

**UNIVERSITE MONTPELLIER 2**  
**SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**Thèse**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Montpellier 2**

**Ecole doctorale** : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

**Discipline** : Nutrition et Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement

par

**Laurencia Touloumdé SONGRE, épouse OUATTARA**

**Titre**

**Potentialités d'utilisation de souches starters de bactéries lactiques pour  
l'amélioration de la qualité nutritionnelle de bouillies de mil fermenté**

**Thèse co-dirigée par Jean-Pierre GUYOT et Claire MOUQUET-RIVIER**

Soutenue le 8 Décembre 2009

**JURY :**

Bertrand CAPORICCIO  
Isabelle CHEVALLIER  
Jean-François GRONGNET  
Jean-Pierre GUYOT

Professeur Université Montpellier 2  
Professeur ENITAC  
Professeur, Agrocampus Ouest  
Directeur de recherche, IRD Montpellier

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse

A la mémoire de mon très cher et regretté frère **Christian Songré**, que j'aimais profondément qui nous a quittés il y a 5 ans à l'âge de 28 ans, qui aurait sans doute été fier de ce travail accompli,

A mes parents Ambroise Songré et Anne Marie Nikiéma pour leur soutien permanent et inconditionnel, leur grande compréhension, leur appui financier, leur conseil et leur encouragement constant pour les études, le travail professionnel et la vie de famille,

A mes enfants Maichka Axelle et Doris Eve Farida pour leur patience, leur amour et leur grande affection et qui sont mes sources de motivation, mon combat pour la réussite professionnelle,

A mon mari Ouattara Ousmane pour avoir fait preuve de patience, je mesure combien mes absences ont été difficiles pour lui,

A mes frères (Thierry, Lionel) et sœur (Liliane) pour leurs soutiens multiformes et qui n'ont pas jamais cessé de m'encourager, de me soutenir et de me manifester leur amour.

A toutes les personnes qui m'ont apporté leur appui appréciable et dont je ne peux citer les noms qu'elles trouvent ici l'expression de mes meilleurs sentiments.

**«Merci à toi Seigneur, ma lumière et le rempart de ma vie; Je te rends grâce pour le travail accompli»**

Ce travail est le résultat de plusieurs années de recherche et le fruit d'une collaboration, accomplie grâce à l'aide et à la coopération active de plusieurs personnes physiques et morales.

### ***Remerciements au personnel de l'IRD***

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude et tous mes sincères remerciements à Mr Jean-Pierre Guyot, Directeur de Recherche à l'IRD pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction de cette thèse. Aussi, je le remercie pour avoir assuré cette thèse avec beaucoup de compétence et de disponibilité et de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances scientifiques et techniques, de sa grande expérience qui ont permis la réalisation de ce travail. Je le remercie également des nombreux conseils précieux qu'il m'a prodigués en matière de rédaction scientifique, et de projets de recherche et pour avoir développé en moi l'amour pour la microbiologie.

Je voudrai exprimer ma reconnaissance infinie à Mme Claire Mouquet-Rivier, Chargée de Recherche à l'IRD pour son rôle déterminant dans les investigations menées de cette thèse, dans son appui très précieux pour les recherches de bourses et pour avoir bien voulu être ma co-directrice de thèse et sans oublier son encadrement technique et scientifique et enfin les différentes formes de soutien qu'elle m'a apporté, et ses grandes qualités humaines.

Je remercie bien sincèrement Mr Serge Trèche, Directeur de Recherche à l'IRD, pour sa sympathie et ses conseils avisés.

Je remercie Mr Francis Delpeuch, Directeur de Recherche (ancien directeur de l'UR106) d'avoir accepté de m'accueillir à l'Unité 106 «Nutrition, Alimentation et Sociétés».

Je remercie Mme Christèle Vernière, Ingénieur de Recherche à l'IRD et Mme Christèle Humblot, Chargée de Recherche à l'IRD, pour leur bienveillance, leur amitié et pour leurs aides techniques, scientifiques ainsi que pour leur soutien moral pendant les moments difficiles de la thèse,

Je remercie Mme Isabelle Rochette pour toutes les analyses HPLC et HPIC, pour sa gentillesse, son amitié et sa grande qualité humaine,

Je remercie Mr Christian Picq pour les analyses de composition globale, pour sa grande gentillesse et sa disponibilité,

Je remercie Ruben Perez, Post doctorant pour son aide très précieuse pour les analyses TTGE, pour sa patience et pour sa grande gentillesse et son amitié,

J'adresse mes vifs remerciements à Catherine Philibert, pour sa grande gentillesse (merci encore pour les produits à base de plantes qui m'ont permis d'améliorer la qualité de mon sommeil). Je ne saurais oublier sa sympathie, sa disponibilité, son dynamisme et les nombreux efforts consentis à chacune de mes arrivées à Montpellier,

Je remercie Valérie Greffeuille que j'ai eu le plaisir de rencontrer la dernière année de ma thèse, pour son soutien, ses encouragements et sa disponibilité,

Un GRAND MERCI à toute l'équipe UR106 de France et du Burkina Faso qui a facilité la réalisation de cette thèse.

Je ne saurais oublier non plus toute la sympathie, l'assistance précieuse des amis (ies) et des collègues thésards (Andréina, Mourad, Séverine, Youna, Hélène, Fabienne, Hassane, Tahirou, François, Hoan, Thuy, Annie, Williams, Menja) et tous les autres stagiaires de l'UR106 pour la bonne ambiance et la collaboration qu'ils ont su maintenir au sein du laboratoire lors de mes différents séjours. Je garde de bons souvenirs pour les nombreux repas que nous avons souvent partagés et nos visites touristiques.

### ***Remerciement au personnel de l'IRSAT et du DTA à Ouagadougou***

J'adresse mes vifs remerciements à Mr Bréhima Diawara, Maître de Recherche au CNRST, pour son appui sur le plan administratif, ses conseils et ses encouragements,

Je remercie Mr Alhadi Wereme, Maître de Recherche au CNRST, pour son soutien et ses conseils précieux pour la formulation de mes demandes de bourses, ses encouragements multiples, et pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail,

Merci à tous les collègues du DTA (Dr Sawadogo Hagrétou, Dr Léguet Ganou, Bougouma Boniface, Parkouda Charles, Kaboré Donatien, Ba Fatoumata, Combarry Michel, Catherine Ouédraogo, Konaté Jacqueline, Konkobo Charlotte, Congo Maimounata, Somda Solange, Raoul Daboné) qui m'ont apporté leur appui, leur soutien, leurs conseils et leurs encouragements.

### ***Remerciements aux personnes morales***

Je remercie le Département Soutien et Formation (DSF) de l'IRD qui m'a accordé une bourse de formation continue (BFC) pour la réalisation d'une partie de mes travaux de thèse,

Je remercie l'Ambassade de France à Ouagadougou pour une bourse de thèse qui m'a permis de m'inscrire à l'Université de Montpellier 2 (UM2) et d'effectuer des séjours scientifiques au laboratoire de l'UR106 à Montpellier (actuel UMR 204),

Je remercie la Fondation Internationale pour la Science (FIS) pour l'octroi d'une bourse de recherche qui a été nécessaire pour réaliser une partie de mes travaux de thèse,

Je remercie l'IRD de Ouagadougou et le Département Technologie Alimentaire de l'IRSAT/CNRST pour l'appui logistique qui a été indispensable à la réalisation de mes travaux de thèse.

### **Remerciements aux membres du jury**

Je suis très reconnaissante de l'honneur que m'ont fait les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail

|                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chapitre 1. Introduction générale .....</b>                                                                                                          | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre 2. Revue bibliographique.....</b>                                                                                                           | <b>6</b>  |
| <b>2.1. Recommandation pour l’allaitement et l’alimentation du nourrisson et du jeune enfant.....</b>                                                   | <b>7</b>  |
| 2.1.1. Allaitement maternel .....                                                                                                                       | 8         |
| 2.1.2. Alimentation complémentaire .....                                                                                                                | 8         |
| 2.1.3. Période et âge d’introduction de l’alimentation complémentaire.....                                                                              | 9         |
| 2.1.4. Besoins et apports nutritionnels et énergétiques recommandés pour le nourrisson et le jeune enfant.....                                          | 9         |
| 2.1.5. Caractéristiques nutritionnelles et hygiéniques requises pour les aliments de complément .....                                                   | 12        |
| <b>2.2. Situation nutritionnelle et alimentaire au Burkina Faso et en Afrique subsaharienne .....</b>                                                   | <b>14</b> |
| 2.2.1. Les pratiques d’allaitement.....                                                                                                                 | 14        |
| 2.2.2. Les pratiques d’alimentation .....                                                                                                               | 15        |
| 2.2.3. L’état nutritionnel des nourrissons et des jeunes enfants .....                                                                                  | 16        |
| <b>2.3. Présentation des principales cultures alimentaires en Afrique subsaharienne et au Burkina Faso : production et importance alimentaire .....</b> | <b>16</b> |
| 2.3.1. La production céréalière .....                                                                                                                   | 17        |
| 2.3.2 Importance alimentaire des céréales en Afrique subsaharienne.....                                                                                 | 18        |
| 2.3.3 Le mil : importance alimentaire, transformation et composition nutritionnelle..                                                                   | 18        |
| <b>2.4. Les aliments de complément traditionnels fermentés en Afrique subsaharienne et au Burkina Faso.....</b>                                         | <b>31</b> |
| 2.4.1. Les bouillies traditionnelles fermentées et leurs caractéristiques générales .....                                                               | 31        |
| 2.4.2. Quelques exemples de bouillies traditionnelles fermentées au Burkina Faso....                                                                    | 34        |
| 2.4.3. Autres exemples de bouillies traditionnelles fermentées produites en Afrique subsaharienne .....                                                 | 37        |
| 2.4.4. Caractérisation de la diversité bactérienne des aliments fermentés .....                                                                         | 39        |

|                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.5. Techniques d'amélioration des conditions de fermentation et la qualité nutritionnelle des bouillies traditionnelles fermentées .....</b> | <b>43</b> |
| 2.5.1. Amélioration du contrôle de la fermentation.....                                                                                          | 44        |
| 2.5.2. La complémentation .....                                                                                                                  | 45        |
| <b>2.6. Rôle et importance des bactéries lactiques dans l'amélioration de la qualité des aliments de complément.....</b>                         | <b>46</b> |
| 2.6.1. Caractéristiques générales et classification .....                                                                                        | 47        |
| 2.6.2. Les voies métaboliques.....                                                                                                               | 48        |
| 2.6.3. Les effets probiotiques .....                                                                                                             | 49        |
| 2.6.4. Les bactéries lactiques à propriétés enzymatiques d'intérêt nutritionnel .....                                                            | 50        |
| <b>Chapitre 3. Matériel et méthodes.....</b>                                                                                                     | <b>56</b> |
| <b>3.1. Matériels.....</b>                                                                                                                       | <b>57</b> |
| 3.1.1. Les microorganismes utilisés .....                                                                                                        | 57        |
| 3.1.2. Matériel végétal.....                                                                                                                     | 59        |
| 3.1.3. Les milieux de culture .....                                                                                                              | 60        |
| <b>3.2. Méthodes .....</b>                                                                                                                       | <b>63</b> |
| 3.2.1. Condition de culture et détection de la production d'enzymes par les bactéries lactiques présélectionnées .....                           | 63        |
| 3.2.2. Quantification des activités enzymatiques des bactéries lactiques prometteuses .....                                                      | 65        |
| 3.2.3. Préparation standardisée du <i>ben-saalga</i> amélioré au laboratoire .....                                                               | 66        |
| 3.2.4. Analyses physico-chimiques et biochimiques des pâtes durant la fermentation et des matières premières utilisées .....                     | 69        |
| 3.2.5. Détermination de la composition globale et de la densité énergétique des bouillies fermentées et des matières premières utilisées .....   | 71        |
| 3.2.6. Analyses microbiologiques et de biologie moléculaire.....                                                                                 | 72        |

|                                                                                                                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre 4. Résultats et discussion .....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>75</b>  |
| <b>4.1. Article 1 : Caractérisation des propriétés enzymatiques d'intérêts nutritionnels des bactéries lactiques isolées de pâtes fermentées de mil d'ateliers de production de <i>ben-saalga</i> à Ouagadougou. ....</b>               | <b>76</b>  |
| 4.1.1. Résumé introductif .....                                                                                                                                                                                                         | 76         |
| 4.1.2. Article 1: Enzymes activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel ( <i>ben-saalga</i> ) of functional interest in nutrition .....                                                                        | 78         |
| <b>4.2. Evaluation des bactéries lactiques sélectionnées pour leurs capacités à hydrolyser <i>in situ</i> l'amidon, les phytates et les <math>\alpha</math>-galactosides lors de la fermentation de mélanges mil-légumineuses. ....</b> | <b>84</b>  |
| 4.2.1. Résumé introductif au second article et au projet de troisième article.....                                                                                                                                                      | 85         |
| 4.2.2. Article 2: Potentiel des bactéries lactiques amylolytiques pour remplacer l'utilisation du malt pour l'hydrolyse partielle de l'amidon pour produire des bouillies africaines à base d'un mélange mil-arachide.....              | 89         |
| 4.2.3. Projet d'article 3: Limites d'utilisation de souches de bactéries lactiques sélectionnées pour leurs activités amylasique, phytasique et $\alpha$ - galactosidasique pour fermenter un mélange mil-soja .....                    | 97         |
| 4.2.4. Résultats complémentaires .....                                                                                                                                                                                                  | 112        |
| <b>Chapitre 5. Discussion générale .....</b>                                                                                                                                                                                            | <b>116</b> |
| <b>Chapitre 6. Conclusion .....</b>                                                                                                                                                                                                     | <b>122</b> |
| <b>RESUME en français.....</b>                                                                                                                                                                                                          | <b>151</b> |

|                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1: Besoins et apports énergétiques des nourrissons et des jeunes enfants selon les différentes classes d'âges (6 à 24 mois).....                                       | 10  |
| Tableau 2: Apports nutritionnels recommandés en quelques nutriments chez les nourrissons et les enfants de 6 à 24 mois.....                                                    | 12  |
| Tableau 3: Composition nutritionnelle recommandée pour les aliments de complément dans les PED par ration journalière .....                                                    | 13  |
| Tableau 4: Evolution de la production des principales cultures alimentaires au Burkina Faso (tonnes).....                                                                      | 18  |
| Tableau 5: Origines, noms scientifiques et communs des principaux types de mils .....                                                                                          | 19  |
| Tableau 6: Les principaux aliments traditionnels à base de mil consommés au Burkina Faso                                                                                       | 21  |
| Tableau 7: Répartition des macronutriments dans le grain de mil .....                                                                                                          | 23  |
| Tableau 8: Composition globale des grains de céréales.....                                                                                                                     | 24  |
| Tableau 9: Composition en acides aminés du mil chandelle .....                                                                                                                 | 25  |
| Tableau 10: Teneurs en différents minéraux et vitamines du mil chandelle.....                                                                                                  | 26  |
| Tableau 11: Aliments traditionnels fermentés à base de matières premières amylacées utilisés dans l'alimentation complémentaire du jeune enfant en Afrique subsaharienne ..... | 33  |
| Tableau 12: Comparaison des techniques moléculaires de caractérisation de la diversité bactérienne d'aliments fermentés .....                                                  | 42  |
| Tableau 13: Composition globale de quelques graines de légumineuses et oléagineuses .....                                                                                      | 46  |
| Tableau 14: Souches de bactéries lactiques présélectionnées parmi les isolats du <i>ben-saalga</i>                                                                             | 58  |
| Tableau 15: Composition nutritionnelle des matières végétales et des formulations réalisées                                                                                    | 60  |
| Tableau 16: Evolution de la teneur en phytates en début et fin de fermentation des pâtes de mélange mil-arachide .....                                                         | 113 |

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 1: Facteurs immédiats et directs influençant la santé et l'état nutritionnel des nourrissons et des jeunes enfants (adapté de l'UNICEF, 1990)</b> ..... | 7   |
| Figure 2: Coupe longitudinale d'un grain de mil.....                                                                                                              | 22  |
| Figure 3: Structure de l'acide phytique, myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5 hexaphosphate .....                                                                           | 27  |
| Figure 4: Structure des $\alpha$ -galactosides .....                                                                                                              | 29  |
| Figure 5: Catabolisme du glucose par les bactéries lactiques .....                                                                                                | 49  |
| Figure 6: Mécanismes d'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylolytiques .....                                                                                  | 53  |
| Figure 7: Diagramme de production au laboratoire du <i>ben-saalga</i> amélioré utilisant un starter naturel ou biologique.....                                    | 68  |
| Figure 8: Teneurs en galactosides des pâtes de mélange mil-arachide en début et fin de fermentation .....                                                         | 114 |
| Figure 9: Profil TTGE des espèces bactériennes dans les pâtes fermentées de mélange mil-arachide en début et fin de ferment .....                                 | 115 |

## *Liste des abréviations et acronymes*

---

ADN : Acide désoxy ribonucléique  
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism  
AGI : Acides Gras Insaturés  
ANC : Apports Nutritionnels Conseillés  
ARN : Acide ribonucléique  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate  
BET : Bromure d’Ethidium  
BLA : Bactéries lactiques amylolytiques  
Bs : Base sèche  
CEREFER : Céréales Fermentées  
CNRST : Centre National de Recherche Scientifique et Technologique  
DE : Densité énergétique  
DTA : Département Technologie Alimentaire  
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
EDS BF: Enquête Démographique et de Santé Burkina Faso  
EPRAN : Equipe Pluridisciplinaire de Recherche en Alimentation et Santé  
ET : Ecart type  
FAO : Organisation des Nations Unies pour l’Alimentation et l’Agriculture  
GRAS : Generally Recognized As Safe  
HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance  
HPIC : Chromatographie Ionique à Haute Performance  
IP6 : Myo-Inositol Hexaphosphate  
IPRAN : Institut Pluridisciplinaire de Recherche en Alimentation et Nutrition  
INSD : Institut National des Statistiques et de la Démographie  
IRD : Institut de Recherche pour le Développement  
IRSAT : Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies  
IUB : Union Internationale de Biochimie  
IUPAC : Union Internationale de Chimie pure et Appliquée  
MS: Matière Sèche  
MRS: Man Rogosa Sharpe  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ONG : Organisation non gouvernementale  
PED : Pays en Développement  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PIB: Produit Intérieur Brut  
p-NP: p- Nitrophényl  
p-NPGP: p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside  
RADP: Random Amplification of DNA Polymorphic  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism  
T-RFLP: Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism  
TTGE: Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis  
TGGE: Température Gradient Gel Electrophoresis  
UNICEF: Fonds des Nations Unies pour l’Enfance  
UR : Unité de Recherche  
UMR : Unité Mixte de Recherche  
WHO: World Health Organization

## **Chapitre 1. Introduction générale**

La période de l'alimentation complémentaire est dans les pays en développement, un moment de grande vulnérabilité pour les nourrissons et les jeunes enfants (Michaelsen et Friis, 1998). L'inadéquation des aliments de complément du point de vue nutritionnel et sanitaire est l'une des causes majeures de prévalence élevée des formes de malnutrition infantile (Brown, 1997). En général, la malnutrition ou sous nutrition affecte particulièrement les enfants d'âge compris entre 6 et 24 mois à cause de leurs besoins nutritionnels très élevés (WHO, 1998) et de leur vulnérabilité accrue face aux infections. La malnutrition est responsable, directement ou indirectement, de plus du tiers soit 35% des décès des enfants de moins de cinq ans dans le monde (Black et al., 2008). Selon les plus récentes estimations de l'OMS (2008), 178 millions d'enfants de moins de cinq ans présentent un retard de croissance dans le monde, dont 90 % vivent dans les PED. Aussi, la malnutrition est connue avoir des répercussions graves à court et à long terme sur la santé, le développement psychique et la croissance des enfants (Slingerland et al., 2005; Black et al., 2008).

En considération des problèmes persistants de la malnutrition dans le monde et en particulier dans les pays en développement, plusieurs institutions internationales et organisations non gouvernementales (ONG) en collaboration avec des experts développent des stratégies depuis quelques décennies visant à prévenir ou à lutter contre ce fléau. Ces stratégies sont multiples et reposent sur l'élaboration de déclarations, de politiques et de plans d'action nationaux pour la nutrition, de lignes directrices, de recommandations ou de normes. Des recommandations internationales ont été récemment formulées afin de garantir une alimentation adéquate du nourrisson et du jeune enfant. Par exemple, l'allaitement maternel exclusif de la naissance à l'âge de 6 mois (WHO, 2001) ainsi qu'une alimentation complémentaire adéquate introduite à partir de 6 mois jusqu'à 24 mois ou plus avec poursuite de l'allaitement maternel (WHO/UNICEF, 2002) sont promus conjointement par l'OMS et l'UNICEF. De plus, pour les pays en développement où la majorité de la population vit dans des conditions très précaires sans accès aux technologies de réfrigération pour la conservation des aliments, la FAO et l'UNICEF sont enclins à encourager et à soutenir l'utilisation des aliments traditionnels amylicés fermentés dans l'alimentation complémentaire du jeune enfant (WHO, 1998) en raison des conséquences bénéfiques de la fermentation lactique sur la qualité sanitaire de ces aliments.

En Afrique et en particulier en Afrique de l'Ouest, les bouillies traditionnelles de céréales fermentées (mil, maïs ou sorgho) ou de manioc sont généralement des aliments populaires (Belton et Taylor, 2004; Steinkraus, 1995) fréquemment utilisés en alimentation complémentaire des jeunes enfants. Elles représentent en effet l'essentiel des ingérés énergétiques de ces derniers après ceux apportés par le lait maternel. Une grande variété de bouillies traditionnelles fermentées est produite dans de petites unités de production ou au niveau familial (Cornu et al., 1993). Quelques unes comme *ogi* et *mawé* au Bénin, *kenkey* et *koko* au Ghana, *ben-saalga* et *ben-kida* au Burkina Faso, *poto-poto* au Congo, *uji* et *togwa* en Tanzanie, *kirsa* au Soudan, *kwunu-aki* et *ogi* au Nigeria, *mahewu* en Afrique du Sud ont été décrites dans la littérature. Leur préparation inclut une étape de fermentation lactique spontanée (Blandino et al., 2003; Hounhouigan et al., 1991; Tomkins et al., 1988; Tou et al., 2006) due au développement de la microflore naturellement présente dans les matières premières. Cette fermentation lactique naturelle des céréales est un procédé ancien d'une importance considérable en Afrique, développé comme un moyen économique de

conservation et de préservation des aliments dans des conditions ambiantes de température. Ceci explique sans doute l'importante diversité des formes de consommation des produits traditionnels céréaliers fermentés, principalement des bouillies, des pâtes, des gâteaux, des beignets, des boissons non alcoolisées et alcoolisées généralement élaborés à partir d'une diversité de céréales (mil, maïs, sorgho, riz).

Différents genres et espèces de bactéries lactiques ont été rapportés comme étant impliqués dans la fermentation lactique des céréales souvent en association avec des levures. Ces différents groupes de microorganismes produisent de grandes quantités d'acide lactique à partir du glucose et d'autres glucides durant la fermentation permettant d'améliorer la sécurité sanitaire et la conservation des aliments fermentés. La diversité des bactéries lactiques dans les aliments céréaliers fermentés a été bien étudiée par des techniques dites «cultures-dépendantes» et plus récemment par des approches moléculaires largement basées sur l'analyse des séquences de l'ADN et de l'ARN ribosomal 16S. Les résultats de ces travaux ont montré l'implication de nombreuses espèces appartenant principalement aux genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Pediococcus* (Oyewole, 1997; Halm et al., 1993; Blandino et al., 2003). Cependant, le fait que ces fermentations soient spontanées et donc dépendantes à la fois des conditions ambiantes et de l'implantation des microflore naturelles peut être à l'origine des problèmes de variation de la qualité organoleptique, nutritionnelle et sanitaire et de la stabilité des aliments traditionnels fermentés.

Dans les pays industrialisés, ces problèmes ont conduit depuis longtemps au développement de l'utilisation de cultures starters pour d'une part contrôler et optimiser les procédés de fermentation et la qualité des produits fermentés et d'autre part exploiter leur rôle antimicrobien et leur habilité à conférer aux aliments des caractéristiques organoleptiques désirées, notamment de texture et de conservation. Des travaux antérieurs ont en effet montré que les cultures starters de bactéries lactiques initient une rapide acidification des matières premières, réduisant ainsi les risques de contamination microbienne ultérieure, rendant par conséquent plus prédictibles les procédés de fermentation et les caractéristiques sensorielles désirées (Holzapfel, 1997). L'utilisation de cultures starters fonctionnelles qui contribuent à la sécurité des aliments fermentés et qui offrent en plus un ou plusieurs avantages organoleptiques, technologiques, nutritionnels ou des effets bénéfiques sur la santé a été récemment suggérée par de nombreux auteurs (De Vuyst, 2000; Leroy et De Vuyst, 2003, 2004).

Au Burkina Faso, le *ben-saalga* et le *ben-kida* sont les principales bouillies populaires de mil (*Pennisetum glaucum*) fermenté consommées au petit déjeuner par les adultes et utilisées fréquemment dans l'alimentation complémentaire du jeune enfant (Mouquet-Rivier et al., 2008). A Ouagadougou, la capitale, environ 36 % des enfants de moins de 5 ans consomment quasi-quotidiennement le *ben-saalga* (Tou et al., 2006). Le procédé traditionnel de production du *ben-saalga*, ses caractéristiques nutritionnelles et l'amélioration de son procédé ont été récemment étudiés par Tou et al. (2006, 2007a et 2007b) et Mouquet-Rivier et al. (2008). Ces derniers ont montré que le *ben-saalga*, tout comme les bouillies traditionnelles de matières premières amylacées élaborées en Afrique et en Asie, avaient une valeur nutritionnelle très insuffisante pour satisfaire les besoins des jeunes enfants africains en raison de leur très faible densité énergétique et de leurs faibles teneurs en protéines, lipides et minéraux essentiels

(Oyewole, 1997; Tou et al., 2007a; Trèche et Mbome, 1999). Ces bouillies généralement obtenues par cuisson des pâtes fermentées, présentent de faibles viscosités facilement acceptables par les enfants mais en conséquence de faibles concentrations en matière sèche, le plus souvent comprises entre 5 et 10 g/100 g de bouillie. Ceci correspond à des valeurs de densité énergétique de l'ordre de 20 à 40 kcal/100 g (Mosha et Svanberg, 1990; Lorri, 1993; Trèche, 2002; Tou et al., 2006; Mouquet-Rivier et al., 2008). Ces valeurs de densité énergétique sont inférieures à 84 kcal/100 g de bouillie qui représente la valeur minimale recommandée par Dewey et Brown (2003) pour les enfants âgés de 9 à 11 mois, avec une teneur en matière sèche d'au moins 20%. Cependant, lorsque les bouillies sont préparées à des concentrations en matière sèche suffisantes d'environ 20-25 g/100 g, les bouillies sont de viscosité très élevée, voire quasiment solides et donc difficilement consommables par les jeunes enfants. Cette augmentation de la viscosité causée par la gélatinisation de l'amidon (constituant majoritaire des farines de céréales) durant les traitements hydro-thermiques pour la préparation des bouillies conduit à limiter la quantité de farine et de ce fait le contenu énergétique des bouillies afin de leur conférer une texture semi-liquide adéquate pour les jeunes enfants. Ainsi, l'enfant doit consommer de plus grandes rations pour satisfaire ses besoins nutritionnels, ce qui n'est pas possible compte tenu de sa capacité gastrique limitée estimée à environ 30 ml/kg de poids corporel/repas (Mlingi, 1989; Trèche, 1995; De Benoist, 1995).

Pour améliorer la qualité nutritionnelle du *ben-saalga* en vue de son utilisation par les jeunes enfants, la densité énergétique peut être augmentée par une incorporation accrue de matière sèche amylacée grâce à une hydrolyse partielle de l'amidon, tandis qu'une complémentation obtenue par co-fermentation du mil avec des légumineuses localement disponibles (soja, arachide) pourrait accroître les teneurs en protéines et lipides et améliorer le profil en acides aminés essentiels. Cependant, de nombreux travaux ont montré la présence de quantités non négligeables de facteurs antinutritionnels tels que les phytates, les fibres, les  $\alpha$ -galactosides et certains polyphénols dans certaines graines de légumineuses qui pourraient diminuer la valeur nutritionnelle des aliments dérivés. En effet, les phytates et les polyphénols sont d'importants agents chélateurs qui réduisent la biodisponibilité de plusieurs minéraux essentiels divalents comme le fer, le zinc, le calcium, le magnésium et les protéines dans les aliments infantiles (Hurrell, 2004; Perlas et Gibson, 2002; Phillippy, 2006). En revanche, les  $\alpha$ -galactosides, autres composés antinutritionnels thermorésistants, non hydrolysables par les enzymes digestives de l'espèce humaine (Leske et al., 1993) sont responsables de désordres métaboliques tels que la production de gaz et de diarrhées. L'hydrolyse des phytates et des  $\alpha$ -galactosides a été déjà observée durant la fermentation naturelle pour la production du *ben-saalga* traditionnel et serait due à l'effet d'enzymes bactériennes et endogènes.

Jusqu'alors, peu d'études se sont intéressées à l'utilisation de souches starters pour améliorer la qualité nutritionnelle des bouillies traditionnelles fermentées à base de mélange de céréales et de légumineuses. Nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse d'étudier l'amélioration des conditions de production d'une formule améliorée de la bouillie de mil fermenté de type «*ben-saalga*», à base d'un mélange mil/légumineuse par l'utilisation de souches de bactéries lactiques à activités amylasique, phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique.

Ces travaux ont été initiés dans le cadre d'un projet financé par l'Union Européenne connu sous l'acronyme «CEREFER» et mené par l'Institut de Recherche pour le Développement

(IRD, France) en partenariat avec les Universités de Ouagadougou (Burkina Faso), Wageningen (Pays-Bas) et Jaen (Espagne), et l'Equipe pluridisciplinaire de recherche en alimentation et nutrition du Congo (EPRAN, Congo). Ce projet avait pour but l'amélioration de la qualité nutritionnelle et sanitaire et de la conservation de divers produits fermentés à base de céréales du Burkina Faso et du Congo. Un relais de financement des travaux a été assuré à la fin du projet CEREFER intervenu en 2006 grâce à l'obtention d'une bourse de recherche de la FIS (Fondation Internationale pour la Science).

L'ensemble des travaux réalisés est présenté en 6 chapitres:

Le chapitre 1 donne l'introduction générale;

Le chapitre 2 est une revue bibliographique des connaissances axées sur l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant, la situation alimentaire et nutritionnelle au Burkina Faso et dans le monde, les aliments de complément traditionnels en Afrique subsaharienne et les bactéries lactiques;

Le chapitre 3 décrit les matériels, les protocoles et méthodes d'analyses utilisés dans le cadre de ce travail;

Le chapitre 4 présente les résultats et les discussions:

- Un premier sous chapitre 4.1 qui présente l'étude de caractérisation des propriétés fonctionnelles de bactéries lactiques isolées de la pâte de mil fermenté en vue d'une sélection de souches potentielles pour leur utilisation comme cultures starters dans la production d'un *ben-saalga* de valeur nutritionnelle améliorée;
- Un deuxième sous chapitre 4.2 consacré à l'évaluation des capacités des souches potentielles retenues, principalement amylasique, phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique, utilisées seules ou en mélange comme cultures starters dans les fermentations des pâtes mil-légumineuses (arachide ou soja) pour hydrolyser respectivement l'amidon, les phytates et les  $\alpha$ -galactosides;

Le chapitre 5 propose une discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail, expose les limites de l'étude, fait des recommandations et définit les perspectives de recherche;

Le chapitre 6 donne une conclusion générale de l'étude.

Les résultats de cette thèse ont fait l'objet de la rédaction de deux articles publiés dans International Journal of Food Microbiology (IJFM), et d'un projet d'article soumis à Journal of Food Science (JFS).

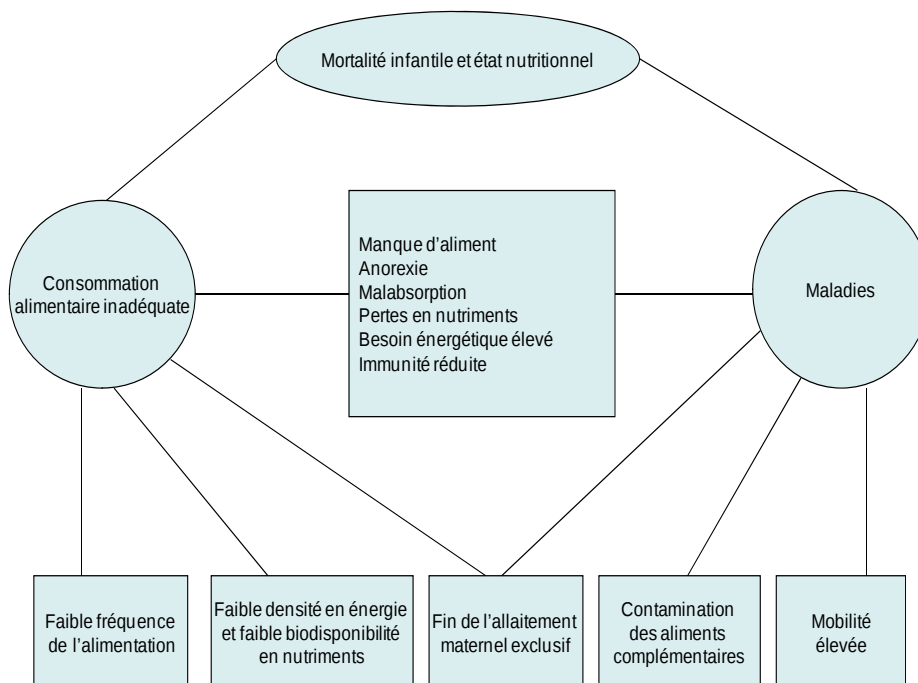
## **Chapitre 2. Revue bibliographique**

## 2.1. Recommandation pour l'allaitement et l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant

La conduite d'une bonne nutrition liée à l'alimentation est fondamentale pour le développement et la croissance du nourrisson et du jeune enfant.

Différents facteurs sont directement ou indirectement en relation avec la santé et l'état nutritionnel défaillant des enfants de moins de cinq ans dans le monde (Figure 1). Ceci particulièrement pour ceux vivant dans les pays en développement (PED) d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. Dans ces pays, les problèmes alimentaires et nutritionnels sont à l'origine d'une mortalité et d'une morbidité élevées ainsi que de troubles de la croissance et du développement psychique chez ces enfants. Cette morbidité est souvent irréversible avec des conséquences négatives sur la croissance et la productivité des nations.

Face à l'ampleur des problèmes nutritionnels dans le monde, et de leurs effets néfastes sur la santé des populations et sur le développement socio-économique des pays, différentes stratégies de lutte sont développées par des institutions internationales telles que la FAO, l'OMS et l'UNICEF et régulièrement mises à jour avec l'avancée des connaissances scientifiques. Ces stratégies vont de l'élaboration de règles de référence ou recommandations en matière de pratiques d'allaitement, de l'amélioration et de la définition des normes de qualité nutritionnelle et sanitaire des aliments de complément, à celle des soins de santé primaire.



**Figure 1: Facteurs immédiats et directs influençant la santé et l'état nutritionnel des nourrissons et des jeunes enfants (adapté de l'UNICEF, 1990)**

### **2.1.1. Allaitement maternel**

En 2002, l'OMS et l'UNICEF ont conjointement recommandé l'allaitement maternel exclusif pour tous les enfants dès la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois, âge à partir duquel il devient nécessaire d'introduire des aliments de complément au lait maternel sûrs et adéquats du point de vue nutritionnel, tout en poursuivant l'allaitement jusqu'à 24 mois ou plus (WHO/UNICEF, 2002).

Ces recommandations sont basées sur les informations scientifiques récentes apportées par diverses études, tant cliniques, épidémiologiques que nutritionnelles. Celles-ci ont permis d'établir fermement aujourd'hui que le lait maternel est l'aliment initial qui répond le mieux aux besoins du nourrisson aussi bien sur le plan nutritionnel que psychoaffectif. En effet, le lait maternel apporte de nombreux éléments nutritionnels sous une forme particulièrement assimilable et bien adaptée aux besoins de l'enfant. Aussi, le lait maternel est de bonne qualité sanitaire et joue un rôle protecteur vis-à-vis des infections -diarrhées, infections respiratoires aiguës, et même affections allergiques- souvent rapportées comme causes de mortalité infantile dans les PED. Son activité anti-infectieuse est liée à la présence des immunoglobulines, des macrophages et des lysozymes qui stimulent le système immunitaire de l'enfant et diminue ainsi sa vulnérabilité aux infections d'origine alimentaire ou transmis par l'eau ou les jus. Il présente aussi l'avantage d'être un aliment de très faible coût. Cependant, l'effet protecteur de l'allaitement maternel dépend de sa durée et de son exclusivité (Baehler et al., 2008).

Les avancées scientifiques en matière d'allaitement ont montré également que l'allaitement maternel exclusif garantit des conditions optimales de croissance, de santé et de développement durant les six premiers mois de vie avant le passage à des aliments complémentaires appropriés (Underwood and Hofvander, 1982; Kramer et al., 2004; Turck, 2005; Wambach et al., 2005). L'allaitement maternel exclusif permet ainsi de mieux appréhender les problèmes nutritionnels et de réduire les menaces nutritionnelles les plus graves qui pèsent sur les nourrissons à cause des mauvaises pratiques d'allaitement.

Par ailleurs pour les mères, l'allaitement maternel aurait aussi des effets bénéfiques à plus long terme dans la prévention des maladies chroniques comme l'obésité et certaines maladies cardiovasculaires et des effets bénéfiques sur la santé (Turck, 2005; Wambach et al., 2005).

### **2.1.2. Alimentation complémentaire**

D'après les recommandations internationales les plus récentes (WHO/UNICEF, 2002), tous les enfants devraient recevoir des aliments de complément appropriés à partir de l'âge de 6 mois pour compléter les apports en énergie et en nutriments du lait maternel, devenus insuffisants pour assurer la couverture de leurs besoins.

La dénomination d'aliments de complément désigne toutes sortes d'aliments donnés en complément du lait maternel, parmi lesquels les bouillies et les produits lactés de substitution (Baehler et al., 2008). Les aliments de complément peuvent se présenter sous forme de purée fraîchement préparée ou sous forme de produits manufacturés à l'échelle traditionnelle, artisanale ou industrielle. Ces aliments peuvent résulter de différentes matières premières ou

de leur combinaison généralement des fruits et légumes, des céréales, des tubercules ou des racines avec ou non des ingrédients divers (viande, poisson, légumineuse etc.). Le choix des aliments utilisés pour les aliments de complément est influencé par des facteurs individuels, traditionnels et culturels multiples et ne joue pas souvent un rôle significatif au niveau de la physiologie nutritionnelle.

De par leur nature, les aliments de complément permettent également chez l'enfant le passage de l'alimentation lactée à l'alimentation adulte.

### **2.1.3. Période et âge d'introduction de l'alimentation complémentaire**

La période pendant laquelle les nourrissons et les jeunes enfants reçoivent des aliments de complément est désignée comme période d'alimentation complémentaire. Il s'agit d'une période de diversification du régime alimentaire du jeune enfant et celle-ci ne doit pas être confondue avec le sevrage qui est l'arrêt de l'allaitement maternel. C'est aussi une période au cours de laquelle diverses pratiques alimentaires peuvent altérer l'état nutritionnel de l'enfant. Cette période de l'alimentation complémentaire est ainsi critique pour de nombreux enfants vivant dans les pays en développement car c'est à cette période de la vie que l'on enregistre beaucoup de décès liés à des maladies nutritionnelles et infectieuses.

L'âge d'introduction de l'alimentation complémentaire a longtemps été controversé par les organisations internationales comme l'OMS et l'UNICEF. En effet, jusqu'en 2001, l'âge de début d'introduction des aliments de complément n'était pas défini de façon précise. En revanche, il ne devait pas intervenir avant l'âge de 4 mois selon les pédiatres à cause de l'immaturité des enzymes pancréatiques et hépatiques qui impose l'usage du lait comme aliment exclusif. Alors que l'OMS préconisait la période allant de 4 à 6 mois, l'UNICEF quant à elle recommandait l'introduction des aliments de complément vers l'âge de 6 mois (WHO, 1995; UNICEF, 1995). Leurs recommandations reposaient sur des arguments à la fois mécaniques, physiologiques et nutritionnels liés à l'état de maturation de l'organisme.

Ces dernières années, de nombreux travaux dont une revue de littérature sur la durée optimale de l'allaitement maternel exclusif initiée par l'OMS en 2001 (WHO, 2002) ont montré que l'introduction d'aliment de complément ne présentait aucun avantage objectif pour la période allant de 4 à 6 mois. Dès lors, l'OMS et l'UNICEF se sont accordés à recommander conjointement l'âge de 6 mois pour le début de l'introduction de l'alimentation complémentaire (WHO/UNICEF, 2002). Toute situation de déficit d'apports en nutriments ou à l'inverse tout excès a des répercussions parfois fort délétères. Le respect d'une telle recommandation permet d'assurer un bon équilibre nutritionnel.

### **2.1.4. Besoins et apports nutritionnels et énergétiques recommandés pour le nourrisson et le jeune enfant**

La vie, la croissance et l'activité normale d'un enfant nécessitent la couverture de ses besoins nutritionnels. Au sens large, les besoins nutritionnels sont par définition la quantité moyenne de nutriments nécessaire chaque jour à l'homme pour se maintenir en bon état de santé physique et psychique, et tenant compte de son état physiologique, de son sexe, de son âge, de

son environnement et de son état physique. En résumé, ils doivent couvrir les dépenses de repos et assurer le coût de la croissance et du métabolisme des nutriments.

Les besoins nutritionnels sont exprimés par kg de poids corporel et par jour, en fonction de l'âge et parfois du sexe. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) pour un groupe correspondent aux besoins nutritionnels moyens plus deux écarts-types. On estime ainsi que les besoins nutritionnels de 97,5% de la population concernée sont couverts par ces ANC (Chevalier, 2005). Les besoins nutritionnels comprennent les besoins énergétiques et plastiques.

Les recommandations actuelles en ce qui concerne les besoins énergétiques ont été publiées par Butte et al. (2000) puis ensuite par Dewey et Brown (2003) à partir des conclusions d'une réunion d'experts sous l'égide de la FAO, l'OMS et l'Université des Nations Unies (FAO/WHO/UNU, 2001). Ces nouvelles recommandations sont basées sur une étude longitudinale de mesure de la dépense énergétique totale de la masse et de la composition corporelle, obtenues sur 76 enfants américains âgés de 3, 6, 9, 12, 18 et 24 mois (Butte et al., 2000). Le tableau 1 donne les besoins et apports énergétiques récemment estimés pour les nourrissons et les jeunes enfants.

**Tableau 1: Besoins et apports énergétiques des nourrissons et des jeunes enfants selon les différentes classes d'âge (6 à 24 mois)**

| Classes d'âge | Besoins énergétiques totaux (kcal/j) |                    | Apport en énergie du lait maternel (kcal/j) |       | Apport en énergie requis à partir des aliments de complément (kcal/j) |       |
|---------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------|-------|
|               | Butte et al. (2000)                  |                    | Dewey et Brown (2003)                       |       |                                                                       |       |
|               | Moyen                                | + 2ET <sup>2</sup> | Faible <sup>1</sup>                         | Moyen | Faible <sup>1</sup>                                                   | Moyen |
| 6-8 mois      | 615                                  | 769                | 217                                         | 413   | 552                                                                   | 356   |
| 9-11 mois     | 686                                  | 858                | 157                                         | 379   | 701                                                                   | 479   |
| 12-23 mois    | 894                                  | 1118               | 90                                          | 346   | 1028                                                                  | 772   |

(1) Moyenne moins 2 écarts-types des ingérés énergétiques à partir du lait maternel observés dans les pays en développement

(2) Moyenne +25% pour pouvoir couvrir les besoins de la presque totalité des enfants

L'apport énergétique est fonction de l'âge et il est assuré par les macronutriments. Selon Lutter et Dewey (2003), les macronutriments tels que les protéines, les lipides et les glucides doivent représenter respectivement 6 à 10%, 24 à 28% et 62 à 70% de l'apport énergétique total ingéré.

Les protéines jouent essentiellement un rôle de matériau de construction en participant à la constitution des membranes cellulaires et des organites intracellulaires ainsi qu'au renouvellement continu des tissus. Chez le nourrisson et les jeunes enfants, le coefficient d'utilisation digestive (biodisponibilité des protéines), la teneur en acides aminés et la nature

des protéines sont d'importants déterminants de la croissance. En revanche, un excès de protéines dans l'alimentation peut réduire l'appétit de l'enfant et constituer une source inefficace et coûteuse d'énergie.

Les lipides sont une importante source d'énergie pour les nourrissons et les jeunes enfants et aussi d'acides gras essentiels ayant d'importantes fonctions métaboliques. Les acides gras essentiels sont les acides gras polyinsaturés à longues chaînes (oméga 3 et oméga 6) qui favorisent le développement des facultés cognitives du jeune enfant. De plus, ils sont des précurseurs de molécules indispensables à l'organisme (hormones, stéroïdes, prostaglandines etc.) mais ils ont aussi un rôle de réserve, de structure et favorisent l'absorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K).

Concernant les glucides, ils fournissent de l'énergie à partir de l'alimentation surtout végétale.

Les micronutriments représentés par les vitamines (A, B<sub>1</sub> à B<sub>12</sub>, C, D, E, K etc.), les minéraux (calcium, sodium, magnésium, phosphore etc.) et les oligoéléments (cuivre, fer, zinc, iode, fluor etc.) sont aussi des substances indispensables pour la croissance. De plus, ils jouent un rôle protecteur et assurent le bon fonctionnement de l'organisme grâce à leur implication dans différents processus métaboliques en tant que coenzyme ou catalyseur de la libération d'énergie. La couverture de l'ensemble des besoins en tous ces nutriments est l'une des conditions nécessaires à un bon état nutritionnel du jeune enfant. Les recommandations d'actualité, en ce qui concerne les apports en macronutriments et quelques micronutriments sont présentées dans le tableau 2 ci-après.

**Tableau 2: Apports nutritionnels recommandés en quelques nutriments chez les nourrissons et les enfants de 6 à 24 mois**

|                                                   | Apports recommandés en quelques nutriments |           |            |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|------------|
|                                                   | 6-8 mois                                   | 9-11 mois | 12-23 mois |
| <b>Macronutriments</b>                            |                                            |           |            |
| Protéines (g/j) <sup>a</sup>                      | 10,2                                       | 10,2      | 11,6-11,8  |
| Protéines (g/kg de poids corporel/j) <sup>a</sup> | 1,31                                       | 1,31      | 1,14-1,03  |
| Lipides <sup>b</sup>                              | -                                          | -         | -          |
| <b>Micronutriments (FAO/WHO, 2004)</b>            |                                            |           |            |
| Vitamine A (µg ER/j)                              | 400                                        | 400       | 400        |
| Folates (µg /j)                                   | 80                                         | 80        | 150        |
| Vitamine D (µg/j)                                 | 5                                          | 5         | 5          |
| Fer (mg/j) <sup>c</sup>                           | 9,3                                        | 9,3       | 5,8        |
| Zinc (mg/j) <sup>d</sup>                          | 4,2                                        | 4,1       | 4,1        |
| Iode (µg/j)                                       | 90                                         | 90        | 90         |
| Calcium (mg/j)                                    | 400                                        | 400       | 500        |
| Vitamine C (mg/j)                                 | 30                                         | 30        | 30         |

(a) FAO/WHO, 2007

(b) WHO (1998)

(c) Besoins en fer estimés pour une biodisponibilité de 10%

(d) Estimation pour une biodisponibilité modérée du zinc

## 2.1.5. Caractéristiques nutritionnelles et hygiéniques requises pour les aliments de complément

### 2.1.5.1. Caractéristiques nutritionnelles

Les aliments complémentaires introduits à partir de l'âge de 6 mois doivent avoir une qualité nutritionnelle adéquate pour répondre aux besoins en énergie et en nutriments des nourrissons et des jeunes enfants et assurer ainsi leur croissance et leur développement. Les apports nutritionnels requis à partir des aliments de complément se calculent de la manière suivante:

$$\begin{array}{lcl} \text{Quantités en énergie ou} & & \text{Besoins totaux} \\ \text{en nutriments à fournir} & = & \text{en énergie ou} \\ \text{par les aliments de} & & \text{en nutriments} \\ \text{complément} & & \text{Apport en énergie ou} \\ & & \text{en nutriments du lait} \\ & & \text{maternel} \end{array}$$

Chez le nourrisson et le jeune enfant, l'ingéré énergétique et nutritionnel au cours d'une journée représente la somme des apports en énergie et en nutriments fournis par les aliments de complément et par le lait maternel durant la journée. Il est ainsi possible d'estimer sur la base de calculs les densités énergétiques et en nutriments souhaitables pour les aliments de complément en fonction de l'âge. Les recommandations récentes faites par Butte et al. (2000)

et ensuite par Dewey et Brown, (2003) tiennent compte du niveau d'apport en lait maternel dont ils bénéficient et du nombre de repas par jour qu'ils reçoivent.

Le tableau 3 donne les recommandations sur les densités en protéines et lipides et en quelques vitamines et minéraux, requises pour les aliments de complément (Lutter et Dewey, 2003). Ces recommandations tiennent compte de niveaux d'ingérés à partir du lait maternel moyens en fonction de l'âge (WHO, 1998).

**Tableau 3: Composition nutritionnelle recommandée pour les aliments de complément dans les PED par ration journalière**

|                                   | Pour 100 g de farine |            |           |
|-----------------------------------|----------------------|------------|-----------|
|                                   | 6-11 mois            | 12-23 mois | 6-23 mois |
| <b>Energie et macronutriments</b> |                      |            |           |
| Energie (kcal/)                   | 440                  | 440        | 440       |
| Protéines (g)                     | 7,5-11, 3            | 6,7-10,8   | 6-11      |
| Lipides <sup>1</sup> (g)          | 11,7                 | 13,7       | 12,7      |
| <b>Micronutriments</b>            |                      |            |           |
| Vitamine A (µg ER)                | 500                  | 500        | 500       |
| Folates (µg)                      | 43,6-54,5            | 83         | 83        |
| Vitamine D                        | 2,5-5                | 1,7-3,3    | 2-4       |
| Calcium (mg)                      | 250-500              | 170-330    | 200-400   |
| Fer (mg)                          | 27,5                 | 11,7       | 14        |
| Zinc (mg)                         | 10-12,5              | 6,7        | 8,3       |

<sup>1</sup> 24% d'énergie apporté par les lipides chez les enfants de 6 à 11 mois d'âge, 28% pour les enfants de 12-23 mois d'âge et 26% pour les enfants de 6 à 23 mois d'âge

Source : Lutter et Dewey, 2003

### 2.1.5.2. Caractéristiques sanitaires

La qualité sanitaire des aliments de complément est particulièrement importante. La consommation d'aliments contaminés d'origine biologique, chimique ou physique par les nourrissons et les jeunes enfants contribue à la survenue de pathologies infectieuses gastro-intestinales pouvant dans certains cas être à l'origine de décès (Motarjemi et al., 1999). Les agents pathogènes et les contaminants chimiques (pesticides, métaux lourds...) doivent être absents ou en quantité inférieure au seuil de toxicité. De ce fait, les aliments de complément doivent être de bonne qualité sanitaire donc conforme aux principes régissant l'établissement et l'application de critères microbiologiques pour les aliments (CAC/GL 21-1997). Aussi, les facteurs antinutritionnels doivent normalement être éliminés ou réduits en dessous d'un seuil acceptable. Enfin, la préparation et la conservation des aliments de complément doivent être réalisées dans des conditions d'hygiène satisfaisante.

