cellules.
- Seuls les taux de dégradation importants ($\geq 95\%$) obtenus dans la farine fermentée et la farine traitée par la phytase s'accompagnent d'une amélioration sensible de la biodisponibilité estimée par la méthode utilisant le modèle cellulaire

La mise en relation des taux de dégradation des phytates et des estimations de la biodisponibilité du fer et du zinc obtenus sur un nombre plus important d'échantillons de teneurs en phytates différentes devrait permettre de déterminer des valeurs seuils du taux de dégradation en phytates ou de la teneur résiduelle en phytates au-delà desquelles la réduction de la teneur en phytate a un effet significatif favorable sur la biodisponibilité des minéraux.

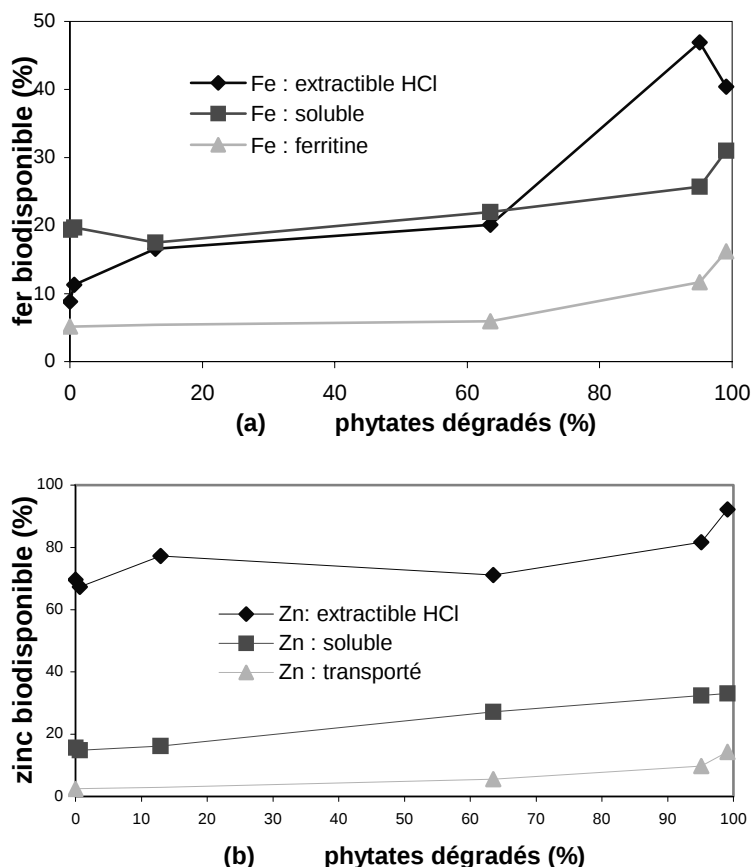


Figure 2: Variations de la biodisponibilité du fer (a) et du zinc (b) estimée selon différentes méthodes en fonction du pourcentage de dégradation des phytates mesuré dans les échantillons.

Par ailleurs, l'effet des procédés utilisés (figure 3) a également été évalué en calculant les indicateurs couramment utilisés de biodisponibilité que sont les rapports molaires¹⁰. Etant donné que pour le rapport phytate/zinc, des valeurs supérieures à 10 sont généralement associées à des carences en zinc², il semblerait que, dans pour nos différentes farines de mil, seuls la fermentation et le traitement par la phytase, voire la germination, permettraient d'obtenir une biodisponibilité du zinc acceptable. Les valeurs des rapports molaires phytate*calcium/zinc, dont le seuil se situe aux alentours de 3,5, confirmeraient les données précédentes, excepté pour la germination. Pour le rapport molaire phytate/fer, certains auteurs placent la limite d'amélioration de la biodisponibilité à 10-15², d'autres, notamment pour les aliments fortifiés, à environ 0,1- 0,5⁹. Il semblerait donc que pour le fer, comme pour le zinc, seuls la fermentation et l'ajout de phytase au cours de la transformation du mil peuvent être envisagés afin d'améliorer la biodisponibilité de ces minéraux.