### 2.1.5.3. Autres caractéristiques

En plus des caractéristiques nutritionnelles et sanitaires, les aliments de complément devront avoir des caractéristiques organoleptiques (saveur, consistance, couleur) acceptables par les mères et les enfants et adaptées aux habitudes alimentaires locales. De plus, ils devront être disponibles et facilement accessibles et présenter une grande commodité de préparation. Les

traitements technologiques utilisés lors des procédés de fabrication doivent également permettre de rendre effectivement utilisables les nutriments qu'ils contiennent et d'éliminer ou réduire suffisamment les effets néfastes des composés susceptibles de diminuer leur acceptabilité ou leur efficacité nutritionnelle. Il s'agit principalement des facteurs antinutritionnels comme les phytates, les fibres, les tannins et les  $\alpha$ -galactosides susceptibles de se trouver en quantité importante dans les aliments complémentaires.

## **2.2. Situation nutritionnelle et alimentaire au Burkina Faso et en Afrique subsaharienne**

La malnutrition sous toutes ses formes principalement protéino-énergétique ou due aux déficiences en micronutriments est très répandue depuis plusieurs décennies chez les nourrissons et les jeunes enfants dans les pays en développement (UNICEF, 2008), où elle constitue un problème de santé publique. D'après la FAO, la sous-nutrition et la malnutrition affecte aujourd'hui 923 millions de personnes dans le monde (FAO, 2008). Selon l'OMS, 178 millions d'enfants de moins de cinq ans présentent un retard de croissance dans le monde, dont 90% vivent dans les pays fortement défavorisés (OMS, 2008) et particulièrement dans les pays d'Asie du sud et d'Afrique Sub-saharienne. Après l'âge de 2 ans, la sous nutrition peut causer des dommages irréversibles pour le développement. La malnutrition est responsable directement ou indirectement chaque année, de plus de 35% des décès des enfants de moins de cinq ans dans le monde, soit 3,5 millions (Black et al., 2008). Les pratiques d'allaitement maternel et d'alimentation ainsi que l'environnement sanitaire déficient constituent les principaux facteurs déterminants de l'état nutritionnel des nourrissons et des jeunes enfants, qui affectent à leur tour la morbidité et la mortalité de ces enfants.

### **2.2.1. Les pratiques d'allaitement**

L'Afrique est une des régions du monde où l'allaitement au sein est le plus répandu et dure le plus longtemps (Perez-Escamilla, 1993), avec cependant une grande hétérogénéité dans les pratiques d'allaitement. Seulement un peu plus d'un tiers environ des nourrissons dans les PED sont allaités exclusivement pendant les six premiers mois de leur vie même si les données tendanciellles ont montré une amélioration du pourcentage d'enfants allaités exclusivement qui est passé de 34% à 41% entre 1990 et 2004 (UNICEF, 2006). Des variations considérables sont observées entre les quatre groupes de région qui composent les PED avec les taux les plus faibles (20%) en Afrique de l'ouest et centrale (UNICEF, 2006).

Au Burkina Faso, l'allaitement maternel est pratiqué par toutes les femmes. Les dernières enquêtes démographiques et de santé réalisées en 2003 au Burkina Faso (EDSBF) ont montré que la quasi-totalité des enfants burkinabé soit 98% sont allaités au sein et cette pratique est uniforme quelles que soient les caractéristiques de la mère (INSD et ORC Macro, 2004). Cette étude a également montré que l'allaitement maternel se poursuit longtemps après la naissance puisque, à 20-23 mois, plus de huit enfants sur dix sont encore allaités. Cependant, parmi les enfants allaités, la proportion de ceux qui ont été allaités dans l'heure qui a suivi immédiatement la naissance et dans les 24 h sont respectivement de 33 et 63 %. Ces comportements se révèlent néfastes pour l'enfant et mettent en danger sa survie car c'est durant les vingt-quatre heures qui suivent la naissance que l'enfant reçoit le colostrum qui

contient les anticorps de la mère et qui sont essentiels pour résister à de nombreuses maladies. Cependant, la durée et les pratiques de l'allaitement au sein varient considérablement selon les femmes.

L'allaitement exclusif pendant les six premiers mois de vie n'est pas une pratique courante malgré les recommandations de l'OMS et l'UNICEF. En effet, dès la naissance de l'enfant, seulement 18 % des enfants ne reçoivent que le lait maternel et à 4-5 mois, cette proportion n'est que de 16 % (INSD et ORC Macro, 2004). Une grande majorité, soit 83 % des enfants de moins de 6 mois reçoit d'autres liquides (eau plate, eau sucrée, jus de fruit, lait maternisé, infusions) ou des aliments de complément en plus du lait maternel.

Ces pratiques inadéquates fréquemment observées exposent les enfants aux agents pathogènes ce qui occasionnent de nombreuses maladies infectieuses entraînant parfois la mort comme le témoignent les données démographiques et sanitaires (INSD et ORC Macro, 2004). De plus, l'introduction précoce de ces aliments diminue la prise de lait par l'enfant, et donc la succion, ce qui réduit la production de lait.

L'éducation nutritionnelle avec l'encouragement et la promotion de l'allaitement maternel exclusif pendant les 6 premiers mois de la vie du nouveau-né est de nos jours un challenge pour de nombreux pays.

### **2.2.2. Les pratiques d'alimentation**

Les pratiques alimentaires inadéquates font référence, non seulement à la qualité et à la quantité des aliments donnés aux enfants, mais aussi aux étapes de leur introduction dans l'alimentation de l'enfant (INSD et ORC Macro, 2004). Les premiers aliments de complément donnés aux jeunes enfants en Afrique subsaharienne dont le Burkina Faso sont principalement des bouillies traditionnelles généralement à base de matières premières amylacées (Moise et al., 1988; Dop et Benbouzid, 1999). Dans la plupart des cas, il s'agit de bouillie à base d'une seule céréale (maïs, mil, sorgho) donc non enrichie. Les aliments riches en lipides et micronutriments sont consommés en quantité insuffisante, particulièrement ceux d'origine animale tels que : lait, fromage, œufs et viandes solides.

L'alimentation inadéquate est généralement en relation avec le niveau d'éducation des mères, les mauvaises pratiques de sevrage, l'état de santé précaire des enfants, spécifiquement la fréquence des fièvres (paludisme) et/ou des diarrhées ainsi que le faible accès à l'eau potable. Il est fréquent d'observer qu'un grand nombre d'enfant dans les PED et en Afrique subsaharienne sont encore nourris avec des pratiques qui s'éloignent des recommandations actuelles de l'OMS et de l'UNICEF. En effet, l'âge d'introduction des aliments de complément reste encore variable bien que l'OMS et l'UNICEF recommandent l'âge de 6 mois pour tous les enfants. Les étapes de leur introduction ne sont généralement pas respectées. En effet, l'introduction des aliments de complément est soit précoce ou se fait trop tardivement ce qui entraîne des conséquences nutritionnelles graves. Au Burkina Faso, seulement 48% et 84% des enfants reçoivent un aliment de complément en plus du lait maternel respectivement entre 6 et 9 mois et entre 16 et 19 mois (INSD et ORC Macro, 2004).

### **2.2.3. L'état nutritionnel des nourrissons et des jeunes enfants**

Selon l'OMS, l'état nutritionnel représente l'état de l'organisme résultant de l'ingestion, de l'absorption et de l'utilisation des aliments ainsi que des facteurs de nature pathologique (maladie ou infection). En résumé, il reste la résultante à chaque instant de trois facteurs fondamentaux: la consommation, les dépenses énergétiques (activité physique) et les besoins physiologiques.

L'état nutritionnel est évalué au moyen de différents indices anthropométriques calculés à partir de l'âge et des mesures de la taille et du poids de l'enfant pris au cours de l'enquête. Les principaux indices anthropométriques utilisés sont la taille par rapport à l'âge (taille-pour-âge) ou indice de malnutrition chronique que l'on appelle encore retard de croissance, le poids par rapport à la taille (poids-pour-taille) ou indice de malnutrition aigue ou maigreur ou encore émaciation, et le troisième indice, poids par rapport à l'âge (poids-pour-âge) qui est une combinaison d'indices qui fait référence aux enfants souffrant d'insuffisance pondérale. D'autres indices anthropométriques comme le périmètre brachial, le tour de taille et le tour de hanche sont également utilisés.

Dans les pays en développement, un peu plus d'un enfant de moins de cinq ans sur quatre (27%) souffre d'insuffisance pondérale représentant au total près de 146 millions d'enfants (UNICEF, 2007). En Afrique subsaharienne, 28% des enfants présentent une insuffisance pondérale. Ceci place l'Afrique subsaharienne en deuxième position pour le pourcentage d'enfants accusant des retards de croissance dont 41% pour l'Afrique de l'est et australe et 35% pour l'Afrique de l'ouest et centrale.

Au Burkina Faso, les trois dernières enquêtes démographiques et de santé ont montré que la situation nutritionnelle des enfants de moins de 5 ans est grave et préoccupante et ne s'améliore guère. En effet, entre 1992, 1998 et 2003, le retard de croissance était de 29, 37 puis 39%, l'insuffisance pondérale de 30, 34 et 38%, et enfin l'émaciation de 13, 13 et 19% (INSD et ORC Macro, 2004). Ces chiffres montrent que beaucoup d'efforts, d'actions de sensibilisation et d'information doivent être menés pour améliorer la nutrition et donc l'état nutritionnel des jeunes enfants burkinabè. En ce qui concerne la carence en fer, 92% des enfants de moins de 5 ans et plus de 40 % des femmes enceintes au Burkina ont des taux d'hémoglobine inférieurs à la normale dont 60% sous une forme modérée et 13% sous des formes sévères (INSD et ORC Macro, 2004). Les enfants de 6 à 24 mois sont les plus atteints probablement parce qu'ils ne reçoivent pas une alimentation de complément adéquate. La malnutrition reste également due à certains comportements individuels, familiaux et sociaux qui sont les résultants des conditions socio-économiques. L'éducation reste donc une composante essentielle de toute action en matière de nutrition.

### **2.3. Présentation des principales cultures alimentaires en Afrique subsaharienne et au Burkina Faso : production et importance alimentaire**

Les céréales, les légumineuses et les oléagineuses sont les principales cultures alimentaires à travers le monde, notamment dans les pays en développement (PED) d'Afrique subsaharienne

dont le Burkina Faso. Cependant les céréales représentent plus de 60% du total de la production alimentaire mondiale. Dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, les céréales sont particulièrement les plus importantes sur le plan de la production et de l'alimentation.

### **2.3.1. La production céréalière**

D'après les estimations de la FAO, la production céréalière mondiale en 2007 se chiffrait en moyenne à 2,3 milliards de tonnes (FAOSTAT, 2009). La répartition entre les différentes céréales cultivées place le maïs au premier rang avec une production mondiale de 791 millions de tonnes, suivi par le riz paddy (659 millions de tonnes), le blé (605 millions de tonnes), l'orge (133 millions de tonnes), le sorgho (63 millions de tonnes) et le mil (33 millions de tonnes).

En Afrique, le sorgho et le mil ont un caractère ancestral et représentent près de la moitié du total de la production céréalière du continent.

Au Burkina Faso, les cultures céréalières occupent environ 85% des surfaces totales cultivées avec une production totale estimée à 3,7 millions de tonnes en 2007 (FAOSTAT, 2009). Sur le plan quantitatif, les céréales les plus importantes sont le sorgho (rouge et blanc), suivi du mil et du maïs qui représentent respectivement 43,3%, 29,5% et 23,5% de la production totale. A ceux-ci s'ajoutent le riz (3,3%) et le fonio (2,8%) qui sont produits dans certaines régions du pays et qui représentent des spéculations également importantes. On observe depuis une vingtaine d'année, une augmentation régulière et importante de la production de maïs, mais le sorgho et le mil, céréales anciennement cultivées restent prépondérantes en termes de quantités produites, probablement en raison de leur plus grande adaptation au milieu. La production céréalière au Burkina Faso connaît un accroissement depuis quelques décennies, due à l'extension des surfaces cultivées mais aussi à une hausse des rendements avec l'introduction de nouvelles variétés (Tableau 4). En revanche, elle reste néanmoins fortement tributaire des aléas climatiques.

**Tableau 4: Evolution de la production des principales cultures alimentaires au Burkina Faso (tonnes)**

| Céréales cultivées | 2003             | 2004             | 2005             | 2006             | 2007             |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Sorgho             | 1 610 255        | 1 399 302        | 1 552 911        | 1 515 770        | 1 619 590        |
| Mil                | 1 184 283        | 937 630          | 1 196 253        | 1 175 040        | 1 104 010        |
| Maïs               | 665 508          | 481 474          | 799 052          | 866 664          | 879 030          |
| Riz paddy          | 95 494           | 74 501           | 93 516           | 113 700          | 123 000          |
| Fonio              | 8 741            | 9 066            | 7 801            | 9 500            | 10 600           |
| <b>Total</b>       | <b>3 564 281</b> | <b>2 901 973</b> | <b>3 649 533</b> | <b>3 680 674</b> | <b>3 736 230</b> |

Source : (FAOSTAT, 2009)

### 2.3.2. Importance alimentaire des céréales en Afrique subsaharienne

Les céréales occupent une part prépondérante dans la consommation alimentaire des populations d'Afrique subsaharienne. En effet, 68 à 98% des céréales produites sont utilisées dans l'alimentation humaine. Elles sont ainsi l'une des sources majeures en énergie, protéines et même en minéraux dont le fer et le zinc pour ces populations. Elles peuvent en effet représenter 80 à 90% de la consommation énergétique totale des populations.

### 2.3.3. Le mil : importance alimentaire, transformation et composition nutritionnelle

#### 2.3.3.1. Description du mil

Le terme mil regroupe un ensemble de graminées alimentaires annuelles, appartenant à plusieurs genres et espèces et qui ont pour caractéristique commune le nombre élevé et la petitesse de leurs grains. Parmi les espèces les plus importantes, on peut citer: *Pennisetum glaucum*, *Panicum milaceum*, *Setaria italica*, *Eleusine coracana*, *Paspalum scrobiculatum*, *Digitaria exilis*, *Digitaria iburua* et *Echinochloa crusgalli* (Tableau 5). Le mil et le sorgho, contrairement à la plupart des céréales, sont cultivés dans des régions sèches sur des terres marginales (sols secs et infertiles) des zones tempérées, subtropicales et tropicales dont la pluviométrie généralement très faible varie entre 300 et 500 mm/an. En règle générale, les mils sont plus résistants à la sécheresse que les sorghos.

Le mil pénicillaire (*Pennisetum glaucum*, *P. typhoides*, *P. typhideum*, *P. americanum* ou *P. spicatum*) également connu sous plusieurs noms vernaculaires tels que mil chandelle, ou encore mil perlé est quantitativement le plus important de toutes les espèces cultivées (environ 76% du total de la production) en raison de son fort potentiel de rendement (Belton et Taylor, 2004). C'est l'espèce principalement cultivée en Afrique et en Asie, notamment en Afrique occidentale tropicale où on note la plus grande diversité des variétés cultivées.

**Tableau 5: Origines, noms scientifiques et communs des principaux types de mils**

| Noms scientifiques                                                                                | Noms courants                                                                                                                                     | Localisation                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>Pennisetum glaucum</i> ,<br><i>P. americanum</i> ,<br><i>P. typhoides</i> , <i>P. spicatum</i> | mil chandelle, mil pénicillaire, mil perlé, bajra,<br>mil à épis, sétiaire, scirpe ou en anglais : pearl<br>millet, bulrush millet, candle millet | Afrique, Inde                                                   |
| <i>Panicum milaceum</i> ,<br><i>P. sumatrense</i> ,<br><i>P. psilopodium</i>                      | mil proso, samai, panivarigu, millet commun, mil,<br>sama                                                                                         | Chine, Russie<br>Fédérale, Etats Unis,<br>Inde, Népal, Birmanie |
| <i>Eleusine coracana</i>                                                                          | Mil finger, ragi, mil des oiseaux, mil africain,<br>tamba, petits mils, koracan, ragi, wimbi, bulo,<br>telebun                                    | Afrique, Inde, Chine                                            |
| <i>Setaria italica</i>                                                                            | Mil foxtail, pavane, millet d'Italie, millet<br>d'Allemagne, millet de Hongrie, millet de Sibérie                                                 | Chine, Europe,<br>Proche-Orient                                 |
| <i>Digitaria exilis</i> ,<br><i>D. iburua</i>                                                     | Fonio, acha, pene, fundi, iburu, riz du pauvre                                                                                                    | Afrique de l'Ouest et<br>du Nord                                |
| <i>Eragrostis tef</i> ,<br><i>E. abyssinica</i>                                                   | Teff                                                                                                                                              | Afrique de l'Est,<br>Ethiopie                                   |
| <i>Paspalum scrobiculatum</i> ,<br><i>P. commersoni</i>                                           | Kodo, varagu, millet indigène                                                                                                                     | Asie du Sud                                                     |
| <i>Echinochloa crusgalli</i> ,<br><i>E. utilis</i> , <i>E. frumentacea</i> ,<br><i>E. colona</i>  | Moaha du japon                                                                                                                                    | Asie                                                            |

Source: McDonough, C.M., Rooney, L.W. (2000)

### 2.3.3.2 Importance alimentaire du mil au Burkina Faso

Le Burkina Faso occupe le troisième rang des pays producteurs de mil en Afrique, après le Nigeria et le Niger. Aussi, le mil représente la deuxième culture importante dans l'alimentation après le sorgho, et pour le maintien de la sécurité alimentaire au Burkina Faso (Burton et al., 1972). Ces deux cultures ancestrales, mil et sorgho, constituent la base de l'alimentation de la population burkinabè et demeurent ainsi une des sources majeures d'énergie, de protéines, de minéraux, de vitamines et d'acides aminés essentiels. Elles représentent à elles deux environ 73,9% de la consommation alimentaire des populations burkinabè (FAOSTAT, 2003). Elles sont généralement utilisées de façon interchangeable avec le maïs dans les systèmes de production des aliments.

Le niveau de la consommation céréalière varie à l'intérieur du pays. Entre 1989-1990, il était estimé à environ de 200 kg/an et par habitant en milieu rural et apparaît nettement plus faible en milieu urbain, se situant autour de 151 kg/an et par habitant (INSD, 1991; Cheyns, 1996). La part de consommation du mil était estimée entre 1993-1994 respectivement à 69 et 21 kg/an et par habitant pour les milieux rural et urbain contre 121 et 17 kg/an et par habitant pour le sorgho (INSD, 1991).

Le mil est cependant la céréale la plus importante dans les modèles de consommation qui caractérisent le Burkina Faso. Il joue un rôle social et culturel important et participe à la diversification de l'alimentation. En effet, comparativement aux autres céréales, les utilisations alimentaires du mil sont nombreuses et très variées en raison de ses caractéristiques organoleptiques très appréciées et du fait qu'il conserve un prestige certain. Les aliments à base de mil sont principalement des produits traditionnels obtenus parfois de la préparation de grains entiers ou concassés, mais le plus souvent de farine ou de semoule, issus du décortilage et de la mouture des grains. Pour la préparation des produits dérivés du mil, plusieurs traitements utilisés singulièrement ou en combinaison sont utilisés dans les schémas de production parmi lesquels: le trempage, le lavage, le décortilage, la mouture, la cuisson à la vapeur, la torréfaction, la germination, la fermentation et la cuisson à l'eau.

Une classification détaillée des aliments traditionnels préparés à partir du mil a été établie par plusieurs auteurs (Vogel et Graham, 1979; Rooney et al., 1986; Rooney et McDonough, 1987). Ces derniers distinguent neuf catégories d'aliments, comprenant les bouillies légères (*ben-saalga*, *ben-kinda*), les pâtes ou bouillies épaisses (*tô*), les produits cuits à la vapeur (couscous, *fourra* etc.), les galettes fermentées (*massa*) ou non, les produits cuits à l'eau bouillante et similaires au riz, les boissons alcoolisées ou non alcoolisées (*zoom-koom*), et les snacks, lesquels sont désignés par des noms spécifiques (Tableau 6).

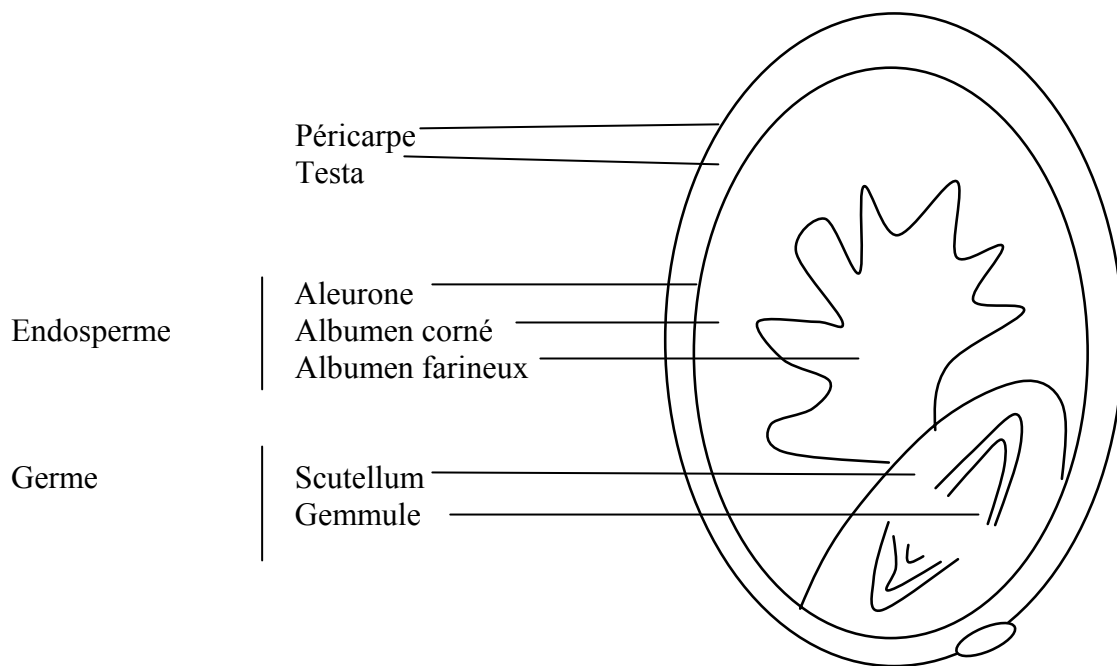
Au Burkina Faso, le mil est essentiellement consommé sous forme de *tô*, un plat de base consommé avec une sauce. Cependant, le mil reste la céréale de prédilection pour la préparation des bouillies, fermentées ou non, à cause de ses caractéristiques organoleptiques très appréciées des consommateurs et des qualités nutritionnelles qu'on lui reconnaît comparées aux autres céréales (Klopfenstein et Hoseney, 1995). Le mil offre également des opportunités de nouvelles utilisations culinaires, par exemple par les possibilités de transformer la farine en granules ou de l'incorporer dans des produits amylacés de type biscuit, farines infantiles simples ou enrichies avec des légumineuses ou oléagineuses, boissons etc. Ces transformations sont déjà explorées par des petites unités au Burkina Faso.

**Tableau 6: Les principaux aliments traditionnels à base de mil consommés au Burkina Faso**

| Catégorie d'aliment                      | Noms communs                       | Principales opérations                                                                                                                                                                                    | Ingrédients                                   | Nature du produit | Utilisation                                                                                                |
|------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Farine/semoule sèche non fermentée       | <i>Zoom</i>                        | Mouture des graines entières de mil ou décortiquées                                                                                                                                                       | -                                             | solide            | Préparation des aliments de base et des boissons                                                           |
| Bouillie                                 | <i>Ben-kida</i>                    | Granules de farine de mil hydraté fermentée cuite à l'eau                                                                                                                                                 | Tamarin ou citron, sucre, gingembre           | semi-liquide      | Petit déjeuner et aliment complémentaire                                                                   |
|                                          | <i>Ben-saalgou ou koko</i>         | Pâte fermentée de mil obtenue par trempage, mouture et tamisage ensuite cuite dans de l'eau                                                                                                               | Epices (gingembre, poivre etc.), sucre        | liquide           | Petit déjeuner et aliment complémentaire                                                                   |
|                                          | <i>bouillie simple ou enrichie</i> | Farine de mil ou en mélange avec des légumineuses cuite à l'eau                                                                                                                                           | Sucre,                                        | liquide           | Aliment complémentaire                                                                                     |
| Produits cuits à l'eau                   | <i>Tô</i>                          | Préparation d'une bouillie légère en versant un lait de farine dans de l'eau bouillante et addition par dispersion d'une farine de granulométrie variable et malaxage/Pétrissage avec une spatule en bois | Citron ou potasse                             | solide            | Aliment de base, consommé avec une sauce                                                                   |
|                                          | <i>fourra</i>                      | Farine de mil hydraté cuite à l'eau ensuite pilée au mortier en y ajoutant des épices et mise sous forme de boules puis fermentée naturellement avant consommation                                        | Epices (gingembre, poivre etc.)               | solide            | Consommé délayé dans de l'eau ou avec du lait ou du yaourt additionné de sucre                             |
| Produits non fermentés cuits à la vapeur | <i>couscous</i>                    | Farine de mil hydraté, tamisée et cuite à la vapeur                                                                                                                                                       |                                               | solide            | Aliment                                                                                                    |
|                                          | <i>bassi</i>                       | Farine de mil hydraté, tamisée, cuite à la vapeur ensuite séchée et pilée                                                                                                                                 | pâte d'arachide, sel                          | solide            | Aliment                                                                                                    |
|                                          | <i>gonré</i>                       | Semoule de mil hydraté mise sous forme de boule et cuite à la vapeur                                                                                                                                      | graine d'arachide ou graine de coton, potasse | solide            | Aliment                                                                                                    |
|                                          | <i>gnon</i>                        | Semoule de mil mélangée aux feuilles de haricot pilées avec divers ingrédients et ensuite cuite à la vapeur                                                                                               | graine d'arachide ou graine de coton, potasse |                   |                                                                                                            |
| Produits cuits à l'huile                 | <i>Galette, beignets, massa</i>    | Farine de mil hydraté et fermenté frite dans de l'huile sur une plaque en métal ou en terre cuite après façonnage                                                                                         | sucre                                         | solide            | Amuse gueule, consommé soit avec la bouillie ou avec une soupe ou simplement délayé et additionné de sucre |
| Boissons                                 | <i>Dolo</i>                        | Maltage du mil, concassage brassage et fermentation                                                                                                                                                       | levures                                       | liquide           | Généralement réservé à des rites                                                                           |
|                                          | <i>Zoom-koom</i>                   | Boisson sucrée à base d'une pâte de mil fermenté et aromatisée                                                                                                                                            | épices, sucre, tamarin                        | liquide           | Boisson sucrée                                                                                             |
|                                          | <i>thiobal</i>                     | Farine de mil hydratée et mise en boule, cuite à la vapeur, fermentée pendant une nuit et mélangée à du lait caillé ou tamarin et ensuite dilué                                                           | lait caillé ou tamarin, sucre, sel            | liquide           | Boisson                                                                                                    |
|                                          | <i>gabai</i>                       | Farine de mil décortiqué obtenue par pillage, hydratée, pilée additionnée d'ingrédients (sel et ou sucre) et de lait caillé ou tamarin puis dilué                                                         | sel et ou sucre, lait caillé ou tamarin       | semi-liquide      | Consommé par les enfants et les adultes                                                                    |
| Produits                                 | <i>Mougoudougou</i>                | Farine de mil grillé mélangée avec de la pâte d'arachide, du sucre, du sel et des épices et mise sous forme de petites boules                                                                             | sel, sucre, pâte d'arachide, épices           | solide            | Amuse gueule                                                                                               |
|                                          | <i>Toukna</i>                      | Son de mil malaxé après ajout de potasse, puis additionné de sucre, sel et eau                                                                                                                            | potasse, sucre, sel                           |                   | Consommé par les enfants et les adultes                                                                    |

### 2.3.3.3. Structure et caractéristiques physiques des grains de mil

Le grain de mil est un caryopse tout comme celui du sorgho, se caractérisant par une diversité considérable de formes (globulaire, hexagonale, ovoïde et elliptique), de couleurs (presque blanc, jaune pâle, brun, gris, vert, bleu étoilé ou pourpre) souvent non uniformes. Comme tous les caryopses, les principaux éléments anatomiques sont le péricarpe, le germe ou embryon et l'albumen ou endosperme (Figure 2), mais avec cependant des différences importantes notamment au niveau de la taille du grain généralement comprise entre 3 et 15 g/1000 grains (Taylor, 2004) contre 5-80 g/1000 grains pour le sorgho (Fliedel et al., 1996).



**Figure 2: Coupe longitudinale d'un grain de mil**

Les proportions relatives de ces différents composés varient suivant les variétés, les conditions environnementales de culture et les pratiques agronomiques. Les travaux d'Abdelrahman et al. (1982, 1984) ont permis de déterminer la composition de chacune des fractions du grain de mil chandelle (Tableau 7). Le péricarpe est constitué de l'extérieur vers l'intérieur de trois tissus (épicarpe, mésocarpe et endocarpe) et représente environ 7,2 à 10,6% du poids sec du grain. Il renferme des protéines (9,4%), des lipides (5,9%) et des cendres (13,9%). Sous le péricarpe se trouve une testa mince qui contribue peu à la couleur du grain (Rachie and Majmudar, 1980). L'albumen représente 73,9 à 76,2% du poids sec du grain et est subdivisé en albumen périphérique, farineux et corné. Il contient principalement les granules d'amidon, des protéines (59,5%), peu de lipides (6,2%) et de minéraux (13,9%). La couleur du grain de mil est due aux effets combinés de la pigmentation dans le péricarpe, l'aleurone et l'endosperme. Le germe du mil chandelle est plus important que ceux de la

plupart des autres céréales et comprend principalement l'embryon et le scutellum. En outre, il représente 15,5 à 17,4% du poids du grain et renferme environ au niveau du scutellum, 87,8% de lipides, 32,2% de protéines et 72,2% de minéraux.

**Tableau 7: Répartition des macronutriments dans le grain de mil**

| Composés                          | Grain total | Endosperme (%) | Germe (%) | Péricarpe (%) |
|-----------------------------------|-------------|----------------|-----------|---------------|
| Grain total                       | 100         | 75,1           | 16,5      | 8,4           |
| Pourcentage d'amidon              |             | 73,9-76,2      | 15,5-17,4 | 7,2-10,6      |
| Protéines                         | 13,3        | 10,9           | 24,5      | 17,1          |
| Pourcentage des protéines totales | 100         | 59,5           | 31,2      | 9,4           |
| Lipides                           | 6,3         | 0,5            | 32,2      | 5             |
| Pourcentage des lipides totaux    | 100         | 6,2            | 87,8      | 5,9           |
| Cendres                           | 1,7         | 0,3            | 7,2       | 3,2           |
| Pourcentage de cendres totales    | 100         | 13,9           | 72,2      | 13,9          |

Adapté d'après Abdelrahman et al. (1984)

#### 2.3.3.4 Composition biochimique et valeur nutritionnelle des grains de mil

Comparativement aux autres céréales, peu de travaux ont été réalisés sur la composition chimique des grains de mil. Le grain de mil, à l'instar des autres céréales est un organe de réserve, constitué principalement de glucides, notamment l'amidon ce qui explique son utilisation comme source d'énergie dans l'alimentation humaine et animale. Entre les espèces et les variétés, la composition varie significativement en raison de facteurs génétiques et environnementaux et des pratiques agronomiques.

##### - L'amidon et les autres glucides

L'amidon est le principal constituant de tous les grains de céréales et la principale forme de stockage des glucides. Chez les mils chandelles, les teneurs en amidon varient de 63,1 à 78,5% MS (Taylor, 2004) et représentent environ 56 à 65% du grain (Tableau 8).

L'amidon est principalement localisé dans l'albumen sous forme de granules insolubles constituées d'un mélange de deux polymères, l'amylose et l'amylopectine, dans des proportions variables. Dans le grain de mil, l'amylose représente entre 17 et 21,5% de l'amidon (Taylor, 2004).

**Tableau 8: Composition globale des grains de céréales en % MS**

| Produits                                                       | Teneur en eau | Amidon    | Protéines | Lipides | Fibres totales | Cendres |
|----------------------------------------------------------------|---------------|-----------|-----------|---------|----------------|---------|
| Maïs ( <i>Zea mays</i> )                                       | 12-14         | 65-68     | 8-10      | 3,5     | 7-9            | 1-1,5   |
| Riz ( <i>Oryza sativa</i> ) complet <sup>a</sup>               | 12            | 72-80     | 7         | 1,0     | 1-2            | 0,7     |
| Blé ( <i>Triticum</i> ) <sup>a</sup>                           | 12            | 68-72     | 9-12      | 2,0     | 12             | 1,5-2   |
| Orge <sup>a</sup>                                              | 12            | 62-65     | 8,5-10,5  | 1,0     | 10             | 1,0     |
| Sorgho ( <i>Sorghum spp</i> ) <sup>b</sup>                     | -             | 65,3-81,0 | 8,1-16,8  | 1,4-6,2 | 0,4-7,3        | 1,2-7,1 |
| Mil ( <i>pennisetum glaucum</i> ) <sup>c</sup>                 | -             | 63,1-78,5 | 8,6-19,4  | 1,5-6,8 | 8-9,0          | 1,6-3,6 |
| Mil ( <i>pennisetum glaucum</i> ) du Burkina Faso <sup>d</sup> | -             | -         | 8,3-11,7  | 4,7-5,7 | 1,9-3,6        | 1,3-5,9 |

Source (a): USDA Handbook No.8; supplier specifications

(b): Rooney et Serna-Salvador, 2000

(c): Taylor, 2004

(d): Mouquet-Rivier et al., 2008

Les teneurs en amidon du grain de mil sont généralement plus faibles que celles des autres céréales. Cela est dû au fait que son germe est plus important et l'albumen plus petit. Outre l'amidon, le mil renferme d'autres glucides tels que des sucres solubles et des fibres. Selon les travaux de Subramanian et Suryaprakash (1981), les sucres solubles dans le grain de mil varient de 1,4 à 2,8% et sont composés principalement de sucres réducteurs libres et de sucres non réducteurs. Le saccharose et le raffinose sont les sucres prédominants qui varient respectivement de 1,32 à 1,82% (66% des sucres totaux) et de 0,65 à 0,84%. Les autres sucres présents en quantité considérable sont le stachyose qui varie de 0,06 à 0,1%, le glucose et le fructose qui représentent respectivement 0,08 et 0,16% (Subramanian and Suryaprakash, 1981). Quant aux teneurs en fibres du grain de mil ou glucides pariétaux constitués essentiellement de cellulose, d'hémicellulose, de lignine, de pectines et de gommes, elles sont présentes dans le péricarpe et les grains cellulaires de l'albumen et varient de 8 à 9% MS (Taylor, 2004).

Durant les traitements hydrothermiques, les granules d'amidon perdent leur structure cristalline, s'hydratent et gonflent augmentant drastiquement la viscosité du milieu qui peut être réduite par rupture des liaisons sous l'action des enzymes amylolytiques.

#### - Les protéines et acides aminés

Taylor (2004) a rapporté que les grains des mils chandelles ont des teneurs en protéines qui varient généralement entre 8,6 et 19,4% MS. La prolamine (21,3-38%) et la glutéline (23,8-37,7%) sont les constituants majeurs des protéines du mil ainsi que de petites quantités d'albumine (6,1-26,5%) et de globulines (3,5-14,7%) qui sont des protéines solubles (FAO, 1995).

Les acides aminés essentiels à l'alimentation humaine comme la lysine, la thréonine, la méthionine et le tryptophane sont plus abondants dans les mils chandelles que dans ceux du sorgho et des autres mils. En effet, les teneurs en lysine des mils chandelles varient de 2,8 à

3,2 g pour 16 g d'azote. Cependant ces teneurs en lysine restent inférieures aux valeurs souhaitées dans les aliments pour les enfants.

Comparativement aux protéines animales, les protéines du mil et des autres céréales sont qualitativement peu intéressantes car limitées en acides aminés essentiels tels que la thréonine, la lysine et le tryptophane (Horn et Schwartz, 1961). Cela explique que leur valeur biologique soit inférieure à celles des protéines animales. Elles contiennent en revanche suffisamment d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine). Globalement, le profil en acides aminés des mil chandelles est meilleur que celui du sorgho et du maïs et comparable à celui du blé, de l'orge et du riz (Ejeta et al., 1987). Le tableau 9 donne la composition en acides aminés essentiels du grain des mils chandelles.

**Tableau 9: Composition en acides aminés du mil chandelle**

| Acides aminés essentiels | (g par 16 g N) |
|--------------------------|----------------|
| Isoleucine               | 3,9-4,6 (4,6)  |
| Leucine                  | 9,5-12,4 (9,3) |
| Lysine                   | 2,8-3,2 (6,6)  |
| Phénylalanine + tyrosine | 7,1-9,3 (7,2)  |
| Thréonine                | 3,3-4,1 (4,3)  |
| Tryptophane              | 1,4-1,5 (1,7)  |
| Valine                   | 4,9-6,0 (5,5)  |
| Cystéine + méthionine    | 3,4-4,4 (4,2)  |

Source : Taylor et al. (2004)

#### - Les lipides

Les lipides du mil sont à 87,8% contenus dans le germe et essentiellement constitués de lipides libres, de phospholipides et de glycolipides. Les teneurs en lipides des mil chandelles varient de 1,5 à 6,8% MS (Taylor, 2004) et sont généralement plus élevées que celles des autres céréales, à l'exception de celles du maïs. Le blé en contient de 1 à 2 % MS et le maïs environ 5 % MS. Les triglycérides sont les composés majeurs des lipides libres et en représentent 83,5 à 86,9%. Les teneurs en lipides du mil et des céréales en général sont relativement peu élevées comparativement à la plupart des légumineuses ou des oléagineuses, exceptés le niébé et le pois chiche. Cependant, elles sont extrêmement intéressantes par la forte proportion des acides gras insaturés (AGI). Comme toutes les autres céréales, les acides gras des mils chandelles les plus importants quantitativement sont l'acide linoléique (C18:2), l'acide oléique (C18:1) et l'acide palmitique (C16 :0), lesquels représentent respectivement 43-45%, 26-27% et 20-21% du total (Adeyeye et Ajewole, 1992; Taylor et al., 2004). En raison de ces teneurs en lipides élevées, le grain de mil chandelle après décorticage et ou mouture développe très rapidement de mauvaises odeurs.

#### - Les minéraux et les vitamines

Les grains de mil comme d'autres grains de céréales sont une importante source de minéraux et de vitamines B (exceptée la B12) ainsi que de vitamine E (Tableau 10) principalement trouvés dans le germe et en plus faible quantité dans le péricarpe et la couche à aleurone.

Ainsi, leurs teneurs peuvent être négativement affectées par le décortiquage et le broyage. Les teneurs en sels minéraux du mil sont fortement influencées par les facteurs environnementaux, principalement la composition du sol et sa nature. Les plus abondants éléments minéraux sont le potassium, le phosphore et le magnésium. Cependant, la biodisponibilité des minéraux divalents tels que le calcium, le fer, le zinc, le magnésium etc. est négativement influencée par la présence de certains composés chélatants comme les phytates, les fibres et certains polyphénols. Dans le grain de mil, la niacine se trouve liée aux glucides et selon certains auteurs, pour être complètement disponible, les farines devraient être traitées à la chaux (Taylor, 2004).

**Tableau 10: Teneurs en différents minéraux et vitamines du mil chandelle**

| Minéraux (mg/100g) |      | Vitamines (mg/100g) |     |
|--------------------|------|---------------------|-----|
| Ca                 | 41   | Vitamine A (µg ER)  | 24  |
| Cl                 | 47   | Thiamine            | 0,3 |
| Cu                 | 0,5  | Riboflavine         | 0,2 |
| Fe                 | 10,8 | Niacine             | 2,9 |
| Mg                 | 125  | Vitamine E          | 1,9 |
| Mn                 | 0,8  |                     |     |
| P                  | 373  |                     |     |
| K                  | 460  |                     |     |
| Na                 | 17   |                     |     |
| Zn                 | 2,4  |                     |     |

D'après Taylor (2004)

#### - Les enzymes

Les grains de mil contiennent des amylases dont l'activité augmente rapidement avec la germination. Chandrasekhara et Swaminathan (1957) ont montré que l'activité enzymatique des amylases du malt du mil indien (ou éleusine) était deux fois plus élevée que celle des grains non germés. Toutefois, certaines variétés de malt de mil montrent aussi des niveaux d'activité  $\alpha$ -galactosidase élevés qui sont comparables à celles des malts du blé et de l'orge. Le pH optimum rapporté pour les amylases du mil était 4,6-5,0 (McDonough et Rooney, 2000).

#### - Les composés à activité antinutritionnelle

Le grain de mil, à l'instar des autres grains en particulier ceux des légumineuses, contient des composés qui diminuent la valeur nutritionnelle des aliments et de ce fait leur utilisation. Ces composés couramment désignés comme des facteurs antinutritionnels sont très diversifiés et appartiennent à des classes chimiques très différentes avec des manifestations par des effets extrêmement variés. Il s'agit principalement des phytates, des  $\alpha$ -galactosides et de certains polyphénols.

**L'acide phytique et ses sels** : L'acide phytique (myo-inositol hexaphosphate, IP6) ou ses sels encore appelés phytates (Figure 3) sont un constituant abondant des plantes, très ubiquitaires dans les graines de céréales et de légumineuses et dans les noix. Ils renferment environ 60 à 90% du phosphore total des plantes (Lolas et Markakis, 1975; Erdman, 1979) ainsi que de l'inositol. En plus de son rôle primaire de stockage du phosphore et de l'inositol dans les

plantes, il permet par la même occasion le stockage de l'énergie (ATP). Ceux-ci permettent l'initiation de la dormance durant la germination (Reddy et al., 1982).

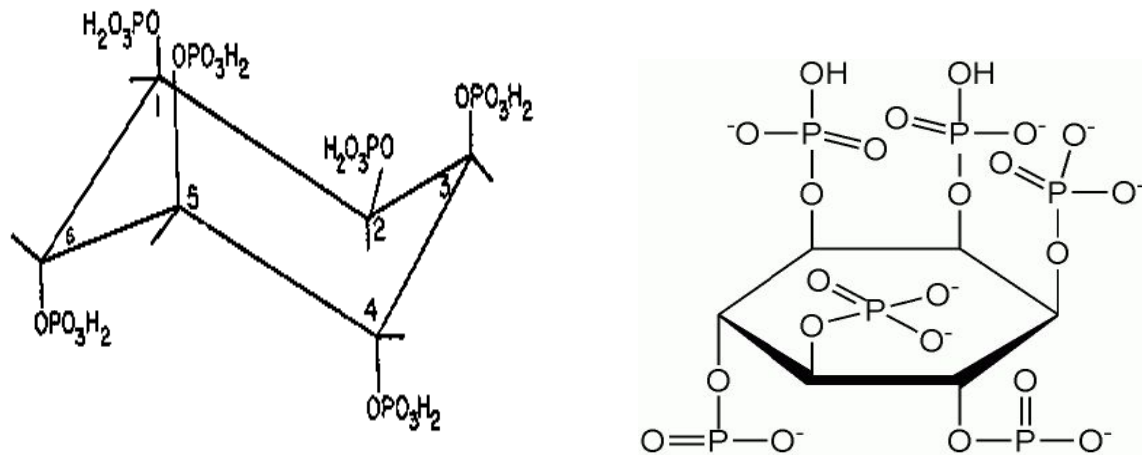


Figure 3: Structure de l'acide phytique, myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5 hexaphosphate

Chez les monocotylédones, les phytates sont localisés dans l'enveloppe au niveau de la couche à aleurone et dans le germe ainsi que dans la partie centrale. En exemple environ 60% des phytates du mil seraient localisés dans le germe (Abdelrahman et al., 1984; Simwemba et al., 1984), 10% dans les enveloppes et 20% dans l'endosperme (Lestienne et al., 2007). Selon Reddy (2002), 80% des phytates du riz sont dans le péricarpe; 88% des phytates du maïs se trouvent dans le germe tandis que 87% des phytates du blé se trouvent dans la couche à aleurone et 13% dans le germe. En revanche dans les graines de légumineuses, les phytates sont uniformément répartis dans les cotylédons où ils sont associés aux corps protéiques.

Les teneurs en phytates rapportés par Reddy et al. (1982) varient de 0,5 à 1,9% dans les céréales brutes et de 0,4 à 2,1% dans les légumineuses. D'autres auteurs rapportent aussi que les teneurs en phytates dans les graines entières de mil et de sorgho varient respectivement de 0,17 à 0,33 g pour 100 g (Sankara et Deosthale, 1983; Chauhan et al., 1986; Taylor, 2004) et de 0,17 à 0,39 g pour 100 g (Doherty et al., 1982). Mouquet-Rivier et al. (2008) rapportent des teneurs plus importantes variant de 0,36 à 0,68 g pour 100 g MS pour les mils du Burkina Faso.

Les phytates présentent à la fois des effets négatifs et positifs au pH physiologique. On leur attribue d'abord des propriétés antinutritionnelles. En effet, l'acide phytique ou ses sels possèdent des groupements phosphates négativement chargés à des valeurs de pH neutre, et ils forment des complexes insolubles avec des minéraux nutritionnellement importants tels que le Fe, Zn, Mg, Ca, Co, Cu etc. réduisant ainsi leur disponibilité biologique pour l'absorption (Reddy et al., 1982). Les phytates forment également des complexes avec les protéines à pH alcalin et acide. Ces interactions peuvent modifier la structure des protéines et décroître les activités enzymatiques des  $\alpha$ -amylases (Knuckles et al., 1987; Desphande et al.,

1982), des lipases (Knuckles, 1988) et des protéinases (Singh et al., 1982) ainsi que la solubilité et la digestibilité des protéines. Par ailleurs, les phytates peuvent aussi interagir avec l'amidon, soit directement par la formation de liaisons hydrogènes 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).

L'effet inhibiteur des phytates sur l'absorption des minéraux est rapportée uniquement pour les IP4, IP5 et les IP6 (Sandberg et al., 1989; Sandtröm et Sandberg, 1992, Sandberg et al., 1999). En effet, selon Lönnerdal et al. (1989), les myo-inositol phosphates avec moins de cinq groupes phosphate (c'est-à-dire les monophosphates IP1 à tétraphosphates IP4) n'affectent pas négativement l'absorption du Zn et ceux avec moins de trois groupes phosphate n'inhibe pas l'absorption du fer non héminique (Sandberg et al., 1999).

Dans le cas particulier des aliments de complément préparés à partir de ces matières premières qui sont administrés aux jeunes enfants dans les PED, l'élimination ou la réduction de ces composés lors des préparations est souhaitable pour lutter contre les malnutritions principalement dues aux déficiences en minéraux. Selon Hurrell (1992), la teneur en phytate doit être réduite à moins de 0,3 mg/g pour que des répercussions significatives soient constatées sur la biodisponibilité des minéraux.

Divers procédés et méthodes de cuisson entraînent une diminution de la teneur en phytates. Les techniques permettant l'élimination ou la réduction des phytates se font principalement par voie biologique faisant intervenir des phytases endogènes (végétales) ou exogènes (microbiennes) comme dans le maltage et les fermentations (Sandberg and Ahderinne, 1986). Une diminution de la teneur en phytates peut aussi être obtenue par voie physique au cours des procédés de fractionnement (décorticage) ou de traitements technologiques (solubilisation par trempage) ou thermique à des températures très élevées comme l'appertisation (Tabekhia et Luh, 1980), car l'acide phytique est résistant à la chaleur. Concernant l'appertisation, plusieurs auteurs pensent que la décroissance des phytates observée est apparente et non réelle. Selon Kratzer (1965), la réduction des niveaux de phytates par appertisation ne peut pas être due à une réduction des composés mais probablement à leur habilité à former des complexes avec les minéraux et protéines ce qui peut les rendre inextractibles.

La fermentation, le décorticage, le broyage, le trempage ou la germination réduisent les teneurs en phytates des céréales (Temple et al., 2002; Hurrell et al., 2002; Lestienne et al., 2005). Sripriya et al. (1997) ont montré que le maltage combiné à la fermentation réduit la teneur de phytate du grain de mil et augmente la biodisponibilité du phosphore jusqu'à 60% en augmentant le niveau de production de phytase. Par ailleurs, certains auteurs ont montré que les phytates sont réduits durant la fermentation du soja (30,7%), de l'arachide (29,1%) et du petit pois (32,6%) (Egounlety et Aworh, 2003; Shallenberger, Hand et Steinkraus, 1967; Sudarmadji et Markakis, 1977).

Cependant, la consommation de phytates ne semble pas avoir seulement des effets négatifs sur la santé. Les phytates sont aussi des antioxydants et à ce titre peuvent présenter des propriétés prophylactiques et de protection contre les maladies cardiovasculaires (coronaire, athérosclérose), les lithiases urinaires (Grases et al., 2000; Jariwalla, 1999; Onomi et al., 2004) et des activités anticancérigènes (Vucenik et Shamsuddin, 2006) justement dues à leur capacité à chélater des minéraux qui sont des cofacteurs essentiels de nombreuses oxydoréductases.

Dans le cas de l'alimentation du jeune enfant dans les PED, qui a du mal à couvrir ses besoins nutritionnels, les effets négatifs sur l'absorption des minéraux sont plus importants que ces effets positifs et il est donc préférable de limiter leurs teneurs dans l'alimentation.

**Les  $\alpha$ -galactooligosides:** Les  $\alpha$ -galactooligosides ( $\alpha$ -GOS) sont de petits oligomères glucidiques composées de saccharose lié par des liaisons  $\alpha$  (1,6) à des résidus de galactose (Figure 4). Les plus importants sont le raffinose, le stachyose et le verbascose, naturellement présents dans les graines de certaines céréales et particulièrement dans celles des légumineuses comme le soja et le haricot. Le raffinose est un triholoside réducteur composé d'une molécule de galactose, de glucose et de fructose et dont l'hydrolyse par une galactosidase donne du saccharose et du galactose. Quant au stachyose, il est constitué de deux unités de D-galactose et d'une molécule de saccharose. Il convient de noter que le mélibiose est un diholoside constitué d'une unité de galactose liée à une unité de glucose par une liaison osidique  $\alpha$  (1-6).

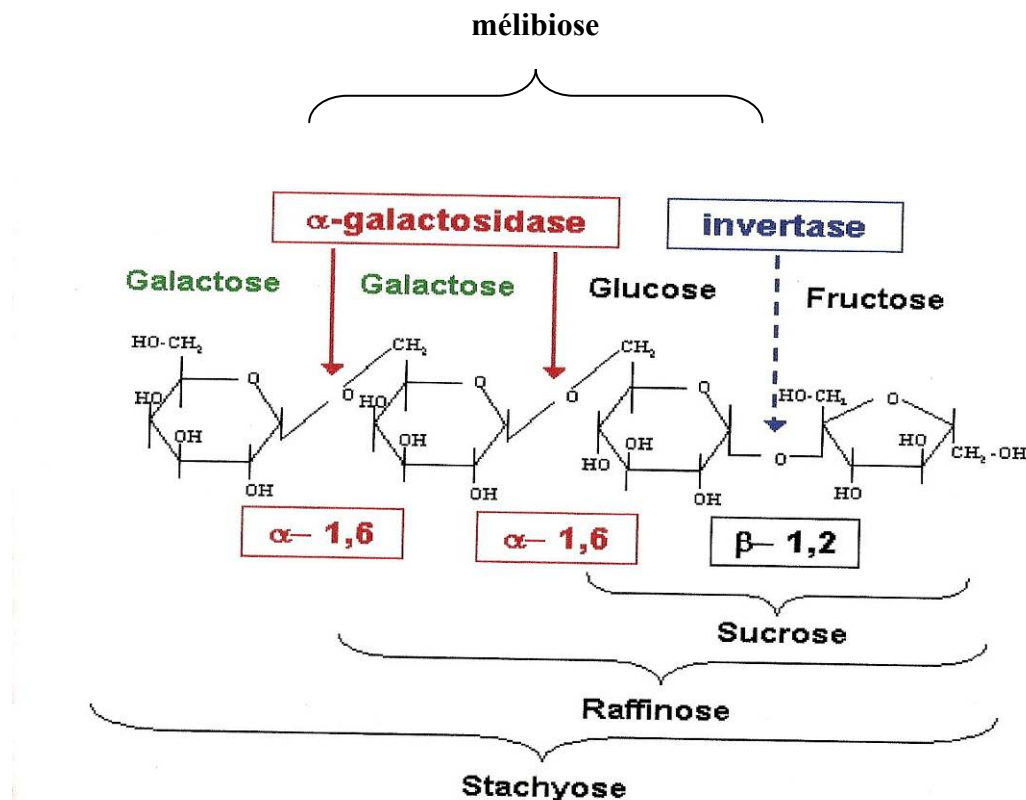


Figure 4: Structure des  $\alpha$ -galactosides

Dans le mil chandelle, les teneurs varient de 0,06 à 0,10% MS pour le stachyose, et de 0,65 à 0,86% MS pour le raffinose (Subramanian et al., 1986). Mouquet-Rivier et al. (2008) rapportent pour les mils du Burkina Faso des teneurs variant de 0,002 à 0,006% MS pour le

mélibiose, de 0,61 à 0,89% MS pour le raffinose et de 0,05 à 0,08% MS pour le stachyose. Dans les autres céréales comme le sorgho, les teneurs en raffinose et en stachyose sont respectivement de 0,23 et 0,10 g /100g (Rooney et Serna-Salvador, 2000). Ces composés sont fermentescibles, partiellement solubles, mais cependant thermostables et ne sont pas dégradés et absorbés au niveau de l'intestin grêle des animaux supérieurs qui ne possèdent pas les enzymes digestives spécifiques que sont les  $\alpha$ -galactosidases (Leske et al., 1993). De ce fait, lorsqu'ils arrivent au niveau du colon, ils servent de source de glucides où ils sont métabolisés par des bactéries produisant ainsi des désordres digestifs tels que des phénomènes de flatulence (production de dioxyde de carbone, de méthane et d'hydrogène), et de diarrhée (Steggerda et al., 1966). Pour ces raisons, leur présence dans les aliments compromet l'acceptabilité et l'utilisation de ces derniers.

**Les polyphénols :** Les polyphénols sont un groupe très diversifié de composés phénoliques plus ou moins polymérisés ou condensés, presque ubiquitaires dans les plantes. Ces derniers ne jouent pas un rôle sur la croissance mais interviennent plutôt comme une substance protectrice du grain. Ce groupe comprend les acides phénoliques, les flavonoïdes et les polyphénols condensés que l'on désigne sous le nom de tannin. Les mils, à l'instar des sorghos, contiennent des acides phénoliques qui sont localisés dans le péricarpe, la testa, la couche d'aleurone et dans l'endosperme (Hahn et al., 1984; McDonough et al., 1986). Ces composés sont des dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique, libres ou liés sous forme d'esters. Les acides phénoliques les plus importants sur le plan quantitatif présents dans les mils sont principalement les acides ferulique, p-coumarique et cinnamique (McDonough and Rooney, 2000; McDonough et al., 1986). Les flavonoïdes identifiés comme abondants dans les mils sont des flavones (Hilu et al., 1978; Reichert, 1979) responsables de la décoloration jaune-vert des farines de mil à pH basique. Tout comme les acides phénoliques, les flavonoïdes ne sont pas préjudiciables à la qualité nutritionnelle du grain.

En revanche, les tannins qui sont des polyphénols condensés, parce qu'ils se lient à la fois aux protéines exogènes et endogènes, aux glucides et aux minéraux, réduisent la digestibilité ou la biodisponibilité de ces nutriments et sont donc considérés comme indésirables dans les aliments destinés aux jeunes enfants. Ces composés se trouvent uniquement chez certaines espèces ou variétés de mil et de sorgho, chez lesquelles on note la présence d'une testa pigmentée. Ainsi, c'est seulement dans certaines variétés de millet indien qu'a été rapportée la présence de tannins à des concentrations qui varient de 0,12 à 3,47% (Ramachandra et al. (1977). La présence de ces composés confèrent des résistances à l'attaque des oiseaux, des insectes, des moisissures et à la détérioration du grain (Waniska et al., 1989).

Les polyphénols et l'acide phytique sont également connus pour inhiber certaines activités enzymatiques tels que l'amylolyse (Thompson et Yoon, 1984; Beta et al., 2000) et la protéolyse (Serraino et al., 1985). Contrairement aux autres polyphénols, les tannins sont difficilement hydrolysables et non absorbables. De plus, les traitements thermiques sont inefficaces sur les tannins. Une réduction des effets négatifs des tannins peut être obtenue avec certains traitements technologiques comme le décorticage, la germination, la fermentation et certain traitement chimique (alcalin).

Cependant, le pouvoir antioxydant des polyphénols et notamment des tannins (Besançon, 1999) dû à leur capacité d'inhibition de la production de peroxydes d'hydrogène et de propagation des radicaux libres leur confère un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires et les cancers.

## **2.4. Les aliments de complément traditionnels fermentés en Afrique subsaharienne et au Burkina Faso**

Les bouillies traditionnelles de matières premières amylacées, utilisées comme aliments de complément pour les nourrissons et les jeunes enfants dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne sont fermentées ou non fermentées. Elles sont élaborées suivant des procédés de fabrication variables selon les pays, les régions, les groupes ethniques et les habitudes alimentaires. Elles peuvent être élaborées à partir de produits bruts comme les grains entiers, ou de produits semi-transformés tels que les grains décortiqués, trempés, germés ou maltés, de farines simples, de farines composées, de pâtes fermentées, ou de farines plus élaborées ayant subi des traitements spécifiques comme la torréfaction et parfois enrichies par des produits locaux riches en lipides ou protéines (légumineuses, oléagineux, poisson, lait, etc.). Excepté pour les grains, quelle que soit la forme du produit de base, dans 90% des cas, il est mis en suspension dans de l'eau froide puis versé dans l'eau bouillante (Trèche et Massamba, 1991; Trèche et al., 1992) pour la cuisson.

### **2.4.1. Les bouillies traditionnelles fermentées et leurs caractéristiques générales**

Une grande variété de bouillies fermentées est produite dans les pays d'Afrique subsaharienne (Blandino et al., 2003) (Tableau 11). Les bouillies fermentées peuvent être classées soit sur la base de la matière première utilisée dans leur préparation, soit en fonction de la texture du produit fermenté (c'est-à-dire produit solide ou produit liquide). Ces bouillies fermentées sont souvent préparées à partir de céréales comme le maïs, le mil ou le sorgho ou de racines (manioc). Différents traitements technologiques sont souvent décrits au cours de leur production comme le trempage, le maltage, la mouture, le tamisage à sec ou à l'eau, la fermentation en milieu liquide ou solide, la cuisson. Cependant, la grande variabilité de ces traitements entraîne des variations importantes au niveau de la qualité nutritionnelle, sanitaire et organoleptique des bouillies fermentées.

#### **2.4.1.1 Qualité nutritionnelle**

La quasi-totalité des bouillies traditionnelles de céréales fermentées à l'instar des bouillies traditionnelles non fermentées ont de très faibles densités en énergie et en nutriments (Svanberg et Sandberg, 1988; Walker et Pavitt, 1989; Tou et al., 2006; Mouquet-Rivier et al., 2008) et leur consommation ne permet pas de couvrir les besoins nutritionnels des jeunes enfants.

De nombreux travaux réalisés sur les bouillies traditionnelles fermentées rapportent des teneurs en matière sèche qui varient en moyenne entre 5 et 10 g/100 g de bouillie et qui correspondent à des densités énergétiques de l'ordre de 20 kcal/100 g (Mosha et Svanberg, 1990; Lorri, 1993; Trèche, 2002; Tou et al., 2006; Mouquet-Rivier et al., 2008). Ces très faibles densités en énergie et en nutriments sont dues au fait que pour avoir une consistance semi-liquide aisément consommable par les jeunes enfants, il est nécessaire de diluer les bouillies pour limiter leur épaississement au cours de la cuisson en raison du gonflement de l'amidon.

En outre, les bouillies traditionnelles fermentées ont souvent une composition nutritionnelle déséquilibrée car très pauvres en lipides et en protéines par comparaison aux valeurs recommandées. A cela s'ajoute la présence de certains facteurs antinutritionnels comme les phytates et les  $\alpha$ -galactosides, respectivement responsables d'une réduction de la biodisponibilité des minéraux essentiels divalents et de phénomènes de flatulence. Bien qu'une réduction des teneurs en phytates, en fibres et  $\alpha$ -galactosides soit souvent observée au cours des fermentations traditionnelles, cette diminution est souvent insuffisante pour avoir un impact positif respectivement sur la biodisponibilité des minéraux divalents et la digestibilité des composés responsables de phénomènes de flatulence. Toutes ces raisons sont les principaux facteurs qui concourent à l'inadéquation des bouillies fermentées traditionnelles à assurer la couverture des besoins nutritionnels des nourrissons et des jeunes enfants.

**Tableau 11: Aliments traditionnels fermentés à base de matières premières amylacées utilisés dans l'alimentation complémentaire du jeune enfant en Afrique subsaharienne**

| Produit                      | Céréales/tubercules       | Microorganismes impliqués                                                                  | Procédés                                           | Régions/Pays                | pH      | Teneur en matières sèches | Auteurs                                           |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|---------|---------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Uji</i>                   | Maïs, sorgho, mil, manioc | Lactobacilli, levures, moisissures                                                         |                                                    | Tanzanie, Uganda, Kenya     | 3,5-4,0 | 4 à 5%                    | Mbugua et Njenga, 1992                            |
| <i>Togwa</i>                 | Sorgho, mil, maïs manioc  | Lactobacilli, levures                                                                      |                                                    | Tanzanie                    | 3,6-4,2 |                           | Mugula et al., 2001                               |
| <i>Kenkey</i>                | Maïs, sorgho              | <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , levures |                                                    | Ghana                       | 3,6-4,2 |                           | Mugula et al., 2001                               |
| <i>Nasha</i>                 | Sorgho, mil               | <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces</i>                           |                                                    | Soudan                      |         |                           |                                                   |
| <i>Mahewu</i>                | Maïs                      | Bactéries lactiques, levures                                                               |                                                    | Afrique du Sud, Zimbabwe    | 3,5     | 8 à 10%                   | Simango et Rukure, 1991; Okagbue, 1995            |
| <i>Ogi</i>                   | Maïs, sorgho, mil         | Lactobacilli, levure, moisissures                                                          |                                                    | Nigeria, Afrique de l'ouest | 3,6     |                           | Akinrele, 1970                                    |
| <i>Bogobe</i>                | Sorgho                    | non connus                                                                                 |                                                    | Botswana                    |         |                           |                                                   |
| <i>Obusera</i>               | Mil                       | non connus                                                                                 |                                                    | Uganda, Rwanda              |         |                           |                                                   |
| <i>Gari</i>                  | Manioc                    | <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> ,                                                |                                                    | Nigeria                     |         |                           |                                                   |
| <i>Pozol</i>                 | Maïs                      | <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> , levures                                        | Nixtamalisation et fermentation lactique naturelle | Mexique                     |         |                           | Diaz-Ruiz et al., 2003<br>Guyot et al., 2003      |
| <i>Bensaalga</i>             | Mil                       | Lactobacilli, levures, moisissures                                                         |                                                    | Burkina Faso                |         | 5 à 10%                   | Tou et al., 2006 ;<br>Mouquet-Rivier et al., 2008 |
| <i>Benkida</i>               | Mil                       |                                                                                            |                                                    | Burkina Faso                |         |                           | Mouquet-Rivier et al., 2008                       |
| <i>Aklui, koko, akuiyonu</i> | Maïs                      |                                                                                            |                                                    | Bénin                       |         |                           | Hounhouigan et al., 1993                          |
| <i>potopoto</i>              | Maïs                      |                                                                                            |                                                    | Congo                       |         |                           | Cerefer, 2003                                     |

#### 2.4.1.2. Qualité sanitaire

Du point de vue de la qualité sanitaire, les aliments traditionnels sont fréquemment contaminés par des germes pathogènes et constituent de ce fait un facteur de risque majeur de transmission des maladies, en particulier les maladies diarrhéiques, qui affectent la croissance des enfants et conduisent dans les cas graves à la mort. Dans les PED, les germes à l'origine des infections les plus couramment rencontrées sont *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae 01* et les rotavirus. Les germes pathogènes existent naturellement dans l'environnement et peuvent donc contaminer les aliments de diverses manières et à différents stades du processus de production. Mais on note cependant que les contaminations restent liées à de mauvaises pratiques d'hygiène lors de la préparation des bouillies et de leur consommation et également à de mauvaises conditions de conservation. Un exemple type souvent rapporté est le stockage trop long des bouillies pendant plusieurs heures après préparation à température ordinaire (Mensah et Tomkins, 2003).

Comparativement aux bouillies traditionnelles simples, les bouillies de céréales fermentées sont souvent de qualité sanitaire plus satisfaisante du fait de la fermentation lactique qui diminue le pH du milieu à des valeurs généralement inférieures à 4,5. Le bas pH du milieu causé par la formation d'acide lactique et acétique entraîne une inhibition de la croissance des bactéries pathogènes telles que *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneria*. Cependant la consommation des bouillies fermentées à l'instar de celle des aliments et des boissons fermentés peuvent présenter des dangers toxicologiques liés à la présence d'amines biogènes. Les amines biogènes sont responsables d'effets toxicologiques, de nausées, d'hypertension et d'hypotension, de palpitation cardiaque etc. (Ten Brink et al., 1990; Busto et al., 1994; Romero et al., 2000). Ces substances toxiques sont formées par décarboxylation des acides aminés libres par des décarboxylases microbiennes. En effet, l'acidification du milieu est susceptible d'entraîner la formation d'amines biogènes lorsque des microorganismes décarboxylases positives sont impliqués dans le processus de fermentation et les matières premières utilisées contiennent des protéines (Shalaby, 1996). A cet effet, Nout (1994) a proposé des niveaux acceptables pour les aliments fermentés de 50-60 mg/kg, 100-800 mg/kg et 30 mg/kg respectivement pour l'histamine, la tyramine et la  $\beta$ -phenyléthylamine et un total de 100-200 mg/kg.

#### 2.4.2. Quelques exemples de bouillies traditionnelles fermentées au Burkina Faso

Au Burkina Faso, les bouillies traditionnelles sont principalement à base de mil, maïs, sorgho. Elles sont consommées par la grande majorité des enfants soit 98,2% (INSD et ORC Macro, 2004). Les bouillies de mil fermenté représentent une part considérable dans la consommation globale des bouillies traditionnelles. D'après une enquête effectuée au Burkina Faso, environ 40% des ménages ouagalais sont des consommateurs réguliers de bouillies de mil fermenté (Cerefer, 2003).

A Ouagadougou, capitale du Burkina Faso, deux types de bouillie de mil fermenté très populaires, connus en langue *mooré* sous les noms de *ben-kinda* et *ben-saalga* sont produits et commercialisés quotidiennement dans des ateliers généralement tenus par des femmes au sein même de la concession familiale (Mouquet-Rivier et al., 2008). Dans les ménages consommateurs, les bouillies sont consommées par environ 75% des enfants de moins de 5

ans et 20% des adultes (Cerefer, 2003). Ces aliments sont fortement autoconsommés en milieu rural et font l'objet d'un commerce actif en milieu urbain.

Ces bouillies légères fermentées sont appréciées en raison des avantages organoleptiques qu'offrent la fermentation, principalement les améliorations de l'appétibilité et de texture ainsi que l'abaissement du pH qui permet d'améliorer leur durée de conservation à température ambiante. Ces avantages sont très importants en Afrique où la majorité de la population n'a pas accès aux méthodes modernes de conservation des aliments, comme la réfrigération.

Au Burkina Faso, le mil est la céréale de loin la plus utilisée dans la préparation du *ben-saalga* et du *ben-kinda* contrairement à d'autres pays d'Afrique subsaharienne où le maïs est fréquemment utilisé. Le *ben-saalga* est une bouillie de consistance fine ou légère avec un goût acide. Le procédé de production du *ben-saalga* a été étudié et décrit par Tou et al. (2006) dans 24 ateliers de production à Ouagadougou. Pour la production du *ben-saalga*, cinq étapes principales sont distinguées: un trempage du mil pendant 16 h en moyenne suivi de lavage ou inversement, au cours duquel il se produit une première fermentation de type alcoolique. Après égouttage des grains, s'ensuit une mouture avec souvent addition d'ingrédients aromatiques divers (gingembre, piment doux, poivre, etc.). La mouture fine obtenue est additionnée d'eau, malaxée et l'ensemble filtré dans une mousseline dont la maille est  $<250\ \mu\text{m}$  afin d'éliminer les drêches (essentiellement les enveloppes). Le décantât obtenu est ensuite fermenté naturellement pendant 11 h en moyenne. Les microorganismes impliqués dans la fermentation sont principalement des bactéries lactiques, des levures et des moisissures (Tou, 2007). Le *ben-saalga* est ensuite obtenu par cuisson du décantât (pâte fermentée) pendant environ 7 min dans le surnageant préalablement chauffé à ébullition durant environ 40 min. Lorsque des granules préparés à partir de farine humide (résultant du broyage des grains trempés) sont ajoutés au surnageant porté à ébullition, on obtient le *ben-kinda*.

**Illustrations de quelques étapes de la production du *ben-saalga***



**Photo 1 : Mouture**



**Photo 4 : Cuisson**



**Photo 2 : Malaxage de la pâte de mil pour filtration**



**Photo 5 : Bouillie prête**



**Photo 3 : Fermentation**



**Photo 6 : Vente de la bouillie**

### 2.4.3. Autres exemples de bouillies traditionnelles fermentées produites en Afrique subsaharienne

#### 2.4.3.1. L'*ogi* ou *akamu* nigérian ou béninois

*Ogi* est une bouillie populaire fermentée, de consistance légère, et contrairement au *ben-saalga* peut être préparé à partir d'une diversité de céréales comme le maïs, le sorgho ou le mil (Akingbala et al., 1981a). *Ogi* est principalement consommé au Nigeria, Bénin, Ghana, Mali et Niger, au petit déjeuner et également comme aliment de complément.

Divers noms vernaculaires lui sont attribués tels que *agidi*, *kamu*, *akamu*, *koko*, et *furah*, en fonction des régions et/ou des pays, des formes de consommation et de la céréale utilisée.

Son procédé de fabrication est similaire à celui du *ben-saalga*. Sa préparation débute par un trempage des grains entiers dans de l'eau à température ordinaire pendant 1 à 2 jours, suivi de lavage ou inversement. Les grains ramollis sont moulus en farine très fine, laquelle est ensuite tamisée à l'eau à travers une fine mousseline pour l'élimination des sons. Similairement au *ben-saalga*, le tamisât qui contient les granules d'amidon subit une fermentation lactique naturelle, mais dans le cas de l'*ogi* la fermentation dure plus longtemps parfois jusqu'à 48 à 72 heures durant lesquelles il devient acide. L'augmentation de l'acidité durant la fermentation a été attribuée à des bactéries lactiques et à des levures (Odunfa et Adeyele., 1985).

Les microorganismes dominants identifiés lors de la production d'*ogi* à partir de maïs sont *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* (Hayford et al., 1999). La pâte fermentée est également appelée *ogi*. Pour la consommation, la pâte fermentée est cuite dans de l'eau, ou parfois dans la même eau de décantation pour donner la bouillie légère *ogi* de consistance crémeuse avec une texture lisse comme le *ben-saalga*. Sa coloration dépend des grains de céréales employés, blanc crème pour le maïs, brun rougeâtre pour le sorgho, et gris sale pour le mil (Banigo, 1993).

Traditionnellement, l'*ogi* est consommé le jour même de sa cuisson. Les propriétés physicochimique, nutritionnelle et sensorielle de l'*ogi* de maïs, sorgho et de mil ont été étudiées par de nombreux auteurs (Banigo et Muller., 1972; Akingbala et al., 1981a,b; Egounlety et Syarief, 1992). Comme l'*ogi* était rapporté être de faibles teneurs en lipides et protéines, l'amélioration de sa valeur nutritionnelle et ou sensorielle était obtenue à travers la complémentation avec du soja (Akinrele et Bassir, 1967; Akinrele et Edwards, 1971; Alnwick et al., 1988; Ekpenyong et al., 1977; Nkama, 1991, Oluwamukomi et al., 2005). De plus, l'amélioration des conditions de fermentation de l'*ogi* était obtenue par l'utilisation de cultures starters sélectionnées (Banigo et al., 1974)

#### 2.4.3.2 Le *mawé* béninois

Le *mawé* est une pâte crue fermentée de maïs, épaisse, de couleur blanche et de saveur acide avec un pH généralement compris entre 3,5 et 4,0 et vendu comme produit intermédiaire pour la préparation d'un pain cuit à la vapeur (*ablo*) ou de bouillies (*koko*, *aklui*, *akluiyonu*) (Hounhouigan, 1994). Pour la préparation du *mawé*, le maïs est d'abord lavé, ensuite concassé au moulin, puis tamisé successivement à sec et à l'eau pour l'élimination des sons. Le tamisât

grossier et la farine sont humectés d'eau, laissés au repos pendant 2 à 4 heures avant d'être finement moulus. Le mélange obtenu est pétri en y additionnant un peu d'eau, puis soumis à une fermentation spontanée pendant 1 à 3 jours (Nago, 1989, Hounhouigan et al., 1993). Contrairement à l'*ogi* et au *ben-saalga*, cette fermentation lactique qui implique des bactéries lactiques et des levures (Hounhouigan et al., 1993) se fait en milieu solide, et constitue un exemple typique de fermentation en Afrique dont la microbiologie a été largement étudiée par Hounhouigan (1994). On obtient ainsi le mawé qui est conservé sous forme d'une boule compacte recouverte d'une feuille de plastique l'isolant de l'extérieur. Le mawé a une teneur en eau de 45 à 49% et en amidon de 65 à 70% bs et en protéines de 8 à 9% (Nago et al., 1993). Le mawé est utilisé pour la préparation d'aklui dès le lendemain de sa préparation et jusqu'au troisième jour de stockage. Pour la préparation de l'aklui, le mawé est émotté et les fines particules obtenues sont agglomérées sous forme de granules fins et homogènes, de granulométrie comprise entre 1 et 2 mm. Les granules sont ensuite jetées en pluie dans l'eau bouillante et la cuisson dure environ 10 min. La bouillie obtenue, aklui est très appréciée des consommateurs urbains, et essentiellement consommée au petit déjeuner, et plus rarement au goûter.

#### 2.4.3.3 Le *potopoto* congolais

Le *potopoto* congolais fait référence à une pâte fermentée à base de maïs à grains blancs ou à une bouillie obtenue par cuisson d'une suspension diluée de la pâte fermentée. Comme le *ben-saalga* et l'*ogi*, la première étape de préparation commence par le lavage suivi du trempage des grains. Les grains trempés sont soumis à une fermentation spontanée avant d'être broyés finement. La farine est ensuite tamisée à l'eau pour l'élimination des sons, puis soumise à une décantation durant laquelle intervient une seconde fermentation lactique. Après fermentation, un égouttage permet d'obtenir la pâte fermentée très épaisse ou *potopoto*. Après dilution et cuisson sous forme de bouillie et incorporation de grandes quantités de sucre, le *potopoto* sous forme de bouillie est utilisé comme aliment de complément au lait maternel pour les jeunes enfants et aussi par les adultes (Cerefer, 2003).

#### 2.4.3.4 Le *mahewu* zimbabwéen

Le *mahewu* ou encore *amahewu* est à la fois une boisson et un aliment pour les adultes et pour les jeunes enfants, chez lesquels il est introduit entre 4 et 18 mois comme aliment complémentaire au lait maternel (Simango, 1997). Il est souvent vendu dans le commerce sous forme de poudre ou de concentré. Traditionnellement, il est préparé soit à partir d'une bouillie de maïs légère soit une bouillie épaisse ou *sadza* (Gomez, 1989, Okagbue, 1995). Sa préparation est différente des autres bouillies. Les bouillies sous forme légère ou épaisse sont mélangées avec l'eau et, à ce mélange, on ajoute du malt de sorgho ou de mil ou une petite quantité de farine de blé (environ 5% du poids de la farine de maïs). Les malts de céréales ou la farine de blé fournissent l'inoculum nécessaire à la fermentation qui se fait à température ambiante pendant environ 24 à 36 h (Simango et Rukure, 1991; Okagbue, 1995). Les microorganismes prédominants dans les fermentations naturelles du *mahewu* sont des souches de *Lactococcus lactis* (Steinkraus, 1996). La teneur en matière sèche du *mahewu* est d'environ 8 à 10% de MS avec un pH autour de 3,5.

#### 2.4.3.5 Le togwa tanzanien

Le *togwa* est une bouillie fermentée ou boisson, préparée à partir de manioc, maïs, sorgho, mil, ou leur combinaison (Mugula et al., 2001). Pour la préparation du *togwa*, la farine est mélangée dans un premier temps à l'eau pour former une suspension à une concentration autour de 10% de MS. Après cuisson de la suspension, la bouillie obtenue est refroidie à température ambiante et 5 à 10% de farine est additionnée. Le mélange obtenu est malaxé et une petite quantité de pâte fermentée y est additionnée. A l'image des autres bouillies à base de céréales fermentées, les bactéries lactiques et les levures sont les microorganismes prédominants de la fermentation du *togwa* (Mugula et al., 2003a).

#### 2.4.3.6 L'uji kenyan

L'*uji* est une bouillie fermentée à base de maïs, mais peut également être préparée à partir d'autres céréales comme le mil, le sorgho ou le manioc. Elle est consommée au petit déjeuner et au déjeuner et largement utilisé comme aliment pour les nourrissons et les jeunes enfants. Contrairement au *ben-saalga* et à l'*ogi*, la première étape de préparation de l'*uji* commence par la mouture des grains en farine qui est mise en suspension dans l'eau avec une concentration en matière sèche d'environ 30% (p/v). La suspension est ensuite fermentée spontanément durant 1 à 3 jours, ce qui permet d'atteindre des concentrations en acide lactique d'environ 0,3% (p/p). Après cette fermentation, la suspension est diluée, puis bouillie et de nouveau diluée jusqu'à contenir 4 à 5% de matière sèche, ce qui donne une bouillie fluide crémeuse (Nout, 1981). La fermentation spontanée de l'*uji* est caractérisée par une croissance séquentielle des microorganismes dominants. Dans la fermentation de l'*uji* à base de maïs et de sorgho, des coliformes étaient observés durant les premières heures de fermentation, lesquels étaient ensuite remplacés par des bactéries lactiques, principalement *Lactobacillus plantarum* avec des souches hétérofermentaires comme *Lb. fermentum* et *Lb. buchneri* (Mbugua et Njenga, 1992). L'utilisation de cultures starters mixtes pour la fermentation de l'*uji* permet une production d'acide rapide avec inhibition des coliformes (Mbugua, 1981).

### 2.4.4 Caractérisation de la diversité bactérienne des aliments fermentés

Les bactéries jouent un rôle important dans les fermentations. L'utilisation des méthodes culturales de microbiologie pour l'estimation de la diversité microbienne dans les aliments fermentés présente de nombreux inconvénients. Il s'agit principalement du temps de mise en œuvre et du recours à des milieux de culture sélectifs qui sont différents des milieux d'origine des microorganismes ce qui entraîne ainsi un biais dû à une sous estimation de la population microbienne. Les méthodes moléculaires développées depuis le début des années 1990 connaissent un grand succès car elles présentent l'avantage d'être indépendantes de la culture. Elles permettent d'évaluer la diversité des écosystèmes microbiens, de détecter et de caractériser les microorganismes non cultivables et aussi d'étudier la relation entre la diversité microbienne et les propriétés fonctionnelles. Ces méthodes moléculaires dites «cultures-indépendantes» reposent sur les propriétés des acides nucléiques. Elles sont très nombreuses et mettent en jeu plusieurs techniques différentes couplées à la méthode Polymerase Chain Reaction (PCR). Dans la majorité des cas, ces techniques moléculaires utilisent le gène de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) comme marqueur parce qu'il est présent chez tous les procaryotes et assez polymorphe pour permettre de distinguer deux espèces. Aussi, il est de taille idéale (1500 paires de base) plus facile à analyser que l'ARN 23S (2900 paires de base)

et plus riche en information que l'ARN 5S (120 nucléotides). Seules quelques unes des techniques moléculaires utilisées pour l'étude de l'écologie microbienne d'aliments fermentés seront évoquées dans le présent travail.

#### **2.4.4.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

L'Amplification en Chaîne par Polymérisation (ACP) ou Polymerase Chain Reaction (PCR) en anglais a été imaginée par Mullis en 1985. C'est une technique de biologie moléculaire de répllication ciblée *in vitro* qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Son principe repose sur une succession de répllications d'une matrice d'ADN double brin. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3 prime pointent l'une vers l'autre. Chaque réaction comprend trois phases différentes: une dénaturation, une hybridation et une élongation (extension des amorces). Les amorces définissent alors, en la bornant, les séquences à amplifier. L'amplification obtenue est exponentielle.

#### **2.4.4.2. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis et autres techniques apparentées (TTGE, TGGE et DGGE)**

Les techniques TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ont été introduites il y'a environ une décennie en microbiologie environnementale et sont maintenant utilisées dans plusieurs laboratoires comme méthode moléculaire pour l'étude de la composition de la population et de la diversité de la communauté microbienne entre autre dans les aliments. Elles sont fondées sur le caractère à la fois ubiquitaire et hypervariable de séquences d'ADN spécifiques codant pour l'ARNr 16S des procaryotes au niveau de la région hypervariable V3 qui représente 1% des ADN totaux des bactéries.

Ces techniques consistent essentiellement à l'amplification de la région V3 des gènes codant pour l'ARNr 16S à partir d'une matrice contenant différentes populations microbiennes, suivie par la séparation des fragments d'ADN. Cette séparation est basée sur la réduction de la mobilité électrophorétique des fragments d'ADN amplifiés double brin dans un gel d'acrylamide contenant un gradient dénaturant chimique (formamide, urée) dans le cas de la DGGE (Muyzer et al., 1993) ou un gradient linéaire de température dans les cas de la TTGE et TGGE (Muyzer et Smalla, 1998). Par ces techniques, des mélanges de fragments d'ADNr 16S de tailles identiques, mais de séquences différentes par leur composition en nucléotides pour différentes espèces bactériennes peuvent être séparés. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la technique TTGE. Au cours de l'électrophorèse, les fragments d'ADN initialement double brin, sont partiellement dénaturés pour former une structure partiellement monocaténaire, dite branchée ou ramifiée dont la mobilité est quasi nulle. Des différences de séquence dans le domaine de fusion ( $T_m$ ) le moins stable entraînent des différences de stabilité, donc de niveau de migration. Ceci permet alors de séparer des fragments d'ADN de même longueur (taille) mais variant par leur séquence en base.

#### **2.4.4.3. Autres techniques**

Le tableau 12 présente quelques techniques moléculaires d'étude de la diversité génétique des bactéries lactiques dans les aliments fermentés.

La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste à incuber les produits d'amplification des fragments d'ADNr clonés avec des enzymes de restriction, lesquelles sont séparées par électrophorèse. La diversité des profils reflète grossièrement la diversité de la communauté microbienne étudiée. Cette méthode est assez fastidieuse si on considère un nombre important de clones. Elle est actuellement supplantée par les techniques de séquençage à haut débit.

La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ou polymorphisme de conformation des simples brins, est basée sur les différences de comportement électrophorétique (migration) d'un fragment d'ADN simple brin dans un gel de polyacrylamide non dénaturant de leurs différentes conformations.

La RADP (Random Amplification of Polymorphic DNA) ou amplification aléatoire d'ADN polymorphe par PCR. Cette technique est basée sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique en utilisant des amorces courtes de séquence définies arbitrairement. Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse. L'intérêt de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissance préalable de l'ADN cible, les amorces utilisées s'hybrident de façon aléatoire. En revanche, une des limites de cette technique est qu'elle doit utiliser des fragments d'ADN génomique intacts.

La T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux. Cette technique utilise des amorces marquées à l'aide de deux marqueurs fluorescents pour l'amplification par PCR de l'ADNr. Les amplicons sont ensuite digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction. Cette digestion génère un mélange de fragments de restriction de taille variable qui sont séparés par électrophorèse capillaire. Seuls les fragments de restriction terminaux marqués par le fluorochrome sont visualisés par le faisceau laser. La taille et la quantité des fragments sont mesurées à l'aide d'un séquenceur.

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est utilisée pour détecter les polymorphismes de l'ADN. Elle débute par la digestion de l'ADN total à l'aide d'une ou plusieurs enzymes de restriction. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés aux extrémités des sites de coupure pour que les amorces puissent se fixer sur les fragments. Une pré-amplification est effectuée sur tous les fragments pour augmenter la quantité d'ADN. Une amplification sélective est effectuée avec deux amorces contenant des séquences spécifiques de l'adaptateur et du site de restriction. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Tableau 12: Comparaison des techniques moléculaires de caractérisation de la diversité bactérienne d'aliments fermentés

| Méthodes | Description                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Application                                                                                             | Références                                                                                                                                                                                           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TTGE     | Séparation des fragments d'ADN basée sur des différences chimiques à travers une augmentation d'un gradient linéaire de température                                                                                                                                                                         | <i>potopoto</i> , <i>dégué</i><br>pâte de manioc fermentée                                              | Abriouel et al., 2006<br>Miambi et al., 2003                                                                                                                                                         |
| DDGE     | Séparation des fragments d'ADN basée sur des différences chimiques à travers une augmentation linéaire d'un gradient de dénaturation chimique (urée, formamide). Le fragment d'ADN, initialement double brin est partiellement dénaturé pour former une structure branchée dont la mobilité est quasi nulle | <i>pozol</i><br><i>kenkey</i><br><br><i>potopoto</i>                                                    | Ampe et al., 1999<br>Ben Omar et al., 2000a<br>Ampe et al., 2000                                                                                                                                     |
| RAPD     | Des amorces courtes de séquence définie arbitrairement sont utilisées pour amplifier par PCR l'ADN génomique. Ces produits PCR obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour donner des profils électrophorétiques caractéristiques des espèces et des souches                     | <i>gari</i><br><br><i>kenkey</i><br><i>husuwa</i><br><br>pâte de manioc fermenté<br><br><i>potopoto</i> | Kostinek et al., 2005<br>Duthoit et al., 2003<br>Callon et al., 2006<br><br>Hayford et al., 1999<br>Yousif et al., 2005<br><br>Ben Omar et al., 2000b; Lacerda et al., 2005<br>Ben Omar et al., 2008 |
| SSCP     | Les fragments d'ADN génomique sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques. L'ADN double brin est dénaturé (94°C, 10 min), rapidement refroidi afin d'empêcher la réassociation des simples brins et chargé sur un gel d'acrylamide non dénaturant                                                   | fromage                                                                                                 | –                                                                                                                                                                                                    |
| T-RFLP   | L'ADN est hydrolysé par une endonucléase de restriction puis le polymorphisme est révélé après hybridation d'une sonde marquée sur les fragments et séparés par électrophorèse sur gel et transférés sur une membrane                                                                                       | yaourt<br>fromage                                                                                       | Rademaker et al., 2006                                                                                                                                                                               |
| RFLP     | Des profils de restriction de fragments d'ADN sont générés par digestion enzymatique et électrophorèse sur gel d'agarose                                                                                                                                                                                    | <i>Husuwa</i><br>Bière de sorgho                                                                        | Yousif et al. 2005<br>Sawadogo-Lingani et al., 2007                                                                                                                                                  |
| AFLP     | Cette technique repose sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique après digestion par deux enzymes de restriction et ligation d'un adaptateur d'environ 20 paires de bases. Les amorces sont constituées de l'adaptateur et de trois bases aléatoires en 3'                                             | <i>Kenkey</i><br><i>Husuwa</i><br>Bière de sorgho                                                       | Hayford et al., 1999<br>Yousif et al., 2005<br>Sawadogo-Lingani et al., 2007                                                                                                                         |

## **2.5. Techniques d'amélioration des conditions de fermentation et la qualité nutritionnelle des bouillies traditionnelles fermentées**

Pour que les bouillies traditionnelles de céréales fermentées soient des aliments de complément adéquats pour les nourrissons et les jeunes enfants et de qualité constante, il est nécessaire que des améliorations soient apportées au plan nutritionnel ainsi qu'au niveau des conditions de leur production.

Au plan nutritionnel, les améliorations concernent principalement l'équilibre en macronutriments, l'augmentation de la densité énergétique et l'amélioration de la biodisponibilité des minéraux essentiels comme le fer et le zinc par la destruction accrue des facteurs antinutritionnels comme les phytates, les fibres ou certains composés polyphénoliques qui sont les agents chélateurs de ces derniers, présents dans les matières premières.

Sur le plan technologique, un meilleur contrôle des opérations unitaires du procédé de fabrication des bouillies fermentées conduisant à une meilleure reproductibilité de la qualité des bouillies fermentées et à une baisse du risque de développement de la microflore pathogène ou indésirable devra être obtenu, en particulier par l'utilisation de cultures starters à activités enzymatiques désirables.

En Afrique, la fermentation naturelle ou spontanée est encore celle pratiquée de nos jours dans la préparation des bouillies traditionnelles fermentées (Miambi et al., 2003. Holzapfel., 2002). Cette pratique ancestrale de fermentation connue depuis des millénaires résulte d'une activité compétitive d'une diversité de microorganismes autochtones et de contaminants qui proviennent naturellement des matières premières, du matériel utilisé ou de l'environnement. Cette complexité de la microflore naturelle rend difficile le contrôle de la fermentation spontanée et entraîne une grande variabilité au niveau de la qualité nutritionnelle, sanitaire et sensorielle des bouillies fermentées (Tamang et Nikkuni, 1996; Akingbala et al., 1981a,b). Certains auteurs ont en effet souligné que les procédés traditionnels de fermentation ne permettent pas toujours d'obtenir des produits avec une qualité hygiénique et organoleptique satisfaisante. Ce mode de fermentation est encore dominant dans une grande partie du monde en développement mais elle tend à devenir une pratique ancienne dans les pays industrialisés en raison des efforts réalisés pour développer de nouveaux modes de fermentation qui permettent d'améliorer la qualité des aliments fermentés.

Différentes techniques peuvent être utilisées pour améliorer la qualité nutritionnelle et diminuer la variabilité des bouillies traditionnelles à base de céréales fermentées. L'un des moyens les plus simples à mettre en œuvre et peu onéreux dans les PED est la complémentation par co-fermentation des céréales avec des légumineuses localement disponibles. Cette co-fermentation peut être soit spontanée soit maîtrisée par l'utilisation d'un starter naturel (pied de cuve) ou de souches sélectionnées.

Toutefois, l'utilisation de souches sélectionnées spécifiquement pour leur potentiel nutritionnel peut offrir des avantages additionnels.

## **2.5.1. Amélioration du contrôle de la fermentation**

### **2.5.1.1. Fermentation par pied de cuve**

La fermentation par pied de cuve dénommée «back slopping» en anglais est une fermentation obtenue par l'inoculation de la matière première avec une petite quantité de produit issu d'une fermentation antérieure que l'on désigne par pied de cuve. Le pied de cuve est une forme de sélection des souches dominantes les mieux adaptées au substrat. Cette technique de fermentation permet d'accélérer la fermentation et aussi de réduire les risques de fausse fermentation (Nout, 1992). La fermentation par pied de cuve est en usage dans la production de choucroute, de pâtes aigres ou acides, et particulièrement les produits dépendants de l'écologie microbienne et pour lesquels le rôle de la succession de flore n'est pas encore précisé (Harris, 1998). De nos jours, la production d'aliments et de boissons fermentés par le procédé utilisant un pied de cuve représente des méthodes de conservation et de transformation bon marché et sûres dans les PED. Elle est plus avantageuse que la fermentation spontanée car elle permet de réduire la variabilité de la qualité des produits fermentés. Néanmoins, on observe parfois des difficultés pour maintenir la qualité, l'uniformité des produits et l'équilibre de la flore microbienne ainsi que pour détecter les contaminants microbiens. Cette technique de fermentation améliorée est encore cependant peu développée pour la production des bouillies utilisées dans l'alimentation complémentaire. Elle pourrait représenter une alternative intéressante à la fermentation spontanée.

### **2.5.1.2 Fermentation par l'utilisation de cultures starters sélectionnées**

La fermentation contrôlée par l'addition intentionnelle de cultures starters aux matières premières à fermenter est une pratique relativement récente, développée dans les industries pour maîtriser et standardiser la qualité des produits finaux fermentés. Outre la maîtrise de la qualité des aliments fermentés, cette technique s'est également développée pour satisfaire d'une part les attentes des consommateurs modernes ou pour répondre aux exigences de certification selon les normes ISO 9000-9004 et d'autre part pour des raisons économiques. L'utilisation des cultures starters est devenue presque essentielle dans les industries alimentaires car elle répond aux problèmes de variation et de non maîtrise de la qualité des aliments fermentés obtenus avec les techniques de fermentation naturelle ou par l'utilisation d'un pied de cuve. Cependant, cette technique de fermentation optimisée entraîne souvent une perte ou une réduction des caractéristiques organoleptiques du produit. L'approche prometteuse de l'application des cultures starters est essentiellement basée sur leur habilité à se développer et à acidifier rapidement le milieu et aussi à être très compétitives dans les conditions environnementales utilisées pour fermenter les produits. Selon Holzapfel (1997), la première culture pure starter a été introduite en 1890 simultanément au Danemark et en Allemagne dans l'industrie laitière. C'est ensuite qu'elle a été appliquée aux produits fermentés animaux ou végétaux. Certains travaux ont rapporté l'utilisation des cultures starters pour améliorer la qualité et la valeur nutritionnelle de certains produits céréaliers fermentés comme le *gari* (Huch et al., 2008), le *dolo* (Sawadogo-lingani et al., 2007), le *togwa* (Mugula et al., 2003b), le *boza* (Zorba et al., 2003). Toutefois l'application des cultures starters dans les pays en développement pour la transformation de produits céréaliers améliorés comme celles des bouillies ou des pâtes fermentées reste encore de nos jours quasi-

inexistants. Ceci en raison d'un manque de disponibilité des souches starters dans le commerce et d'infrastructures adaptées.

### **2.5.2. La complémentation**

La complémentation ou «food to food fortification» en anglais se réfère à l'addition de nutriments spécifiques à l'aliment, en excès par rapport à ceux normalement trouvés dans l'aliment (Mensah et Tomkins, 2003). Cette approche est basée sur l'identification d'un ou plusieurs aliments potentiellement intéressants sur le plan nutritionnel pour compléter un autre aliment en vue d'améliorer la qualité nutritionnelle de l'ensemble, grâce à un meilleur équilibre en macronutriments ou par une augmentation des teneurs en certains micronutriments. L'exemple de complémentation le plus connu pour améliorer la qualité protéique et/ou lipidique des aliments est la combinaison des céréales avec les légumineuses (Campbell-Platt, 1994) ou les oléagineux. Dans les PED, les légumineuses représentent les principales sources de protéines, et d'acides aminés essentiels et parfois de lipides (cas du soja ou de l'arachide), meilleur marché que les produits d'origine animale. Elles peuvent ainsi compléter avantageusement les céréales en vue d'améliorer l'équilibre en macronutriments et en acides aminés de la ration alimentaire. Du point de vue de la composition en acides aminés, les légumineuses apportent la lysine, acide aminé déficient dans les céréales, qui elles apportent la méthionine, présente en faibles quantités chez les légumineuses. Toutefois, l'utilisation d'une telle approche doit tenir compte des teneurs élevées en facteurs antinutritionnels (phytates, alpha-galactosides, etc.) des légumineuses et offrir la possibilité de les réduire naturellement.

Ces combinaisons ont été fortement recommandées ces dernières années par les agences internationales et les organisations non gouvernementales pour améliorer la nutrition des nourrissons et des jeunes enfants dans les pays en développement qui en majorité reçoivent principalement des aliments à base de céréales, essentiellement riches en amidon. Cette approche se révèle être de moindre coût dans ces pays parce qu'elle est basée sur l'utilisation d'aliments localement disponibles et accessibles. De nos jours, les programmes d'intervention nutritionnelle accordent une attention particulière à l'utilisation du soja ou de l'arachide dans les aliments complémentaires.

Plusieurs formules ont déjà été élaborées à partir de combinaison de légumineuses et de céréales par de nombreux auteurs (Glover, 1976; Sefa-Dede, 1984; Plahar et al., 1999; Egounlety et Aworh, 2003). Le tableau 13 donne une liste non exhaustive de légumineuses et oléagineux pouvant être utilisés dans la complémentation des céréales.

Parmi les légumineuses, le soja et l'arachide sont particulièrement intéressantes de par leur richesse à la fois en protéines et en lipides, alors que les autres légumineuses sont quasiment dépourvues de lipides.

Le soja a des caractéristiques nutritionnelles supérieures à beaucoup de légumineuses pour sa teneur en protéines élevée et leur composition en acides aminés essentiels. Le profil en acides aminés essentiels de ses protéines se rapproche plus des recommandations pour l'alimentation humaine que la plupart des autres protéines végétales (Young, 1991). On reconnaît également au soja, des effets bénéfiques dans la prévention des maladies chroniques comme les maladies

cardiovasculaires, les cancers, l'ostéoporose, et les désordres liés à la ménopause d'origine hormonale (Liu et al. 2002) lesquels semblent être liés à ses teneurs élevées en isoflavones (Setchell, 1988). Cependant la consommation du soja a souvent été limitée par la présence d' $\alpha$ -galactosides non digestibles tels le raffinose, le stachyose et le verbascose qui représentent de 4 à 6% de la matière sèche des graines et ne sont pas éliminés lors les traitements thermiques usuels (Hymowitz *et al.*, 1972; Leske *et al.*, 1993).

Quant à l'arachide, sa teneur en lipides est supérieure à celles du soja qui est beaucoup plus riche en protéines. La forte concentration en lipides de l'arachide permet une augmentation de la densité énergétique dans le cas d'une complémentation avec des céréales pour la production de bouillies. Par rapport au soja, le profil en acides aminés de l'arachide paraît être de qualité inférieure. De plus, la présence de composés toxiques comme l'aflatoxine dans les graines d'arachide occasionnée par le développement de certaines moisissures peut limiter son utilisation.

Cependant, depuis 15 à 20 ans, la persistance des problèmes nutritionnels liés à une carence en micronutriments montre que la complémentation seule n'est pas suffisante et devra être couplée à l'enrichissement. La stratégie de l'enrichissement ou fortification est définie comme l'addition à un aliment d'un ou de plusieurs nutriments essentiels, normalement ou non contenus dans l'aliment, avec l'objectif de prévenir ou corriger une carence affirmée en un ou plusieurs nutriments dans la population ou dans des groupes de population spécifiques (FAO/WHO, 1994).

**Tableau 13: Composition globale de quelques graines de légumineuses et oléagineuses**

|                          | Teneur en eau<br>g/100 MB | Protéines  | Lipides | Glucides | Energie       |
|--------------------------|---------------------------|------------|---------|----------|---------------|
|                          |                           | g/100 g MS |         |          | kcal/100 g MS |
| <b>Soja</b>              | 11                        | 34         | 18      | 29       | 405           |
| <b>Arachide</b>          | 7                         | 23         | 45      | 20       | 570           |
| <b>Haricot</b>           | 12                        | 22         | 1,5     | 57       | 320           |
| <b>Niébé</b>             | 11                        | 23         | 1,4     | 57       | 320           |
| <b>Graines de courge</b> | 6                         | 26         | 50      | 11       | 595           |

Source FAO (1995)

## 2.6. Rôle et importance des bactéries lactiques dans l'amélioration de la qualité des aliments de complément

Les bactéries lactiques regroupent différents genres de bactéries qui fermentent les glucides pour produire l'énergie nécessaire à leur croissance tout en produisant majoritairement de l'acide lactique (Aguirre et Collins, 1993; Olusola, 1997) favorable à la conservation des aliments. Elles sont rencontrées partout dans la nature, et dans le système digestif de l'homme. C'est un groupe de bactéries extrêmement important et intéressant du fait de leurs nombreuses activités métaboliques qui contribuent aux caractéristiques organoleptiques très appréciées des produits fermentés, notamment la flaveur, la saveur, la texture ainsi que les attributs nutritionnels et technologiques en plus de leur rôle de conservation. Aussi, certaines bactéries lactiques offrent un certain nombre de caractéristiques probiotiques.

Les principales activités métaboliques rapportées sont les activités acidifiantes, enzymatiques, la synthèse de bactériocines et de vitamines, la résistance aux bactériophages ou la production d'exopolysaccharide qui sont dépendantes de la souche. Leur choix et importance dans les fermentations dépend du substrat de fermentation qui peut être des céréales, des légumineuses, du lait, des fruits ou légumes, des viandes ou poissons. La fermentation lactique est l'un des procédés de fermentation le plus important dans le monde et particulièrement en Afrique. Plusieurs travaux ont rapporté l'implication et la dominance des bactéries lactiques dans de nombreux produits céréaliers fermentés traditionnels. Il s'agit principalement de l'*ogi*, du *mawé*, du *kenkey*, du *ben-saalga*, du *pozol* (Hounhouigan et al., 1993; Nuraida et al., 1995; Hamad et al., 1997; Ampe et Miambi, 2000; Lei et Jakobsen, 2004; Tou et al., 2006). Dans les pays occidentaux en revanche, il existe très peu de produits lacto-fermentés à base de céréales. Les produits de fermentation lactique les plus courants sont à base de lait (yaourt), de fruits ou légumes (choucroute) etc.

Les bactéries lactiques sont actuellement utilisées comme cultures starters dans de nombreuses fermentations alimentaires industrielles dans les pays occidentaux pour améliorer la qualité et la sécurité du produit final et standardiser le procédé de production (Campbell-Platt et Cook, 1995; Lücke, 1998, 2000).

### 2.6.1. Caractéristiques générales et classification

La dénomination « bactérie lactique » est une appellation générique qui désigne des bactéries appartenant au phylum des bactéries Gram positif, et qui ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase et produisent par voie fermentaire de l'acide lactique seul ou en mélange avec de l'acétate et/ou de l'éthanol avec production de dioxyde de carbone dans ce dernier cas. Elles sont asporulées, anaérobies et généralement immobiles (Aguirre and Collins, 1993). Les différents genres de bactéries lactiques sont séparés par une divergence évolutive considérable et ce malgré une communauté de caractéristiques physiologiques communes.

Les bactéries lactiques *sensu stricto* se rattachent à la subdivision « *Clostridium* » regroupant les bactéries Gram positif de bas GC% ( $\leq 50$ ) dans leur ADN génomique (De Vos et al., 2005). Les espèces se répartissent principalement entre les genres suivants pour les coques et coccobacilles: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* et dans les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium* pour les bacilles (Vandamme et al., 1996). Néanmoins, le genre *Bifidobacterium* se distingue particulièrement de ces bactéries car il regroupe des bactéries lactiques anaérobies strictes productrices d'acides lactique et acétique sans production de dioxyde de carbone, appartenant à la subdivision « Actinomycètes » (bactéries à Gram positif et à GC% élevé).

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles. Elles sont généralement mésophiles et acido-tolérantes puisque certaines peuvent croître à pH bas compris entre 4,0 et 4,5. Cependant certaines peuvent se multiplier à des températures extrêmes (5°C et 45°C) et à des pH extrêmes (9,6 et 3,2). L'acide lactique produit peut être sous forme L (+) ou sous forme D (-) ou en mélange racémique. Seule la

forme L (+) est métabolisée chez les humains (Uribarri et al., 1998). Ainsi, l'ingestion de grande quantité d'acide D-lactique pourrait résulter en une accumulation dans le sang et par conséquent en une acidose métabolique.