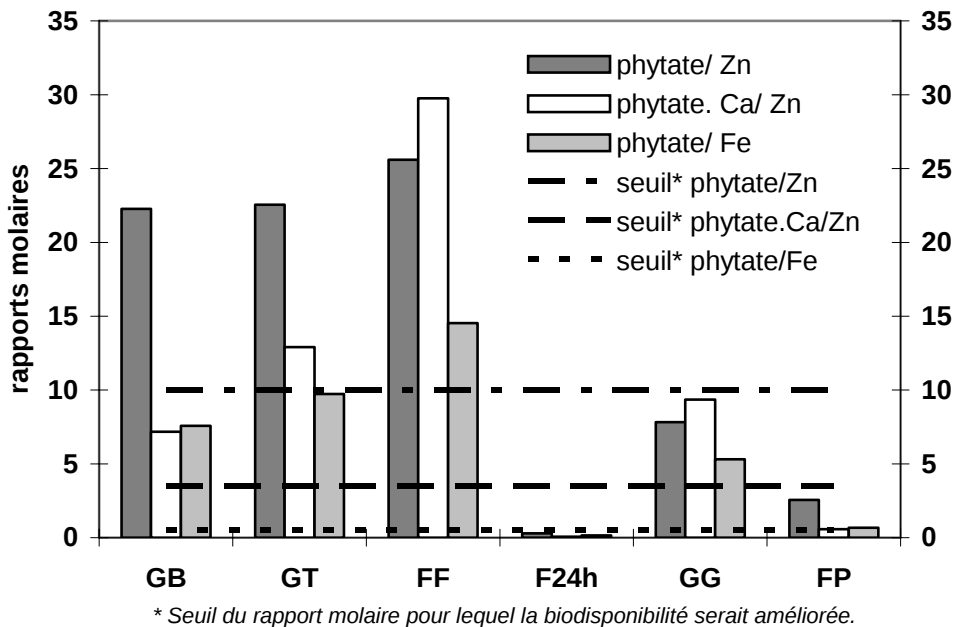


Figure 3: Rapports molaires phy/Fe, phy/Zn et phy*Ca/Zn dans les produits de transformation du mil.

CONCLUSION

Cette étude confirme que la biodisponibilité du fer et du zinc est très liée à la teneur en phytates des céréales. Elle est améliorée significativement après fermentation, ajout de phytase et, de façon plus limitée, après germination. L'estimation de la biodisponibilité des minéraux après digestion *in vitro* puis centrifugation est une méthode répétable, facile à mettre en œuvre et applicable au suivi d'opérations technologiques. Les cultures cellulaires pourraient constituer un outil de diagnostic plus fin, mais d'utilisation plus limitée en raison de leur coût et du temps nécessaire à leur mise en œuvre.

RÉFÉRENCES

1. Sathe S, Venkatachalam M. Influence of processing technologies on phytate and its removal. In: Reddy NR, Sathe SK, eds. Food phytates. London: CRC Press, 2002:157-88.
2. Weaver CM, Kannan S. Phytate and mineral bioavailability. In: Reddy NR, Sathe SK, eds. Food phytates. London: CRC Press, 2002:211-23.
3. Guyot JP, Mouquet C, Tou EH, Counil E, Traore AS, Trèche S. Etude de la transformation du mil (*Pennisetum glaucum*) en *ben-saalga*, une bouillie fermentée traditionnelle du Burkina Faso. Affiche présentée à l'atelier international «Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles en Afrique de l'Ouest: le rôle des technologues et des nutritionnistes». Ouagadougou, 23-28 novembre, 2003.
4. Shen X, Weaver CM, Kempa-Steczko A, Martin BR, Phillippy BQ, Heaney RP. An inositol phosphate as a calcium absorption enhancer in rats. J Nutr Biochem 1998;9:298-301.
5. Puyfouhloux G, Rouanet JM, Besançon P, Baroux B, Baccou JC, Caporiccio B. Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. J Agric Food Chem 2001;49:1625-9.
6. Glahn RP, Lai C, Hsu J, Thompson JF, Guo M, Van Campen DR. Decreased citrate improves iron availability from infant formula: application of an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. J Nutr 1998(a);128:257-64.
7. Glahn RP, Lee OA, Yeung A, Goldman MI, Miller DD. Caco-2 cell ferritin formation predict nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/ Caco-2 cell culture model. J Nutr 1998(b);128:1555-61.
8. Talamond P, Gallon G, Trèche S. Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. J Chromatogr A 1998;805:143-7.
9. Hurrell RF. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. J Nutr 2003;133:2973S-2977S.
10. Lestienne I, Icard-Vernière C, Mouquet C, Picq C, Trèche S. Effect of soaking cereal grains and legumes seeds on iron, zinc, and phytate contents. Food Chem, 2005;89: 421-425.

Remerciements: Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet "Cerefer" financé par la Commission Européenne (www.mpl.ird.fr/cerefer), contrat N° ICA4-CT-2002-10047.