Cela peut être un problème chez les nouveau-nés à cause de l'immaturation rénale qui limite l'excrétion des ions hydrogènes par les reins (Mack, 2004). Pour cette raison, la FAO et l'OMS recommandent que l'acide D-lactique ne soit pas additionné dans les aliments destinés aux nourrissons et enfants de moins de 3 ans (FAO/WHO, 1974; Yusof et al., 1993). Cependant, de Vrese et Barth (1991) ont montré lors d'une étude que l'acide D-lactique qui peut être ingéré à travers la consommation des bouillies fermentées est plus faible que ce qui est absorbé à partir du yaourt par des adultes en bonne santé, lequel n'est pas nuisible à la santé.

### 2.6.2. Les voies métaboliques

Les bactéries lactiques *sensu stricto* sont catégorisées en homofermentaires ou hétérofermentaires selon la voie métabolique qu'elles utilisent, soit la voie Embden-Meyerhof soit la voie pentose phosphocétolase (Figure 5) et selon les produits finaux en résultant.

Chez les bactéries homofermentaires, l'acide lactique est le principal ou seul produit de fermentation du glucose. Ce type de fermentation est effectué par les genres *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* qui sont exclusivement homofermentaires et *Lactobacillus* qui comprend des espèces homofermentaires et hétérofermentaires. Ce premier groupe de bactéries est en général recherché sur le plan technologique pour diriger la fermentation, abaisser rapidement le pH des produits et sécuriser les produits fermentés.

Concernant les hétérofermentaires, ils produisent des quantités équimolaires d'acide lactique, de dioxyde de carbone et d'éthanol en mélange ou non avec de l'acide acétique. Les bactéries lactiques de type hétérofermentaire produisent plus généralement des composés aromatiques désirables comme l'acétaldéhyde et le diacétyl.

Le bilan métabolique des voies homofermentaire et hétérofermentaire peut s'établir comme suit :

#### a.Voie homolactique (via la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof)

1 Glucose  $\longrightarrow$  2 Acides lactiques

#### b.Voie hétérolactique

1 Glucose  $\longrightarrow$  1 Acide lactique + 1 Ethanol + 1 CO<sub>2</sub>

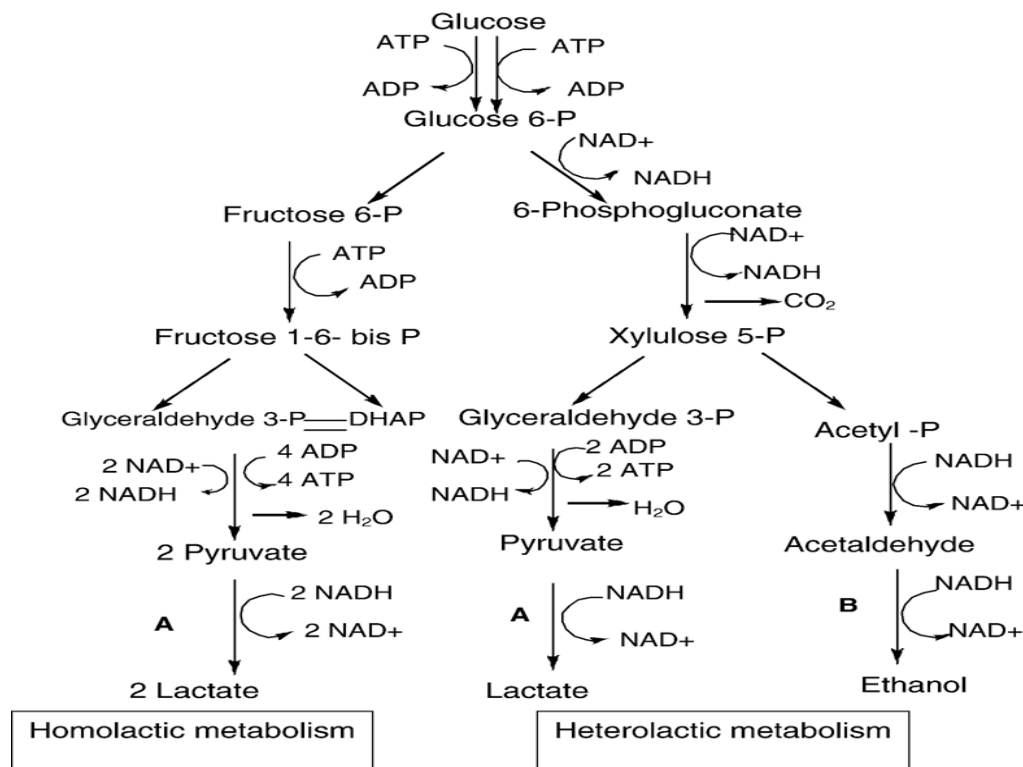


Figure 5: Catabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Reddy et al., 2008)

### 2.6.3. Les effets probiotiques

Les microorganismes probiotiques décrits dans l'alimentation humaine sont essentiellement des bactéries lactiques et des levures présentes ou non dans la microflore intestinale résidente. Les probiotiques sont définis comme des microorganismes présents dans des aliments ou des suppléments alimentaires qui, lorsqu'ils sont ingérés vivants en quantité suffisante, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'homme ou de l'animal en améliorant les propriétés de la microflore endogène et du transit intestinal (Fuller, 1989; Holzappel et al., 1998; Saarela et al., 2000). Rachmilewitz et al. (2004) souligne également que des effets bénéfiques liés à la lyse des bactéries probiotiques dans le tractus digestif peuvent également exister. Plusieurs travaux ont rapporté que l'effet probiotique des bactéries lactiques pouvait être obtenu à partir d'une dose d'ingestion d'environ  $10^8$ - $10^9$  unités formant colonie (UFC)/jour (Sanders et Huis in't Veld, 1999). Pour qu'un microorganisme soit reconnu probiotique, il faut que son effet bénéfique chez l'homme et sa capacité à survivre au transit intestinal en résistant aux sucs gastriques et aux acides biliaires soient démontrés (Prasad et al., 1998). La levure, *Saccharomyces boulardii*, appartenant taxonomiquement à *Saccharomyces cerevisiae* est la seule levure probiotique aujourd'hui utilisée comme un produit pharmaceutique dans la prévention et le traitement des diarrhées du nourrisson particulièrement liées à des infections par *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* et *Entamoeba histolytica* ou associées à l'usage des antibiotiques et la prévention des

rechutes de colites pseudo-membraneuses. Certaines souches de bactéries lactiques trouvées naturellement dans les aliments fermentés sont également de bons candidats de cultures probiotiques parce qu'elles sont des constituants normaux de la flore intestinale et possèdent des effets bénéfiques sur la santé. Ces bactéries lactiques probiotiques peuvent en effet avoir des effets bénéfiques sur la santé à travers l'aliment, en augmentant la disponibilité d'éléments nutritifs essentiels, en produisant une variété de vitamines, des antioxydants ou autres composés et dans certains cas peuvent survivre au transit digestif, interagir avec l'hôte et ainsi contribuer à la santé de l'homme (Vaughan et al., 2005).

De nombreux travaux réalisés ces dernières décennies ont ainsi mis en évidence le rôle thérapeutique et prophylactique des bactéries lactiques pour de nombreuses maladies. Cependant, les propriétés probiotiques sont souvent spécifiques à la souche. De nombreux travaux cliniques rapportent l'effet probiotique de certaines bactéries lactiques dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses chez les enfants. Les espèces utilisées appartiennent au genre *Lactobacillus* pour le traitement des diarrhées virales ou bactériennes (Van Niel et al., 2002) comme *L. rhamnosus* GG (Isolauri et al., 1991; Kaila et al., 1992; Huang et al., 2002) et *L. reuteri* pour les diarrhées aiguës chez le jeune enfant, *B. lactis* BB12 (Chouraqui et al., 2004) ou *L. casei* DN-114 001 (Pedone et al., 2000) pour la prévention des diarrhées infectieuses chez l'enfant. En outre, les probiotiques réduisent les taux de cholestérol élevés dans le sang, renforcent et maintiennent le système immunitaire et digestif aidant de ce fait notre organisme à prévenir les maladies comme le cancer, etc. (Sanders et Huis in't Veld, 1999).

Le premier aliment probiotique reconnu est le lait fermenté produit pour la consommation humaine (Fuller, 1994). De nos jours, un certain nombre de souches probiotiques de bactéries lactiques sont classiquement utilisées dans des produits laitiers fermentés. L'incorporation des probiotiques dans des produits non laitiers tels que les produits céréaliers représente encore un défi (Andersen, 1998). En effet, l'addition de bactéries lactiques probiotiques aux aliments céréaliers fermentés comme les bouillies pourrait contribuer à augmenter la durée de vie, leur palatabilité et leur sécurité (Motarjemi et Nout, 1996; Hammes et Hertel, 2002) en plus de leur effet bénéfique sur la santé (Helland et al., 2004).

#### **2.6.4. Les bactéries lactiques à propriétés enzymatiques d'intérêt nutritionnel**

Différents genres et espèces de bactéries lactiques prennent part à la fermentation lactique des céréales souvent en association avec des levures. Cependant, les bactéries lactiques sont les microorganismes dominants. Elles possèdent de nombreuses activités enzymatiques contribuant à la qualité des produits fermentés. Elles peuvent en effet être responsables de la qualité sanitaire, organoleptique, nutritionnelle, technologique et d'effets bénéfiques sur la santé des consommateurs. Il peut s'agir d'activités protéolytiques, lypolytiques, phosphohydrolytiques, amylolytiques,  $\alpha$ -galactosidasiques, phytasiques, etc.

Pour le cas particulier des bouillies traditionnelles fermentées préparées à partir de céréales simples ou en mélange avec des légumineuses, l'utilisation de bactéries lactiques à activités spécifiques telles que amylolytiques, phytasiques et  $\alpha$ -galactosidasiques comme cultures starters pourrait présenter un intérêt nutritionnel considérable. L'hydrolyse de l'amidon par

les enzymes amylolytiques bactériennes durant le processus de fermentation peut contribuer à augmenter la densité énergétique des bouillies par une incorporation accrue de matière sèche amylacée. L'utilisation de bactéries phytasiques permettrait d'hydrolyser les phytates et d'améliorer de ce fait la biodisponibilité des minéraux essentiels. Quant aux bactéries  $\alpha$ -galactosidasiques, leur implication dans les fermentations permettrait d'éliminer ou de réduire les teneurs en  $\alpha$ -galactosides comme le raffinose et le stachyose. Une description de ces souches particulières est présentée ci-après.

#### 2.6.4.1. Les bactéries lactiques à activités amylolytiques et leurs enzymes

Les bactéries lactiques amylolytiques (BLA) ont été décrites pour la première fois par Sherman en 1937, et désignées comme des bactéries qui produisent de l'acide lactique à partir de l'amidon. Ces bactéries peuvent être utilisées dans la transformation de nombreux aliments fermentés grâce à leur statut européen QPS (Qualified Presumption of Safety) traduit en français par présomption d'innocuité reconnue, qui correspond au caractère GRAS (Generally Recognized As Safe) défini par les instances nord-américaines. La présence des BLA a été rapportée dans les aliments fermentés à partir de matières premières amylacées comme les céréales et le manioc et selon Johansson et al. (1995), elles représenteraient environ 10% de la population totale de bactéries lactiques. Récemment, Tou et al. (2007) ont montré la présence des BLA dans les pâtes fermentées de mil et souligné leur habilité à hydrolyser l'amidon lorsqu'une étape de pré-gélatinisation est introduite dans le procédé traditionnel avant la fermentation. Ces bactéries produisent en effet des amylases qui peuvent être extracellulaires, intracellulaires ou encore liées à la paroi cellulaire. La revue de littérature de Reddy et al. (2008) rapporte que différentes espèces de bactéries lactiques amylolytiques ont été isolées dans divers aliments fermentés amylacés à base de céréales et de manioc. Leur recherche a été motivée par les teneurs en amidon élevées dans les matières premières. *Lactobacillus manihotivorans* a été isolé de la fabrication d'amidon aigre de manioc en Colombie (Morlon-Guyot et al., 1998), *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 a été isolé d'une pâte de maïs fermentée *ogi* du Bénin (Agati et al., 1998), des souches amylolytiques de *Lactobacillus plantarum* (comme la souche A6) ont été isolées du rouissage du manioc au Congo (Giraud et al., 1991) ou de racines fermentée de manioc (Nwankwo et al., 1989; Johansson et al., 1995) ou de riz fermenté aux Philippines (Olympia et al., 1995).

Les amylases, dont certaines sont décrites plus bas, hydrolysent les molécules d'amidon pour donner divers produits comme les dextrines, du glucose et du maltose (Windish et al., 1965). Les amylases regroupent plusieurs types d'enzymes principalement des  $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -amylases, pullulanases et des amyloglucosidases (Figure 6), qui se différencient suivant leur aptitude à hydrolyser les liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1-4) ou  $\alpha$ -(1-6), leur mode d'action ou encore par les produits de fin de réaction. La classification courante est celle basée sur leur mode d'action qui permet ainsi de distinguer deux catégories d'amylases: les endoamylases et les exoamylases. Ces enzymes sont produites par divers types de microorganismes, des bactéries, des moisissures et des levures et sont aussi naturellement présentes dans la salive, le suc pancréatique des humains, ainsi que dans les plantes.

Les  $\alpha$ -amylases (EC3.2.1.1) ou 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase sont des endo-enzymes qui hydrolysent au hasard les liaisons  $\alpha$ -(1,4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine de l'amidon, à l'exception des chaînes terminales, en libérant quelques

molécules de glucose, des oligosides de 2 (maltose) à 7 unités d'anhydroglucose et des dextrines résultant de l'inaptitude des  $\alpha$ -amylases à hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -(1,6) de l'amylopectine. On qualifie les  $\alpha$ -amylases d'enzymes liquéfiantes parce qu'elles agissent rapidement sur l'amidon gélatinisé en rendant l'empois d'amidon beaucoup plus fluide.

Les produits d'hydrolyse de l'amidon ont en effet une faible capacité d'absorption d'eau et de gonflement, si bien que les bouillies préparées avec des sources d' $\alpha$ -amylases ont une viscosité nettement réduite. Le pH et la température jouent un rôle important dans la stabilité des  $\alpha$ -amylases. Les  $\alpha$ -amylases des bactéries et des moisissures connaissent de nombreuses applications dans les industries. Les  $\alpha$ -amylases sont produites par plusieurs espèces du genre *Bacillus* (Vihinen et Mantsala, 1990; Viara et al., 1993; Canganella et al., 1994), *Lactobacillus* (Aguilar et al., 2000), *Thermococcus* (Canganella et al., 1994; Estelle et al., 1997). On les trouve dans tous les types d'organes et de tissus. Selon la revue de littérature de Haki et Rakshit (2003), les  $\alpha$ -amylases sont en général stables dans une large gamme de pH allant de 4,0 à 7,5 et de température variant entre 60 et 100°C selon l'espèce ou la souche.

Les  $\beta$ -amylases (EC3.2.1.2) ou 1,4- $\alpha$ -D-glucan maltohydrolase sont produites par les bactéries, les levures et les moisissures et apparaissent également dans les graines de céréales et de légumineuses. Ce sont des exo-enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -(1,4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de leur extrémité non réductrice en libérant du maltose et catalysent l'inversion de la configuration en bêta du maltose libéré (environ 60% de l'amidon gélatinisé est hydrolysé en maltose). Cette amylase a cependant un faible effet sur la viscosité des empois d'amidon (tels que les bouillies), et son principal effet est d'augmenter la saveur sucrée. C'est pourquoi elle est classifiée comme une enzyme saccharifiante. Les  $\beta$ -amylases sont inactivées à pH autour de 6,0-7,0 tandis qu'à ces pH, les  $\alpha$ -amylases sont stables (Muralikrishna et Nirmala, 2005).

Les pullulanases (EC3.2.1.41) de type I coupent spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -(1,6) alors que celles du type II sont capables d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -(1,6) et  $\alpha$ -(1,4). Elles ont une action déramifiante et permettent aux  $\beta$ -amylases de poursuivre leur activité. Cette enzyme est uniquement produite par les microorganismes, telles que les bactéries appartenant aux genres *Thermococcus* (Canganella et al., 1994) et *Bacillus* (Takasaki, 1976a,b).

Les amyloglucosidases (EC3.2.1.3), dénommées également glucamylases,  $\gamma$ -amylases, glucan 1,4- $\alpha$ -glucosidase, exo-1,4- $\alpha$ -glucosidase, lysosomal  $\alpha$ -glucosidase ou encore 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohydrolase, hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -(1,4) en libérant du  $\beta$ -D-glucose à partir des extrémités non réductrices de l'amylose et de l'amylopectine. Ce sont des exoenzymes qui hydrolysent rapidement les longues chaînes et peuvent transformer totalement l'amidon en glucose. Elles hydrolysent également les liaisons  $\alpha$ -(1,6) mais beaucoup plus lentement.

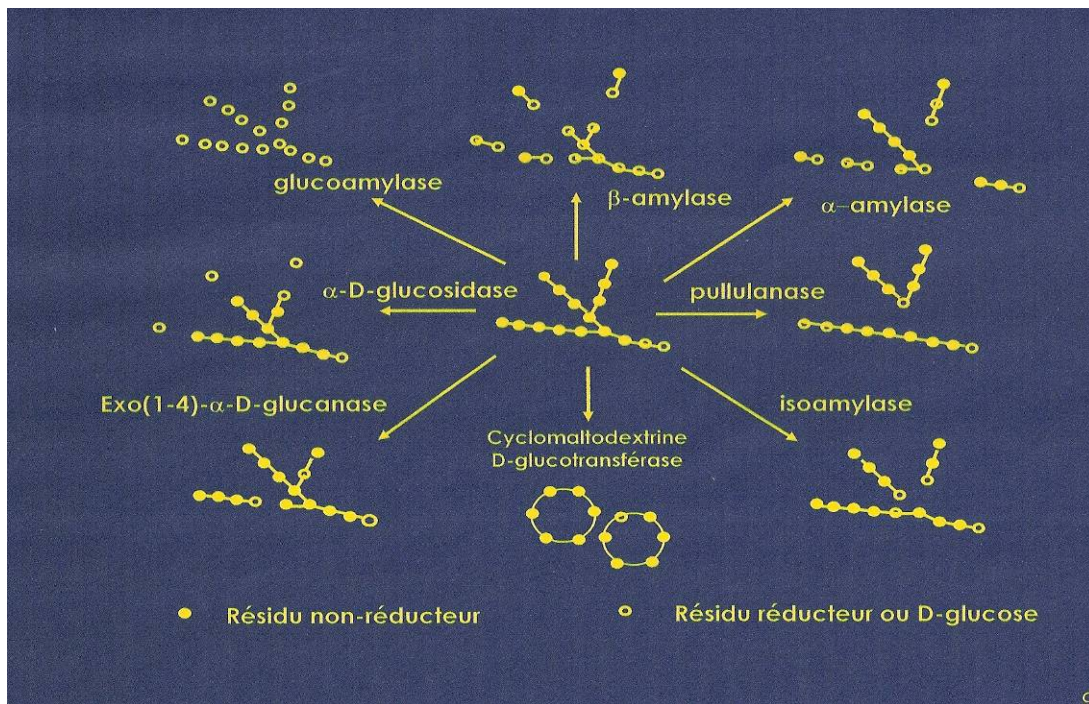


Figure 6: Mécanismes d'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylolytiques

#### 2.6.4.2. Les bactéries lactiques à activité phytasique et leurs enzymes

Les bactéries lactiques désignées phytasiques sont celles qui produisent des phytases qui permettent l'hydrolyse des phytates (IP-6) en différents dérivés phosphorylés (IP-5 à IP-1) libérant ainsi du phosphore inorganique. Les phytases représentent un sous-groupe des phosphatases que l'on peut classifier suivant leurs structures et leurs fonctionnalités diverses (Greiner et al., 2006). Elles sont généralement trouvées dans la nature chez les animaux (tissus animaux, flore bactérienne du tube digestif et au niveau de la muqueuse intestinale), chez de nombreux microorganismes et chez les plantes (Liu et al., 1998; Pandey et al., 2001; Konietzny et al., 2002).

Selon leurs mécanismes d'action, les phytases peuvent être subdivisées en histidine acide phytase,  $\beta$ -propeller phytase, cystéine phytase ou purple acide phytase. Lorsque l'on considère les conditions optimales d'action de pH, les phytases peuvent être groupées en phosphatases acides, neutres ou alcalines. Leur classification peut également être basée sur la position du groupement phosphate du carbone de la molécule de phytate attaquée en premier par l'enzyme et qui permet de distinguer les 3-phytases (EC 3.1.3.8), les 5-phytases (EC 3.1.3.72) et les 6-phytases (EC 3.1.3.26). Cette dernière classification fait plutôt référence à celle identifiée par l'Union Internationale de Chimie pure et Appliquée (IUPAC) et l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUPAC-IUBMB, 1989). Les 3-

phytases sont généralement trouvées chez les microorganismes comme les moisissures et les bactéries et très rarement chez les végétaux.

Les revues de littérature de Greiner et al. (2006) et Bohn et al. (2008) montrent que l'activité phytasique a été identifiée chez plusieurs espèces appartenant à différents genres microbiens comme *Aspergillus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Citrobacter*, *Bifidobacterium*. D'importantes activités phytasiques intracellulaires (De Angelis et al., 2003) ou extracellulaires (Sreeramulu et al., 1996; Vohra et al., 2003) ont été trouvées chez plusieurs espèces de bactérie lactique. Il s'agit principalement de *L. sanfranciscensis* CB1 (De Angelis et al., 2003), *L. amylovorus* B4552 (Sreeramulu et al., 1996), *Bifidobacterium dentium*, *Lactobacillus reuteri* (L-M15) et *Lactobacillus salivarius* (L-ID15) (Palacios et al., 2008), *Bifidobacterium globosum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. longum* (Haros et al., 2005), *B. infantis* ATCC 15697 (Harros et al., 2007). Les pH et températures optimaux de l'activité phytasique des bactéries se situent dans la gamme de valeurs variant respectivement de 2,2 à 8 et de 55 à 77°C (Greiner et al., 2006).

Seule une 5-phytase alcaline a été détectée pour l'instant et cela uniquement chez les pollens de lys (Barrientos et al., 1994). Cette phytase présente une grande activité à pH 8 et 55°C (Jog et al., 2005).

Les 6-phytases encore désignées par 4-phytases sont d'origine végétale principalement issues des céréales, légumineuses, noix et oléagineux. Leurs valeurs optimales de pH et de température sont très variables et respectivement comprises entre 4,3 et 8,0 et entre 35 et 58°C (Greiner et al., 2006; Bohn et al., 2008). Par ailleurs, Greiner et al. (2006) soulignent que la stabilité de la plupart des phytases végétales décroît drastiquement à des valeurs de pH en dessous de 4 et au dessus de 7,5 tandis que pour la majorité des enzymes microbiennes correspondantes, elle reste stable au dessus de pH 8 et en dessous de pH 3. Cependant l'intervalle de pH de 4 à 5,5 paraît optimal pour l'expression de l'activité phytasique de plusieurs bactéries et de céréales (Konietzny et al., 2002; Vohra et al., 2003; Greiner et al., 2006; De Angelis, 2003).

#### **2.6.4.3. Les bactéries lactiques à activité $\alpha$ -galactosidase et leurs enzymes**

Les bactéries produisant l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase (EC.3.2.1.22) ou  $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase pourraient être désignées comme des bactéries à activité  $\alpha$ -galactosidase. L' $\alpha$ -galactosidase synthétisée en général par les microorganismes est intra, extracellulaire ou partiellement liée à la cellule. Actuellement, plusieurs espèces de bactéries lactiques, comme *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* ont été identifiées comme capables d'hydrolyser les  $\alpha$ -galactosides en oses digestibles (Cruz et al., 1981; Garro et al., 1996b; Leblanc et al., 2004; Chen et Huo, 2008; Yoon et Hwang, 2008; Kim et al., 2005).

L'hydrolyse des  $\alpha$ -galactosides est obtenue soit par une  $\alpha$ -galactosidase, soit par une invertase ou bien les deux (Figure 4). L' $\alpha$ -galactosidase est une exoglycosidase qui hydrolyse les liaisons terminales non réductrices  $\alpha$ -(1,6) galactosyl à partir de différents  $\alpha$ -galactosides, tels que le raffinose, le stachyose ou le verbascose, les galacto(gluc)mannanes et les

galactolipides (Carrera-Silva et al., 2006) habituellement présents dans les céréales et particulièrement dans les graines de légumineuses. L' $\alpha$ -galactosidase hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -(1,6) du raffinose produisant du galactose et du sucrose. Quant à l'invertase, elle hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -(1,2) produisant du mélibiose et du fructose à partir du raffinose. L' $\alpha$ -galactosidase est présente chez de nombreux genres et espèces de bactéries et aussi de levures et de moisissures. Outre sa présence dans les microorganismes, elle existe également naturellement dans différentes plantes et chez certains animaux. Cependant, cette enzyme est déficiente chez les humains et les autres animaux monogastriques (poule et cochon) si bien que les  $\alpha$ -galactosides ne sont pas digérés dans le duodénum. Ils passent ainsi dans le gros intestin où ils sont dégradés par des bactéries intestinales productrices de gaz comme *Clostridium spp* et *Bacteroides spp* provoquant ainsi la libération de grandes quantités de dioxyde de carbone, d'hydrogène et de méthane (par l'intervention de bactéries méthanogènes), responsables de la formation des flatulences associées à la consommation des légumineuses. Plusieurs travaux rapportent l'isolement et la caractérisation d' $\alpha$ -galactosidase à partir de différentes sources microbiennes et végétales, ainsi que ses propriétés. Les  $\alpha$ -galactosidases des différentes espèces de bactéries lactiques sont en général stables à pH compris entre 5 et 10 et présentent un optimum entre 5 et 7 avec des températures optimales comprises entre 35 et 51°C (Chen et Huo, 2008; Yoon et Hwang., 2008; Garro et al., 1996a; Mital et al., 1973). Ces valeurs sont proches de celles rapportées par Guimaraes et al. (2001) pour les  $\alpha$ -galactosidases isolées de la germination du soja qui présentent une activité maximale à pH compris entre 5 et 5,5 et à des températures comprises entre 45 et 50°C.

## **Chapitre 3. Matériel et méthodes**

Le travail envisagé dans cette thèse a comporté deux volets. Le premier volet a eu pour but de caractériser des isolats de bactéries lactiques préalablement isolées de la fermentation du mil pour la production du *ben-saalga* (bouillie fermentée) au plan qualitatif puis quantitatif pour les propriétés enzymatiques d'intérêts nutritionnels en vue d'une sélection de souches potentielles. Le deuxième volet de ce travail a consisté à utiliser les souches potentiellement prometteuses identifiées puis sélectionnées comme cultures starters dans des expériences de fermentation à partir de mélanges mil-légumineuses (arachide ou soja) en vue de tester leur capacité à améliorer la qualité nutritionnelle des bouillies fermentées obtenues. Les matières premières, les bactéries et les milieux de cultures utilisés ont été décrits ci-après. Les différentes méthodes d'analyses physico-chimiques, biochimiques, rhéologiques et microbiologiques utilisées pour évaluer l'action des souches potentielles starters de bactéries lactiques sont également définies.

### 3.1. Matériels

Le matériel utilisé est constitué d'une part de matériel biologique de base qui se compose d'isolats du *ben-saalga* présélectionnés parmi une collection de bactéries lactiques et des souches de collection choisies pour leurs propriétés enzymatiques connues. D'autre part, nous avons utilisé des matières premières végétales pour nos essais expérimentaux de fermentation et de production du *ben-saalga*. En outre, des milieux de culture ont été également utilisés pour la production des cellules bactériennes.

#### 3.1.1. Les microorganismes utilisés

##### 3.1.1.1. Les bactéries lactiques du *ben-saalga* : origine et présélection des souches

Cent cinquante-cinq souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir d'échantillons de pâtes fermentées provenant de douze ateliers de production de *ben-saalga* différents à Ouagadougou (capitale du Burkina Faso). Ces ateliers ont été choisis de façon aléatoire parmi plusieurs ateliers répertoriés. Les isolats de ces souches sont conservés en cryotubes à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du glycérol (40 %) et du bouillon MRS et font partie de la collection de souches de l'IRD. Les propriétés biochimiques de ces souches ont été étudiées au laboratoire de l'UR 106 de l'IRD à Montpellier (actuel UMR 204), utilisant les galeries Api 50 CHL en plus de quelques propriétés technologiques. Toutes ces souches produisent l'acide lactique, seul ou avec l'éthanol, comme produit de la fermentation du glucose. Elles sont Gram positif et catalase négative. Dans le cadre de notre étude, une première sélection de 30 souches a été réalisée sur la base de considérations nutritionnelles particulièrement intéressantes pour l'amélioration de la qualité des bouillies fermentées à base de mil avec ajout de légumineuses. Les isolats de bactéries lactiques présélectionnées possèdent toutes le caractère phytasique, à l'exception des souches 8.12 et 10.9 et sont également amylasiques ou  $\alpha$ -galactosidasiques ou à la fois amylasiques et  $\alpha$ -galactosidasiques (Tableau 14).

**Tableau 14: Souches de bactéries lactiques présélectionnées parmi les isolats du *ben-saalga***

| Isolats de bactéries lactiques présélectionnés durant la fermentation du <i>ben-saalga</i> | Propriété phytasique | Propriété amylasique | Propriété $\alpha$ -galactosidasique |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|
| 1.5.2                                                                                      | +                    | -                    | +                                    |
| 1.6                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 1.8                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 2.17.1                                                                                     | +                    | -                    | +                                    |
| 3.1                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 3.2                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 3.6                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 3.7                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 3.10.1                                                                                     | +                    | -                    | +                                    |
| 4.4                                                                                        | +                    | +                    | +                                    |
| 4.5                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 4.8.2                                                                                      | +                    | -                    | +                                    |
| 4.9                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 4.11.1                                                                                     | +                    | -                    | +                                    |
| 5.6.2                                                                                      | +                    | -                    | -                                    |
| 5.7                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 5.11                                                                                       | +                    | +                    | -                                    |
| 6.1                                                                                        | +                    | +                    | +                                    |
| 6.6.2                                                                                      | +                    | -                    | +                                    |
| 6.9                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 7.4                                                                                        | +                    | -                    | +                                    |
| 7.9.1                                                                                      | +                    | -                    | +                                    |
| 8.12                                                                                       | -                    | -                    | -                                    |
| 10.2                                                                                       | +                    | -                    | +                                    |
| 10.8                                                                                       | +                    | -                    | -                                    |
| 10.9                                                                                       | -                    | +                    | +                                    |
| 11.1                                                                                       | +                    | -                    | +                                    |
| 11.11.1                                                                                    | +                    | -                    | +                                    |
| 11.11.2                                                                                    | +                    | +                    | +                                    |
| 12.7                                                                                       | +                    | +                    | -                                    |

(-) : négatif ; (+) : positif

### 3.1.1.2. Les souches de collection

Sept souches de collection appartenant à différents genres ont été utilisées :

*Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053, BCCM, Gent, Belgium) est une souche de bactérie hétérolactique facultative amylolytique isolée du manioc roui au Congo (*Manihot esculenta*). Cette espèce est un bacille plus ou moins court, isolé ou par paire, parfois par groupe de trois (Giraud et al., 1991). Cette souche a été utilisée lors de ce travail de thèse comme culture starter dans les fermentations pour tester sa capacité à hydrolyser l'amidon gélatinisé des pâtes de mélange mil-légumineuses (arachide ou soja).

*Escherichia coli* ATTC 10798 est un bacille Gram négatif de la famille des enterobacteriaceae sélectionné pour l'activité phytasique. Cette espèce a été choisie comme témoin positif dans l'étude de quantification des activités phytasiques des isolats du *ben-saalga*.

*Bacillus subtilis* ATCC 2385 est une bactérie Gram positif, catalase positive, appartenant à la famille des *Bacillaceae*. Cette souche également phytasique a été sélectionnée pour servir de

témoin positif tout comme *Escherichia coli* dans le cadre de l'étude de quantification de l'activité phytasique des isolats du *ben-saalga*.

Quatre autres espèces choisies parmi les souches de la collection de l'IRD ont été utilisées dans notre étude comme marqueur en vue de l'identification présomptive des espèces de bactéries lactiques qui participent à la fermentation des pâtes de mélange mil-légumineuses à travers l'analyse TTGE (Temporel Temperature Gel Electrophoresis). Cette analyse a été réalisée dans le cadre de la présente étude pour suivre l'implantation des espèces bactériennes impliquées dans les expériences de fermentation réalisées. Les espèces choisies comme marqueur sont les suivantes:

*Lactobacillus fermentum* (LMG 9846T) appartient à la famille des *Lactobacillaceae*. Cette espèce bactérienne est souvent associée aux fermentations des végétaux et des animaux.

*Pediococcus pentosaceus* (ATCC43200) est une espèce acido-tolérante généralement trouvée chez les végétaux, dans les viandes et les produits laitiers.

*Weissella paramesenteroides* (LMG9852) appartient au genre *Weissella*. Cette espèce est généralement abondante dans les végétaux frais.

*Bacillus cereus* (ATCC9139) est une bactérie Gram positif, mobile, formant des spores ovoïdes thermorésistantes (résistant à 100°C). Ce bacille est un germe ubiquiste et tellurique qui appartient à la famille des *Bacillaceae* et responsable de toxi-infections.

### 3.1.2. Matériel végétal

#### 3.1.2.1. Les matières premières

Le matériel végétal utilisé dans notre étude se compose des matières premières suivantes :

La variété locale de petit mil (*Pennisetum glaucum*) nommée Gampela, de couleur jaune caractérisée par des grains de petite taille a été utilisée. Ce mil a été acheté auprès d'un paysan. L'arachide (*Arachis hypogea*) et le soja (*glycine max*) ont été les deux légumineuses utilisées. Elles ont été achetées au marché local à Ouagadougou.

Toutes les matières premières ont été débarrassées de leurs impuretés diverses composées de pierres, de pailles, de graines étrangères, par vannage et triage manuel. Le mil a été utilisé en mélange avec une légumineuse pour tous les essais expérimentaux de fermentation pour la production du *ben-saalga* nutritionnellement amélioré. Un lot unique de chacune des matières premières a été constitué pour réaliser tous les essais expérimentaux de fermentation afin de limiter l'effet de variabilité du matériel végétal.

#### 3.1.2.2. Les formulations à base de céréales et de légumineuses

Les mélanges mil-légumineuses ont été formulés dans les proportions respectives de 76 et 24 % MS pour le mélange mil-arachide et 70 et 30 % MS pour le mélange mil-soja, lesquels respectent la balance en macronutriments et en énergie des aliments des nourrissons et jeunes enfants allaités. Pour ce faire le logiciel Alicom non commercial développé par l'IRD a été

utilisé en connaissance des teneurs en nutriments disponibles dans les matières premières utilisées. Le tableau 15 donne la composition nutritionnelle des matières premières et des formulations réalisées après une analyse de la composition globale.

**Tableau 15: Composition nutritionnelle des matières premières végétales et des formulations réalisées**

| Echantillons                        | Lipides      | Fibres ADF<br>(Van Soest) | Protéines<br>(N×6,25) | Cendres     | Glucides<br>(différence) |
|-------------------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------|-------------|--------------------------|
|                                     |              |                           |                       |             |                          |
| Mil                                 | 5,12 ± 0,15  | 3,96 ± 0,08               | 9,86 ± 0,30           | 1,78 ± 0,07 | 79,59                    |
| Soja                                | 20,32 ± 0,51 | 8,02 ± 0,42               | 40,91 ± 1,07          | 5,35 ± 0,18 | 25,39                    |
| Arachide                            | 46,93 ± 1,97 | 6,62 ± 0,38               | 29,59 ± 0,11          | 2,54 ± 0,14 | 14,32                    |
| Formulation mil-arachide<br>(76/24) | 18,64 ± 0,84 | 2,24 ± 0,79               | 12,71 ± 0,49          | 1,76 ± 0,02 | 64,66                    |
| Formulation mil-soja (70/30)        | 11,02 ± 0,43 | 2,39 ± 0,00               | 22,21 ± 0,55          | 2,80 ± 0,19 | 61,58                    |

### 3.1.3. Les milieux de culture

#### Le Milieu MRS (MAN, ROGOSA, SHARP, 1960)

Le milieu MRS déshydraté ou bouillon MRS (Difco) a été utilisé pour la culture et le dénombrement des bactéries lactiques. Sa composition en gramme par litre est la suivante :

| Composition                                               | g/l  |
|-----------------------------------------------------------|------|
| Peptone de protéase                                       | 10,0 |
| Extrait de bœuf                                           | 10,0 |
| Extrait de levure                                         | 5,0  |
| Dextrose (glucose)                                        | 20,0 |
| Polysorbate 80                                            | 1,0  |
| Citrate d'ammonium                                        | 2,0  |
| Acétate de sodium                                         | 5,0  |
| Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )                 | 0,1  |
| Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> )                 | 0,05 |
| Phosphate dipotassique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 2,0  |

Le milieu MRS a été préparé en solubilisant 55 g de poudre commerciale dans un litre d'eau. Après homogénéisation, le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 15 minutes.

### **Le milieu MRS modifié**

Pour analyser l'effet des teneurs en différentes sources de carbone (amidon, glucose, stachyose, raffinose) trouvées dans les matières premières de céréales ou de légumineuses sur les activités enzymatiques bactériennes, le milieu MRS dont la composition est donnée plus haut a été modifié par sa composition en sucre et par l'absence de polysorbate 80. La composition par litre de ce milieu modifié est la suivante en l'absence de source de carbone.

| <b>Composition</b>     | <b>g/l</b> |
|------------------------|------------|
| Peptone de caséine     | 10         |
| Extrait de viande      | 10         |
| Extrait de levure      | 5          |
| Source de carbone      | X          |
| Citrate d'ammonium     | 2.17       |
| Acétate de sodium      | 5          |
| Sulfate de magnésium   | 0.207      |
| Sulfate de manganèse   | 0.056      |
| Phosphate dipotassique | 2.62       |

### **Le milieu MRS-amidon**

Le milieu MRS-Amidon solide a été utilisé pour le test de détection de production d'amylase par les bactéries lactiques amylolytiques. La composition de ce milieu est donnée en g/l.

| <b>Composition</b>     | <b>g/l</b> |
|------------------------|------------|
| Peptone de caséine     | 10         |
| Extrait de viande      | 10         |
| Extrait de levure      | 5          |
| Citrate d'ammonium     | 2,17       |
| Acétate de sodium      | 5          |
| Sulfate de magnésium   | 0,207      |
| Sulfate de manganèse   | 0,056      |
| Phosphate dipotassique | 2,62       |
| Amidon soluble         | 20         |
| Agar                   | 15         |

L'amidon soluble (Prolabo) a été solubilisé dans de l'eau par chauffage avant d'être ajouté au reste du milieu. Après homogénéisation, l'ensemble a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### Le milieu MRS-Phytate solide

Ce milieu test était utilisé pour mettre en évidence la production de phytase par les bactéries lactiques sur boîtes de Petri. La composition de ce milieu est donnée en g/l.

| Composition          | g/l  |
|----------------------|------|
| Milieu MRS en poudre | 55 g |
| Agar                 | 15 g |
| Phytate de sodium    | 10 g |

L'acide phytique a été ajouté stérilement juste après la stérilisation du milieu de culture réalisée à 121°C pendant 15 minutes.

### Le milieu de Joosten et Northolt (1987) modifié

Ce milieu a été utilisé pour tester la capacité des souches bactériennes à produire des amines biogènes telles que l'histamine, la cadavérine, la putrescine, la spermine, la tyramine et la tryptamine par décarboxylation d'acides aminés. Seuls les acides aminés précurseurs de ces amines biogènes ont été utilisés dans le cadre de notre étude. Il s'agit essentiellement de la L-lysine, L-histidine, L-tyrosine et L-ornithine. Le test a été réalisé avec chacun des acides aminés précurseurs, lesquels étaient additionnés dans le milieu de culture avant la stérilisation. Ce test est réalisable sur milieu liquide ou solide.

| Composition             | g/l  |
|-------------------------|------|
| Tryptone                | 5    |
| Extrait de levure       | 5    |
| Glucose                 | 1    |
| Chlorure de sodium      | 5    |
| Acide aminé précurseur  | 20   |
| Pourpre de bromochrésol | 0,05 |
| Agar                    | 20   |

NB : le pH du milieu test a été ensuite ajusté à 5,0 car le pH optimum d'activité des décarboxylases pour la plupart des microorganismes est compris entre 5 et 6,5 (Teodorovic et al., 1994).

### Le milieu de dilution

Le milieu de dilution était composé de 9 g de NaCl/l d'eau distillée.

### Le milieu BHI (Brain Heart Infusion)

Ce milieu a été utilisé pour la culture des bactéries pathogènes comme *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Sa composition est la suivante:

| Composition du milieu BHI                    | g/l  |
|----------------------------------------------|------|
| Infusion cœur de cervelle (matières solides) | 6,0  |
| Digestion peptidique de tissu animal         | 6,0  |
| Chlorure de sodium                           | 5,0  |
| Glucose                                      | 3,0  |
| Digestion pancréatique de gélatine           | 14,5 |
| Phosphate disodique                          | 2,5  |

Le milieu BHI (Bacto) a été préparé en solubilisant 37 g de poudre commerciale dans 1 litre d'eau distillée. La solution a été ensuite chauffée sous agitation fréquente jusqu'à ébullition pendant 1 min avant d'être stérilisée à 121°C pendant 15 min. Le pH était de  $7,4 \pm 0,2$ .

## 3.2. Méthodes

### 3.2.1. Conditions de culture et détection de la production d'enzymes par les bactéries lactiques présélectionnées

#### 3.2.1.1. Conditions de culture

Toutes les souches présélectionnées ont été réactivées à partir d'un cryotube dans 5 ml de milieu MRS Broth pendant 24 h pour obtenir une pré-culture. Les cultures ont été obtenues par inoculation à 10% (v/v) de la pré-culture dans du milieu MRS liquide, puis une incubation a été ensuite réalisée pendant une nuit à 30°C. Ces cultures ainsi obtenues ont été utilisées pour la détection des activités enzymatiques recherchées.

#### 3.2.1.2. Détection de la production d'enzymes d'intérêt nutritionnel par les bactéries lactiques sur milieu test agar

Les tests de détection pour la production d'amylase, de phytase, d' $\alpha$ -galactosidase et de décarboxylase ont été réalisés sur la première sélection de souches. La méthode des spots a été utilisée pour repérer les souches qui ont des potentiels enzymatiques en vue d'une quantification de leur activité pour une sélection finale de souches potentielles starters. Brièvement, 3  $\mu$ l de culture d'une nuit obtenue sur milieu MRS liquide ont étéensemencées sous forme de spots sur boîte de Petri contenant chacun des milieux tests agar et une incubation a été ensuite réalisée à 30°C pendant 24 à 48 h.

### Production d'amylase

La production d'amylase a été testée comme décrit par Sanni et al. (2002) utilisant le milieu solide MRS-agar avec 2% (p/v) d'amidon soluble comme seule source de carbone et incubée comme décrit ci-dessus. Les boîtes de culture ont été ensuite recouvertes d'une solution de lugol (iode-iodure de potassium) pour révéler les zones d'hydrolyses traduites par la coloration jaune qui apparaît tout autour des colonies des souches amylolytiques.

### Production de phytase

La production de phytase a été détectée utilisant la technique de Bae et al. (1999) qui repose sur la disparition des précipités de complexe de calcium ou de sodium formés avec les phytates. Pour détecter cette activité, 1% de sodium-phytate a été additionné au milieu MRS-agar (15%) après stérilisation pendant 15 min à 121°C. Après incubation, les colonies présentes en surface ont été éliminées par lavage et les boîtes de culture recouvertes d'une solution aqueuse de chlorure de cobalt à 2% (p/v). Après 5 min d'incubation à température ambiante, la solution de chlorure de cobalt a été remplacée par une nouvelle solution contenant à volume égal, une solution aqueuse de molybdate d'ammonium à 6,25% (p/v) et une solution de vanadate d'ammonium à 0,42% (p/v). Après 5 min d'incubation, la solution de molybdate d'ammonium/vanadate d'ammonium a été rejetée et l'apparition de zones d'éclaircissement rend compte de la production de phytase.

### Production d' $\alpha$ -galactosidase

La production d' $\alpha$ -galactosidase a été détectée utilisant le milieu modifié décrit par Gilligand et Speck (1977). Il s'agit du milieu MRS-Agar ne contenant pas d'extrait de viande et de glucose et additionné de stachyose (0,309%, p/v) ou de raffinose (0,8%, p/v) et dont le citrate diammonium hydrogène a été remplacé par du citrate de sodium. Du rouge de chlorophenol a été additionné comme indicateur à 0,004%. Après incubation, les bactéries lactiques  $\alpha$ -galactosidasiques ont été révélées par une coloration jaune tout autour de leurs colonies.

### Production de décarboxylase

En présence de décarboxylases microbiennes, les acides aminés tels que la lysine, la tyrosine, l'histidine, l'ornithine, etc. peuvent subir une décarboxylation pour former des amines biogènes qui sont des composés indésirables (malodorants et toxiques). La présence de décarboxylases microbiennes est mise en évidence en utilisant le milieu test décrit par Joosten et Northol (1987). Ce milieu est composé de 0,5% de tryptone, 0,5% d'extrait de viande, 0,1% de glucose, 0,5% de chlorure de sodium, 2% de chaque acide aminé précurseur, 0,005% de pourpre de bromochrésol, 2% d'agar et ajuster à pH5. Un résultat positif a été révélé indiqué par un changement de couleur du milieu tout autour des colonies passant du bleu au jaune causé par la production d'amines biogènes alcalines. Ce test peut être également réalisé sur milieu liquide sans ajout d'agar.

### 3.2.1.3. Détermination du profil enzymatique des souches de bactéries lactiques présélectionnées

Le kit Apizym (bio Mérieux) a été utilisé pour déterminer le profil enzymatique des souches présélectionnées. Ce kit permet la détection de 19 enzymes qui appartiennent à plusieurs classes d'enzymes. Il s'agit des enzymes lipolytiques, protéolytiques, glucosidasiques, et phosphatases. Les tests enzymatiques ont été réalisés par inoculation avec une suspension dense de souches de bactéries lactiques à étudier. Les cellules de 1 ml de culture ont été récoltées dans un tube eppendorf par centrifugation à 13 000×g pendant 10 min. Ces cellules ont été lavées deux fois à l'eau distillée stérile avant d'être reprises dans 1 ml d'eau physiologique fournie par le fabricant. La suspension de cellules ainsi obtenue était diluée suivant les instructions du fabricant avant d'être inoculée dans la galerie contenant les substrats déshydratés des enzymes recherchées. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 4 heures. Des virages colorés traduisant la présence des enzymes recherchées ont été révélés par l'addition de réactifs fournis par Apizym. La lecture de ces réactions a été réalisée à l'aide d'un tableau de lecture fourni par API comparé à un blanc.

### 3.2.2. Quantification des activités enzymatiques des bactéries lactiques prometteuses

La quantification des activités enzymatiques a été réalisée sur la deuxième sélection de souches obtenues après le test qualitatif de mise en évidence de la production des enzymes d'intérêts nutritionnels recherchés. Au total, 5 souches ont été retenues parmi les 30 souches étudiées. Il s'agit des souches 6.1, 7.4, 3.7, 11.11.2, 4.4. Les souches 6.1 et 4.4 ont été retenues pour l'activité amylasique tandis que l'ensemble des souches a été quantifié pour les activités phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique.

#### 3.2.2.1. Dosage de l'activité amylasique

L'activité amylasique a été mesurée utilisant la méthode Ceralpha de Megazyme International (Irlande) basée sur le dosage du p-nitrophénol libéré par l'hydrolyse du p-nitrophényl maltoheptaoside sous l'action de l'alpha-amylase. Les souches amylolytiques identifiées et sélectionnées et la souche de référence amylolytique (*Lb. plantarum* A6) ont été inoculées sur milieu MRS modifié sans glucose contenant 1% d'amidon soluble. Après différents temps d'incubation (0, 6, 24 h), les cultures ont été centrifugées à 13 000×g pendant 10 min. L'analyse a été réalisée sur les surnageants de culture et les culots cellulaires, lesquels ont été obtenus par un double lavage à l'eau distillée stérile et resuspendus dans 1 ml de la même solution. La réaction a été réalisée en incubant dans 0,1 ml de p-nitrophényl maltoheptaoside (BPNPG7, 54,3 mg) en présence d'un excès d' $\alpha$ -glucosidase thermostable : 100 U à pH6, maintenu à 40°C, 0,1 ml de solution enzymatique (surnageant ou culot cellulaire resuspendu). La réaction a été stoppée après 10 minutes d'incubation par addition de 1,5 ml d'une solution de 20% (p/v) de tri-sodium phosphate. L'absorbance a été mesurée à 400 nm (Hitachi U-1800 UV-Vis). Une unité de l'activité est définie comme la quantité requise pour libérer une  $\mu$ mole de p-nitrophénol à partir du BPNPG7 par minute sous les conditions définies par l'essai. Les résultats sont exprimés en Unité Ceralpha (CU)/ml.

### 3.2.2.2. Dosage de l'activité phytasique

La méthode modifiée de Fiske et Subbarow (1925) a été utilisée pour le dosage des activités phytasiques. Les bactéries lactiques phytasiques identifiées et sélectionnées et les souches phytasiques de référence (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) ont été respectivement cultivées sur milieu MRS contenant 0,1% (p/v) de phytate de sodium et soit 0,2 ou 2% (p/v) de glucose et sur milieu BHI. L'activité phytasique a été déterminée à partir des surnageants de culture et des culots cellulaires en mesurant l'orthophosphate inorganique libéré par hydrolyse de l'acide phytique sous l'action de la phytase. La réaction a été réalisée en incubant 150 µl de la solution enzymatique avec 600 µl de 0,2% (p/v) de solution de phytate de sodium préparée à partir d'une solution tampon de 0,1 M d'acétate de sodium pH5, à 39°C. Après 30 min d'incubation, la réaction a été arrêtée par addition de 750 µl de 5% (p/v) de solution d'acide trichloroacétique. Le phosphate inorganique libéré a été mesuré par addition de 750 µl d'une solution de coloration fraîchement préparée par mélange de 4 volumes d'une solution de 1,5% (p/v) de molybdate d'ammonium dans 5,5% (v/v) de solution d'acide sulfurique et un volume de 2,7% (p/v) de solution de sulfate ferreux. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. La concentration de l'orthophosphate inorganique libéré a été déterminée à partir d'une gamme étalon de phosphate inorganique ( $K_2HPO_4$ ) comprise entre 0 et 1 mM. Une unité de l'activité phytasique est définie comme la quantité d'enzyme requise pour libérer une nanomole de phosphate par minute et par ml de milieu dans les conditions de l'essai.

### 3.2.2.3. Dosage de l'activité $\alpha$ -galactosidasique

L'activité  $\alpha$ -galactosidasique a été déterminée utilisant la méthode modifiée de Church et al. (1980). Cette méthode est basée sur la détermination du p-nitrophenol (p-NP) libéré par l'hydrolyse du p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (p-NPGP) par l'enzyme. Les souches  $\alpha$ -galactosidasiques sélectionnées ont été inoculées sur milieu MRS broth contenant 0,04% (p/v) de raffinose ou 0,12% (p/v) de stachyose avec soit 0,2 ou 2% de glucose. Après différents temps d'incubation (0, 6, 24 h), l'activité  $\alpha$ -galactosidasique a été mesurée à partir des surnageants de culture et les cellules resuspendues après centrifugation et double lavage comme précédemment décrit. Le mélange réactionnel était composé de 85 µl de solution enzymatique, 27,5 µl de tampon McIlvaine et 12,5 µl de 30 mM de p-nitrophenyl  $\alpha$ -D galactopyranoside (PNPG) puis incubés à 37°C pendant 15 min. La réaction a été stoppée par addition de 125 µl d'une solution de 0,5 M de carbonate de sodium. L'absorbance a été ensuite mesurée à 405 nm. Une gamme d'étalonnage établie à partir de solutions de p-nitrophénol de concentration comprise entre 2,5 et 25 mg/l a permis d'estimer la concentration en p-nitrophénol libéré. Une unité  $\alpha$ -galactosidasique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une  $\mu$ mole de p-nitrophénol à partir de son substrat par minute sous les conditions données de l'analyse. Les résultats sont exprimés en U/ml.

### 3.2.3. Préparation standardisée du *ben-saalga* amélioré au laboratoire

#### 3.2.3.1. Méthode de préparation du *ben-saalga* amélioré au laboratoire

Le procédé traditionnel de production du *ben-saalga* a été établi par Tou et al. (2006). En rappel, il consiste principalement en cinq opérations successives comprenant: le trempage, la mouture, le tamisage, la décantation pendant laquelle se déroule la fermentation et la cuisson.

Une méthode améliorée a été ensuite mise au point par Tou et al. (2007a) en vue d'une augmentation de la densité énergétique du *ben-saalga*. Elle consiste en l'addition, au procédé traditionnel, d'une étape de pré-cuisson avant la fermentation puis, après ajout de malt, en une inoculation par un pied de cuve. Dans le cadre de notre étude, une méthode de laboratoire a été utilisée conformément au procédé amélioré de production du *ben-saalga* décrit par Tou et al. (2007a). Cependant, contrairement à l'étude de Tou et al. (2007a) nous n'avons pas utilisé de malt. L'inoculation a été réalisée en utilisant soit des cultures pures seules ou en mélange de bactéries lactiques, soit un pied de cuve (pâte fermentée de la veille). L'utilisation de la méthode de laboratoire permet de pouvoir toujours opérer dans les mêmes conditions expérimentales et de mieux contrôler les paramètres de fabrication. Les conditions expérimentales de la méthode de laboratoire sont résumées dans la figure 7 et décrites ci après:

**Trempage** : Le trempage a été fait pendant 16 h dans un rapport mil-légumineuse/eau de 1:1,5 (p/p). La quantité de mélange propre utilisé était 250 g pour le mil/arachide et 300 g pour le mil/soja.

**Mouture** : A la fin de l'opération précédente, l'eau du trempage a été éliminée, et les grains ont été lavés dans un rapport mil-légumineuse/eau de (1:2 p/p), puis égouttés pendant 30 min. Les grains humides ont été ensuite broyés dans un broyeur de laboratoire (Warring, LB20E, USA) à la vitesse 7 pendant 3 min.

**Tamissage** : Le produit de mouture a été additionné d'eau dans un rapport pâte/eau de 1:3 (p/p) pour le mélange mil-arachide et de 1:3,5 pour le mélange mil-soja. L'ensemble a été malaxé et ensuite filtré à travers une mousseline très fine pour obtenir le filtrat.

**Pré-cuisson** : Le filtrat récupéré après l'opération de tamissage a été soumis à une cuisson de 10 min à compter de la température d'ébullition (85°C) pour gélatiniser l'amidon afin de le rendre plus sensible à l'attaque des amylases bactériennes.

**Inoculation et fermentation** : La pâte précuite obtenue après cuisson a été refroidie autour de 35°C. Elles ont été inoculées à 3 % (v/p) avec un pied de cuve ou à 1 et 2 % (v/p) avec les cultures starters comme indiqué plus haut. Un contrôle a été réalisé par fermentation naturelle (fermentation spontanée) de la pâte sans pré-cuisson. Les fermentations ont été réalisées pendant 24 h à température ambiante variant entre 32 et 39°C (température à Ouagadougou pendant la période d'essais).

**Cuisson** : Les pâtes fermentées de mélange mil-légumineuses ont été diluées et soumises à une cuisson de 5 min pour obtenir le *ben-saalga* amélioré.

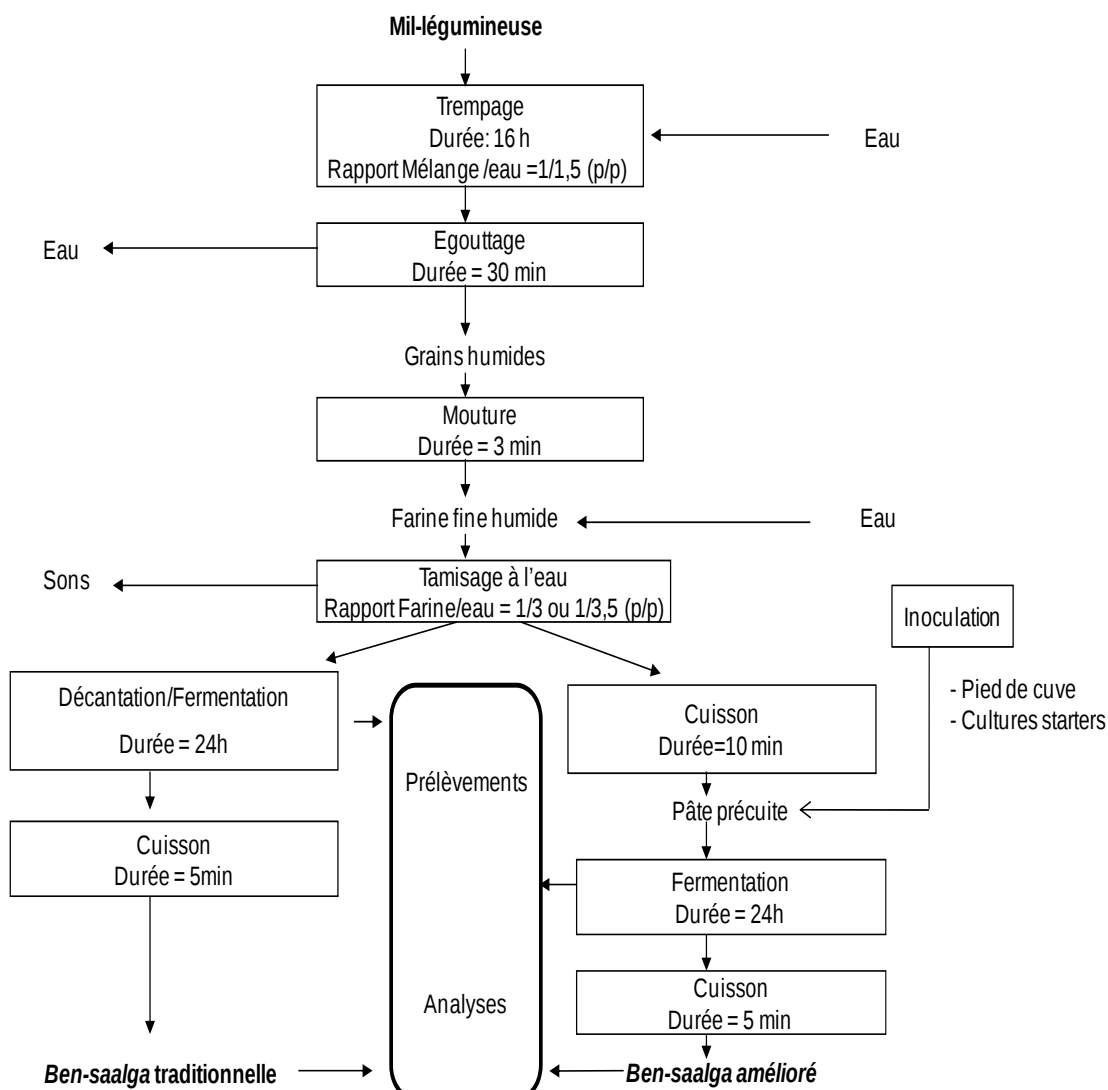


Figure 7: Diagramme de production au laboratoire du *ben-saalga* amélioré utilisant un starter naturel ou biologique

### 3.2.3.2. Suivi et contrôle de la fermentation des pâtes

Des prélèvements ont été réalisés durant la fermentation ou à différents stades de la fermentation destinés à déterminer des paramètres physico-chimiques, biochimiques, microbiologiques ou rhéologiques.

Pour les cinétiques de fermentation (monosaccharides et disaccharides, acides organiques et éthanol), 2 g d'échantillon ont été pris à intervalle de 2 heures durant les huit premières heures puis après 22 et 24 h de fermentation. L'échantillon a été aussitôt mélangé avec 8 ml d'eau distillée stérile. L'ensemble a été homogénéisé et 1,3 ml a été prélevé et introduit dans un tube eppendorf de 2 ml. 0,2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) a été additionné à chaque sous échantillon de 1,3 ml pour arrêter les réactions enzymatiques. Les microtubes ont été ensuite centrifugés à 8000×g à 4°C pendant 10 min et les surnageants des échantillons ont été récupérés et conservés à -20°C au laboratoire du DTA. Ces échantillons ont été transportés dans des glacières sous condition réfrigérée et acheminés en France par transport aérien et ensuite au laboratoire de l'UR 106 à Montpellier pour les analyses biochimiques.

Pour les analyses de biologie moléculaire ainsi que celles de détermination des teneurs en phytates, les échantillons de pâtes ont été pris au début et en fin de fermentation, lyophilisés et transportés à Montpellier pour analyses.

Seules les analyses de dénombrement des bactéries lactiques, de mesure de pH des pâtes et de mesures rhéologiques des bouillies fermentées ont été aussitôt réalisées à Ouagadougou dans les laboratoires du DTA et de l'IRD.

### 3.2.4. Analyses physico-chimiques et biochimiques des pâtes durant la fermentation et des matières premières utilisées

#### 3.2.4.1. Détermination et suivi du pH

Les changements de pH dans la pâte (filtrat) ont été suivis avec un pH-mètre enregistreur (WTW 340 i) Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

#### 3.2.4.2. Détermination de la matière sèche

Les teneurs en matière sèche des échantillons (matières premières, pâtes et bouillies) ont été déterminées à partir de 5 g de produit, par pesée différentielle, après passage à l'étuve à 105°C pendant une nuit jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

#### 3.2.4.3. Détermination des glucides

Les sucres (mono et diholosides), les  $\alpha$ -galactosides et les maltodextrines ont été analysés sur des surnageants d'échantillons de pâtes par chromatographie ionique haute performance (HPIC) en utilisant une colonne échangeuse d'anions Dionex Carbopac PA1 (4x250 mm) comme décrit par Calderon et al. (2001). Les conditions de chromatographie utilisées pour la phase mobile sont les suivantes : H<sub>2</sub>O ultrapure, NaOH 150 mM, gradient d'acétate de sodium de 0 à 300 mM, débit, 0.1 ml.min<sup>-1</sup>; et température, 34°C, pression 980 psi et volume injecté 25µl.

### 3.2.4.4. Détermination des acides organiques

Les acides organiques (acide lactique et acétique) et éthanol ont été analysés sur des surnageants d'échantillons de pâtes par chromatographie liquide haute performance (HPLC) comme préalablement décrit par Calderon et al. (2001) utilisant une colonne Aminex HPX-87H, 300x7.8 mm (Biorad, Yvry-sur-seine, France) connectée à un détecteur réfractomètre (Model Waters 2410; Biorad, Yvry-sur-Seine, France). Avant le passage dans la colonne, les échantillons ont été filtrés à travers une membrane de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité afin d'éliminer toutes les impuretés et éviter ainsi le colmatage de la colonne. La quantification des composés a été faite par la méthode d'étalonnage externe en utilisant différentes concentrations de l'étalon. Les conditions de l'analyse utilisées étaient : phase mobile,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (6  $\text{mmol.l}^{-1}$ ); débit, 0.8  $\text{ml.min}^{-1}$ , température, 65°C, pression 1000 psi, volume injecté 10  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.4.5. Détermination des phytates

Les phytates ou myo-inositol-hexaphosphate ont été dosés suivant la méthode décrite par Talamond et al. (1998) sur des échantillons de pâtes lyophilisés, prélevés en début et en fin de fermentation. L'extraction des phytates a été réalisée à partir d'échantillons lyophilisés de 100 mg additionnés de 5 ml d'acide chlorhydrique (0,5 N) contenus dans des tubes, placés dans des béchers d'eau bouillante pendant 6 min sous agitation. Le mélange a été ensuite centrifugé pendant 20 min à 4000 rpm. Le surnageant a été recueilli et repris dans 1,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange obtenu a été évaporé sous vide à 40°C pendant une nuit utilisant un speedvac (modèle RC 1010 Jouan). Le culot obtenu a été stocké à 4°C jusqu'au dosage. Pour le dosage, le culot a été repris dans un 1 ml d'eau milliQ, suivi d'une dilution au 50<sup>ème</sup>.

### 3.2.4.6. Mesure de la consistance des bouillies fermentées

Pour chaque essai expérimental de fermentation, 3 bouillies de concentration en matières sèches différentes ont été préparées par cuisson de la pâte fermentée diluée pendant 5 min. La consistance des bouillies a été estimée par la mesure de l'écoulement Bostwick (Bookwalter et al, 1968) décrite par Mouquet et al. (2006). Cette mesure a consisté à verser 100 g de bouillie dans le premier compartiment d'un consistomètre Bostwick (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, Virginia, USA). Le consistomètre a été disposé sur une surface plane horizontale (vérifiée à l'aide d'un niveau). Lorsque la température de la bouillie était autour de 45°C ( $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ), la gâchette de l'appareil était actionnée pour libérer la bouillie qui s'écoule alors dans le second compartiment. Le paramètre retenu correspond à la distance parcourue par le front de la bouillie en 30 s et les valeurs d'écoulement Bostwick s'expriment en mm/30 s. Ce paramètre varie de 0 (presque solide) à 240 mm/30s (très liquide, correspondant à une bouillie qui peut être bue).

En outre, la viscosité apparente des bouillies a été mesurée à 45°C utilisant un viscosimètre modèle Haake VT500 équipé d'un système de mesure de type cylindres coaxiaux SV-DIN. La vitesse et la durée de cisaillement ont été respectivement de 83.21  $\text{sec}^{-1}$  et 10 min. Les mesures de viscosité ont été exprimées en Pascal secondes (Pa.s).

### **3.2.5. Détermination de la composition globale et de la densité énergétique des bouillies fermentées et des matières premières utilisées**

Des échantillons de bouillies issus des différentes expériences ont été lyophilisés à l'aide d'un appareil de type *Beta 1-8 CHRIST LOC-2*.

#### **3.2.5.1. Dosage des protéines**

Les teneurs en protéines ( $N \times 6,25$ ) ont été dosées sur les échantillons lyophilisés par la méthode de Kjeldhal selon la norme NF V03-050 (AFNOR, 1970) 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. La teneur en protéines a été calculée à partir de la teneur en azote multipliée par le coefficient de conversion pour les céréales soit 6,25.

#### **3.2.5.2. Dosage des lipides**

Les lipides ont été extraits à l'éther de pétrole utilisant l'appareillage HT6 Soxtec (Tecator, Höganäs, Suède) selon la méthode officielle AOAC 2003.06 (AOAC, 2003). Le solvant a été ensuite évaporé et la masse des lipides éthérosolubles a été déterminée par gravimétrie et rapportée à la quantité de matière sèche initiale.

#### **3.2.5.3. Dosage des cendres**

Les cendres qui se composent d'éléments métalliques ou métalloïdes sous forme de sels (phosphates, chlorures, sulfates) et de résidus minéraux incombustibles provenant de la décomposition des matières organiques ont été déterminés par minéralisation au four à 530°C pendant 3 h selon la méthode NF V03-760 (AFNOR, 1981). Les teneurs ont été ensuite déterminées par pesée différentielle.

#### **3.2.5.4. Dosage des fibres insolubles**

Les fibres totales insolubles correspondant approximativement à la cellulose et à la lignine ont été dosées par la méthode gravimétrique de Van Soest (1963) utilisant un fibertec Dosi-fiber (Selecta, Barcelona, Spain).

#### **3.2.5.5. Détermination des teneurs en glucides totaux**

Les glucides totaux ont été calculés par différence ( $100 - (\text{protéines} + \text{lipides} + \text{fibres} + \text{cendres})$ ).

#### **3.2.5.6. Calcul de la valeur énergétique des bouillies**

La valeur énergétique des bouillies a été calculée pour une consistance souhaitable correspondant à un Bostwick flow de 120 mm/s (Vieu et al., 2001) en prenant 4 kcal/g comme coefficient de conversion pour les protéines et les glucides et 9 kcal/g comme coefficient de conversion pour les lipides. Les résultats ont été exprimés en kcal/100 g de bouillie.

### **3.2.6. Analyses microbiologiques et de biologie moléculaire**

#### **3.2.6.1. Dénombrement des bactéries lactiques**

Pour toutes les expériences de fermentation, 10 g d'échantillon de pâte ont été prélevés aseptiquement à 0 et 24 h de fermentation, puis mélangés avec 90 ml d'eau peptonée stérile et homogénéisés au stomacher 400 (Type BA 7021, England) pendant 2 minutes. A partir de cette suspension mère, une gamme de dilution décimale a été réalisée. 1 ml de chaque dilution a été coulé dans des boîtes de Petri et mélangé au milieu MRS Agar. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 48 h et les résultats obtenus exprimés en log cfu/g.

#### **3.2.6.2. Identification des espèces bactériennes dans les échantillons de pâtes fermentées de mélange mil-légumineuses**

##### **Extraction de l'ADN total des bactéries lactiques à partir des pâtes de mélange mil-légumineuse**

Prétraitement des échantillons de pâtes fermentées: 1,6 g d'échantillon de pâte lyophilisée a été prélevé et suspendu dans 10 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M à pH 8 dans un falcon de 50 ml, puis homogénéisé pendant 30 s à l'Ultra-turax (Jankel et Kinkel, IKA ultra-labortechnik T8 24000 tr/min). Les tubes ont été ensuite centrifugés à 13 000×g pendant 10 minutes à température ambiante, et le surnageant a été aussitôt éliminé. Les culots obtenus ont été repris dans 12 à 14 ml de NaCl à 0,9 %. Une séparation différentielle par centrifugation a été réalisée deux fois à 1000×g pendant 10 minutes à 4°C de façon à éliminer les grosses particules. Tous les surnageants ont été rassemblés et centrifugés de nouveau à 13000×g à 4°C pendant 20 minutes. Après l'étape de centrifugation, le culot (extrait de cellules bactériennes) a été récupéré dans un microtube et l'ADN total a été extrait utilisant le kit de purification Wizard genomic DNA A1120 (Promega, Charbonnières, France) suivant les instructions du fabricant ci après désignées.

Lyse des bactéries : elle a été réalisée sur les cellules bactériennes extraites des pâtes fermentées et sur les cellules des souches choisies comme marqueur et obtenues après culture sur milieu MRS ou BHI respectivement pour les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes. 480 µl d'EDTA 50 Mm et 500 µl de billes de zirconium 0.1 mm ont été ajoutés aux microtubes contenant les cellules bactériennes. Les microtubes ont été ensuite placés au Bead beater pendant 3 minutes à une vitesse maximale pour une lyse mécanique des cellules. 120 µl de lysozyme (TES) 20 mg/ml et 10 µl de mutanolysine (1U/µl) ont été ajoutés dans les microtubes, lesquels ont été centrifugés à 37°C pendant 1 h. Après l'incubation, 600 µl de solution de lyse nucléique ont été ajoutés dans les microtubes qui ont été ensuite incubés pendant 5 min à 80°C. Après refroidissement, une centrifugation a été réalisée à 13 000×g pendant 5 min pour éliminer les billes et les débris cellulaires tandis que le surnageant contenant l'ADN a été récupéré dans un microtube propre. 3 µl de solution de RNase a été additionné dans les tubes contenant l'ADN et après mélange les tubes ont été incubés à 37°C pendant 1 h.

Précipitation des protéines : Deux cents (200) µl de solution de précipitation des protéines ont été ajoutés dans les microtubes contenant l'ADN bactérien. Après homogénéisation au vortex,

les tubes ont été incubés dans la glace pendant 5 min et ensuite centrifugés à 13 000×g pendant 3 minutes.

Précipitation de l'ADN et réhydratation : Le surnageant a été transféré dans un microtube contenant 600 µl d'isopropanol conservé à la température ambiante. Après un mélange qui précipite l'ADN, une centrifugation a été réalisée à 13 000×g pendant 2 min et l'isopropanol a été ensuite éliminé. 600 µl d'éthanol à 70 % ont été ajoutés dans les tubes. Après un mixage, les tubes ont été centrifugés à 13 000 g pendant 2 min et l'éthanol ensuite éliminé. Une évaporation de l'éthanol a été réalisée en plaçant les tubes dans un speedvaac pendant 10 à 15 min. 100 µl de solution de réhydratation de l'ADN ont été ajoutés dans les tubes qui ont été conservés toute une nuit à 4°C.

### **Vérification de la qualité de l'ADN total extrait**

La qualité de l'ADN total extrait a été vérifiée sous lumière UV après migration sur gel d'agarose à 1 % à 100 V pendant 1 h dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X et la coloration au bromure d'éthidium (BET) 50 mg/l pendant 10 min.

### **Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) pour l'identification des bactéries lactiques**

L'ADN extrait a été amplifiée par PCR avec le couple d'amorces gc-338f (3'ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG) (338-357) et 518r (5'ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (518 à 534). Le mélange réactionnel PCR pour un volume final de 25µl contenait 1 µl d'extrait d'ADN, 2,5 µl de tampon PCR (10X), 0,5 µl de Dntp (10 Mm), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 Mm), 0,3125 µl d'amorce gc-338f (20 pmol/L), 0,3125 µl d'amorce 518r (20 pmol/L), 0,25 µl de taq polymérase (Promega M1886A, Charbonnière-les-Bains, France) et 18,625 µl d'eau Milli-Q stérile. L'amplification a été réalisée avec un total de 32 cycles dans un Thermocycler Perkin Elmer 9400. Le programme des cycles démarre avec une température de dénaturation à 94°C pendant 5 min, suivie de 20 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 65°C pendant 1 min et une élongation à 72°C pendant 3 min. Puis 10 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 55°C pendant 1 min et une élongation à 72°C pendant 3 min et le produit amplifié refroidi pendant 10 min. La qualité des produits PCR a été ensuite vérifiée sous lumière UV après migration sur gel d'agarose à 2 % à 100 V pendant 40 mn dans un tampon tris-borate-EDTA (TBE) 1X et la coloration au bromure d'éthidium (BET) 50 mg/l pendant 10 min. Les produits d'amplification de l'ADN ribosomal 16S des cinq souches de bactéries lactiques sélectionnées ont été séquencés par la société Eurofilms MWG GmbH (Ebersberg, Germany). Chaque souche a été ensuite identifiée par comparaison des séquences avec celles du Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>), les séquences ont été déposées à GenBank.

### **Analyse TTGE**

Pour l'analyse TTGE, 5 µl de produits d'amplification obtenus selon le protocole décrit par Ampe et al. (1999) ont été mélangés à 2µl de colorant et séparés sur un gel de polyacrylamide à 8% (p/v) contenant 6 M d'urée, 0, 1% d'APS, 6,6 Mm de TEMED dans un tampon tris-acétate-EDTA (TAE) 1X. La migration a été ensuite réalisée pendant 16 h à 70 V dans un

tampon TAE 1X avec l'appareil Dcode <sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System BIORAD. La température de migration était comprise entre 63°C et 70°C avec un gradient de température de 0,4°C/h. Après la migration, les gels ont été colorés 15 min dans un bain de TEA 1X contenant 0,5 µg/ml de BET (bromure d'éthidium). Après 15 min de rinçage sous agitation dans du TEA 1X, les gels ont été visualisés sur une table de transillumination UV et photographiés.

Les profils obtenus ont été comparés à ceux réalisés avec des souches connues afin de déterminer présomptivement les bactéries présentes dans les échantillons.

## **Chapitre 4. Résultats et discussion**

#### **4.1. Article 1 : Caractérisation des propriétés enzymatiques d'intérêts nutritionnels des bactéries lactiques isolées de pâtes fermentées de mil d'ateliers de production de ben-saalga à Ouagadougou.**

##### **4.1.1. Résumé introductif**

Les bactéries lactiques et leurs enzymes influent sur la qualité des aliments et des boissons fermentés. Connaître leur potentiel enzymatique est nécessaire pour sélectionner les souches de bactéries lactiques sur leur capacité à améliorer les caractéristiques qualitatives telles que la biodisponibilité des nutriments, la densité énergétique, la digestibilité, l'apparence, la saveur ou autres.

Récemment, certains auteurs (Tou et al., 2007, Nguyen et al., 2007a,b) ont rapporté la capacité des bactéries lactiques amylolytiques à hydrolyser l'amidon gélatinisé, ce qui permet d'obtenir des bouillies de densité énergétique suffisante à une consistance facilement acceptable par les nourrissons et les jeunes enfants. De même, l'hydrolyse des phytates par l'action des phytases endogènes et des bactéries lactiques à caractère phytasique a été rapportée dans de nombreuses fermentations lactiques des céréales, contribuant à une augmentation de la biodisponibilité des minéraux essentiels comme le fer, le zinc, le calcium etc. (Tou et al., 2006; Svanberg et Sandberg, 1988; Mahajan et Chauhan, 1987; Lopez et al., 1983). Par ailleurs, l'hydrolyse des  $\alpha$ -galactosides principalement le raffinose et le stachyose qui sont présents dans les graines de céréales et plus particulièrement chez les légumineuses, réduit les phénomènes de flatulence et de diarrhées.

Cette première partie du travail a eu pour objectif d'évaluer le potentiel enzymatique des bactéries lactiques isolées du *ben-saalga* en relation avec les caractéristiques nutritionnelles des bouillies utilisées dans l'alimentation complémentaire du jeune enfant, puis de sélectionner celles qui ont les activités les plus importantes pour leur utilisation comme cultures starters. Sur 30 souches criblées sur boîtes de Petri, seulement cinq souches ont été repérées comme des souches potentiellement prometteuses ayant la capacité d'hydrolyser soit l'amidon soit les phytates et encore les  $\alpha$ -galactosides.

Les activités enzymatiques de ces souches prometteuses ont été quantifiées in vitro après culture sur milieu MRS contenant leur substrat d'hydrolyse à des concentrations connues proches de celles observées dans les fermentations naturelles des pâtes de mil en vue d'une sélection finale de souches starters. Toutes les activités mesurées sont exclusivement liées à la cellule quelle que soit la souche. Aussi, les niveaux des activités sont variables entre les souches et les espèces de bactéries lactiques. En effet, les deux isolats naturels du *ben-saalga*, *Lb. plantarum* 6.1 et 4.4 ont montré de très faibles activités amylolytiques comparativement à la souche de référence *Lb. plantarum* A6, étudiée par plusieurs auteurs (Pintado et al., 1999). Nos résultats ont également montré que les activités phytasiques et  $\alpha$ -galactosidasiques des souches sont plus fortes quand la concentration en glucose du milieu augmente. Les plus fortes activités phytasiques ont été trouvées chez *Lb. plantarum* 4.4 et 6.1 ( $348,7 \pm 17,4$  et  $276,3 \pm 51,4$  U/ml U/ml) et *Lb. fermentum* 7.4 (et  $276,3 \pm 13,2$  U/ml, respectivement). Aussi, l'activité  $\alpha$ -galactosidasique des souches est plus importante en présence de stachyose que de

raffinose. Les niveaux d'activité  $\alpha$ -galactosidasique les plus élevés sont rencontrés chez *Lb. fermentum* 3.7 et *Lb. pentosus* 4.4 ( $1444,1 \pm 132,7$  et  $1223,1 \pm 148,4$  U/ml) en présence de stachyose et chez *Lb. plantarum* 4.4 ( $763,3 \pm 23,5$  U/ml) en présence de raffinose.

Ces résultats nous ont ainsi permis de sélectionner 3 souches potentiellement prometteuses pour être utilisées comme cultures starters. Par ailleurs, la détection d'activités phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique chez les bactéries lactiques est en cohérence avec l'observation de la diminution de la concentration en phytates et en raffinose lors de la fermentation naturelle des pâtes de mil dans les ateliers ouagalais de production de *ben-saalga*. Cependant il restera à déterminer si ces souches seront capables d'exprimer leur potentiel au sein des matrices alimentaires des formules améliorées.

**4.1.2. Article 1: Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (*ben-saalga*) of functional interest in nutrition**



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)



## Short communication

# Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (*ben-saalga*) of functional interest in nutrition

L.T. Songré-Ouattara<sup>a</sup>, C. Mouquet-Rivier<sup>b</sup>, C. Icard-Vernière<sup>b</sup>, C. Humblot<sup>b</sup>, B. Diawara<sup>a</sup>, J.P. Guyot<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> IRSAT, Département Technologie Alimentaire, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

<sup>b</sup> IRD (Institut de Recherche pour le Développement), BP 64501, UR106, « Nutrition, Alimentation, Sociétés », 34394 Montpellier, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 January 2008

Received in revised form 8 September 2008

Accepted 9 September 2008

### Keywords:

Lactic acid bacteria

Amylase

Phytase

$\alpha$ -galactosidase

Pearl millet

Young children complementary food

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria responsible for the fermentation of a pearl-millet based fermented gruel, *ben-saalga*, were investigated for enzyme activity in relation with the nutritional characteristics of gruels used as complementary foods for young children. Thirty pre-selected LAB from a set of 155 isolates were characterized principally for their ability to produce amylase, phytase and  $\alpha$ -galactosidase. Two *Lactobacillus plantarum* strains (4.4 and 6.1) and three *Lactobacillus fermentum* strains (11.11.2, 3.7, 7.4) able to produce one or more of these enzymes were selected. Only weak amylase activity was found in the two *Lactobacillus plantarum* strains.  $\alpha$ -amylase activity was associated with cells and was lower than 0.05 Ceralpha Units/ml. Phytase activity was detected in all five strains and was linked to the cell. The highest phytase activity was found in *Lb. plantarum* 4.4 and 6.1 ( $348.7 \pm 17.4$  U/ml and  $276.3 \pm 51.4$  U/ml, respectively) and *Lb. fermentum* 7.4 ( $276.3 \pm 13.2$  U/ml). All strains displayed a cell-linked  $\alpha$ -galactosidase activity. In a medium containing 2% glucose, the highest cellular activity was found in *Lb. fermentum* 3.7 ( $1441.1 \pm 133.7$  U/ml) and *Lb. plantarum* 4.4 ( $1223.1 \pm 148.3$  U/ml) after 6h of fermentation in the presence of stachyose, and in *Lb. plantarum* 4.4 ( $763.3 \pm 23.5$  U/ml) and *Lb. fermentum* 7.4 ( $346.7 \pm 14.8$  U/ml) after 24h of fermentation with raffinose. These results are consistent with previous observations showing that phytates and  $\alpha$ -galactooligosaccharides decreased during the natural lactic acid fermentation of pearl millet slurries, and that partial starch hydrolysis can be performed by endogenous microflora provided a pre-gelatinisation step is included in the process.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Ben-saalga* is a traditional gruel made in Burkina Faso by cooking a diluted lactic acid fermented paste of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Tou et al., 2006). In Ouagadougou, the capital of Burkina Faso, this gruel is consumed by adults and is also regularly eaten by about 37% of children less than 5 years old as a complementary food to breast feeding (Guyot et al., 2003). The characteristics of *ben-saalga* do not meet the nutritional requirements of young children (Mouquet et al., in press; Tou et al., 2006). Mainly, the energy density of this traditional gruel is lower than the minimum value of 84 kcal/100g of gruel recommended for children of 9–11 months of age at a rate of 2 meals/day added to average breast milk intake (Dewey and Brown, 2003). Adding more starchy material would allow increasing the energy density of the traditional gruels, provided starch is partially hydrolysed to maintain a suitable semi-liquid consistency for young children. Tou et al. (2007) showed the presence of amylolytic LAB (ALAB) in the fermented pearl millet paste and underlined the ability of natural microflora to hydrolyse starch when

a pre-gelatinisation step is introduced in the traditional process. Selected ALAB could be used as starter for such a purpose. Another issue is the presence of antinutritional factors such as phytates and  $\alpha$ -galactooligosaccharides ( $\alpha$ -GOS), (e.g. stachyose and raffinose) in legumes, pulses and cereals. Phytates contribute to the low mineral availability in foods and  $\alpha$ -GOS cause gastrointestinal disorders. However, the fermentation of pearl millet slurry to produce *ben-saalga* showed a marked decrease in the phytate and  $\alpha$ -GOS concentrations (Guyot et al., 2003) which was putatively attributed to the metabolic activity of LAB (Tou et al., 2006).

The use of starter cultures with technological and functional properties has been suggested to optimise fermentation conditions and improve the quality of fermented foods (De Vuyst, 2000; Leroy et al., 2006). According to Leroy et al. (2006), functional starter cultures could improve microbial safety or represent organoleptic, technological, nutritional, or health advantages. In the present study, we considered low energy density and bioavailability of minerals to be the main nutritional issues to be addressed to improve the nutritional quality of cereal-based fermented gruels used as complementary foods for young children. The objective of this work was to determine if the LAB isolated from *ben-saalga* display enzyme activities (i.e. amylase and phytase) that could help in improving these nutritional characteristics. These isolates

\* Corresponding author. Tel.: +33 467416285.

E-mail address: [jpguyot@ird.fr](mailto:jpguyot@ird.fr) (J.P. Guyot).

were also investigated for  $\alpha$ -galactosidase activity. Furthermore, since LAB can produce biogenic amines which could affect the quality of the fermented product, complementary tests to detect amino acid decarboxylase activities were performed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preliminary screening of LAB isolates

155 isolates were obtained from fermented pearl-millet slurries sampled in 12 different traditional production units in Ouagadougou. All isolates produced lactic acid, alone or with ethanol, as major product of glucose fermentation, were Gram positive and catalase negative and were assigned to the LAB group. Biochemical characters were determined using API 50CHL tests (BioMérieux, France) (data not shown). Among these isolates, 30 isolates were pre-selected for their ability to ferment starch and degrade phytic acid (IP6). Tests were performed as described below. Only the results regarding these 30 strains are presented here.

Three collection strains were also used as positive controls: *Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053) for amylase activity, *Escherichia coli* (ATCC 10798) and *Bacillus subtilis* (ATCC 23857) for phytase activity. Stock cultures of the isolates were stored in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth medium for LAB or Brain Heart Infusion (BHI) for *E. coli* and *B. subtilis*, containing 40% glycerol (Carlo Erba, Italy) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For routine cultivation, the strains were grown overnight in MRS broth or BHI at  $30^{\circ}\text{C}$ . All strains were inoculated at 10% (v/v).

**Table 1**  
Ability of the 30 pre-selected LAB isolates to hydrolyse starch and phytate, and detection of decarboxylase activity

| Isolate number | Hydrolytic enzyme activities               |     | Decarboxylase activity |             |             |            |
|----------------|--------------------------------------------|-----|------------------------|-------------|-------------|------------|
|                | Diameter of halo surrounding colonies (mm) |     | L-lysine               | L-histidine | L-ornithine | L-tyrosine |
| 1.5.2          | –                                          | 8   | –                      | –           | –           | –          |
| 1.6            | –                                          | 7   | –                      | –           | –           | –          |
| 1.8            | 4                                          | 9   | +                      | –           | +           | +          |
| 2.17.1         | –                                          | 9   | –                      | –           | –           | –          |
| 3.1            | –                                          | 9   | –                      | –           | –           | –          |
| 3.2            | –                                          | 6   | –                      | –           | –           | –          |
| 3.6            | –                                          | 8   | –                      | –           | –           | –          |
| 3.7            | –                                          | 11  | –                      | –           | –           | –          |
| 3.10.1         | –                                          | 8   | –                      | –           | –           | –          |
| 4.4            | 6                                          | 8   | +                      | +           | +           | +          |
| 4.5            | –                                          | 9   | +                      | +           | +           | +          |
| 4.8.2          | –                                          | 7   | +                      | +           | +           | +          |
| 4.9            | 4                                          | 7   | +                      | –           | +           | +          |
| 4.11.1         | –                                          | 8   | –                      | –           | –           | –          |
| 5.6.2          | 4                                          | 0   | –                      | +           | –           | –          |
| 5.7            | 4                                          | 8   | +                      | +           | +           | +          |
| 5.11           | –                                          | 7   | +                      | +           | +           | +          |
| 6.1            | 9                                          | 10  | +                      | +           | +           | +          |
| 6.6.2          | –                                          | 6   | +                      | +           | +           | +          |
| 6.9            | –                                          | 7   | –                      | –           | –           | –          |
| 7.4            | –                                          | 11  | –                      | –           | –           | –          |
| 7.9.1          | –                                          | 0   | +                      | +           | +           | +          |
| 8.12           | 4                                          | 7   | +                      | +           | +           | +          |
| 10.2           | 4                                          | 8   | –                      | +           | –           | –          |
| 10.8           | –                                          | 6.5 | +                      | –           | +           | +          |
| 10.9           | 4                                          | 7.5 | +                      | –           | +           | +          |
| 11.1           | –                                          | 6   | –                      | –           | –           | –          |
| 11.11.1        | 4                                          | 9   | –                      | –           | –           | –          |
| 11.11.2        | –                                          | 10  | –                      | –           | –           | –          |
| 12.7           | 4                                          | 6   | +                      | +           | +           | +          |

From this set of pre-selected isolates, four strains selected for more specific activity tests were identified by sequence comparison of the amplification products of part of the 16S rRNA gene. Total DNA was extracted from overnight cultures in MRS broth using the Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, Charbonnières, France). Primers 338f and 518r were used to amplify the 16S rRNA encoding genes as previously described (Ampe et al., 1999). The PCR product was sequenced by Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Germany). Each sequence was identified by comparison with the Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>) and deposited at GenBank.

### 2.2. Detection of enzyme activities

Preliminary tests to screen for the production of phytase, amylase and decarboxylase by the LAB isolates were performed by the spot-on-a-lawn method. Briefly, 3  $\mu\text{l}$  of overnight cultures in MRS broth were spotted on an agar test medium and incubated at  $30^{\circ}\text{C}$  for 24 to 48 h.

The phytase activity of strains was detected using a specific method described by Bae et al. (1999). Production of amylase was tested as described by Agati et al. (1998). The test to detect the decarboxylase activity for the production of different biogenic amines in the pre-selected LAB group strains was performed as described by Joosten and Northolt (1987). The ability of the strains to ferment raffinose was determined on the basis of the fermentation of raffinose in the API 50 CHL test kit.

The enzymatic profiles of the 30 strains were also determined using the Apizym test kit (bioMérieux, France) according to the manufacturer's instructions.

### 2.3. Measurement of enzyme activities

For a given enzyme activity, experiments were performed at the same time under identical growth conditions (same growth medium and substrate concentration), allowing comparisons between strains considering that activity values in the given periods of time can be assimilated to productivity, more particularly to overall productivity at 24 h (Pirt, 1985) (Figs. 1–3). Therefore it is not intended here to make comparisons on the basis of specific rate of product (enzyme) formation.

Cell growth was measured as absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ) using a Spectronic 401 spectrophotometer (Milton Roy, Paris, France). At  $A_{600} > 0.4$ , cell cultures were diluted in sterile medium before measurements and  $A_{600}$  values were then corrected for dilution (Koch, 1981).

For activity measurements, the cell cultures were centrifuged at 10 000 g for 10 min. Assays were performed on the supernatant and on cells. The cells were washed twice in sterile distilled water, resuspended in the same solution.

#### 2.3.1. $\alpha$ -amylase activity

$\alpha$ -amylase activity of strains was assayed using the Ceralpha method from Megazyme International (Ireland) (Ceralpha method, 2004). According to the manufacturer, one unit of activity (Ceralpha Unit) is defined as the amount of enzyme required to release one micromole of p-nitrophenol from BPNPG7 per minute under the defined assay conditions. Results are expressed in Ceralpha Units (CU)/ml.

#### 2.3.2. Phytase activity

The strains were cultivated in MRS broth containing 0.1% (w/v) of sodium phytate (Sigma, France) and either 0.2 or 2% (w/v) glucose (Sigma, France). Phytase activity was determined according to the method of Fiske and Subbarow (1925). One unit (U) was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 nmol of phosphate from sodium phytate per min under the assay conditions. The results are expressed as U/ml.

#### 2.3.3. $\alpha$ -galactosidase activity

The strains were inoculated in MRS broth containing 0.04% (w/v) raffinose (Sigma, France) or 0.12% (w/v) stachyose (Sigma, France)

**Table 2**  
Determination of the hydrolytic activities of the 30 pre-selected LAB isolates from ben-saalga using the Apizym test kit

| Pre-selected isolates | Alkaline phosphatase | Esterase C4 | Esterase lipase C8 | Lipase C14 | Leucine arylamidase | Valine arylamidase | Cystine arylamidase | Trypsin | $\alpha$ -chymotrypsin | Acid phosphatase | Naphtol AS-BI-phosphohydrolase | $\alpha$ -galactosidase | $\beta$ -galactosidase | $\beta$ -glucuronidase | $\alpha$ -glucosidase |
|-----------------------|----------------------|-------------|--------------------|------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 1.5.2                 | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | +                     |
| 1.6                   | +                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 1.8                   | +                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 2.17.1                | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | ±                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 3.1                   | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | +                     |
| 3.2                   | +                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | +                     |
| 3.6                   | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | +                     |
| 3.7                   | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | +                     |
| 3.10.1                | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | +                     |
| 4.4                   | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 4.5                   | ±                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | ±                   | -       | -                      | +                | ±                              | +                       | +                      | ±                      | +                     |
| 4.8.2                 | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 4.9                   | +                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 4.11.1                | -                    | ±           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 5.6.2                 | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 5.7                   | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 5.11                  | ±                    | +           | +                  | ±          | +                   | +                  | ±                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 6.1                   | -                    | -           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 6.6.2                 | ±                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 6.9                   | +                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 7.4                   | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 7.9.1                 | +                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | ±                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 8.1.2                 | -                    | -           | -                  | -          | +                   | +                  | -                   | -       | -                      | +                | +                              | -                       | -                      | -                      | -                     |
| 10.2                  | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 10.8                  | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 10.9                  | -                    | -           | -                  | -          | +                   | +                  | ±                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | -                      | +                     |
| 11.1                  | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | -                     |
| 11.11.1               | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | -                     |
| 11.11.2               | -                    | +           | +                  | -          | +                   | +                  | +                   | -       | -                      | +                | +                              | +                       | +                      | +                      | -                     |
| 12.7                  | -                    | -           | -                  | -          | +                   | +                  | ±                   | -       | -                      | +                | +                              | -                       | -                      | -                      | -                     |

with 2% glucose.  $\alpha$ -galactosidase activity in the supernatant and resuspended cells after centrifugation was determined using the modified method described by Church et al. (1980). One unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1.0  $\mu$ mol of pNP from its substrate pNPG per min under the given assay conditions. The results are expressed as U/ml.

Results are mean values of triplicate experiments with standard errors.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Pre-selection of strains displaying amylase and phytase activity

Based on the tests performed to detect amylase and phytase activity 30 isolates were pre-selected (Table 1). Eleven isolates were able to produce amylase among them isolates 6.1 and 4.4 had the largest hydrolysis zone (Table 1). For phytase production, 28 isolates displayed clearing zones around their colonies in the phytate agar plate test. The largest diameters were obtained with the following isolates 3.7, 7.4, 6.1 and 11.11.2. These results are consistent with previous reports showing that ALAB are common inhabitants of cereal fermented foods (Agati et al., 1998; Diaz-Ruiz et al., 2003; Tou et al., 2006) and that the degradation of phytate occurred during lactic acid fermentation of cereals (Svanberg et al., 1993). In contrast, studies on phytasic LAB isolated from such fermented foods are rare. In sourdough bread, De Angelis et al. (2003) showed that the dominant species *Lb. sanfranciscensis* displayed high phytase activity. However in other traditional fermented cereal-based foods main microorganisms responsible for this activity remain to be identified.

As for  $\alpha$ -galactosidase activity, all 30 isolates characterized either for their amylase or phytase activities were able to ferment raffinose. The presence of LAB with the ability to hydrolyse both phytate and  $\alpha$ -GOS is consistent with a decrease in their contents during the natural fermentation of pearl-millet slurry (Guyot et al., 2003).

Decarboxylases that form biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine) by decarboxylation of their precursor amino acids (L-lysine, L-histidine, L-ornithine and L-tyrosine) were also characterized in the 30 pre-selected strains (Table 1). Sixteen strains were positive for this test. However in cereal-based fermented foods, production of biogenic amine is of minor importance compared to other foods with higher protein content.

The Apizym test was used to further investigate the enzymatic profiles of the 30 pre-selected isolates (Table 2). All showed peptidase activity such as leucine arylamidase, valine arylamidase and cystine arylamidase, except the isolate 8.12 which did not produce cystine arylamidase. However, nearly no trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin activities were detected in most of the isolates. The same results were obtained for LAB isolated during the fermentation of cassava for gari production (Kostinek et al., 2007). The absence of proteolytic activity could be considered as a positive characteristic, since protein hydrolysis and further metabolism of degradation products may generate off-flavours and toxic compounds such as biogenic amines (Kostinek et al., 2007). None of the 30 isolates displayed lipase (C14) activity, in contrast other lipolytic activities such as esterase (C4) and esterase-lipase (C8) activities were present in most of them.  $\beta$ -glucuronidase activity was observed only in a few isolates. According to Humblot et al. (2007),  $\beta$ -glucuronidase activity is undesirable in the host colon since it may convert procarcinogens into carcinogens.

Among the activities of potential interest in the improvement of the nutritional quality of cereal-based fermented gruels, all isolates displayed acid phosphatase activity. However the acid phosphatase test of Apizym is not specific for phytases, so it is not surprising that a few isolates displayed negative results when they were more specifically investigated for phytase activity (Table 1). Phytases more specifically catalyse the hydrolysis of phytic acid in a stepwise manner to lower inositol phosphates, myo-inositol and inorganic phosphate

(Vats and Banerjee, 2004). As for the  $\alpha$ -galactosidase activity of the Apizym test, most strains were positive except two isolates which were able to ferment raffinose in the API 50CHL test kit.

From the preliminary tests to detect amylase and phytase activities, isolates 6.1, 7.4, 3.7, 11.11.2 and 4.4 were selected for more specific activity tests. Based on molecular typing, isolates 11.11.2., 3.7. and 7.4. were identified as belonging to *Lactobacillus fermentum* whereas isolates 4.4. and 6.1. were identified as *Lactobacillus plantarum*. Partial sequences of the 16S rRNA gene were deposited at GenBank under the following accession numbers: EU931242 for *Lactobacillus fermentum* strain 11.11.2; EU931243 for *Lactobacillus fermentum* strain 3.7; EU931244 for *Lactobacillus fermentum* strain 7.4; EU931245 for *Lactobacillus plantarum* strain 4.4 and EU931246 for *Lactobacillus plantarum* strain 6.1. For each species, strains had a different API 50 CHL profile (not shown). All these strains displayed phytase and  $\alpha$ -galactosidase activity, only *Lb. plantarum* 6.1 and 4.4 displayed amylase activity.

### 3.2. Characterisation of the $\alpha$ -amylase activity of *Lb. plantarum* 6.1 and 4.4

Strains 6.1 and 4.4 were selected for quantification of their activity after their growth on MRS-starch medium. No extracellular  $\alpha$ -amylase activity was detected in their culture supernatant, only cell-linked amylase activity was found. Similarly to the ALAB isolated from Mexican *pozol* (Diaz-Ruiz et al., 2003), the strains selected from fermented pearl millet slurries were weakly amylolytic. Their amylase activity was lower than 0.05CU/ml of cultivation medium and very weak compared to the activity of the reference strain *Lb. plantarum* A6, which displayed an activity of 0.42CU/ml (Fig. 1).

### 3.3. Phytase activity of the selected phytasic LAB strains

The phytase activity in LAB strains and strains used as positive control was only found associated with cells, which is in agreement with the results of other studies (De Angelis et al., 2003; Palacios et al.,

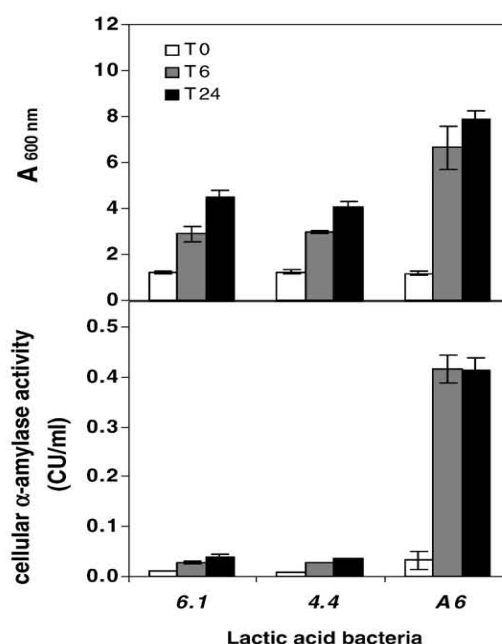


Fig. 1.  $\alpha$ -amylase activity of selected lactic acid bacteria measured after 0, 6 and 24 h of culture on MRS-starch with *Lactobacillus plantarum* A6 as positive control.

2008). Activities after 24h of fermentation were found to be  $28.1 \pm 1.7$  U/ml and  $84.7 \pm 12.9$  U/ml for the positive control strains *B. subtilis* ATCC 23857 and *E. coli* ATCC 10798, respectively, however for these strains the level of growth measured at  $A_{600}$  was low, between 1.5 and 2 (data not shown). For the LAB strains, the level of activity varied with the strain (Fig. 2). After 24h of fermentation, the activities of strains varied between  $236.8 \pm 22.8$  and  $348.7 \pm 17.4$  U/ml in the MRS-phytate medium rich in glucose (2%) and between  $66.7 \pm 4.0$  and  $98.3 \pm 11.9$  U/ml at a low glucose concentration (0.2%). This suggests that a higher level of phytase production depends on a higher bacterial growth level. *Lb. plantarum* 4.4 displayed the highest level of activity, followed of *Lb. plantarum* 6.1.

Activities determined for the *ben-saalga* strains were in the same range of those reported for several LAB isolated from bread sourdough. Using similar conditions of phytase activity assay De Angelis et al. (2003) found values ranging between 7.6 to 420.8 U/ml.

## 3.4. $\alpha$ -galactosidase activity of the selected LAB strains

The amylolytic and phytasic strains were further investigated for their  $\alpha$ -galactosidase activity on raffinose and stachyose. These two  $\alpha$ -GOS were added in MRS-glucose medium at low concentrations similar to those found under the fermentation conditions used for the production of *ben-saalga*.

Maximum growth was observed with *Lb. plantarum* 6.1 and 4.4 (Fig. 3). All strains displayed cellular  $\alpha$ -galactosidase activity, and no extra-cellular activity was found. With stachyose, after 6h the activity was higher than after 24h suggesting the rapid disappearance or inhibition of the corresponding enzyme (Fig. 3). *Lb. fermentum* 3.7 and *Lb. plantarum* 4.4 displayed the highest activities,  $1444.1 \pm 132.7$  and  $1223.1 \pm 148.4$  U/ml, respectively, whereas *Lb. plantarum* 6.1 displayed very low activity (Fig. 3). With raffinose, the strain *Lb. plantarum* 4.4 displayed the highest activity after 24h of fermentation ( $763.3 \pm 23.5$  U/ml).

Under the growth conditions used, the activities obtained with stachyose were much higher than those obtained with raffinose. This

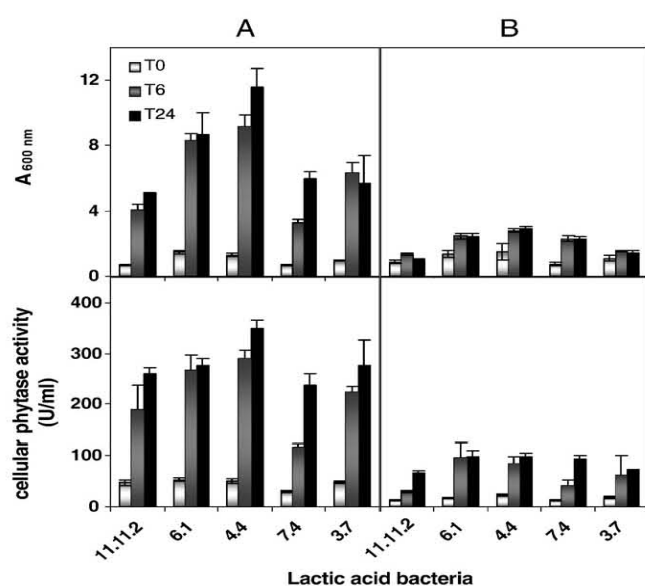


Fig. 2. Phytase activity of the selected phytasic lactic acid bacteria after 0, 6 and 24 h of culture on MRS-glucose (2%) + phytate (0.1%) (A); MRS-glucose (0.2%) + phytate (0.1%) (B).

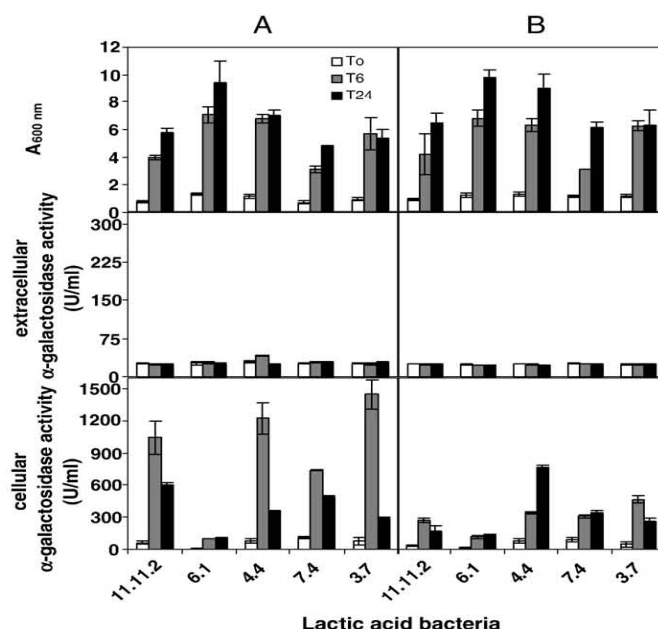


Fig. 3.  $\alpha$ -galactosidase activity of selected lactic acid bacteria after 0, 6 and 24 h of culture on MRS-glucose (2%) + stachyose (0.12%) (A); and MRS-glucose (2%) + raffinose (0.04%) (B).

might indicate that stachyose is a better substrate to produce  $\alpha$ -galactosidase, but in our study it might be possible that raffinose was not present at a sufficient concentration to allow a high level of  $\alpha$ -galactosidase production. However, Garro et al. (1996) showed that for *Lb. fermentum* CRL 251 stachyose was a much more effective inducer of  $\alpha$ -galactosidase than different  $\alpha$ -GOS. Nevertheless, for that strain, the activity reported for stachyose (34 U/ml) (Garro et al., 1996) was lower than that of *ben-saalga* strains.

## 4. Conclusion

Phytase and  $\alpha$ -galactosidase activities of LAB strains are consistent with observations that phytate and  $\alpha$ -GOS contents decrease during natural fermentation of pearl millet (Guyot et al., 2003). Also, isolation of amylolytic LAB is consistent with previous microbial counts in fermented pearl millet slurry (Tou et al., 2006) and with the natural starch hydrolysis reported to occur when a pre-gelatinisation step is introduced in the traditional process (Tou et al., 2007). However natural amylolysis due to the endogenous microflora is not efficient enough to adequately modify the rheological properties of pearl millet gruels (Tou et al., 2007), which is consistent with the weak amylase activity of the *ben-saalga* LAB strain. The effectiveness of the selected strains, i.e. *Lb. fermentum* strains 7.4, 3.7 and 11.11.2 and *Lb. plantarum* strains 4.4 and 6.1, to hydrolyse starch and remove phytate and  $\alpha$ -GOS in pearl millet slurries will consequently be the subject of further investigation.

## Acknowledgements

This research was co-funded by the European Commission (project Cerefer, contract N° ICA4-CT-2002-10047) and the International Foundation for Science (IFS). L.T. Songré-Ouattara thanks the Institute of Research for Development (IRD) and the French Embassy in Burkina Faso for research grants.

**4.2. Evaluation des bactéries lactiques sélectionnées pour leurs capacités à hydrolyser *in situ* l'amidon, les phytates et les  $\alpha$ -galactosides lors de la fermentation de mélanges mil-légumineuses.**

### 4.2.1. Résumé introductif au second article et au projet de troisième article

Les travaux de Tou et al. (2006) ont montré que le *ben-saalga* à l'instar des autres bouillies traditionnelles fermentées africaines ne peut pas satisfaire les besoins nutritionnels recommandés pour les nourrissons et les jeunes enfants à cause particulièrement de sa très faible densité en énergie, en protéines et lipides ainsi qu'en micronutriments. Aussi, ces derniers ont étudié la modification du procédé traditionnel du *ben-saalga*, obtenue par l'addition d'une combinaison de traitements impliquant une étape de pré-cuisson pour la gélatinisation de l'amidon, l'ajout de malt pour hydrolyser l'amidon gélatinisé et l'inoculation avec un pied de cuve (Tou et al., 2007a). Ce procédé modifié a été appliqué à un mélange de mil avec l'arachide pour améliorer la balance en macronutriments des bouillies (Tou et al., 2007a,b). L'utilisation du malt dans l'étude de Tou et al. (2007a) a permis d'incorporer un taux plus élevé de matière sèche et ainsi d'augmenter la densité énergétique du *ben-saalga* modifié de 35 kcal/100g de bouillie sucrée pour la bouillie traditionnelle à 117 kcal/100g de bouillie sucrée pour la bouillie améliorée. Cependant, le malt traditionnel est souvent produit dans des conditions d'hygiène peu satisfaisantes et peut présenter des risques potentiels quant à son utilisation dans la fabrication des aliments destinés aux enfants (Onyango et al., 2004; Trèche et Mouquet-Rivier, 2008).

La complémentation des céréales par les légumineuses est une approche peu coûteuse, facilement réalisable dans les pays en développement pouvant permettre une meilleure nutrition des enfants. Cependant l'emploi de certaines légumineuses ne rencontre pas toujours les bénéfices escomptés à cause de la présence de quantités non négligeables de certains composés antinutritionnels comme les phytates qui réduisent la biodisponibilité des minéraux essentiels divalents (fer, calcium, magnésium, zinc, etc.) à travers les complexes insolubles qu'ils forment avec ces derniers. De surcroît, les  $\alpha$ -galactosides présents sont responsables de ballonnement et de diarrhées parce qu'ils ne sont pas hydrolysables par les enzymes digestives de l'espèce humaine et sont fermentés dans le gros intestin. Il convient donc que ces composés antinutritionnels soient éliminés.

Une nouvelle alternative, très peu explorée jusqu'à présent, consiste à améliorer la qualité nutritionnelle du *ben-saalga* par voie biologique en utilisant des souches starters de bactéries lactiques possédant des propriétés particulières.

Dans la section précédente, nous avons sélectionné trois souches de bactéries lactiques à potentiel enzymatique d'intérêt nutritionnel, principalement amylolytique, phytasique ou  $\alpha$ -galactosidasique, possédant une ou plusieurs de ces activités.

Dans cette partie de notre travail, nous avons testé les capacités d'utilisation de ces souches en remplacement de l'inoculation par pied de cuve et de l'utilisation du malt dans le procédé modifié de Tou et al. (2007a) pour fermenter deux types de préparation à base de mil, l'une en mélange avec de l'arachide, l'autre en mélange avec du soja.

Les résultats de ces travaux sont présentés sous forme de deux articles dont le premier a été publié dans International Journal of Food Microbiology (section 4.2.1) et le second est soumis à Journal of Food Science (section 4.2.2.).

Pour l'article présenté en section 4.2.1., les travaux ont porté sur l'étude de la fermentation d'une suspension précuite d'un mélange mil-arachide par deux souches de bactéries lactiques amylolytiques dont l'action a été comparée à celle d'un pied de cuve et à celle d'une fermentation naturelle selon le procédé traditionnel. Plus particulièrement, ces travaux avaient pour objectif d'augmenter la densité énergétique de ce type de bouillie mil-arachide étudiée par Tou et al. (2007b) en remplaçant le malt par des bactéries lactiques amylolytiques. Alors que la souche isolée du *ben-saalga* (*Lb. plantarum* 6.1) s'est montrée particulièrement décevante, *Lb. plantarum* A6 et le pied de cuve ont permis une hydrolyse efficace de l'amidon gélatinisé en maltodextrines, permettant la préparation de bouillies de densités énergétiques supérieures à celles du contrôle (fermentation traditionnelle sans ajout d'inoculum) ou à celles obtenues par fermentation avec la souche faiblement amylolytique *Lb. plantarum* 6.1. Les valeurs de densité énergétique mesurées ont été de  $84,7 \pm 4,4$  et  $80,4 \pm 23,8$  kcal/100 g de bouillie additionnée de sucre, respectivement avec *Lb. plantarum* A6 et le pied de cuve, c'est-à-dire proche de la valeur de 84 kcal/ 100g de bouillie recommandée par Dewey et Brown (2003). Par ailleurs, similairement au contrôle, l'activité acidifiante a été importante avec *Lb. plantarum* A6 et le pied de cuve permettant d'atteindre, respectivement, des pH de fin de fermentation de  $3,9 \pm 0,1$  et  $4,19 \pm 0,2$ .

Ces résultats montrent que *Lb. plantarum* A6 et le pied de cuve permettent d'hydrolyser efficacement l'amidon du mélange mil-arachide en remplacement du malt utilisé dans le procédé de Tou et al. (2007a et b). Cependant il convient de remarquer qu'une plus grande variabilité a été obtenue avec l'utilisation du pied de cuve. Le fait que le pied de cuve utilisé permette une hydrolyse efficace de l'amidon peut paraître en contradiction avec la faible activité démontrée par la souche sauvage autochtone (*Lb. plantarum* 6.1), pourtant sélectionnée à partir d'une collection de 155 souches isolées de 12 ateliers de production de Ouagadougou. En effet, le pied de cuve permet l'ensemencement avec une population naturelle de microorganismes, ce qui conduit à supposer qu'il existe des souches naturelles amylolytiques du *ben-saalga* de meilleure capacité amylolytique que la souche 6.1 et qu'il conviendrait de les rechercher par la suite.

Dans l'article suivant (section 4.2.2.), les bactéries lactiques phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique sélectionnées ont été testées soit individuellement soit en co-culture avec la souche amylolytique *Lb. plantarum* A6 pendant la fermentation lactique de pâtes précuites d'un mélange mil-soja. En effet, le soja est aussi une source de nutriments intéressante et disponible permettant de compléter le mil mais de caractéristiques nutritionnelles différentes de celles de l'arachide. Nous voulions d'une part déterminer s'il y aurait « un effet matrice » pour l'hydrolyse de l'amidon par la souche A6 en comparaison avec le mélange mil-arachide étudié précédemment, et d'autre part, si les souches sauvages sélectionnées étaient capables d'éliminer les facteurs antinutritionnels présents en forte quantité dans la graine de soja.

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec le contrôle (fermentation naturelle du mélange mil-soja) et avec l'utilisation d'un pied de cuve. Similairement au mélange mil-

arachide, *Lb. plantarum* A6 et le pied de cuve ont été capables d'hydrolyser partiellement l'amidon gélatinisé durant la fermentation des pâtes de mélange mil-soja, permettant l'obtention de bouillies de densités énergétiques supérieures à celles obtenues à partir de la pâte fermentée naturellement. La densité énergétique des bouillies a été de  $73,5 \pm 9,9$  et  $75,8 \pm 5,1$  kcal/100 g de bouillie sucrée respectivement obtenue avec les co-cultures de *Lb. plantarum* A6 avec *Lb. plantarum* 4.4 ou *Lb. fermentum* 7.4 et de  $88,7 \pm 4,2$  kcal/100 g de bouillie sucrée avec le pied de cuve contre  $51,4 \pm 0,6$  kcal/100 g de bouillie sucrée pour le contrôle. Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec le mélange mil-arachide, seule l'utilisation du pied de cuve comme starter dans la fermentation lactique des pâtes de mélange mil-soja a permis une augmentation de la densité énergétique atteignant la valeur recommandée de 84 kcal/100g de bouillie (Dewey et Brown, 2003) pour les nourrissons et les jeunes enfants âgés de 9 à 11 mois.

Contrairement aux travaux de Tou et al. (2006) qui ont montré une réduction des phytates durant la fermentation lactique des mélanges mil-arachide avec les procédés traditionnels et modifiés, aucune réduction n'a été observée avec les mélanges mil-soja pour toutes les conditions de fermentation étudiées incluant le contrôle. Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse de la présence d'inhibiteur de l'activité phytasique dans les graines de soja, cependant la torréfaction du soja (données non présentées dans cet article) n'a pas permis de rétablir une activité phytasique lors de la fermentation. Par ailleurs, contrairement à ce que nous aurions dû observer compte tenu de la composition du soja en  $\alpha$ -galactosides, les concentrations en raffinose, stachyose et verbascose dans la pâte précuite avant fermentation étaient très faibles, inférieures à 0,2 mmol/kg de pâte non fermentée alors que la concentration en mélibiose était environ dix fois supérieure, laissant ainsi supposer que le raffinose, le stachyose et le verbascose ont été pré-hydrolysés en mélibiose lors des étapes précédant la fermentation. De plus, aucune dégradation du raffinose, stachyose et verbascose présents à ces faibles concentrations n'a été observée lors des fermentations avec les souches sélectionnées à cet effet. Nous pourrions penser, à l'instar de ce qui a été observé pour les phytates, que ceci pourrait être dû à la présence d'inhibiteurs des  $\alpha$ -galactosidases, mais une autre hypothèse est tout aussi vraisemblable. Etant donné les très faibles concentrations en ces composés, inférieure à un « threshold level », il se peut que la synthèse d' $\alpha$ -galactosidase n'ait pas été induite ou que les conditions thermodynamiques pour la captation de ces composés par les cellules et leur métabolisme ne soient pas réunies, phénomène déjà connu pour la dégradation microbiologique de composés xénobiotiques comme les pesticides. L'utilisation des souches de bactéries lactiques sélectionnées s'est révélée efficace pour l'hydrolyse de l'amidon dans le mélange mil-soja, quoique à un niveau moindre que pour le mélange mil-arachide mais inefficace pour l'élimination des composés antinutritionnels, bien que les tests de sélection de ces souches aient révélé de fortes activités vis-à-vis des composés antinutritionnels dont l'élimination était souhaitée. Cependant ces tests sont réalisés dans des conditions de culture des souches qui sont loin de celles rencontrées lors de leur utilisation, rendant ainsi nécessaire de vérifier leur potentiel réel sur les matrices alimentaires.

Ces différents résultats ont montré que l'action des souches sélectionnées pour certaines propriétés fonctionnelles est étroitement liée aux conditions de fermentation. Une meilleure connaissance des souches sur le plan physiologique et des conditions de synthèse de leur enzyme sont nécessaires pour une meilleure utilisation de ces souches et leur promotion auprès des utilisateurs potentiels. De même une meilleure connaissance de l'incidence des

différentes opérations unitaires intervenant dans les procédés est nécessaire car, tel que cela est montré pour les  $\alpha$ -galactosides, une diminution importante de leur concentration est clairement liée à au moins l'une des étapes du procédé antérieure à l'étape de fermentation. Il convient cependant de s'interroger sur la réelle nécessité de rechercher une élimination totale en ces composés réputés d'une part comme étant des facteurs antinutritionnels, mais d'autre part comme étant aussi des facteurs prébiotiques pouvant à certaines doses avoir un effet stimulateur de bactéries coliques bénéfiques pour la santé.

**4.2.2. Article 2: Potentiel des bactéries lactiques amylolytiques pour remplacer le malt utilisé pour obtenir l'hydrolyse partielle de l'amidon pour produire des bouillies fermentées africaines à base d'un mélange mil-arachide.**



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)



### Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut

L.T. Songré-Ouattara<sup>a</sup>, C. Mouquet-Rivier<sup>b</sup>, C. Icard-Vernière<sup>b</sup>, I. Rochette<sup>b</sup>, B. Diawara<sup>a</sup>, J.P. Guyot<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> IRSAT, Département Technologie Alimentaire, 03 BP 7047, Ouagadougou 03, Burkina Faso

<sup>b</sup> IRD (Institut de Recherche pour le Développement), BP 64501, UR106, «Nutrition, Alimentation, Sociétés», 34394 Montpellier, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 17 November 2008

Received in revised form 22 January 2009

Accepted 2 February 2009

##### Keywords:

Cereal fermentation

Lactic acid bacteria

Amylase

Starter culture

Complementary food

Energy density

#### ABSTRACT

Fermentation and starch hydrolysis of a pre-cooked pearl millet–groundnut (MG) slurry inoculated with amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) or by back slopping was investigated as a substitute for the addition of malt to prepare infant gruels. The ALAB collection strain *Lb. plantarum* A6, and the endogenous microflora provided by back slopping were more efficient in acidifying and partially hydrolysing starch in the MG slurry than *Lb. plantarum* 6.1, isolated from the traditional process in Burkina Faso. Large amounts of maltotriose and maltotetraose accumulated in slurry fermented by strain A6. No accumulation of maltose was observed, which could be an advantage to prevent the growth of microbial contaminants such as yeasts. Starch hydrolysis in the MG slurry inoculated with strain A6 or by back slopping enabled preparation of high-energy density gruels (84.7±4.4 and 80.4±23.8 kcal/100 g of gruel, respectively) of liquid consistency. However variability was higher with back slopping.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Traditional gruels prepared from cereals like maize, sorghum and millet, or roots like cassava, which are widely used for complementary feeding of young children in Africa, are of low energy and nutrient density (Oyewole, 1997; Tou et al., 2007a; Trèche and Mbome, 1999). In Africa, many of these gruels are prepared from fermented starchy slurries or dough. Their nutritional value can be improved for amino acid composition, protein and lipid contents by the addition of legume seeds such as groundnut or soybean (Nnam, 2000; Tou et al., 2007b). Combining foods is a low-cost approach based on locally available ingredients. The micronutrient content of the gruels can be increased by fortification (Darmon et al., 2002). However, many obstacles first have to be overcome. In particular, traditional gruels have a low energy density, which has to be increased. Increasing the energy density of traditional gruels is a technological challenge for populations with limited economic resources in developing countries. In Africa, many traditional fermented foods are prepared at home, but the processes can be upgraded to meet the production constraints of small and medium enterprises in such contexts. Several technologies based on the reduction of swelling of starch granules obtained by partial starch hydrolysis or dextrinisation have been proposed to increase the energy density (ED) of cereal gruels with appropriate

semi-liquid to liquid consistency (Trèche and Mouquet-Rivier, 2008). Extrusion cooking is a well-known technology able to break down starch under the combined effects of shearing and heating thus enabling the production of instant flours for the preparation of gruels (Mouquet et al., 2003; Onyango et al., 2004). Enzymatic processes based on the action of  $\alpha$ -amylase are cheaper and require less technical knowledge and can be used as alternatives to more sophisticated technologies (Dewey and Brown, 2003; Trèche and Mouquet-Rivier, 2008). Amylase can be of industrial origin or supplied by germinated cereals. Industrial  $\alpha$ -amylase is of constant quality but it is difficult to obtain in developing countries. On the other hand, although cereal malt flours can be produced locally and easily used in small production units, their amylase activity may be low and variable due to production and storage conditions. Recently, Nguyen et al. (2007a,b) showed that ALAB can be used as starter culture for starch hydrolysis to produce high energy density gruels by fermentation of pre-heated rice–soybean slurries in combination with high pressure homogenization or spray drying. However, the purpose of the investigation of Nguyen et al. (2007a,b) was to design new functional starchy foods using processes that require sophisticated technological know-how.

*Ben-saalga*, a popular traditional fermented gruel obtained from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) is usually consumed in Burkina Faso for breakfast by adults and as complementary food by young children. It is similar to the Ghanaian *koko* (Lei and Jakobsen, 2004). Pearl millet is processed into gruel in small production units using the following steps: washing (optional), soaking the millet grains, grinding and

\* Corresponding author.

E-mail address: [jpguyot@ird.fr](mailto:jpguyot@ird.fr) (J.P. Guyot).

filtering the humid flour, decanting and cooking (Tou et al., 2006). Lactic acid fermentation occurs during the decantation step. To improve the nutritional quality of the final product, the traditional process was modified by Tou et al. (2007a,b) by increasing the dry matter content of pearl millet and adding groundnuts to improve the macronutrient balance. To ensure a suitable liquid consistency of the gruel, a pre-cooking step of the pearl millet–groundnut slurry was added after decantation, followed by the addition of malt flour for partial starch hydrolysis and thereafter inoculation by back slopping with a fermented slurry obtained during a previous fermentation. However, even if malt is recommended as a source of amylase and is relatively easy to use in cereal processing to prepare gruels in African small scale producing units, it is not devoid of potential health risks, particularly if it is produced from different kinds of germinated cereal by local manufacturers with unhygienic practices (Onyango et al., 2004; Trèche and Mouquet-Rivier, 2008). For instance, there is a risk of the production of mycotoxins if fungi develop due to the sprouting conditions (temperature and humidity) (Briggs, 1998; Trèche and Mouquet-Rivier, 2008). Furthermore, the amylolytic activity of malt produced under local conditions is often highly variable (Trèche and Mouquet-Rivier, 2008).

The use of amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) as a functional starter culture could provide an alternative to the use of traditional or industrial malt by combining amylase production and acidification using the same strain, which would improve control of fermentation, and lead to products of more regular quality.

In the present work, an alternative to the use of traditional malt was investigated by replacing malt with amylolytic lactic acid bacteria (ALAB). Modifications induced by starch partial hydrolysis and fermentation of pearl millet–groundnut slurries were studied using as starter cultures a *ben-saalga* selected ALAB strain, *Lb. plantarum* 6.1 (Songré-Ouattara et al., 2008), or *Lactobacillus plantarum* A6 known to be an efficient amylolytic LAB (Giraud et al., 1991). In the same way as for the addition of malt, ALAB were inoculated after pre-cooking of the pearl-millet slurry. Inoculation by starter cultures was compared to natural (spontaneous) fermentation of an uncooked slurry (traditional process) and to fermentation of a pre-cooked slurry inoculated by back slopping to restore the natural microflora.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Raw material

A local Burkinabe variety of pearl millet (*P. glaucum*) called *Gampela* was purchased from a farmer. Groundnuts (*Arachis hypogaea*) were purchased at a local market in Ouagadougou, Burkina Faso. In Burkina Faso, the pearl millet grains and groundnut bought at local markets can contain until 5% of impurities (straw, pebble, foreign material), so they were cleaned of all impurities by using the traditional methods of winnowing and sorting by hand.

### 2.2. Lactic acid bacteria and culture conditions

Two strains of ALAB, *Lb. plantarum* 6.1, isolated from *ben-saalga* (Songré-Ouattara et al., 2008), and *Lb. plantarum* A6 (LMG 18053, BCCM, Gent, Belgium) were selected as starter cultures for partial starch hydrolysis and fermentation of a pre-gelatinized slurry obtained from a pearl millet–groundnut slurry.

For routine cultivation, the strains were grown overnight in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth medium at 30 °C. All strains were inoculated with a 10% (v/v) pre-culture. The strains were conserved in 40% glycerol at –80 °C. To inoculate the gelatinized pearl millet–groundnut slurry, the cultures were centrifuged at 8000 ×g for 10 min at 4 °C, and the cells obtained were washed in sterile distilled water, centrifuged in the same conditions and suspended in sterile

distilled water to form a cell suspension containing approximately 10<sup>9</sup> cfu/ml.

### 2.3. Description of the processing method

The modified method of *ben-saalga* preparation described by Tou et al. (2007a) was used, which includes an additional pre-cooking step to allow gelatinization of the starch before inoculation and fermentation. 250 g (dry weight – d.w.) of millet–groundnut (MG) blend was formulated at a proportion of 76 and 24% (g/100 g dry matter) (Tou et al., 2007a), respectively. The blend was first soaked in water (1:1.5 w/v) for 16 h, washed with water (1:2 w/v), and drained for 30 min. It was then milled for 3 min using a laboratory blender (Warring, LB20E, USA) sieved with water (1:3.5 w/v) through muslin and boiled for 10 min to gelatinize the starch, then cooled to around 35 °C. The inoculation was carried out with either a single LAB starter culture (1%, v/w) or by back slopping (3%, w/w) using a small amount of fermented paste from a previous natural fermentation to obtain an initial biomass of around 10<sup>7</sup> cfu/g; initial concentrations are given in results (Section 3). A negative control was made by natural (spontaneous, without pre-cooking) fermentation following the traditional process described by Tou et al. (2006). All fermentations were carried out for 24 h at 30 °C.

### 2.4. Chemical analysis

#### 2.4.1. pH

Changes in the pH of the slurry (dough) during fermentation were recorded on-line using a pH-meter (WTW 340 i, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Recorded data were then transferred to an Excel file.

#### 2.4.2. Analysis of fermentable sugars and fermentation products

Mono- and disaccharides and malto-dextrins were analyzed by high-performance ion chromatography (HPIC) using an anion exchange chromatograph (Dionex S.A., Voisins-Le-Bretonneux, France) with a carboxypac PA1 column. The following conditions were used: mobile phase, MQ H<sub>2</sub>O, NaOH (150 mM), sodium acetate gradient of 0 to 300 mM; flow rate, 0.1 ml/min; and temperature, 34 °C.

Lactic acid, acetic acid and ethanol were analyzed as previously described (Calderon et al., 2001) by HPLC using an Aminex HPX-87H, 300×7.8 mm column (Biorad, Ivry-sur-Seine, France) connected to a refractive index detector (Model Waters 2410; Biorad, Ivry-sur-Seine, France). The following conditions were used: mobile phase, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 mmol/l); flow rate, 0.8 ml/min, and temperature, 65 °C.

For chromatography analyses, samples (2 g) of slurry collected at 2 h intervals during the first 8 h of fermentation and subsequently at 22 and 24 h were homogenized with 8 ml of distilled water. 0.2 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N was added to each 1.3 ml sub-sample in microtubes, which were centrifuged at 8000 ×g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were frozen at –20 °C until analysis. Immediately before analysis, the samples were filtered through 0.20 µm pore size filters and 10 µl were then injected onto the HPLC system. For the HPIC system, 25 µl were injected after appropriate dilution. The results are expressed in mmol/kg of slurry.

### 2.5. Preparation of gruels and rheological measurements

For each experiment, three gruels were prepared at different DM contents by boiling the fermented paste for at least 5 min. The consistency of the gruels was measured after cooling to 45 °C using a Bostwick consistometer (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, Virginia, USA) (Bookwalter et al., 1968) according to the procedure described by Mouquet et al. (2006). The Bostwick flow value was expressed in mm/30 s. This parameter ranges from 0 (almost solid)

**Table 1**

Kinetic parameters of pH changes during the fermentation of pearl millet–groundnut slurries without inoculation (natural fermentation) or inoculated after cooking either by back slopping or with the amylolytic lactic acid bacteria *Lb. plantarum* A6 or *Lb. plantarum* 6.1.

| Fermentation conditions                   | Initial pH               | $V_{\max}$                | Time ( $V_{\max}$ )       | Time (pH 4.5)             | Final pH                  |
|-------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                           |                          | Units pH/h                | h                         | h                         |                           |
| Natural fermentation                      | 6.58 ± 0.10 <sup>a</sup> | 0.46 ± 0.05 <sup>ab</sup> | 6.00 ± 1.00 <sup>a</sup>  | 10.00 ± 1.00 <sup>a</sup> | 4.13 ± 0.08 <sup>a</sup>  |
| Inoculation by back-slopping              | 6.52 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.55 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 2.67 ± 1.15 <sup>b</sup>  | 7.33 ± 1.15 <sup>a</sup>  | 4.19 ± 0.24 <sup>ab</sup> |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> A6  | 6.64 ± 0.11 <sup>a</sup> | 0.51 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 4.00 ± 1.00 <sup>ab</sup> | 7.33 ± 2.31 <sup>a</sup>  | 3.94 ± 0.07 <sup>a</sup>  |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> 6.1 | 6.69 ± 0.18 <sup>a</sup> | 0.39 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 4.67 ± 1.15 <sup>ab</sup> | >24 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 4.61 ± 0.11 <sup>b</sup>  |

$V_{\max}$ : maximum acidification rate ( $-\text{dpH}/\text{dt}$ ); Time ( $V_{\max}$ ): fermentation time to reach  $V_{\max}$ ; Time (pH 4.5): fermentation time required to reach pH 4.5. <sup>a–d</sup>Values in the columns with different letters in superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ).

to 240 mm/30 s (very fluid, corresponding to a gruel that can be drunk).

Apparent viscosity was measured on gruels at 45 °C with a Haake viscometer VT500 with SV-DIN coaxial cylinders. The shear rate and the shear time were 83 s<sup>−1</sup> and 10 min, respectively (Mouquet and Trèche, 2001).

## 2.6. Energy density of gruels

Dry matter (DM) content of gruels was determined by oven-drying at 105 °C to constant weight. The energy density (ED) of the gruel was calculated at a Bostwick flow of 120 mm/30 s, corresponding to a suitable consistency for young children (Vieu et al., 2001), by multiplying the gruel DM content by its energy value, and expressed in kcal/100 g of gruel.

## 2.7. Counts of viable cells in pearl millet slurries

For all experiments, 10 g of sample of pearl millet slurry, taken at 0 and 24 h of fermentation were homogenized with 90 ml sterile peptone water solution, using a stomacher 400 (Type BA 7021, England). Viable cells were counted by plate count on MRS agar after serial decimal dilution. Samples were incubated at 30 °C for 48 h. Results are expressed in log cfu/g of slurry.

## 2.8. Statistical analysis

Each experiment was replicated three times. Values were averaged. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA), using the general model procedure of STATGRAPHICS Plus version 5.1.

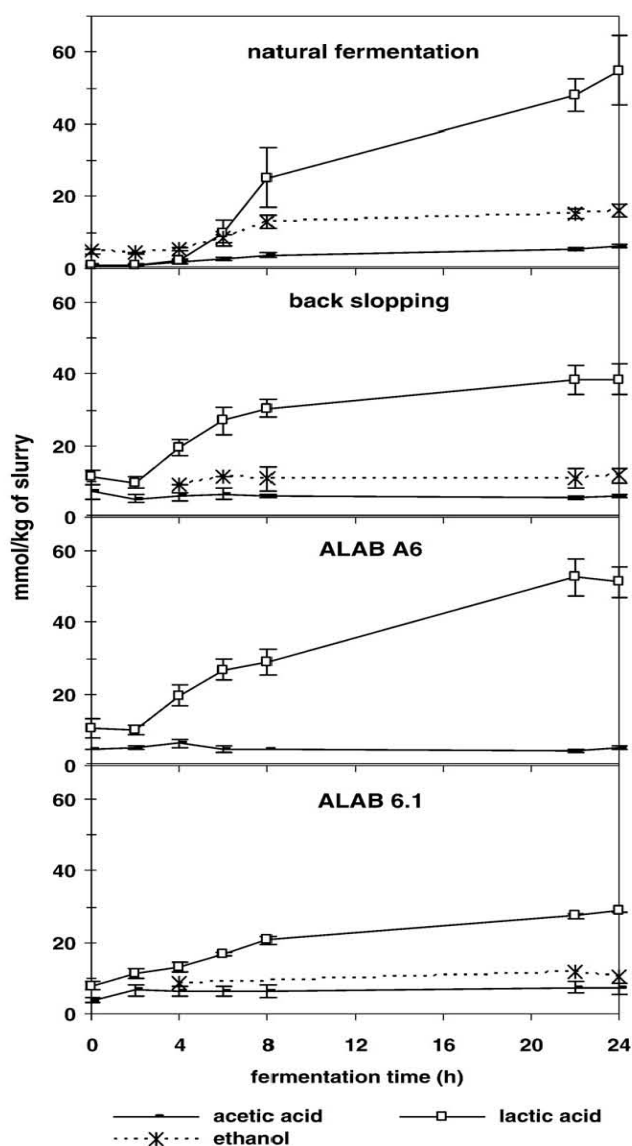
## 3. Results

### 3.1. Microbial counts during fermentation of MG slurries

At the beginning of fermentation of MG slurries under the different experimental conditions (i.e. natural fermentation, inoculation by back slopping or with amylolytic starter cultures), MRS counts differed significantly ( $P < 0.05$ ). The number of viable cells was  $7.4 \pm 0.1$  log cfu/g with natural fermentation and back slopping,  $7.5 \pm 0.1$  and  $8.1 \pm 0.2$  log cfu/g with *L. plantarum* 6.1 and A6, respectively. An increase in MRS counts was observed during fermentation and the maximum population concentration reached after 24 h was between  $8.9 \pm 0.1$  and  $9.1 \pm 0.1$  log cfu/g. Whatever the fermentation conditions, no significant difference ( $P < 0.05$ ) was observed in the cell counts after 24 h of fermentation.

### 3.2. Changes in pH during fermentation

There was no significant difference in the initial pH between each experiment (Table 1). The pH values were between  $6.52 \pm 0.05$  and  $6.69 \pm 0.18$ . During fermentation, the pH decreased to reach final values between  $4.19 \pm 0.24$  and  $3.94 \pm 0.07$ , except for the MG slurry inoculated with *Lb. plantarum* 6.1, which had a higher final pH (4.61). After comparison of the different parameters of the acidification kinetics (Table 1), the data showed that acidifying activity was slower in the case of natural fermentation and of the slurry inoculated with *Lb. plantarum* 6.1. Maximum acidification rates ranged from 0.39 to



**Fig. 1.** Kinetics of end product formation during the fermentation of pearl millet–groundnut slurries without inoculation (natural fermentation) or inoculated after cooking either by back slopping or with amylolytic lactic acid bacteria: *Lb. plantarum* A6; ALAB A6; *Lb. plantarum* 6.1; ALAB 6.1.

0.55 pH units/h and were reached between 2 and 6 h of fermentation. The slurries inoculated by back slopping or with *Lb. plantarum* A6 showed the highest maximum acidification rates and reached a pH of 4.5 more rapidly (Table 1).

### 3.3. Formation of organic acids and ethanol during fermentation of MG slurries

With all fermentation processes, lactic acid accumulation ranged from 28.9 to 56.1 mmol/kg of slurry at 24 h (Fig. 1). The concentration of lactic acid was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of the other end products (acetate and ethanol) and the highest concentrations were observed with natural fermentation and in the MG slurry inoculated with *Lb. plantarum* A6. Lactic acid production started later

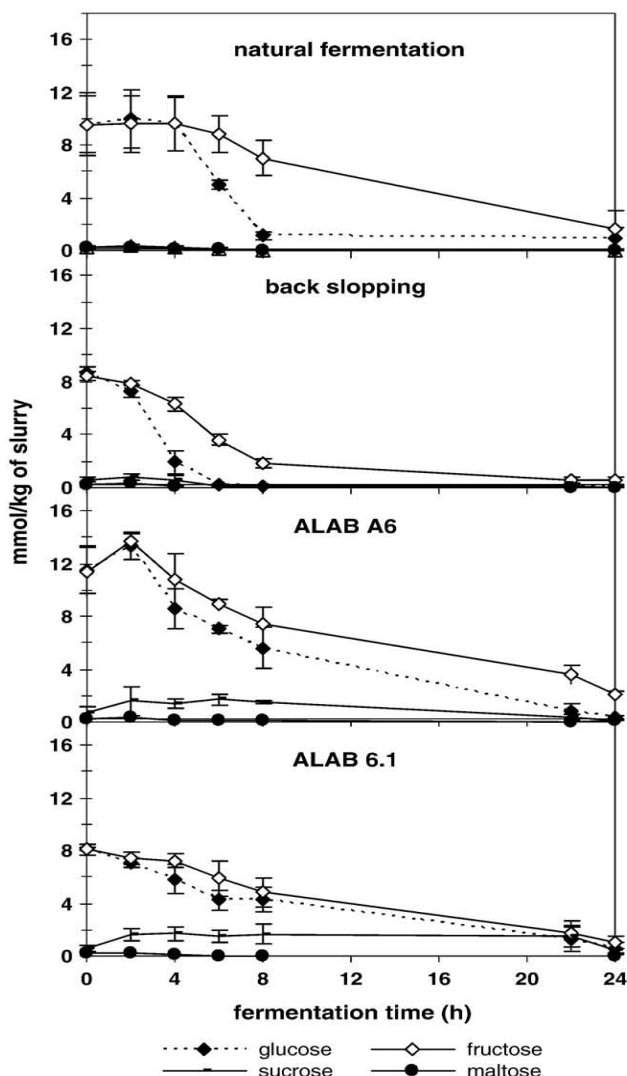


Fig. 2. Changes in mono- and disaccharides during the fermentation of pearl millet-groundnut slurries without inoculation (natural fermentation) or inoculated after cooking either by back slopping or with amylolytic lactic acid bacteria: *Lb. plantarum* A6: ALAB A6; *Lb. plantarum* 6.1: ALAB 6.1.

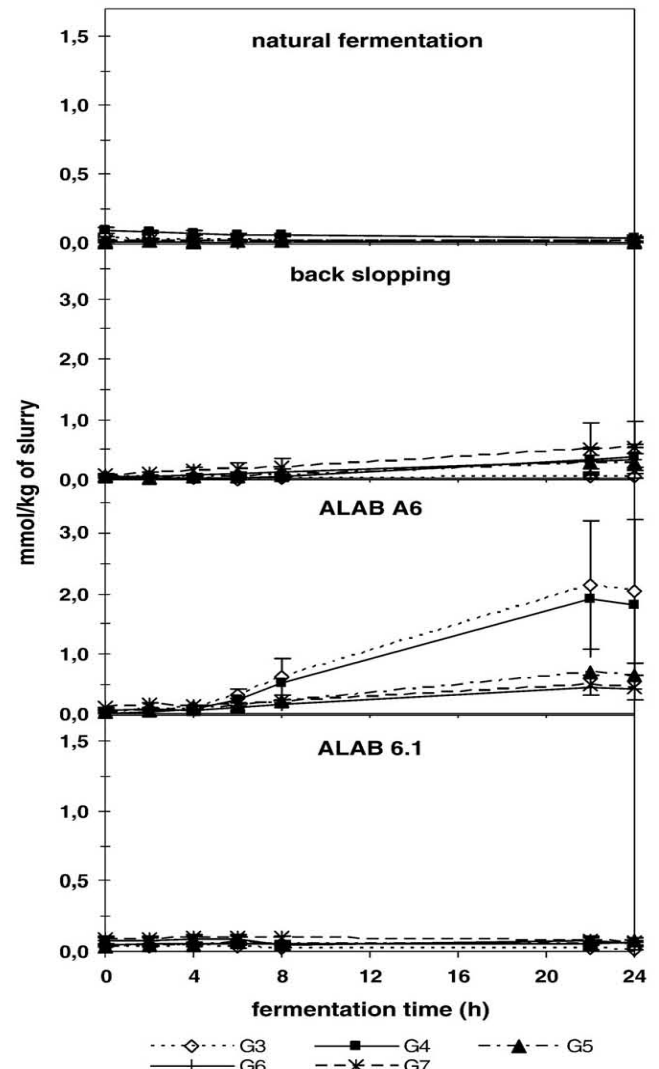


Fig. 3. Kinetics of maltodextrin formation during the fermentation of pearl millet-groundnut slurries without inoculation (natural fermentation) or inoculated after cooking either by back slopping or with amylolytic lactic acid bacteria: *Lb. plantarum* A6: ALAB A6; *Lb. plantarum* 6.1: ALAB 6.1.

with natural fermentation than with the other fermentations. Production of acetic acid and ethanol was very low and levelled off very early, whereas the concentration of lactic acid increased continuously (Fig. 1). No ethanol was detected in the slurry inoculated with *Lb. plantarum* A6.

### 3.4. Changes in mono-, di-saccharide and maltodextrin concentrations during fermentation of MG slurries

Glucose and fructose were the only available sugars found in slurries at the beginning of fermentation. Their initial concentrations were similar and dropped from mean values of 9.45 and 9.35 mmol/kg of slurry to final mean values of 0.49 and 1.33 mmol/kg of slurry (Fig. 2) for glucose and fructose, respectively. With natural

fermentation and in the MG slurry inoculated by back slopping, consumption of fructose occurred later than consumption of glucose, whereas in the slurries inoculated with the ALAB strains, glucose and fructose were consumed simultaneously (Fig. 2). Only traces of maltose were detected in all fermentations. Traces of sucrose were detected at the beginning of fermentation, but its concentration increased slightly in the MG slurries fermented by the two ALAB strains before disappearing at 24 h.

No accumulation of maltodextrin was detected during natural fermentation of the MG slurry or during fermentation of the slurry inoculated with *Lb. plantarum* 6.1 (Fig. 3). In contrast, maltodextrins (maltotriose to maltoheptaose) accumulated in the slurries inoculated either by back slopping or with *Lb. plantarum* A6, clearly indicating starch hydrolysis. The highest maltodextrin concentration was produced by *Lb. plantarum* A6. Maltotriose and maltotetraose were the main products of starch hydrolysis by strain A6 and reached a similar concentration of 2 mmol/kg of slurry at the end of fermentation. However, when the back-slopping method was used, maltoheptaose was the main product of starch hydrolysis with a final concentration of 0.53 mmol/kg of slurry.

### 3.5. Effect of different fermentation processes on the rheological changes of gruels

The rheological properties of the fermented gruels were assessed by measuring the apparent viscosity and the Bostwick flow of gruels prepared from the fermented MG slurries at different dry matter contents. Consistent with maltodextrin production, the biggest changes in the apparent viscosities of gruels were observed in the MG slurries inoculated by back slopping or with *Lb. plantarum* A6 whose apparent viscosity was greatly reduced at high DM contents

**Table 2**

Dry matter content and energy density of gruels prepared from pearl millet–groundnut slurries fermented without inoculation (natural fermentation) or inoculated after cooking either by back slopping or with the amylolytic lactic acid bacteria *Lb. plantarum* A6 or *Lb. plantarum* 6.1

|                                                                     | Dry matter content per 100 g of gruel (g DM/100 g of gruel) | Dry matter content of sweetened gruel (g DM/100 g of sweetened gruel) | Energy density (kcal/100 g of sweetened gruel) |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Minimum value recommended for children aged between 9 and 11 months | –                                                           | –                                                                     | 84                                             |
| Natural fermentation                                                | 7.9 ± 0.5 <sup>a</sup>                                      | 10.7 ± 0.5 <sup>a</sup>                                               | 50.6 ± 2.4 <sup>a</sup>                        |
| Inoculation by back slopping                                        | 14.4 ± 5.2 <sup>bc</sup>                                    | 16.9 ± 5.0 <sup>bc</sup>                                              | 80.4 ± 23.8 <sup>bc</sup>                      |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> A6                            | 15.3 ± 1.0 <sup>c</sup>                                     | 17.8 ± 0.9 <sup>c</sup>                                               | 84.7 ± 4.4 <sup>c</sup>                        |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> 6.1                           | 10.4 ± 0.6 <sup>ab</sup>                                    | 13.1 ± 0.5 <sup>ab</sup>                                              | 62.2 ± 2.6 <sup>ab</sup>                       |

MG: millet–groundnut.

<sup>a–c</sup>Values in the columns with different letters in superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ).

compared to that of gruels prepared from naturally fermented slurry or slurry fermented by *Lb. plantarum* 6.1 (Fig. 4).

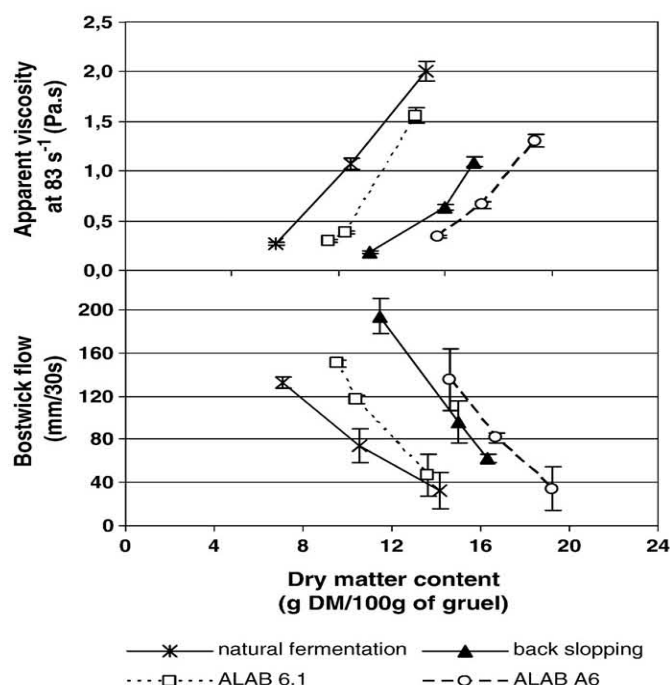
For a Bostwick flow of 120 mm/30 s, which is the consistency suitable for consumption by young children, the corresponding dry matter content of the unsweetened gruel obtained in the control experiment (natural fermentation) was 7.9 ± 0.5 g DM/100 g of gruel (Table 2). At the same Bostwick flow, the highest DM contents obtained after fermentation were 14.4 ± 5.2 and 15.3 ± 1.0 g DM/100 g of gruel for the slurries inoculated by back slopping or with *Lb. plantarum* A6, respectively, and 10.4 ± 0.6 g DM/100 g of gruel for the gruel resulting from inoculation with *Lb. plantarum* 6.1 (Fig. 4, Table 2). No significant differences were observed between the energy densities of gruels prepared from the slurries inoculated by back slopping or with *Lb. plantarum* A6, and adequate values were reached when sucrose (3 g/100 g of gruel) was added to sweeten the gruels (Table 2). However, as indicated by the standard deviations of these values, the observed variability of DM content and consequently of the energy density was higher in the case of gruels prepared from the slurry inoculated by back slopping (Table 2).

### 4. Discussion

In the present study, pre-cooking of the MG slurry followed by inoculation with ALAB starters or by back slopping replaced the addition of malt flour previously described in the improved process of Tou et al. (2007a,b). The cooking step introduced in the traditional process not only has the advantage of gelatinizing the starch fraction, thus favouring starch hydrolysis, but also of eliminating or reducing endogenous microflora, thereby creating more favourable conditions to test different inoculation strategies (i.e. back slopping, starter cultures).

In all fermentations, including the control experiment (natural fermentation of uncooked slurry), the increase in the MRS counts from 7.2–8.1 to 8.9–9.1 log cfu/g was in the same range as that reported by Tou et al. (2007b) during the fermentation of a MG slurry in the modified process with addition of malt before inoculation. A similar result was also reported for fermentation of *togwa* with mixed starter cultures of LAB and yeasts by Mugula et al. (2003).

The fastest rate of pH decrease was observed in the MG slurries inoculated with *Lb. plantarum* A6 or by back slopping. These two fermentation conditions were the most favourable to rapidly reach a pH of 4.5, below which the growth of food-borne pathogen is inhibited (Nout et al., 1989). The kinetic parameters obtained with strain A6 in the MG slurry were similar to those reported by Nguyen



**Fig. 4.** Changes in apparent viscosity and in Bostwick flow of gruels prepared at different DM contents from pearl millet–groundnut slurries naturally fermented or inoculated either by back slopping or with amylolytic lactic acid bacteria: *Lb. plantarum* A6: ALAB A6; *Lb. plantarum* 6.1: ALAB 6.1.

et al. (2007b) for fermentation of a rice–soybean slurry with strain A6, indicating no noticeable matrix effect on these parameters. In contrast, the rate of decrease in pH was very low with the ALAB strain isolated from *ben-saalga*, *Lb. plantarum* 6.1, and had not reached 4.5 after 24 h of fermentation. This fact alone would disqualify this strain for use as a starter culture. However, in our study, *Lb. plantarum* A6 and 6.1 were not selected as fast acidifying strains but to investigate their ability to partially hydrolyse starch in food matrix.

The decrease in pH was mainly due to the production of lactic acid, since the concentration of acetic acid during fermentation was very low. In addition, limited ethanol production or its absence indicated that the fermentation process was dominated by a homolactic type metabolism, which is consistent with previous reports (Tou et al., 2006). Neither strain of *Lb. plantarum* should produce ethanol under the fermentation conditions described here. This was the case for *Lb. plantarum* A6, but in contrast, limited ethanol production was detected with *Lb. plantarum* 6.1. This could be explained by the very low acidification rate that could allow the development of contaminating microorganisms, although the fermentation remained dominated by lactic acid production.

Based on glucose and fructose consumption during fermentation and final concentrations of lactic acid, it can be assumed that most lactic acid is produced from the two carbohydrates in all fermentation processes. However, even if a maximum stoichiometric relation of 2 mol of lactic acid produced/mole of glucose or fructose consumed is used to estimate the acid yield of the reaction, it does not account for all the lactic acid produced in the case of the natural fermentation or in the slurry fermented by *Lb. plantarum* A6. This suggests that lactic acid could also have been produced from another source of carbohydrates, which could be products resulting from starch hydrolysis.

Concerning starch hydrolysis, the fact that maltodextrin did not accumulate during natural fermentation or in the slurry fermented by *Lb. plantarum* 6.1 does not imply starch hydrolysis did not occur: dextrins of DP>7 were not analyzed and, for instance, the rate of maltose consumption could have exceeded the rate of its production thereby preventing its accumulation. Weak starch hydrolysis during natural fermentation has already been reported (Tou et al., 2007a,b) and strain 6.1 was able to decrease the apparent viscosity of gruels prepared from the fermented slurry, suggesting partial starch hydrolysis by strain 6.1. However, the extent of starch hydrolysis was very low compared to that of fermented slurries inoculated either by back slopping or with *Lb. plantarum* A6. These results are consistent with the previous study of Songré-Ouattara et al. (2008) which showed that amylase activity of *Lb. plantarum* 6.1 was very weak (0.05 Ceralpha units/ml of cultivation medium) compared to that *Lb. plantarum* A6 (0.42 Ceralpha units/ml of cultivation medium).

Results with the slurry inoculated by back slopping suggest that more efficient amyolytic bacteria than strain 6.1, can probably, still be isolated from *ben-saalga*.

The marked reduction in the viscosity of the slurry fermented by strain A6 enabled preparation of sweetened gruels at a suitable consistency with the required energy density. With sugar added, DM content reached 17.8 g of DM/100 g (Table 2), thus corresponding to gruel with energy densities of 84.7 kcal/100 g which is in accordance with the value of 84 kcal/100 g proposed by Dewey and Brown (2003) for 9–11 month-children receiving two meals of gruel/day and an average level of breast milk intake. In the case of inoculation by back slopping, pre-cooking of the slurry enabled endogenous amyolytic microflora to hydrolyse the starch fraction more efficiently without the use of sophisticated technology. However, accumulated maltodextrins were different from those produced by strain A6. Higher amyolytic activity by strain A6 is suggested by a higher production of maltooligosaccharides, mainly maltotrioses (G3) and maltotetraoses (G4). Nevertheless, in both cases, no maltose accumulation was observed in contrast to processes in which malt

was incorporated after the cooking step (Helland et al., 2004; Tou et al., 2007a). In that sense, the use of ALAB such as *Lb. plantarum* A6 can provide some benefits, since starch is hydrolysed and fermented without maltose accumulation, thereby preventing the development of other microorganism, including yeasts, which thrive on maltose and could be responsible for product deterioration. Furthermore, the variability of DM content and energy density at the same Bostwick flow was lower in gruels prepared with strain A6 than with the back slopping method, suggesting better control of the process and higher reproducibility of gruel quality when ALAB are used as starter cultures. However, the use of starter cultures and of an additional pre-cooking treatment will undoubtedly lead to higher production costs. In a study performed in Senegal, Totté et al. (2003) investigated the feasibility to produce and use at the local level a strain of *Lb. plantarum* for pearl millet flour acidification. According to these authors the cost to produce this starter culture would only represent a maximum of 5% of the total production cost of the fermented product. As for costs linked to the additional pre-cooking treatment combined to back slopping and additional use of groundnut, transfer trials to local small producers in Ouagadougou (Burkina Faso) led to an improved gruel with a cost four times higher than the inexpensive traditional product (*ben-saalga*) (unpublished results). In spite of this increased cost, the modified gruel was well accepted by consumers due to its good image as a nutritious gruel with a pleasant taste (Cerefer, 2006; Mouquet-Rivier et al., 2008). However, these technical alternatives to traditional practices would probably be more applicable at a higher production scale in small or medium size enterprises.

## 5. Conclusion

The addition of a pre-cooking step to the traditional process before inoculation favoured partial starch hydrolysis in the MG slurry with ALAB starter cultures or with the native microflora supplied by back slopping. Malt or germinated cereals are very efficient in partially hydrolysing starch, and are used in traditional brewing processes to prepare local beers from different cereals (e.g. sorghum; maize), and are recommended to prepare infant gruels (Trèche and Mouquet-Rivier, 2008). Nevertheless, the use of efficient ALAB such as *Lb. plantarum* A6 as starter cultures, could replace the addition of malt and be used for a variety of cereal-based gruels; however ALAB starters still need to be tested on different types of starchy foods.

## Acknowledgements

This research was co-funded by the European Commission (Project Cerefer, contract No. ICA4-CT-2002-10047) and the International Foundation for Science (IFS). L.T. Songré-Ouattara thanks the Institute of Research for Development (IRD) and the French Embassy in Burkina Faso for PhD research grants.

## References

- Bookwalter, G.N., Peplinski, A.J., Pfeifer, V.F., 1968. Using a Bostwick consistometer to measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today* 13 (11), 407–410.
- Briggs, D.E., 1998. *Malts and Maltng*, 1st edn. Blackie Academic and Professional Publications, London, pp. 269–270.
- Calderon, M., Loiseau, G., Guyot, J.P., 2001. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetic of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology* 90, 508–516.
- Cerefer, 2006. Meeting consumer requirements for cereal based fermented foodstuffs with improved nutritional and sanitary quality and shelf-life in Africa. Final Report of the Cerefer Project (Acronym), European Union, contract number ICA4-CT2002-10047.
- Darmon, N., Ferguson, E., Briend, A., 2002. Linear and nonlinear programming to optimize the nutrient density of a population's diet: an example based on diets of preschool children in rural Malawi. *American Journal of Clinical Nutrition* 75, 245–253.

- Dewey, K.G., Brown, K.H., 2003. Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin* 24 (1), 5–28.
- Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B., Raimbault, M., 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 379–383.
- Helland, M.H., Wicklund, T., Narvhus, J.A., 2004. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology* 91, 305–313.
- Lei, V., Jakobsen, M., 2004. Microbiological characterization and probiotic potential of *koko* and *koko* sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of Applied Microbiology* 96 (2), 384–397.
- Mouquet, C., Trèche, S., 2001. Viscosity of gruels for infants: a comparison of measurement procedures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52, 389–400.
- Mouquet, C., Greffeuille, V., Trèche, S., 2006. Characterization of the consistency of gruels consumed by infants in developing countries: assessment of the bostwick consistometer and comparison with viscosity measurements and sensory perception. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57, 459–469.
- Mouquet, C., Salvignol, B., Hoan, N.V., Monvois, J., Trèche, S., 2003. Ability of a « very low-cost extruder » to produce instant infant flours at a small scale in Vietnam. *Food Chemistry* 82, 249–255.
- Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Guyot, J.P., Tou, E.H., Rochette, I., Trèche, S., 2008. Consumption pattern, biochemical composition and nutritional value of fermented pearl millet gruels in Burkina Faso. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59, 716–729.
- Mugula, J.K., Narvhus, J.A., Sorhaug, T., 2003. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of *togwa*, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 83, 307–318.
- Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Havelaar, A., 1989. Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant good ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 8, 351–361.
- Nguyen, T.T.T., Loiseau, G., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S., Guyot, J.P., 2007a. Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: a new method for preparing high energy density complementary foods for young children. *Food Chemistry* 100, 623–631.
- Nguyen, T.T.T., Guyot, J.P., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Loiseau, G., 2007b. Effect of high pressure homogenisation on the capacity of *Lactobacillus plantarum* A6 to ferment rice/soybean slurries to prepare high energy density complementary food. *Food Chemistry* 102, 1288–1295.
- Nnam, N.N., 2000. Chemical evaluation of multimixes formulated for some local staples for use as complementary foods in Nigeria. *Plants Food for Human Nutrition* 55, 255–263.
- Onyango, C., Henle, T., Hofmann, T., Bley, T., 2004. Production of high energy density fermented *uji* using a commercial alpha-amylase or by single-screw extrusion. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 37, 401–407.
- Oyewole, O.B., 1997. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control* 8, 289–297.
- Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Vernière, C., Humblot, C., Diawara, B., Guyot, J.P., 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (*ben-saalga*) of functional interest in nutrition. *International Journal of Food Microbiology* 128, 395–400.
- Totté, A., Tine, E., Seye, N., Mathiam, J.M., Roblain, D., Thonard, P., 2003. Innovation et transfert de technologie: cas du contrôle de la fermentation du mil par l'utilisation d'un starter lactique. In: Brouwer, I.D., Traoré, S., & Trèche (Eds.), *Food Based Approaches for a Healthy Nutrition in West Africa*. Presses Universitaires de Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 709–723.
- Tou, E.H., Guyot, J.P., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Counil, E., Traoré, A.S., Trèche, S., 2006. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology* 106, 52–60.
- Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Traoré, A.S., Trèche, S., Guyot, J.P., 2007a. Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and energy density of *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chemistry* 100, 935–943.
- Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Picq, C., Traoré, A.S., Trèche, S., Guyot, J.P., 2007b. Improving the nutritional quality of *ben-saalga*, a traditional fermented millet-based gruel, by co-fermenting millet with groundnut and modifying the processing method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 40, 1561–1569.
- Trèche, S., Mbome, L.L., 1999. Viscosity, energy density and osmolality of gruels for infants prepared from locally produced commercial flours in some developing countries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50, 117–125.
- Trèche, S., Mouquet-Rivier, C., 2008. Use of amylases in infant food. In: Porta, R., Di Pierro, P., Mariniello, L. (Eds.), *Recent Research Developments in Food Biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids*. Research Signpost, Trivandrum, pp. 213–245.
- Vieu, M.C., Traoré, T., Trèche, S., 2001. Effects of energy density and sweetness of gruels on Burkinabè infant energy intakes in free living conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52, 213–218.

**4.2.3. Projet d'article 3: Limites d'utilisation de souches de bactéries lactiques sélectionnées pour leurs activités amylasique, phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique pour fermenter un mélange mil-soja**

### Fermentation of a pearl millet-soybean slurry to produce gruels for complementary foods for young children: selecting efficient lactic acid bacteria strains for functional properties did not achieve expected performances in the food matrix

L.T. Songré-Ouattara<sup>a</sup>, C. Mouquet-Rivier<sup>b</sup>, C. Humblot<sup>b</sup>, I. Rochette<sup>b</sup>, B. Diawara<sup>a</sup>, J.P. Guyot<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>IRSAT, Département Technologie Alimentaire, 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso

<sup>b</sup>IRD, UMR 204 IRD/Montpellier1/Montpellier2/SupAgro (NUTRIPASS), F-34394 Montpellier, France

\*Corresponding author: IRD; UMR 204 IRD/Montpellier1/Montpellier2/SupAgro (NUTRIPASS), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

E-mail address: jpguyot@ird.fr

#### Abstract

The fermentation of a slurry composed of a mixture of pearl millet with soybean was investigated in order to prepare complementary foods for young children. Inoculation was either by back slopping or by using lactic acid bacteria selected for their ability to hydrolyse starch, phytate or  $\alpha$ -galactooligosaccharides ( $\alpha$ -GOS). Starter cultures thrived on the slurry as shown by counts on MRS agar, TTGE fingerprints and fermentation patterns. The fermentation of precooked slurries inoculated by back slopping or with mixed cultures containing the amylolytic strain *Lb. plantarum* A6 enabled partial starch hydrolysis, as indicated by production of maltotriose. Corresponding gruels had a suitable consistency at high dry matter content, and therefore a high energy density:  $88.7 \pm 4.2$  and  $75.8 \pm 5.1$  kcal/100 g of sweetened gruel, respectively. However, the increase in energy density was less than that obtained with the previously investigated pearl millet-groundnut gruels. Unexpectedly, no decrease in phytates was observed in any of the experiments, suggesting the presence of an inhibitor of phytase activity in soybean. Initial concentrations of  $\alpha$ -GOS were very low whereas a high concentration of melibiose was observed, probably due to raffinose and stachyose hydrolysis by endogenous enzymes before fermentation. Moreover, the concentration of  $\alpha$ -GOS did not vary throughout the fermentation. Implications of  $\alpha$ -GOS as antinutritional factors and their potential beneficial effect as prebiotics are discussed.

**Keywords:** pearl millet, soybean, cereal fermentation, amylase,  $\alpha$ -galactosidase, phytase, complementary food, energy density

---

#### 1. Introduction

In many African countries, the complementary foods that are introduced in the diet of infants during transition to an adult diet are mainly traditional cereal-based gruels. These gruels rarely fulfil the infant's nutritional needs as they have very low energy and nutrient densities (Tou, Mouquet-Rivier, Rochette, Traoré, Trèche & Guyot, 2007a; Tou, Mouquet-Rivier, Picq, Traoré, Trèche, & Guyot, 2007b). Fortification with additional locally available nutrients is one of the cheapest ways to improve their nutritional quality (Nnam, 2000). Oilseeds and legumes are valuable

vegetal sources of proteins and lipids, and are of low cost compared to animal proteins, which the great majority of disadvantaged populations generally cannot afford. A wide range of legumes including soybean, groundnuts, cowpea, and pigeon peas are grown in developing countries. In addition to increasing protein and lipid contents, blends of cereals and legumes provide an optimal combination of essential amino acids (Mensah & Tomkins, 2003). Several studies, like those on *ogi* (Akinrele, Makanju & Edwards, 1969; Oluwamukomi, Eleyinmi & Enujiugha, 2005) and on *ben-saalga* (Tou et al., 2007a and b) proposed co-fermentation with legumes to improve the macronutrient balance of traditional fermented

gruels. To increase the energy density of infant gruels, more sophisticated methods have to be used, such as the addition of amylase from commercial sources or from malt, or extrusion cooking (Trèche & Mouquet-Rivier, 2008).

However, the presence of several antinutritional factors in most legumes may reduce their nutritive value and restrict their wider use and acceptance. Some of these antinutritional factors, like phytates, which decrease the bioavailability of minerals such as calcium, iron and zinc (Hurrell, Lynch, Bothwell, Gori, Glahn & Hertrampf, 2004) or  $\alpha$ -galactooligosaccharides ( $\alpha$ -GOS), in particular raffinose and stachyose, which cause gastric distress, flatulence and diarrhoea in humans (Puchart, Vrsanská, Bhat & Biely, 2000) are thermostable and remain in the meal after cooking. Phytate and  $\alpha$ -GOS contents can be reduced by enzymatic hydrolysis during fermentation or germination and these biological unit operations consequently improve the nutritional quality of the fermented foods (Hachmeister & Fung, 1993; Tou et al., 2006).

Few investigations have been conducted on the production of fermented complementary foods for young children in developing countries using starter cultures to comply with international recommendations concerning their nutritional quality (e.g. increase in energy density). The use of starter cultures or favouring the action of the natural microflora to hydrolyse starch with the aim of increasing the energy density of infant gruels was recently explored by Nguyen, Loiseau, Icard-Vernière, Rochette, Trèche and Guyot (2007). These authors investigated the fermentation of a rice-soybean mixture for the production of a new functional complementary food using combinations of different processes with amylolytic lactic acid bacteria (ALAB). An increase in the macronutrient content and energy density of *ben-saalga*, a traditional fermented pearl millet-based gruel eaten in Burkina Faso, was obtained by combining the addition of groundnut and the use of ALAB as starter culture instead of using malt as a source of amylase (Songré-Ouattara, Mouquet-Rivier, Icard-Vernière, Rochette, Diawara & Guyot, 2009), or by favouring the action of the natural microflora (Tou et al., 2007a and b). Another approach consisted in using probiotic LAB to produce a fermented maize porridge with high energy density and low viscosity, using maize flour and barley malt for starch hydrolysis, with the idea that the probiotic LAB would help reduce the incidence of food-related diarrhea (Helland, Wicklund & Narvhus, 2004).

Depending on the raw materials used as starch, protein and lipid sources, the behaviour of the microorganisms and their effects may vary, making it necessary to explore some, not all, raw material combinations that are most likely to satisfy nutritional requirements. In this connection, we investigated the ability of some lactic acid bacteria (LAB) strains to ferment a pearl millet-soybean slurry. The objective was to investigate the ability of selected LAB strains, cultivated alone or in mixed cultures, to hydrolyse starch to produce high energy density (HED) gruels and to reduce the content of antinutritional factors. *Lactobacillus plantarum* 4.4 and *Lactobacillus fermentum* 7.4, previously isolated from *ben-saalga* were selected because they displayed high phytase and  $\alpha$ -galactosidase activities on culture media and during enzyme detection tests (Songré-Ouattara, Mouquet-Rivier, Icard-Vernière, Humblot, Diawara & Guyot, 2008). *Lb. plantarum* A6 was used as ALAB because of its proven efficiency in hydrolysing starch in various food matrices (Nguyen et al., 2007; Songré-Ouattara et al., 2009).

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Raw materials

A local variety of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) called Gampela was purchased from a farmer. Soybean (*Glycine max*) was purchased at a local market in Ouagadougou, Burkina Faso. Raw materials were cleaned of all impurities using the traditional methods of winnowing and sorting by hand, before use.

### 2.2. Preparation of starter cultures

The phytasic and  $\alpha$ -galactosidasic LAB strains, *Lactobacillus plantarum* 4.4 and *Lactobacillus fermentum* 7.4, and the amylasic strain *Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053) were conserved in 40% glycerol at -80°C.

*Lb. plantarum* 4.4 and *Lb. fermentum* 7.4 were inoculated either alone or each in a mixed culture with *Lb. plantarum* A6. Mixed cultures were used to determine if the association of the phytasic and  $\alpha$ -galactosidasic strains displayed different behaviour when co-cultured with the strong amylolytic LAB *Lb. plantarum* A6.

For routine cultivation, the strains were grown overnight in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth medium at 30°C. To inoculate the gelatinized pearl millet-soybean slurry, the cultures were centrifuged at 8000×g for 10 min at 4°C, and the cells obtained were washed in sterile distilled water, centrifuged in the same conditions and suspended in sterile distilled water to form a cell suspension containing approximately 10<sup>9</sup> cfu/ml.

### 2.3. Description of the processing method

After cleaning, a blend of pearl millet and soybean grains, formulated at a ratio of 70:30 (w/w, DM) to achieve the desirable macronutrient balance for complementary food, was processed according to the modified method described by Tou et al. (2007a). The blend was first soaked in water (1:1.5 w/v) for 16 h, washed with water (1:2 w/v), and drained for 30 min. It was subsequently milled for 3 min using a laboratory blender (Warring, LB20E, USA), sieved with water (1:3.5 w/v) through muslin. The resulting slurry was boiled for 10 min to gelatinize the starch, and then cooled to around 30°C (Fig.1).

The inoculation was carried out with either a single starter culture or with a mixed culture of LAB at a ratio of 1:1 to obtain an initial biomass of around 10<sup>7</sup> cfu/g (corresponding ~1%, v/w) or by back slopping (3 % v/w), with the addition of a small amount of fermented paste from a previous successful natural fermentation. All fermentations were made at ambient temperature (around 30°C) for 24 h. Experiments were performed in triplicate for each condition of fermentation.

### 2.4. Physical and biochemical analyses

#### 2.4.1. Changes in pH.

The pH of the slurry during fermentation was recorded on-line using a WTW 340i pH meter (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

#### 2.4.2. Analysis of sugars and fermentation products.

Monosaccharides, disaccharides and maltodextrins were analyzed by high-performance ion chromatography (HPIC) using an anion exchange chromatograph (Dionex S.A., Voisins-Le-Bretonneux, France) with a carboPac PA1 column.

The following conditions were used: mobile phase, MQ H<sub>2</sub>O, NaOH (150 mM), sodium acetate gradient of 0 to 300 mM; flow rate, 0.1 ml.min<sup>-1</sup>; temperature, 34°C. Lactic acid, acetic acid and ethanol were analyzed as previously described (Calderon, Loiseau & Guyot, 2001) by HPLC using an Aminex HPX-87H, 300 x 7.8 mm column (Biorad, Yvry-sur-seine, France) connected to a refractive index detector (Model Waters 2410; Biorad, Yvry-sur-Seine, France). The following conditions were used: mobile phase, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 mmol.l<sup>-1</sup>); flow rate, 0.8 ml.min<sup>-1</sup>, and temperature, 65°C. For the analyses, samples (2 g) of slurry collected at 2 h intervals during the first 8 h of fermentation and subsequently at 22 and 24 h were homogenized with 8 ml of distilled water. To stop the fermentation, 0.2 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N was added to each 1.3 ml sub-sample in a microtube, which was centrifuged at 8000×g for 10 min at 4°C, and the supernatant was frozen at - 20°C until analysis. Before analysis, supernatants were filtered through 0.20 µm pore size filters and 10 µl were then injected onto the HPLC system. For the HPIC system, 25 µl were injected after appropriate dilution. The results are expressed in mmol/kg of slurry.

#### 2.4.3. Proximate composition.

Dry matter (DM) contents of the samples were determined by oven drying at 105°C to constant weight. Protein content (N × 6.25) was determined by the method of Kjeldahl (AFNOR, NF V03-050, 1970) based on determination of nitrogen content. Lipids were extracted with ether oil using the HT6 Soxtec system (Tecator, Höganäs, Sweden) according to the AOAC Official Method 2003.06 (AOAC, 2003). Ash content was determined by calcination in a furnace at 530°C using the AFNOR Official Method (AFNOR, NF V03-760, 1981). Insoluble fibre (acid detergent fibre) content, corresponding approximately to cellulose and lignin, was determined using the gravimetric method of Van Soest (1963) with a Dosi-fiber (Selecta, Barcelona, Spain). Available carbohydrate content was obtained by difference (100 - proteins - lipids - acid detergent fibre - ashes). The energy values were calculated using the Atwater coefficients: 4 kcal / g DM (16.7 kJ / g DM) for proteins and available carbohydrates, and 9 kcal / g DM (37.6 kJ / g DM) for lipids, and expressed in kcal / 100 g of DM. All analyses were made in duplicate and the results were averaged.

### 2.4.4. Analysis of phytate (IP6).

Phytate (inositol 6-phosphate, IP6) content was determined according to the method of Talamond, Gallon and Trèche (1998) using high-performance ion chromatography. Phytate was extracted from 0.2 g of freeze-dried samples, treated with 10 ml of HCl 0.5 M, evaporated overnight using a centrifugal evaporator RC 10-10 (JOUAN, Saint Herblain, France). The residue was mixed in 1 ml MQ water, filtered and diluted for analysis. IP6 content was expressed in mg/100 g DM.

### 2.5. Preparation of Gruels and Rheological Measurements

For each experiment, three Gruels with different DM contents were prepared by boiling the fermented slurry for 5 min. The consistency of the Gruels was measured after cooling to 45°C using a Bostwick consistometer (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, Virginia, USA) (Bookwalter, Peplinski, & Pfeifer, 1968) according to the procedure described by Mouquet, Greffeuille & Trèche (2006). The Bostwick flow value was expressed in mm/30 s. This parameter ranges from 0 (almost solid) to 240 mm/30 s (very fluid, corresponding to a Gruel that can be drunk). The energy density was calculated for Gruels with suitable consistency, corresponding to a Bostwick flow of 120 mm/s (Vieu, Traoré & Trèche, 2001) after determination of their dry matter content.

### 2.6. Microbiological Analyses

#### 2.6.1. Plate counts.

For all experiments, 10 g of slurry samples, taken at 0 and 24 h of fermentation, were homogenized with 90 ml sterile peptone water solution using a stomacher 400 (Type BA 7021, England). Counts were made by plate count on MRS agar after serial decimal dilution. Samples were incubated at 30°C for 48 h.

#### 2.6.2. DNA extraction from pearl millet-soybean slurry

A total of 1.6 g of freeze-dried MS slurry samples collected at 0 and 24 h during fermentation were suspended in 10 ml of 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8, and

then homogenized for 30 s at the maximum speed with the Ultraturrax T8 apparatus (Jankel et Kindel, IKA Labortechnik 24 000 rpm). The resulting suspension was centrifuged at 13 000 × g for 10 min and the supernatant was eliminated. The cell pellets were suspended again in 12 ml of 0.9% NaCl. A series of centrifugation steps was performed at different speeds (twice at 1000 × g for 10 min at 4°C and 13 000 × g for 20 min at 4°C) to eliminate undesirable particles and recover the cells. Total DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit A1120 (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions.

#### 2.6.3. PCR analysis.

The purified DNA was amplified with primers gc338f and 518r spanning the V3 region of the 16 S ribosomal DNA (rDNA) using methods and amplification conditions described previously by Ampe, Omar, Moizan, Wachter and Guyot (1999). Amplification was performed with a Perkin-Elmer model 2400 thermal cycler, Gene Amp PCR system.

#### 2.6.4. TTGE analysis.

This technique was used to track the LAB species used in this study to ferment the pearl millet-soybean slurries. According to the principle of the technique, DNA fragments of the same length but with different sequences can be separated, based on the decreased electrophoretic mobility of partially melted double-strand DNA molecules on polyacrylamide gel along a chemical denaturing gradient (DGGE) or on a temporal increase in temperature (TTGE). TTGE was performed with the Dcode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Paris, France) on 16 cm x 16 cm x 1 mm gels. Polyacrylamide gels 8% (w/v) were prepared with 1 x TAE buffer diluted from 50 x TAE buffer, 0.1 % APS, 6.6 mM TEMED and a final urea concentration of 6 M. Ten µl samples of PCR products were deposited in wells. A mix of 5 Gram positive strains with low GC% collection species were used as a marker to construct a ladder to enable the presumptive identification of the LAB strains in the fermented slurries (Fig. 2): *Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053, BCCM, Gent, Belgium), *Lactobacillus fermentum* (LMG 9846T), *Pediococcus pentosaceus* (ATCC43200), *Weissella paramesenteroides* (LMG9852), *Bacillus cereus* (ATCC9139). Electrophoresis was run at a

fixed voltage of 70 V for 16 h with an initial temperature of 63°C, and a ramp rate of 0.4°C/h. At the end, the gels were stained for 10 to 15 min with an ethidium bromide (BET) solution (250 µl/L), rinsed for 10 min in 1 x TEA buffer and photographed on a UV transillumination table (GelDoc2000). TTGE analysis was performed on samples obtained from three independent fermentation experiments.

### 2.7. Statistical analysis

Each experiment was made in triplicate; results are given as mean ± standard error. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA), using the general model procedure of STATGRAPHICS Plus version 5.1.

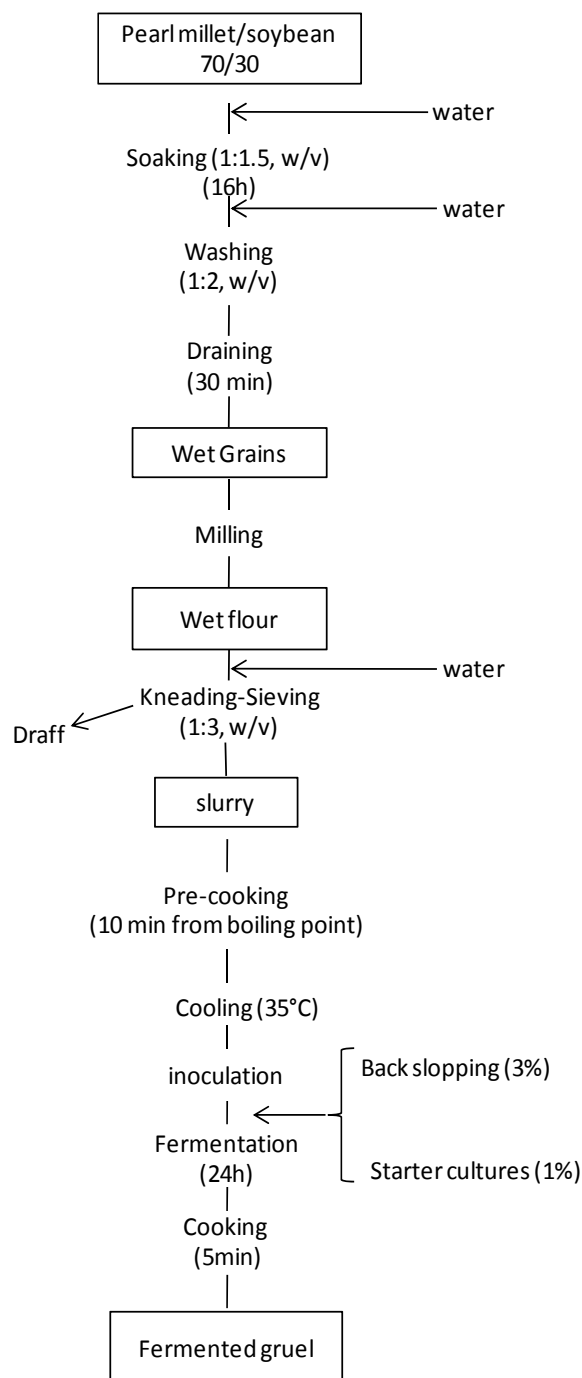


Fig. 1. Processing of the pearl millet-soybean blend to produce a fermented gruel.

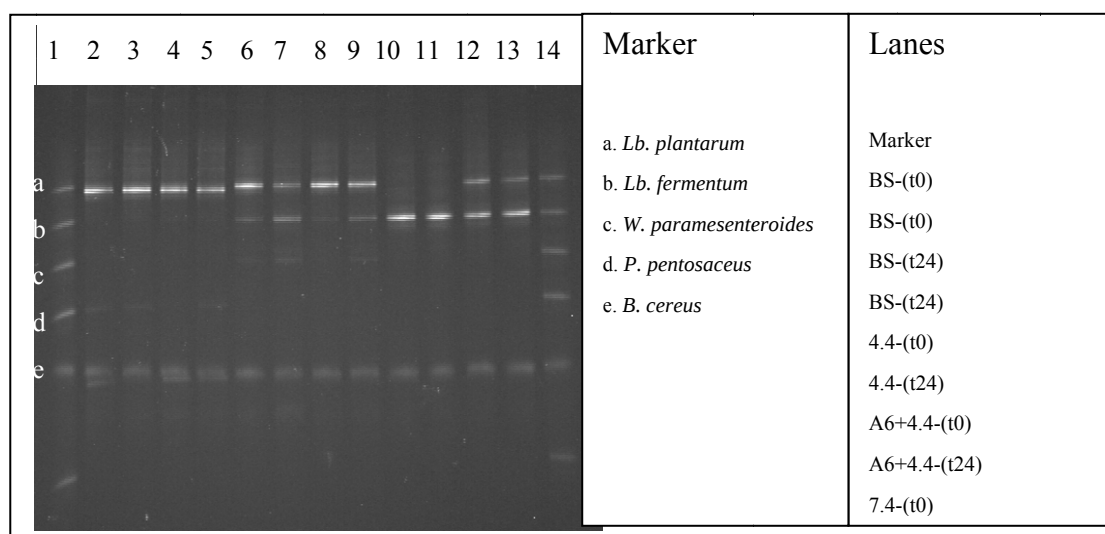
### 3. Results

#### 3.1. Analysis of the LAB population in the pearl millet-soybean slurries

The initial MRS-counts of pre-cooked pearl millet-soybean slurries inoculated by back slopping or with pure cultures of *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 alone or in co-culture with *Lb. plantarum* A6 were in the same range, between  $1.2 \times 10^7$  and  $2.9 \times 10^7$  cfu/g (Table 1). After 24 h of fermentation, counts increased by a factor of  $10^2$ .

TTGE analysis of a PCR-amplified 16S rRNA gene fragment was used to monitor the presence of LAB species in the pearl millet-soybean slurry samples at the beginning and at the end of fermentation. This method enabled rapid and presumptive identification of dominant species in the MS slurries by comparing the position of the bands with a ladder comprising five species. Whatever the inoculum type used, TTGE profiles were similar at

the beginning and at the end of the fermentations. In the MS slurry inoculated by back slopping, i.e. with a natural inoculum from the end of a previous spontaneous fermentation, microbial diversity was very low (Fig. 2, lanes 2 to 5). A high intensity band (Fig. 2, lanes 2 to 5) was positioned at the same level of the *Lb. plantarum* band in the ladder made with collection species (Fig. 2, lanes 1 and 14), and a faint band corresponded to *P. pentosaceus*. In the MS slurries inoculated with *Lb. plantarum* strains only, i.e. strain 4.4. alone (Fig. 2, lanes 6 and 7) or in combination with strain A6 (Fig. 2, lanes 8 and 9), a high intensity band was consistently positioned at the level of the *L. plantarum* band. In the MS slurries inoculated with *Lb. fermentum* 7.4 alone (Fig. 2, lanes 10 and 11) or combined with *Lb. plantarum* A6 (Fig. 2, lanes 12 and 13), TTGE fingerprints were consistent with the inoculation pattern. In the MS slurry inoculated with *Lb. fermentum* 7.4 alone (Fig. 2, lanes 10 and 11), high intensity bands were positioned at the level of the *Lb. fermentum* species, whereas when the coculture was used, bands positioned at the *Lb. fermentum* and *Lb. plantarum* levels were detected.



BS: back slopping; 4.4: *Lb. plantarum* 4.4; 7.4: *Lb. fermentum* 7.4; A6+4.4: co-culture of *Lb. plantarum* A6 and *Lb. plantarum* 4.4; A6+7.4: co-culture of *Lb. plantarum* A6 and *Lb. fermentum* 7.4

Fig. 2. TTGE fingerprints of the amplified V3 region of the 16SrRNA genes from total DNA extracted from samples at time 0 (t0) and after 24h of fermentation (t24) of pearl millet-slurries inoculated by back slopping or with lactic acid bacteria.

## 3.2. Changes in mono- and disaccharides and maltooligosaccharides during fermentation of the pearl millet-soybean slurries

In the raw pearl millet and soybean before processing, sucrose content was high and only traces of glucose, fructose and maltose were detected (Table 2). In contrast, at the beginning of fermentation of the pre-cooked pearl millet-soybean slurry, i.e. after inoculation, maltose was the sugar present at the highest concentration, ranging from

32-41 mmol/kg of slurry, followed by glucose (10-15 mmol/kg of slurry) and fructose (7.7-10.4 mmol/kg of slurry), while only traces of sucrose were detected (Fig. 3A). This indicates that, before the fermentation step *sensu stricto*, some hydrolysis of the raw material occurred without any fermentation as indicated by initial levels of lactic acid, acetic acid and ethanol in Fig. 4. In the slurries inoculated with the LAB strains, alone or in combination, these compounds followed a similar kinetic pattern of consumption during fermentation with final concentrations at 24 h of between 19-25 mmol/kg of slurry

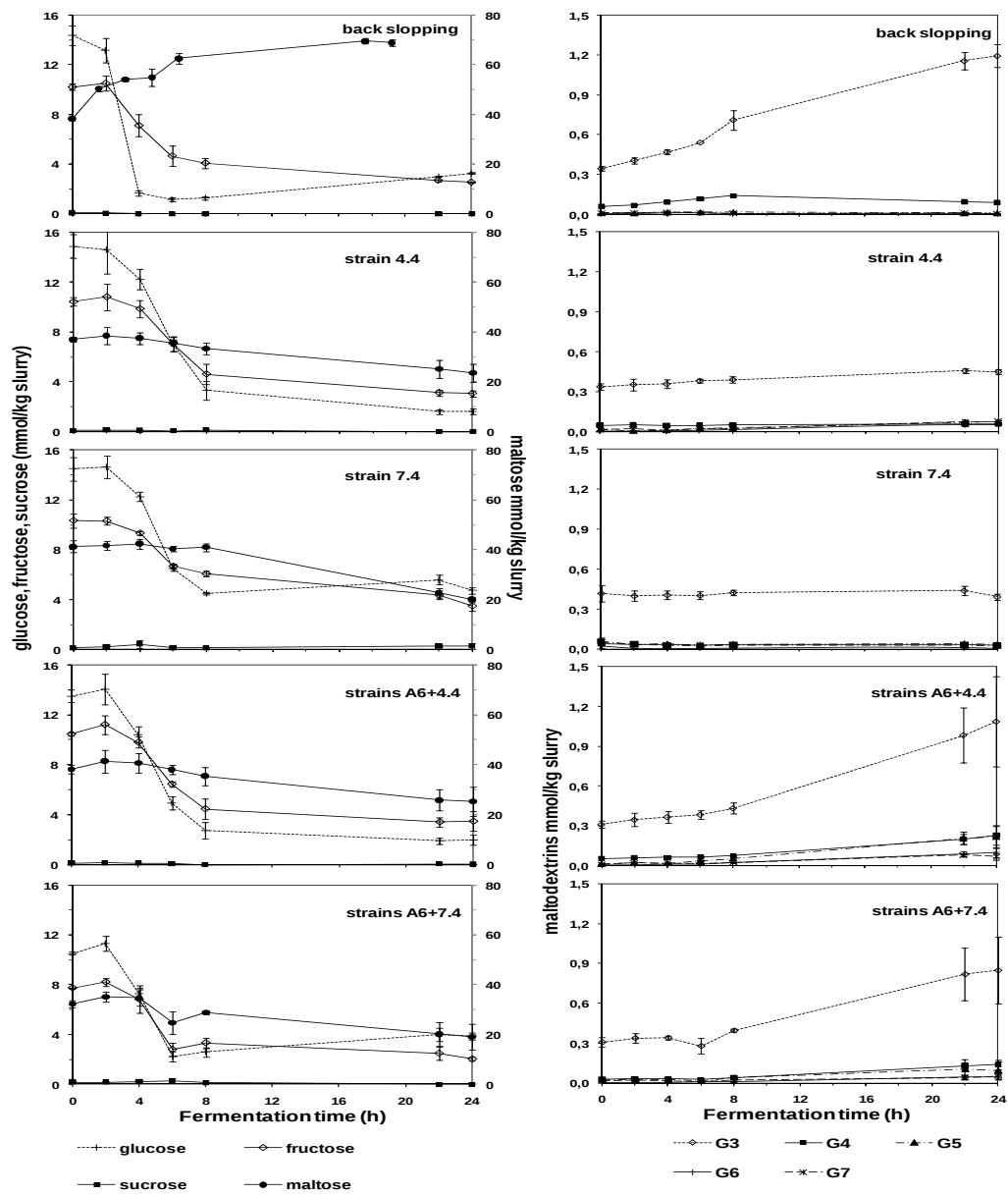


Fig. 3. Changes in mono-, disaccharide and maltodextrin concentrations during the fermentation of pearl millet-soybean slurries inoculated by back slopping or with strains of lactic acid bacteria.

Table 2. Mono- and disaccharides,  $\alpha$ -galactoside contents in pearl millet and soybean before and after soaking

| Treatment           | Mono- and disaccharides |                 |                 |                 | $\alpha$ -galactosides |                 |                 |                 |
|---------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                     | Glucose                 | Fructose        | Sucrose         | Maltose         | Melibiose              | Raffinose       | Stachyose       | Verbascose      |
|                     | g/100g dry basis        |                 |                 |                 | g/100g dry basis       |                 |                 |                 |
| <i>Pearl millet</i> |                         |                 |                 |                 |                        |                 |                 |                 |
| Raw                 | 0.03 $\pm$ 0.00         | 0.01 $\pm$ 0.00 | 2.89 $\pm$ 0.04 | 0.05 $\pm$ 0.00 | 0.38 $\pm$ 0.02        | 0.58 $\pm$ 0.02 | 0.04 $\pm$ 0.00 | 0.01 $\pm$ 0.00 |
| Soaked 16 h at 37°C | 0.02 $\pm$ 0.01         | 0.02 $\pm$ 0.00 | 1.34 $\pm$ 0.08 | 0.05 $\pm$ 0.07 | 3.58 $\pm$ 0.07        | 0.60 $\pm$ 0.03 | 0.06 $\pm$ 0.00 | nd              |
| <i>Soybean</i>      |                         |                 |                 |                 |                        |                 |                 |                 |
| Raw                 | 0.01 $\pm$ 0.00         | 0.08 $\pm$ 0.00 | 8.25 $\pm$ 0.02 | 0.41 $\pm$ 0.38 | 1.84 $\pm$ 0.11        | 0.74 $\pm$ 0.02 | 3.10 $\pm$ 0.09 | 0.12 $\pm$ 0.00 |
| Soaked 16 h at 37°C | 0.02 $\pm$ 0.00         | 0.09 $\pm$ 0.00 | 6.87 $\pm$ 0.08 | 0.13 $\pm$ 0.11 | 2.37 $\pm$ 0.00        | 0.72 $\pm$ 0.01 | 3.08 $\pm$ 0.04 | 0.14 $\pm$ 0.01 |

Values are mean  $\pm$  SD of three determinations. nd: non detectable

for maltose, 2-4 mmol/kg of slurry for glucose and 2-3.5 mmol/kg of slurry for fructose. In the slurry inoculated by back slopping, a rapid decrease in glucose was observed and contrary to the other fermentation patterns, maltose accumulated to reach a value of 68.9 mmol/kg of slurry at 24 h (Fig. 3A).

As for maltooligosaccharides, maltotriose was detected at the highest concentrations in all the fermentations (Fig.3B), while only traces of the other maltodextrins (G4 to G7) were detected. In all fermentations, the initial concentration of maltotriose was around 0.3-0.4 mmol/kg of slurry, and did not markedly vary during fermentation of the MS slurries inoculated with the monoculture of *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 (Fig. 3B). In contrast, the concentration of maltotriose increased during fermentation of the slurries inoculated by back slopping or with the co-cultures containing *Lb. plantarum* A6. At the end of the fermentation, in the slurries inoculated either by back slopping or with the mixed cultures of *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 with *Lb. plantarum* A6, the concentration of maltotriose increased to 1.19 $\pm$ 0.15, 1.08 $\pm$ 0.59 and 0.85 mmol/kg, respectively.

### 3.3. Kinetics of the formation of organic acids and ethanol during fermentation of the pearl millet-soybean slurries

The pH decreased quickly during the first 6 h of fermentation from around 6.4 to between 3.7 and 4.0 (Table 1). Lactic acid was the main end-product formed during all fermentations and the final concentrations of the end products differed significantly ( $P<0.05$ ). In the fermentation experiment with the heterofermentative LAB, *Lb. fermentum* 7.4, ethanol was produced (from 3.8 $\pm$ 0.5 at time 0 to 43.5 $\pm$ 3.5 mmol/kg of slurry at 22 h) together with acetic acid (from 5.4 $\pm$ 0.5 at time 0 to 14.6 $\pm$ 0.2 mmol/kg of slurry at 22 h) and lactic acid (from 5.2 $\pm$ 1.4 at time 0 to 81.7 $\pm$ 1.6 mmol/kg of slurry at 22 h) (Fig. 4). When *Lb. fermentum* 7.4 was co-inoculated with *Lb. plantarum* A6, the fermentation pattern was similar to that of the slurry inoculated by back slopping and was characterized by an increase in lactic acid production (Fig. 4). In this co-culture, lactic acid, ethanol and acetic acid increased from 3.1 $\pm$ 2.2 to 99.8 $\pm$ 4.8 at 22 h, 3.8 $\pm$ 1.7 to 26.5 $\pm$ 3.5 and 4.2 $\pm$ 0.2 to 12.3 $\pm$ 0.7 mmol/kg of slurry, respectively. Similarly, in the slurry inoculated by back

slopping, lactic acid, ethanol and acetic acid increased from 3.8 $\pm$ 0.8 to 104.8 $\pm$ 3.9, 3.5 $\pm$ 0.6 to 32.5 $\pm$ 3.3 and 5.4 $\pm$ 0.5 to 15 $\pm$ 1.2 mmol/kg of slurry.

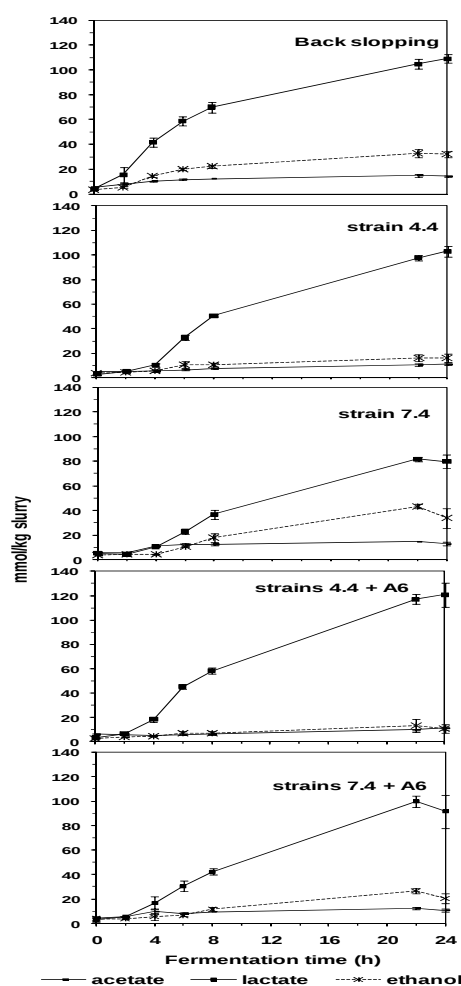


Fig. 4. Kinetics of end product formation during the fermentation of pearl millet-soybean slurries inoculated by back slopping or with strains of lactic acid bacteria.

In the slurry inoculated with the facultative heterofermentative *Lb. plantarum* strains (4.4. and A6) alone or in co-culture, as expected, a higher concentration of lactic acid was produced whereas the ethanol concentration was lower. With strain 4.4 alone, in the end-products of fermentation, lactic acid increased from  $2.7 \pm 0.2$  to  $98 \pm 2.2$  mmol/kg of slurry, acetic acid from  $4.8 \pm 0.5$  to  $11 \pm 0.7$  mmol/kg of slurry, and ethanol from  $3.6 \pm 1.3$  to  $16.3 \pm 3.4$  mmol/kg of slurry. When both strains 4.4 and A6 were mixed, the main change concerned lactic acid, which increased from  $3.3 \pm 0.2$  to  $120.8 \pm 10.0$  mmol/kg of slurry.

## 3.4. Dry matter content and energy density of pearl millet-soybean based fermented gruels

At a consistency suitable for young children (Bostwick flow of 120 mm/30s), the highest dry matter content of gruel was obtained with the slurry inoculated by back slopping ( $17.9 \pm 1.0$  g DM/100 g of gruel,  $P < 0.05$ ) (Table 3). At this consistency, in the gruels prepared from the slurries inoculated with the co-culture of the amylolytic LAB *Lb. plantarum* A6 with *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4, the dry matter content was  $14.3 \pm 2.3$  and  $14.8 \pm 1.2$  g DM/100 g of gruel, respectively. Lower DM contents were obtained with the gruels prepared from the slurries inoculated with monocultures of *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 (Table 2). For the sake of comparison, gruels were prepared from pearl millet-soybean slurries fermented using the traditional process (Tou et al., 2007a), i.e. by spontaneous fermentation of the slurry without a pre-cooking step and inoculation.

Table 3. Dry matter content and energy density of fermented gruels prepared from pre-cooked pearl millet-soybean slurries inoculated either by back slopping or with starter cultures, compared to values obtained with fermented pearl millet-groundnut gruels obtained under similar conditions (Songré-Ouattara et al., 2009).

|                                                                     | Dry matter content<br>(g DM/100g of sweetened gruel) | Energy density<br>(kcal/100g of sweetened gruel) |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Pearl millet-soybean gruels</b>                                  |                                                      |                                                  |
| Inoculation by back slopping                                        | $20.4 \pm 1.0^f$                                     | $88.7 \pm 4.2^e$                                 |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> 4.4                           | $14.6 \pm 0.5^{cd}$                                  | $63.8 \pm 2.1^{bc}$                              |
| Inoculation with <i>Lb. fermentum</i> 7.4                           | $13.6 \pm 0.1^{bc}$                                  | $59.3 \pm 0.2^{ab}$                              |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> strains A6 + 4.4              | $16.9 \pm 2.3^{de}$                                  | $73.5 \pm 9.9^{cd}$                              |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> A6 + <i>Lb. fermentum</i> 7.4 | $17.4 \pm 1.2^e$                                     | $75.8 \pm 5.1^{cd}$                              |
| Natural fermentation                                                | $11.8 \pm 0.1^{ab}$                                  | $51.4 \pm 0.6^{ab}$                              |
| <b>Pearl millet-groundnut gruels</b>                                |                                                      |                                                  |
| Inoculation by back slopping                                        | $16.9 \pm 5.0^{de}$                                  | $80.4 \pm 23.8^{de}$                             |
| Inoculation with <i>Lb. plantarum</i> A6                            | $17.8 \pm 0.9^{ef}$                                  | $84.7 \pm 4.4^{de}$                              |
| Natural fermentation                                                | $10.7 \pm 0.5^a$                                     | $50.6 \pm 2.4^a$                                 |

<sup>a-e</sup> Values in the columns with different letters in superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ).

At a Bostwick flow of 120 mm/30s, the DM content was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than that of the gruels prepared from the slurries fermented by back slopping or with the mixed cultures containing *Lb. plantarum* A6 (Table 2). Macronutrient content was  $22.4 \pm 0.5$  % DM for proteins and  $11.4 \pm 0.69$  % DM for lipids. Carbohydrate content was  $60.9 \pm 0.9$ , fibre content  $2.4 \pm 0.2$ , and ash  $2.9 \pm 0.1$  % DM. Based on this proximate composition of the blend and DM contents at a Bostwick flow of 120 mm/30s, taking into account the addition of 3 g of sugar/100 g of gruel, the energy density of the gruels were calculated (Table 2). The highest values were obtained with the fermented slurry inoculated by back slopping, followed by the fermented gruels inoculated with the mixed cultures containing *Lb. plantarum* A6. Energy densities of the fermented gruels inoculated with *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 alone or of the gruel obtained by spontaneous fermentation using the traditional process were lower.

## 3.5. Changes in antinutritional factor content

*Lb. fermentum* 7.4 and *Lb. plantarum* 4.4. were selected for their high phytase and  $\alpha$ -galactosidase activity in MRS medium. Initial phytate contents in MS slurries ranged from 0.72 to 0.82 g IP6/100 g DM (Table 3). Surprisingly, whatever the inoculum type, no decrease in phytate was observed during fermentation. Initial concentrations of the  $\alpha$ -GOS in the slurries were very low, ranging from  $0.09 \pm 0.02$  to  $0.16 \pm 0.03$  mmol/kg of slurry for stachyose,  $0.10 \pm 0.03$  to  $0.15 \pm 0.03$  mmol/kg of slurry for raffinose and only traces of verbascose were found (not shown), whereas the concentration of the  $\alpha$ -galactoside melibiose was around ten times higher than raffinose and stachyose ( $1.14 \pm 0.04$ - $1.53 \pm 0.05$  mmol/kg of slurry) (Fig. 5). In contrast, in the seeds of the raw materials, mainly soybean, regardless of whether they were soaked or not,  $\alpha$ -GOS content was higher than in the slurries (Table 2).

Table 4. Initial and final phytate content in the pearl millet soybean slurries fermented after inoculation by back slopping or with LAB strains

| Experimental fermentation                         | condition | of | Phytate content<br>(g IP6/100g of dry matter) |                 |
|---------------------------------------------------|-----------|----|-----------------------------------------------|-----------------|
|                                                   |           |    | Time (h)                                      |                 |
|                                                   |           |    | 0                                             | 24              |
| Back slopping                                     |           |    | $0.80 \pm 0.03$                               | $0.86 \pm 0.02$ |
| <i>Lb. plantarum</i> 4.4                          |           |    | $0.72 \pm 0.06$                               | $0.80 \pm 0.02$ |
| <i>Lb. fermentum</i> 7.4                          |           |    | $0.82 \pm 0.04$                               | $0.84 \pm 0.03$ |
| <i>Lb. plantarum</i> 4.4+ A6                      |           |    | $0.74 \pm 0.02$                               | $0.80 \pm 0.01$ |
| <i>Lb. fermentum</i> 7.4+ <i>Lb. plantarum</i> A6 |           |    | $0.80 \pm 0.01$                               | $0.83 \pm 0.04$ |

In the slurries, stachyose and raffinose were not degraded either by LAB strains or by the microflora in the natural inoculum used for back slopping. However, melibiose was partially degraded by *Lb. fermentum* 7.4 or in the slurry inoculated by this strain combined with *Lb. plantarum* A6 (Fig. 5).

## 4. Discussion

Viable counts on MRS agar showed that microorganisms thrived on the pearl millet-soybean slurry. These results agree with growth data reported for *Lb. plantarum* A6 on a pearl millet-groundnut slurry (Songré-Ouattara et al., 2009). At the end of fermentation, viable counts in both types of pearl-millet based slurries were ten times higher than those observed for probiotic LAB strains on a maize porridge pre-hydrolysed with amylases from malted barley (Helland et al., 2004), for *L. plantarum* A6 on a gelatinized rice-soybean slurry (Nguyen et al., 2007) and for amylolytic bifidobacteria on a cooked mashed rice slurry (Lee, Lee, Park, Hwang & Ji, 1999).

Like the counts on MRS agar, TTGE fingerprints corresponded to the expected patterns of LAB in the slurries depending on the type of inoculum used, suggesting that the effects observed were mainly due to the starter cultures. The limited microbial diversity observed by TTGE in the slurry inoculated with the natural inoculum (back slopping) may be due to the fact that this inoculum was sampled at the end of the spontaneous fermentation of a pearl millet slurry in the traditional process. LAB present in that inoculum were those able to survive at the low pH prevailing at the end of fermentation. Therefore, it was not surprising to detect a high intensity band positioned at the level of *Lb. plantarum*, since this species is known for its high tolerance to acidity. Furthermore, since TTGE enabled detection of dominant species, diversity could have been underestimated. However, the use of TTGE for the detection of dominant species could be an efficient method to monitor the growth of starter cultures, and check for the presence of other LAB which could out-compete the starter culture.

Maltose, glucose and fructose were the main fermentable carbohydrates. Whatever the inoculation method used, glucose and fructose concentrations and kinetics of consumption were similar in all the experiments. Kinetic patterns did not differ from those observed in other studies in which pearl millet or a mix of pearl millet with groundnut were fermented either spontaneously or after inoculation by back slopping or with pure cultures of LAB (Songré-Ouattara et al., 2009; Tou et al., 2006; Tou et al., 2007a, 2007b), whereas in rice-soybean slurries inoculated with *Lb. plantarum* A6, sucrose was the main fermentable disaccharide present at initial concentrations between 4-5 mmol/kg of gruel (Nguyen et al., 2007). In the study by Nguyen et al. (2007), soybean was previously roasted, destroying the endogenous enzymes which could have been responsible for the hydrolysis of different sugars in the raw material.

In the present study, maltose was present in the pearl millet-soybean slurries in much higher initial concentrations than in the preceding works in which only traces were detected. This may be due to the action of a soybean  $\alpha$ -amylase on pearl millet starch, from the milling step to the precooking step, particularly during the increase in temperature when the starch is gelatinized and is more susceptible to enzymatic hydrolysis. Indeed, the

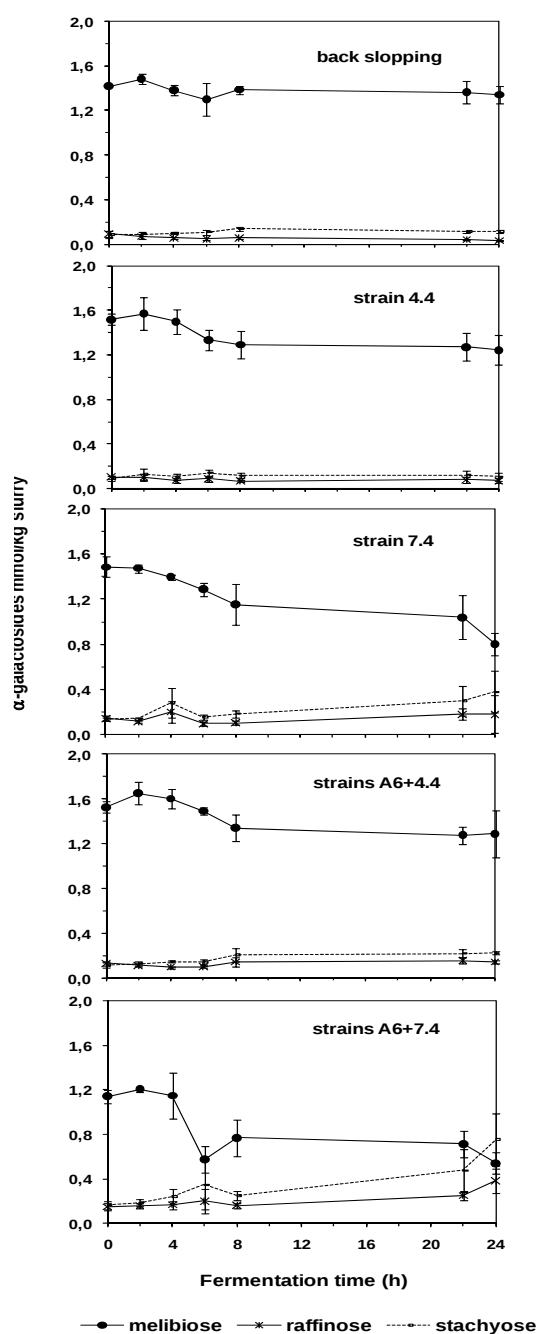


Fig. 5. Changes in  $\alpha$ -galactoside concentrations during the fermentation of pearl millet-soybean slurries inoculated by back slopping or with strains of lactic acid bacteria.

occurrence of a  $\alpha$ -amylase in soybean has been described in higher concentrations than in other legume seeds (Ren et al., 1993). Unlike  $\alpha$ -amylase, which cleaves the  $\alpha(1-4)$  glycosidic linkages in the starch chains and thus has a strong reducing effect on viscosity,  $\alpha$ -amylase attacks the starch chain from the reducing end liberating maltose units. Maltose accumulation during the fermentation of the pearl millet-soybean slurries inoculated by back slopping suggests that the natural microbial population was not efficient for the consumption of maltose. Accumulation of maltose during fermentation is not desirable since post-fermentation contaminating microorganisms, like yeasts, can thrive on maltose and cause product deterioration. Contrasting with this result, maltose did not accumulate during the fermentation of pearl millet alone or mixed with groundnut inoculated by back slopping (Tou et al., 2007a, 2007b) except when malt was used in the process for starch hydrolysis (Tou et al., 2007a, 2007b).

Consistently with the consumption of mono and disaccharides, fermentation was almost homolactic when the *Lb. plantarum* strains were mixed together. Similarly to previous studies in which *Lb. plantarum* A6 was involved (Nguyen et al., 2007; Songré-Ouattara et al., 2009), lactic acid production was higher than the value expected from the consumption of mono and disaccharides, indicating that extra sources of readily fermentable carbohydrates were used, i.e. products from starch hydrolysis. This is not directly apparent from the patterns of sugar consumption in Fig. 3, probably due to a dynamic equilibrium between production and consumption of the products of starch hydrolysis. However, hydrolysis of starch by strain A6 in the pearl millet-soybean slurry was evidenced by the accumulation of maltotriose, whereas in the pearl millet-groundnut slurry fermented by *Lb. plantarum* A6 alone, both maltotriose and maltotetraose accumulated up to around 2 mmol/kg of gruel each (Songré-Ouattara et al., 2009). The low values of energy density and dry matter content obtained with the gruel prepared in the control experiment (naturally fermented pearl millet-soybean slurry) did not significantly differ ( $P \geq 0.05$ ) from those previously obtained with gruels prepared from pearl millet-groundnut slurries fermented under the same conditions (Songré-Ouattara et al., 2009, Table 2). Moreover, in both types of slurry inoculated by back-slopping or with *Lb. plantarum* A6, these values were better than with natural fermentation and did not significantly differ in the two types of experiment. Similarly to the pearl millet-groundnut slurry, the pearl millet-soybean slurry fermented by back slopping enabled preparation of a sweetened gruel of high energy density ( $88.7 \pm 4.2$  kcal/100g of gruel) which meets the required value (84 kcal/100g of gruel) proposed by Dewey & Brown (2003) for young children aged 6-11 months receiving two meals a day. Nevertheless, maltose accumulation and the less stringent process control that could be induced by the use of natural microflora, do not speak in favour of using back slopping in an upgraded process. Surprisingly, compared to the results obtained with fermented pearl millet-groundnut slurries, the use of

soybean seems to have induced lower microbial starch hydrolysis when the mixed culture of *Lb. plantarum* A6 with *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 was used. Indeed, pearl millet-soybean gruels had lower energy density than gruels obtained with the mixture containing groundnut (Songré-Ouattara et al., 2009, Table 2). This suggests that the action of microbial  $\alpha$ -amylases could have been limited by some inhibitory compounds present in the raw soybean. In contrast, strain A6 did very efficiently hydrolyse starch in the rice-roasted soybean mixture investigated by Nguyen et al. (2007), but roasting could have eliminated some thermolabile inhibitory compounds. Considerable decreases in phytate and  $\alpha$ -galactoside contents during the natural fermentation of pearl millet have previously been reported (Tou et al., 2006). Surprisingly, the selected strains *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 failed to remove these compounds in the pearl millet-soybean slurries. In a previous study, high phytase and  $\alpha$ -galactosidase activities were detected for these strains, using different *in vitro* tests, either activity tests or detection tests such as APYZIM for acid-phosphatase and  $\alpha$ -galactosidase or API 50CHL galleries for the use of raffinose (Songré-Ouattara et al., 2008). These tests performed on cells grown in MRS-broth might have led to the selection of strains able to express their activity under such cultivation and test conditions, but not in the pearl millet-soybean slurry. For instance, these strains were able to ferment raffinose in API 50CHL galleries but not in the pearl millet-soybean slurry. However, limited  $\alpha$ -galactosidase activity occurred in this slurry, since *Lb. fermentum* 7.4 was able to partially hydrolyse the  $\alpha$ -galactoside melibiose (D-Gal- $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -D-Glc) (Fig. 5). Therefore, another hypothesis may explain the absence of removal of stachyose and raffinose better. For instance, some inhibitory compounds supplied by soybean could have prevented the strains from hydrolysing the antinutritional factors, including phytic acid, but, contrary to phytic acid -which was present at expected concentrations in the pre-cooked slurry and similar to those found for other pearl millet-based slurries (Tou et al., 2006, Songré-Ouattara et al., 2009)- initial concentrations of stachyose and raffinose were very low in spite of the addition of soybean. This could have resulted from leaching during the soaking step of soybean, since it has been reported that  $\alpha$ -GOS content in soybean seeds decreases during soaking (Martinez-Villaluenga et al., 2008). Notwithstanding, no such effect was observed in our experiments (Table 2). Consistently with the lower concentration of sucrose and higher concentration of maltose in the slurry at the beginning of fermentation than in the raw material, it is clear that hydrolysis of  $\alpha$ -GOS -mainly stachyose and raffinose- occurred during processing steps before fermentation, explaining the high initial melibiose concentrations in the slurry. This hydrolysis could be due to the action of endogenous enzymes brought into contact with their substrates during grinding, and the changes that occur during this step merit further investigation. Consequently, this leads us to think

that at such low stachyose and raffinose concentrations, i.e. putatively lower than a threshold level, their metabolism by *Lb. plantarum* 4.4 or *Lb. fermentum* 7.4 would not be possible. Other conclusions can also be drawn from such a situation. It is commonly accepted that  $\alpha$ -GOS of the raffinose series are antinutritional factors, but depending on the doses at which they are consumed, they can also have beneficial effects as prebiotics by selectively stimulating the growth of bifidobacteria in the large bowel microbiota (Martinez-Villaluenga et al., 2008), which are known to be a major microflora in young children. Based on the results of clinical experiments in adults, Martinez-Villaluenga et al. (2008) suggested that the daily dose should not exceed 3 g  $\alpha$ -GOS. For young children, between 6-24 months, such a balance between negative and beneficial effects would be interesting to investigate, with a view to determining the effects on child health of residual concentrations of  $\alpha$ -GOS in infant gruels.

### 5. Conclusion

In contrast to the results obtained with pearl millet-groundnut mixtures, the increase in energy density enabled by the use of *Lb. plantarum* A6 was not high enough to prepare pearl millet-soybean fermented gruels at the required values for young children who receive only two meals a day. The possible presence of inhibitory compounds for both microbial  $\alpha$ -amylase and phytase will have to be investigated in soybean along with which processing conditions would enable more efficient hydrolysis by these enzymes. As for  $\alpha$ -GOS at low *in situ* concentrations, use of LAB strains with  $\alpha$ -galactosidase activity is not an efficient means to remove all traces of these compounds. On the contrary, instead of looking for complete hydrolysis of  $\alpha$ -GOS, it would be worth investigating their effectiveness as natural prebiotics at low concentrations in infant gruels.

### Acknowledgements

This research was co-funded by the European Commission (Project Cerefer, contract N°ICA4-CT-2002-10047) and the International Foundation for Science (IFS). L.T. Songré-Ouattara thanks the Institute of Research for Development (IRD) and The French Embassy in Burkina Faso for PhD research grants.

### References

Agence Française de Normalisation (AFNOR). (1970). Dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl. Standard NF. V03-050.

Agence Française de Normalisation (AFNOR). (1981). Céréales, légumineuses et produits dérivés. Détermination des cendres par minéralisation. Standard NF. V03-760.

Akinrele, I.A., Makanju, A., & Edwards, C.C. (1969). Effect of soya flour on the lactic fermentation of milled corn. *Applied Microbiology*, 17 (1), 186-187.

Ampe, F., Omar, N.B., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12), 5464-5473.

AOAC, (2003). Crude fat in feeds, cereal grains and forages (hexane extraction). Association of Official Analytical Chemists 06.

Bookwalter, G.N., Peplinski, A.J., & Pfeifer, V.F. (1968). Using a Bostwick consistometer to measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today*, 13 (11), 407-410.

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

Dewey, K.G., & Brown, K.H. (2003). Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin*, 24 (1), 5-28.

Hachmeister, K.A., & Fung, D.Y.C. (1993). Tempeh: a mould modified indigenous fermented food made from soybean and or cereal-grains. *Critical Reviews in Microbiology* 19, 137-188.

Helland, M.H., Wicklund, T., & Narvhus, J.A. (2004). Growth and metabolism of selected strains of probiotics bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology* 91, 305-313.

Hurrell, R.F., Lynch, S., Bothwell, T., Cori, H., Glahn, R., & Hertrampf, E. (2004). Enhancing the absorption of fortification iron. A SUSTAIN Task Force report. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* 74, 387-401.

Lee, J.H., Lee, S.K., Park, K.H., Hwang, I.K., & Ji, G.E. (1999). Fermentation of rice using amylolytic *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 50, 155-161

Lutter, C.K., & Dewey, K.G. (2003). Nutrient Composition for Fortified Complementary Foods. Proposed Nutrient Composition for Fortified Complementary Foods. *American Society for Nutritional Sciences*.

Mensah, P., & Tomkins, A. (2003). Household-level technologies to improve the availability and preparation of adequate and safe complementary foods. *Food and Nutrition Bulletin*, The United Nations University, 24 (1), 104-125.

- Mouquet, C., Greffeuille, V., & Trèche, S. (2006). Characterization of the consistency of gruels consumed by infants in developing countries: assessment of the bostwick consistometer and comparison with viscosity measurements and sensory perception. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 459-469.
- Nguyen, T.T.T., Loiseau, G., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S., & Guyot, J.P. (2007). Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children. *Food Chemistry*, 100, 623-631.
- Nnam, N.N. (2000). Chemical evaluation of multimixes formulated for some local staples for use as complementary foods in Nigeria. *Plants Food for Human Nutrition*, 55, 255-263.
- Puchart, V., Vrsanská, M., Bhat, M.K. & Biely, P. (2000). Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1524, 27-37.
- Oluwamukomi, M.O., Eleyinmi, A.F., & Enujiugha, V.N. (2005). Effect of soy supplementation and its stage of inclusion on the quality of ogi- a fermented maize meal. *Food Chemistry*, 91, 651-657.
- Ren, H., Thompson, J. F. and Madison, J. T. (1993). Biochemical and physiological studies of soybean [beta]-amylase. *Phytochemistry* 33(3): 541-545.
- Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Humblot, C., Diawara, B., & Guyot, J.P. (2008). Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (*ben-saalga*) of functional interest in nutrition, *International Journal of Food Microbiology*. 128, 395-400.
- Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Diawara, B., & Guyot, J.P. (2009) Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *International Journal of food Microbiology* 130, 258-264.
- Talamond, P., Gallon, G., & Trèche, S. (1998). Rapid and sensitive liquid chromatography method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *Journal of Chromatography, A* 805, 143-147.
- Tou, E.H., Guyot, J.P., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Counil, E., Traoré, A.S., & Trèche, S. (2006). Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 52-60.
- Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Picq, C., Traoré, A.S., Trèche, S., & Guyot, J.P. (2007b). Improving the nutritional quality of *ben-saalga*, a traditional fermented millet-based gruel, by co-fermenting millet with groundnut and modifying the processing method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 40, 1561-1569.
- Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Traoré, A.S., Trèche, S., & Guyot, J.P. (2007a). Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and energy density of *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chemistry*, 100, 935-943.
- Trèche, S., & Mouquet-Rivier, C., 2008. Use of amylases in infant food. In R.Porta, P. Di Pierro, & L. Mariniello, Recent research developments in food biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids (pp. 213-245). Trivandrum: Research Signpost.
- 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 AOAC* 46:829-835.
- Vieu, M.C., Traoré, T., & Trèche, S. (2001). Effects of energy density and sweetness of gruels on Burkinabè infant energy intakes in free living conditions. *International of Food Sciences and Nutrition*, 52, 213-218.

### 4.2.4. Résultats complémentaires

Certains des résultats obtenus lors de l'étude de la fermentation du mélange mil-arachide n'ont pas été exploités dans le cadre du second article. Cet article était consacré à l'amélioration de la densité énergétique des bouillies préparées à partir de pâtes fermentées de ce mélange. Ils apportent cependant des informations complémentaires que nous décrivons dans ce chapitre.

#### **Evolution des teneurs en phytates et $\alpha$ -galactosides durant la fermentation lactique du mélange mil-arachide par des souches de bactéries lactiques à caractère $\alpha$ -galactosidasique et phytasique**

Les concentrations en phytates varient de 0,33 à 0,39 g IP6/100 g en début de fermentation dans les pâtes de mélange mil-arachide inoculées après précuisson avec les souches phytasiques sélectionnées ou avec le pied de cuve incluant le témoin obtenu par fermentation spontanée (Tableau 16). Contrairement à la fermentation avec les souches phytasiques, il était observé après 24 h de fermentation dans le témoin et avec le pied de cuve, une décroissance importante des teneurs en phytates respectivement de 68,3 et 89,6 %. Cette décroissance pourrait être due à l'action de phytases produites par certains microorganismes durant la fermentation comme déjà soulignée par certains auteurs (De Angelis et al., 2003; Lopez et al., 2000) et/ou à l'action de phytases végétales endogènes. Ce dernier point (phytases bactériennes vs. phytases endogènes) demanderait à être exploré plus en détail. L'hydrolyse des phytates a été également rapportée dans la fermentation lactique du maïs (Lopez et al., 1983), du mil (Mahajan et Chauhan, 1987) et du mil germé (Udayasekhara Rao et Deosthale, 1988). Ces résultats sont également en agrément avec les travaux de Svanberg et Sandberg (1988) qui ont montré une hydrolyse complète des phytates après fermentation du sorgho blanc germé et en conséquence une forte augmentation de la quantité du fer soluble. En revanche, nous n'avons observé qu'une très faible réduction des concentrations en phytates dans les fermentations avec les souches phytasiques, ce qui laisse supposer que malgré les fortes activités phytasiques des souches sélectionnées à partir de tests *in vitro* en milieux de culture, celles-ci n'étaient pas les plus adaptées pour éliminer les phytates *in situ*. Nous pourrions aussi mettre en doute les tests qualitatifs de sélection des souches, mais ceux-ci ont ensuite été corroborés par des tests quantitatifs de mesure d'activité. La capacité de certaines bactéries lactiques à produire des phytases ou des phosphatases a été décrite, mais certains auteurs ont rapporté que des bactéries lactiques produisaient des phosphatases avec une faible activité phytasique, de fait il n'y a que très peu d'études sur les phytases produites par les bactéries lactiques. D'autres microorganismes, tels que des champignons filamenteux, sont capables d'hydrolyser les phytates, ainsi Sudarmadji et Markakis (1977) ont montré la capacité de *Rhizopus oligosporus* à réduire le niveau des phytates durant la fermentation du soja. Cependant, outre que les souches sélectionnées ne seraient pas efficaces au sein de la matrice mil-arachide, il convient aussi d'émettre l'hypothèse d'une activité phytasique endogène du mil, celle-ci pourrait avoir été détruite lors de l'étape de cuisson des pâtes expliquant ainsi le faible taux de réduction observé. Cependant, lors de la fermentation avec pied de cuve -qui implique une étape de pré-cuisson- une forte réduction de la teneur en phytates a été obtenue (Tableau 16), ce qui invaliderait cette hypothèse.

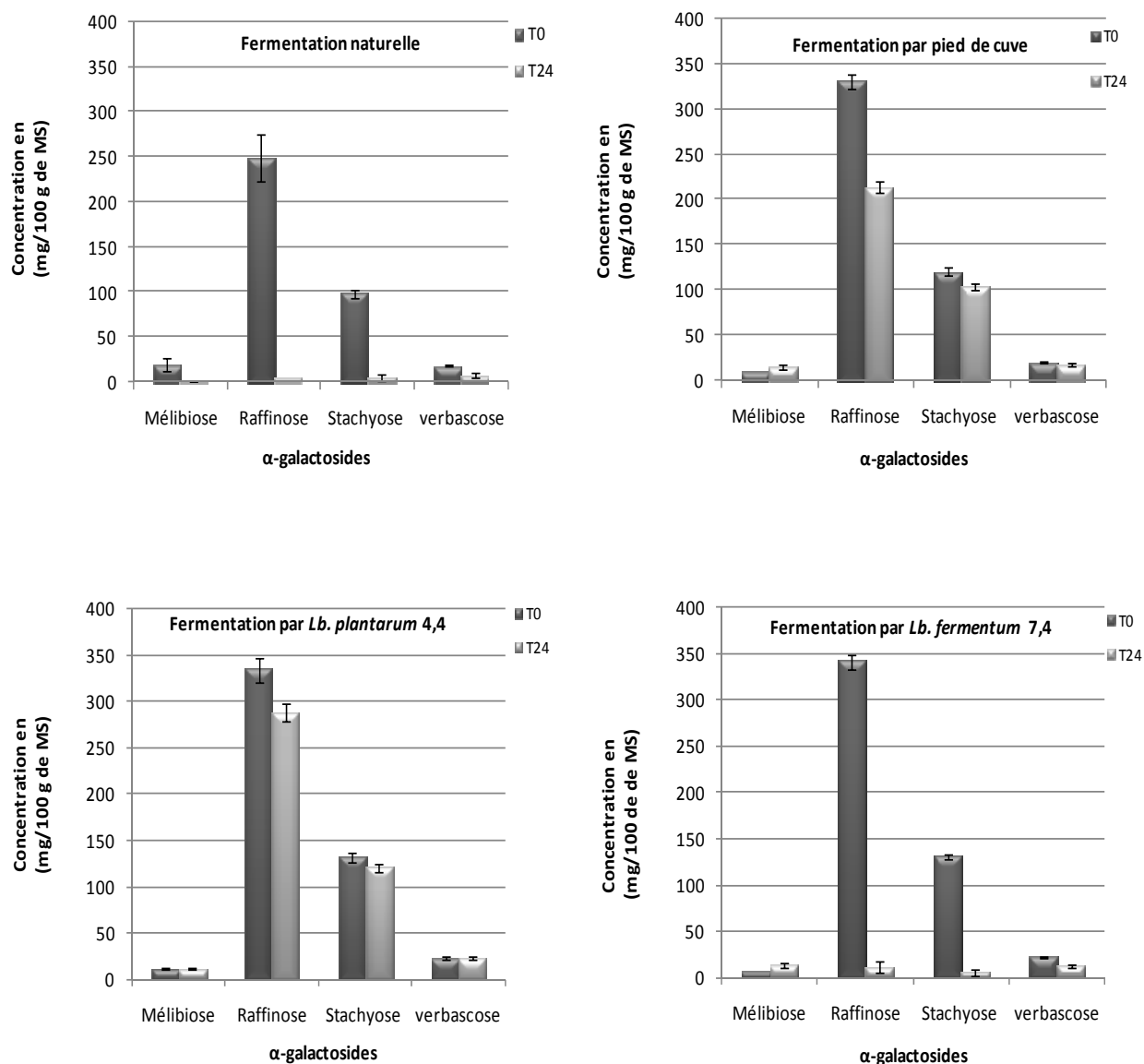
**Tableau 16: Evolution de la teneur en phytates en début et fin de fermentation des pâtes de mélange mil-arachide**

|                                                  | Teneurs en phytate en<br>g IP6/100g de MS |             |               |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------|---------------|
|                                                  | T0                                        | T24         | Réduction (%) |
| <b>Fermentation naturelle</b>                    | 0,35 ± 0,01                               | 0,11 ± 0,01 | 68,3          |
| <b>Fermentation par pied de cuve</b>             | 0,39 ± 0,02                               | 0,05 ± 0,03 | 89,6          |
| <b>Fermentation par <i>Lb. plantarum</i> 4.4</b> | 0,33 ± 0,06                               | 0,30 ± 0,04 | 6,8           |
| <b>Fermentation par <i>Lb. fermentum</i> 7.4</b> | 0,37 ± 0,02                               | 0,34 ± 0,01 | 6,9           |

Concernant les teneurs en  $\alpha$ -galactosides, le raffinose est le composé le plus abondant en début de fermentation suivi du stachyose, du verbascose et du melibiose (Figure 8). Les concentrations initiales lors des différentes fermentations réalisées varient de 248,7±25,9 à 340,9±8,0 mg/100g de MS pour le raffinose, de 98,3±4,1 à 131,1±4,9 mg/100g de MS pour le stachyose, de 18,5±0,5 à 23,1±1,52 mg/100g de MS pour le verbascose et de 7,74±0,2 à 19,70±6,98 mg/100g de MS pour le mélibiose. Les teneurs en raffinose et stachyose sont significativement plus élevées ( $p<0,05$ ) après l'étape de pré-cuisson en début de fermentation que celles déterminées au début de la fermentation naturelle. Ceci pourrait être dû à la destructuration des composants de la matrice, permettant une libération accrue de certains composés, suggérant par conséquent que l'extraction des oses pour analyse n'est peut-être pas suffisamment efficace quand la matrice n'est pas soumise à un traitement préalable (e.g. un traitement thermique). Il convient de remarquer qu'un tel effet n'a pas joué pour les phytates, dont les teneurs initiales n'ont pas varié avec ou sans cuisson (Tableau 16), conduisant à penser que le procédé d'extraction des phytates pour leur analyse permettrait une bonne quantification de leur teneur totale, quel que soit le procédé auquel la matrice a été soumise. Cependant, pour le mélange mil-soja, le troisième article décrit au contraire une augmentation de la teneur initiale en phytates dans les fermentations comportant une étape de précuisson, rendant délicate toute interprétation, à moins qu'un effet matrice soit aussi mis en jeu, appelant ainsi à s'interroger sur l'extractibilité des phytates non seulement selon les procédés employés mais aussi selon la nature de la matrice.

Pour en revenir aux  $\alpha$ -galactosides dans le mélange mil-arachide, une diminution très importante de la concentration en raffinose et stachyose a été observée lors de la fermentation naturelle et celle réalisée par la souche *Lb. fermentum* 7.4. Le raffinose, le stachyose et le verbascose ont été réduits respectivement de 98,1; 94,6 et 87,6% dans le témoin et de 96,7, 95,4 et 41,2% avec *Lb. fermentum* 7.4. En revanche, la fermentation par pied de cuve n'a permis qu'une réduction limitée du raffinose et n'a pratiquement pas eu d'effet sur le stachyose. Concernant la fermentation réalisée par la souche de *Lb. plantarum* 4.4, malgré sa capacité à hydrolyser le raffinose en galerie API et son activité  $\alpha$ -galactosidasique, celle-ci a

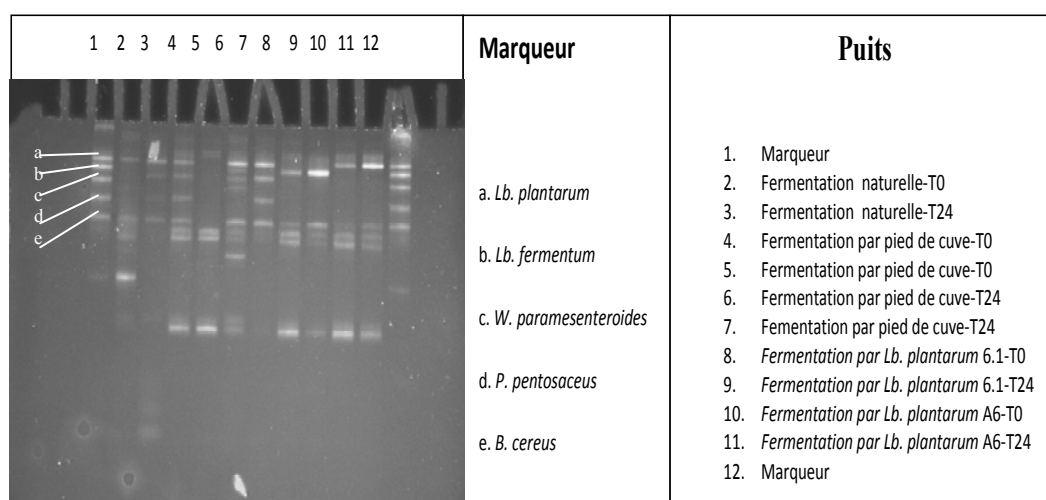
été inefficace pour hydrolyser les  $\alpha$ -galactosides au sein de la matrice, montrant ainsi la nécessité de compléter les tests de sélection réalisés *in vitro* par des tests en conditions réelles.



**Figure 8: Teneurs en galactosides des pâtes de mélange mil-arachide en début et fin de fermentation**

### Suivi de l'implantation des cultures starters lors de la fermentation des pâtes de mélange mil-arachide

La TTGE a permis d'identifier présomptivement certaines espèces microbiennes en début et fin de fermentation des pâtes de mil-arachide (Figure 9). Pour les pâtes inoculées avec la souche *Lb. plantarum* A6, des bandes de forte intensité correspondant au positionnement de l'espèce *Lb. plantarum* suggère sa dominance et sa capacité à s'implanter pendant la fermentation. En revanche, pour la pâte inoculée avec la souche *Lb. plantarum* 6.1, seule une bande de très faible intensité est repérée à la position correspondante à *Lb. plantarum*, alors qu'une bande dont l'intensité s'accroît en fin de fermentation correspond au positionnement de l'espèce *Lb. fermentum*. Cependant, quand on examine les profils de fermentation de la pâte mil-arachide par la souche 6.1 (pistes 8 et 9, Figure 9), en particulier la formation d'acide lactique et d'éthanol (Figure 1 du second article), bien que l'on observe une production d'éthanol celle-ci est faible, et correspond à celle observée pour la fermentation naturelle ou la fermentation par pied de cuve et ne traduit pas une fermentation hétérolactique dominante. De surcroît la production d'éthanol s'arrête quatre heures après le début de la fermentation alors que celle d'acide lactique se poursuit pendant vingt-quatre heures, traduisant donc la dominance d'un métabolisme de type homolactique en cohérence avec l'utilisation d'une souche de *Lb. plantarum*. Ce profil obtenu pour les pistes 8 et 9 pourrait résulter d'un artefact d'amplification ou de migration, ceci n'ayant pas été observé lors du suivi de la fermentation du mélange mil-soja par TTGE. Concernant la fermentation naturelle ou avec le pied de cuve des pâtes, des bandes ont été présomptivement assignées aux espèces *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *P. pentosaceus*, *W. paramesenteroides*, mais le marqueur utilisé n'étant que limité à certaines espèces d'autres bandes n'ont pas été attribuées. Les fermentations naturelles et celles réalisées par pied de cuve présentent des profils ne traduisant pas une grande diversité. Ces profils sont variables, comme ceux observés pour les temps initiaux des fermentations réalisées avec des pieds de cuve.



**Figure 9: Profil TTGE des espèces bactériennes dans les pâtes fermentées de mélange mil-arachide en début et fin de ferment**

## **Chapitre 5. Discussion générale**

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans les fermentations lactiques des céréales du fait de leurs activités métaboliques particulières qui confèrent aux produits leurs caractéristiques texturales, organoleptiques, nutritionnelles et de conservation. Au Burkina Faso, la bouillie de mil fermenté connue sous l'appellation *ben-saalga* en mooré ou *koko* en dioula, obtenue par cuisson d'une pâte de mil ayant subi une fermentation lactique est fréquemment consommée par les enfants de moins de cinq ans comme aliment de complément. Des travaux récemment menés par Tou et al. (2006) ont décrit le procédé traditionnel de production du *ben-saalga* caractérisé principalement par cinq étapes comprenant un trempage caractérisé par une fermentation alcoolique, un broyage, un tamisage à l'eau, une décantation durant laquelle se produit une fermentation de type lactique et une cuisson. Ces auteurs ont également montré que les caractéristiques nutritionnelles du *ben-saalga* sont très inférieures aux valeurs recommandées pour les nourrissons et les jeunes enfants. Cette inadéquation nutritionnelle est liée à de très faibles teneurs en matière sèche (7,5 g/100g de bouillie) et donc de faibles densités énergétiques d'environ 30 kcal/100 g de bouillie ainsi que de faibles teneurs en protéines et lipides (Tou et al., 2006, Mouquet-Rivier et al., 2008). Ceci justifie le besoin de l'améliorer afin qu'elle puisse être un aliment de complément adéquat. Parmi les objectifs d'amélioration de la qualité nutritionnelle de cet aliment, l'augmentation de la densité en énergie et de l'équilibre en nutriments ainsi que l'amélioration de la biodisponibilité et de la digestibilité des nutriments sont des priorités. Différentes stratégies peuvent être appliquées. Récemment, un procédé de fabrication du *ben-saalga* modifié comprenant l'addition d'une étape de pré-cuisson suivie d'une inoculation avec un pied de cuve plus ajout de malt (appelé procédé CMI pour cuisson-malt-inoculation) couplée à une co-fermentation du mil avec l'arachide (Tou et al. 2007a) a permis d'améliorer la densité énergétique et l'équilibre en macronutriments de la bouillie. Cependant, ce procédé modifié ne permet pas la réduction ou l'élimination des composés indésirables dont les teneurs sont renforcées par la complémentation avec les graines de légumineuse.

Notre travail de thèse a eu pour objectif principal de tester une alternative à ce procédé modifié, consistant à remplacer l'addition de malt et l'inoculation par pied de cuve par l'inoculation de souches starters de bactéries lactiques sélectionnées pour leurs activités amylasique, phytasique ou  $\alpha$ -galactosidasique.

Une discussion synthétique des principaux résultats de notre étude, ses limites et les recommandations qui en découlent sont proposés dans ce dernier chapitre.

Dans la première partie de nos travaux, des analyses microbiologiques et biochimiques ont été réalisées pour détecter les souches qui produisent les différents enzymes désirables à partir d'une collection d'isolats de bactéries lactiques du *ben-saalga*. Seules 5 souches présentant les plus fortes plages d'hydrolyse attestant ainsi une production importante des enzymes recherchées ont été retenues pour déterminer leur niveau d'activité. Ces activités ont été comparées à celles de souches de référence connues et à des données de la littérature.

La deuxième partie de nos travaux a consisté en l'utilisation de 3 souches sélectionnées parmi les 5 souches analysées, comme cultures starters dans les fermentations avec les mélanges mil-légumineuses. L'objectif visé était de tester leur capacité à hydrolyser l'amidon, les

phytates et les  $\alpha$ -galactosides en vue de produire un *ben-saalga* de caractéristiques nutritionnelles améliorées.

Pour ces travaux, des analyses biochimiques, physiques, microbiologiques et rhéologiques ont été réalisées pour évaluer la capacité des souches starters à fermenter les pâtes de mélanges mil/légumineuses (arachide, soja), à augmenter la densité énergétique des bouillies obtenues et à réduire ou éliminer les facteurs antinutritionnels tels que les phytates et les  $\alpha$ -galactosides. Leur capacité à dominer et à diriger les fermentations a aussi été évaluée en utilisant une technique de biologie moléculaire, la TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis).

**Les bactéries lactiques isolées d'aliments fermentés présentent des potentialités enzymatiques intéressantes qui pourraient aider à améliorer les caractéristiques nutritionnelles des bouillies fermentées.**

L'analyse qualitative des 30 isolats de notre présélection de la collection de bactéries lactiques du *ben-saalga* basée sur l'utilisation de milieux tests spécifiques a permis de repérer les souches qui produisent soit les enzymes amylasiques, phytasiques ou encore  $\alpha$ -galactosidasiques ou plusieurs à la fois de ces enzymes. La production de ces enzymes a été mise en évidence par des halots d'éclaircissement autour des colonies. Sur la base de ces tests, 11 souches amylolytiques ont été détectées et seules deux souches, *Lb. plantarum* 6.1 et 4.4 se sont distinguées par des diamètres plus larges respectivement de 9 et 6 mm. Ces résultats qui rapportent la présence des bactéries lactiques amylolytiques durant la fermentation du *ben-saalga* sont cohérents avec ceux provenant d'autres études sur des aliments fermentés traditionnels préparés à partir de manioc et de céréales comme le maïs et le sorgho (Diaz-Ruiz et al., 2003; Johansson et al., 1995; Sanni et al., 2002; Agati et al., 1998; Morlon et al., 1998; Nwankwo et al., 1989; Rodriguez-Sanoja et al., 2000). L' $\alpha$ -amylase a une fonction essentielle dans l'alimentation. Cette enzyme peut hydrolyser rapidement l'amidon gélatinisé donnant des molécules plus courtes, principalement des maltodextrines qui gonflent peu durant les traitements hydrothermiques. Ainsi, l'adjonction d'amylases permet de liquéfier les bouillies à base de matières premières amylacées et de ce fait d'augmenter la densité énergétique lorsque plus de farine est apportée à la préparation.

Pour la production de phytase, un grand nombre de souches, soit au total 28 sur 30, ont présenté des zones d'éclaircissement autour de leurs colonies avec le milieu test MRS-phytate agar. Les diamètres variaient de 6 à 11 mm, entre 10 et 11 mm pour les grands, obtenus avec les souches *Lb. fermentum* 3.7, 7.4, et 11.11.2 et *Lb. plantarum* 6.1. La production d' $\alpha$ -galactosidase spécifique pour le raffinose et stachyose a été aussi recherchée pour ces souches présélectionnées. Curieusement, les seuls résultats positifs ont été observés avec le raffinose.

L'enzyme décarboxylase qui conduit à la formation d'amines biogènes par décarboxylation de leur précurseur d'acides aminés libres à pH bas généralement entre 5 et 6,5 a été mise en évidence chez 16 souches. La synthèse de cette enzyme indésirable est considérée comme moins importante dans le cas des fermentations de mélanges mil-légumineuses que dans celui des produits animaux. En plus de ces activités déterminées sur milieu test, le profil enzymatique de l'ensemble des souches présélectionnées a été déterminé par test APIZYM. Les résultats ont révélé que les 30 souches présélectionnées ont des activités peptidases telles que la leucine arylamidase, la valine arylamidase et la cystine arylamidase, exceptée la souche

8.12 qui ne produit pas de cystine arylamidase. Les activités peptidiques représentées par la chymotrypsine et la trypsine n'ont pas été mises en évidence chez ces souches à l'exception de la souche 2.17.1.

Après examen de l'ensemble des résultats, 5 souches prometteuses capables de produire une ou plusieurs des enzymes recherchées et présentant les plus grands diamètres d'hydrolyse ont été retenues pour quantifier leurs activités respectives en vue d'une sélection finale de souches starters. L'activité amylasique mesurée à partir des deux isolats du *ben-saalga*, *Lb. plantarum* 6.1 et 4.4 a été très faible, exclusivement associée aux cellules, en dessous de 0,05 unité Ceralpha/ml comparativement à celle d'une souche de référence connue *Lb. plantarum* A6 qui présente une importante activité de 0,42 unité Ceralpha/ml. D'après nos résultats, l'activité phytasique repérée chez les souches prometteuses était liée aux cellules et à la croissance de la population bactérienne, variables entre les souches, et plus importante en présence d'une forte teneur en glucose. Elles étaient comprises entre  $236,8 \pm 22,8$  et  $348,7 \pm 17,4$  U/ml à forte concentration en glucose (2%) et entre  $66,7 \pm 4,0$  et  $98,3 \pm 11,9$  U/ml à faible teneur en glucose (0,2%). *Lb. plantarum* 4.4 et *Lb. plantarum* 6.1 sont les souches qui ont présenté le niveau d'activité phytasique le plus élevé. L'activité phytasique de ces souches était plus élevée que celles des deux souches phytasiques de référence utilisées dans le cadre de notre étude comme témoins, *B. subtilis* ATCC 23857 et *E. coli* ATCC 10798, (respectivement  $28,1 \pm 1,7$  et  $84,7 \pm 12,9$  U/ml après culture sur milieu BHI). D'importantes activités phytasiques ont également été décelées chez *L. sanfranciscensis* CB1 (De Angelis et al., 2003) et *L. amylovorus* B4552 (Sreeramulu et al., 1996).

### **Augmentation de la densité énergétique par l'utilisation de bactéries lactiques amylolytiques sélectionnées comme cultures starters dans les fermentations à base de céréales et de légumineuses**

L'étude mettant en œuvre l'inoculation de bactéries lactiques amylolytiques (BLA) ou d'un pied de cuve pour la fermentation, après précuisson, de pâtes de mélange de mil avec de l'arachide ou du soja, a permis d'observer une hydrolyse de l'amidon gélatinisé et de produire ainsi des bouillies fermentées avec des valeurs de densité énergétique plus élevées que celui du témoin (fermentation naturelle sans précuisson ni inoculation) mais cependant variables en fonction du potentiel amylolytique des souches. En effet, dans toutes les conditions de fermentation avec les deux mélanges, *Lb. plantarum* A6, seule ou en co-culture, se montre plus efficace pour hydrolyser l'amidon gélatinisé que la souche isolée du *ben-saalga*, *Lb. plantarum* 6.1. Ces résultats ne sont pas surprenants par rapport à ceux obtenus dans la première partie de nos travaux qui montrent que *Lb. plantarum* 6.1 possède un potentiel amylolytique très faible comparativement à *Lb. plantarum* A6. Par ailleurs, *Lb. plantarum* A6 a une capacité amylolytique comparable dans certaines conditions de fermentation à celui d'un inoculum naturel apporté par pied de cuve. L'hydrolyse de l'amidon consécutive à l'action amylolytique des bactéries permet d'en augmenter la teneur, conduisant à un accroissement de la densité énergétique des bouillies d'un facteur variant de 1,5 à 1,7 par comparaison à celle du témoin. Les valeurs de densité énergétique les plus élevées obtenues avec le mélange mil-arachide fermenté respectivement par *Lb. plantarum* A6 et le pied de cuve sont de  $84,7 \pm 4,4$  et  $80,4 \pm 23,8$  kcal/100 g de bouillie sucrée. Ces valeurs sont proches de 84 kcal/100 g de bouillie, valeur minimale recommandée par Dewey et Brown (2003) pour les enfants âgés de 9 à 11 mois dans le cas de la consommation de deux repas de bouillie par jour.

Ces valeurs de densité énergétique obtenues avec le mélange mil-arachide sont proches de celle observée par Tou et al. (2007a) avec le procédé CMI soit 82 kcal/ 100 g de bouillie sucrée. Cependant, avec le mélange mil-soja, les valeurs de DE étaient respectivement de  $51,4 \pm 0,6$ ;  $88,7 \pm 4,2$  pour le témoin et les inoculations avec le pied de cuve et de  $75,8 \pm 5,1$  et  $73,5 \pm 9,9$  kcal/100g de bouillie sucrée avec les starters mixtes de *Lb. plantarum* A6 avec *Lb. fermentum* 7.4 ou *Lb. plantarum* 4.4. Seule l'inoculation avec le pied de cuve a permis dans ces conditions de fermentation d'obtenir une bouillie de DE supérieure à la valeur minimale recommandée. Les résultats obtenus avec *Lb. plantarum* A6, lors de la fermentation de mélanges prégélatinisés mil-légumineuses, corroborent sa capacité à hydrolyser l'amidon au sein de matrices complexes comme cela a été antérieurement monté par Nguyen et al. (2007a,b) pour des mélanges de farines de riz et de soja précuits.

Lors des fermentations avec le mélange mil-arachide, l'importance de l'hydrolyse de l'amidon de *Lb. plantarum* A6 est comparable à celui du pied de cuve. Toutefois, si l'utilisation d'un pied de cuve s'avère être un procédé plus facile à mettre en œuvre et de moindre coût que l'utilisation d'une souche starter sélectionnée, notamment dans les pays en développement, ce procédé présente cependant une plus grande variabilité au niveau de la qualité du produit du fait de la faible maîtrise de la fermentation impliquant une diversité de microorganismes naturellement sélectionnés. Néanmoins la fermentation par l'utilisation d'un pied de cuve reste un procédé amélioré beaucoup moins variable et plus sûr que la fermentation spontanée.

Lors de cette étude, le suivi des cinétiques de fermentation a montré une bonne acidification des pâtes mil-légumineuses, qui atteint un pH variant entre  $3,7 \pm 0,05$  et  $4,2 \pm 0,2$  avec les différents inoculums utilisés excepté la fermentation des pâtes de mélange mil-arachide avec *Lb. plantarum* 6.1. Ces valeurs de pH inférieures à 4,5 permettent d'inhiber la croissance de plusieurs microorganismes dont les bactéries pathogènes améliorant ainsi leur durée de vie et leur qualité sanitaire (Nout et al. 1989; Hubert et Dupuy, 1994; FAO/WHO, 1995). Cette acidification due à la production principalement d'acide lactique et de petites quantités d'acide acétique est liée à la croissance de la population bactérienne, laquelle est relativement similaire entre les différents procédés de fermentation étudiés. En effet, en début de fermentation, la population initiale était comprise entre  $7,4 \pm 0,1$  et  $8,1 \pm 0,2$  log cfu/g dans les pâtes mil-arachide et entre  $7,2 \pm 0,1$  et  $7,4 \pm 0,1$  log cfu/g dans les pâtes mil-soja passant à des valeurs respectivement de  $8,9 \pm 0,1$  à  $9,1 \pm 0,1$  et de  $9,1 \pm 0,2$  à  $9,2 \pm 0,0$  log cfu/g en fin de fermentation. Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par Mugula et al. (2003a) au cours de la fermentation du *togwa* utilisant des cultures starters de bactéries lactiques et de levures. Elles sont également du même ordre que celles rapportées par Tou et al. (2007b) durant la fermentation suivant le procédé modifié CMI.

Les cinétiques de consommation des mono et diholosides ont montré que le glucose et le fructose étaient les oses libres utilisés préférentiellement comme source de carbone quel que soit le procédé de fermentation. Par ailleurs, à l'inverse des pâtes mil-arachide, la concentration initiale en maltose était très importante dans les pâtes mil-soja précuites probablement en raison d'une hydrolyse de l'amidon par des amylases endogènes du soja durant l'étape de précuisson obtenue avant la fermentation. Durant la fermentation du mélange mil-soja, une accumulation simultanée de maltose et de maltodextrines, produits d'hydrolyse de l'amidon, a été observée seulement pour les fermentations utilisant le pied de

cuve montrant ainsi la présence d'une importante activité amylolytique. En présence de *Lb. plantarum* A6, seule l'accumulation de maltodextrines, principalement le maltotriose, a été observée. Il serait intéressant de lier cette accumulation de maltotriose au sein de la matrice à l'activité amylolytique *in situ* de *Lb. plantarum* A6 afin de l'utiliser comme marqueur de cette activité.

### **Capacité des souches starters à activités phytasiques et $\alpha$ -galactosidasiques à hydrolyser *in situ* les phytates et les $\alpha$ -galactosides**

La réduction des phytates et  $\alpha$ -galactosides présents dans les pâtes de mélange mil-légumineuses peut résulter de l'action de phytases et  $\alpha$ -galactosidases endogènes ou produites par certaines bactéries lactiques impliquées dans le processus. Pour les deux isolats du *ben-saalga* (*Lb. plantarum* 4.4 et *Lb. fermentum* 7.4) testés sur le mélange mil-arachide, nos résultats ont montré que seul *Lb. fermentum* 7.4 était capable de réduire significativement ( $p < 0,05$ ) les teneurs en raffinose, stachyose et verbascose à des taux comparables à ceux observés avec le témoin. La diminution du raffinose au cours du procédé traditionnel de fabrication du *ben-saalga* à base de mil rapportée précédemment était de 83 % (Tou et al., 2006), un peu moins élevée que ce que nous obtenons. Il est aussi intéressant d'observer qu'à l'inverse du témoin, le mélibiose n'était pas diminué dans la fermentation par *Lb. fermentum* 7.4. Ce résultat suggère que l' $\alpha$ -galactosidase produite par *Lb. fermentum* 7.4 ne semble pas avoir une grande affinité pour le mélibiose, du moins dans les conditions testées, cependant il convient de remarquer que dans le mélange mil-soja, la souche était capable d'une hydrolyse très limitée de ce composé. En ce qui concerne *Lb. plantarum* 4.4, cette souche s'est montrée inefficace et ce en dépit d'une activité  $\alpha$ -galactosidasique supérieure à celle de *Lb. fermentum* 7.4 quand elles sont cultivées sur milieu de culture MRS, comme nous l'avons montré par les travaux présentés dans le premier article. Ceci semblerait indiquer pour la souche 4.4 que les conditions du milieu n'étaient pas propices soit à la synthèse des  $\alpha$ -galactosidases, soit à l'activité optimale de ces enzymes. En ce qui concerne le pied de cuve, celui-ci n'a pas réussi à restaurer une activité similaire à celle se développant lors de la fermentation spontanée, montrant ainsi certaines limites à l'utilisation de ce procédé d'inoculation.

Avec les fermentations des pâtes de mélange mil-soja par les souches  $\alpha$ -galactosidasiques sélectionnées ou le pied de cuve, aucune diminution significative des différents  $\alpha$ -galactosides n'a été observée. En revanche, les concentrations initiales en raffinose, stachyose et verbascose étaient réduites après la pré-cuisson alors que l'on observait une concentration relativement élevée en mélibiose indiquant une pré-hydrolyse de ces composés due probablement à l'action d'enzymes endogènes. Les faibles quantités d' $\alpha$ -galactosides présentes en début de fermentation, le type de microorganisme et les conditions de fermentation pourraient avoir affecté l'activité  $\alpha$ -galactosidasique.

Quel que soit le mélange utilisé pour les fermentations avec les souches phytasiques, aucune réduction des concentrations en phytates n'a été observée. De plus, à l'inverse du témoin avec le mélange mil-arachide, l'absence totale de réduction des teneurs en phytates observée dans toutes les conditions de fermentation avec le mélange mil-soja, y compris avec le témoin suggère la présence d'inhibiteurs de l'activité phytasique dans le soja.

## **Chapitre 6. Conclusion**

L'intérêt majeur de nos résultats est d'avoir montré que certaines bactéries lactiques possèdent des activités capables d'améliorer la qualité nutritionnelle des bouillies fermentées dans les conditions de fermentation étudiées. Ainsi, *Lb. plantarum* A6 est capable d'hydrolyser l'amidon au cours de la fermentation de pâtes précuites de mélanges mil-arachide ou mil-soja, permettant d'accroître la teneur en amidon de bouillies infantiles et par conséquent leur densité énergétique.

Par ailleurs, une réduction des  $\alpha$ -galactosides (raffinose, stachyose et verbascose) comparable à celle du témoin a été observée durant la fermentation des pâtes mil-arachide par la souche *Lb. fermentum* 7.4 sélectionnée pour son pouvoir  $\alpha$ -galactosidasique mais pas dans le cas de la fermentation du mélange mil-soja. En revanche, aucune réduction des phytates n'a été observée quel que soit le mélange fermenté avec les deux souches phytasiques sélectionnées (*Lb. fermentum* 7.4 et *Lb. plantarum* 4.4) isolées du *ben-saalga*. En outre, avec les mélanges mil-soja, l'absence d'une diminution des teneurs en phytates dans le témoin ou avec l'utilisation du pied de cuve à l'inverse de ce qui est observé avec le mil-arachide laisse supposer la présence d'inhibiteurs de l'activité phytasique dans les graines de soja cru. Il serait intéressant que de futurs travaux permettent d'élucider cette hypothèse. En fait, et ce en dépit de la sélection de souches qui se sont révélées efficaces *in vitro*, l'expression de leur potentialité au sein de la matrice alimentaire semble dépendre de la nature de celle-ci (effet matrice) et des procédés qui lui sont appliqués, ce qui implique la mise à l'épreuve systématique des souches sélectionnées en les confrontant à des conditions réelles d'opération.

L'ensemble de ces résultats montre que la qualité nutritionnelle du *ben-saalga*, et plus généralement des bouillies fermentées à base de céréales, peut être améliorée par co-fermentation du mil avec des légumineuses couplée à l'utilisation de bactéries lactiques spécifiques. Cependant, dans le cadre d'une application de ce procédé, nous recommandons une meilleure connaissance des conditions optimales de production et d'activité des enzymes des bactéries lactiques sélectionnées. Par exemple, pour l'utilisation du soja dans le cadre d'une co-fermentation avec les céréales, il serait intéressant de rechercher un prétraitement du soja qui permettrait de détruire d'éventuels inhibiteurs de l'activité phytasique. Le soja cru peut en effet subir plusieurs traitements avant son utilisation comme la germination, la torréfaction ou un dépelliculage.

Au plan pratique, ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour une variété d'applications dans lesquelles les bactéries lactiques amylolytiques et  $\alpha$ -galactosidasiques pourraient être utilisées comme starters pour améliorer respectivement la densité énergétique des bouillies et réduire la teneur en composés indigestibles comme les  $\alpha$ -galactosides. Ceci pourrait trouver des applications dans de petites unités de production si des souches starters fonctionnelles étaient produites localement et vendues à des coûts accessibles par les utilisateurs locaux.

## **Chapitre 7. Références bibliographiques**

- Abdelrahman, A., Hoseney, R.C., Varriano-Marston, E. (1982). A simple technique for hand dissecting of pearl millet kernels. *Cereals Foods World* 27:452.
- Abdelrahman, A., Hoseney, 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.
- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lopez, R.L., Martinez-Canamero, M., Keleke, S., Galvez, A. (2006). Culture-independent analysis of the microbial composition of the traditional fermented foods *poto poto* and *degue* by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* 111, 228-233.
- Adeyeye, A., Ajewole, K. (1992). Chemical composition and fatty acid profiles of cereals in Nigeria, *Food Chemistry*, 44:41.
- Agati A., J.P. Guyot, J. Morlon-Guyot, Hounhouigan. J. (1998). Isolation and characterization of new strains of amylolytic *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (*mawè* and *ogi*) from Benin. *Journal of Applied Microbiology* 85: 512-520.
- Agence Française de Normalisation (AFNOR). (1970). Dosage de l'azote avec minéralisation selon la méthode de Kjeldahl. Standard NF. V03-050.
- Agence Française de Normalisation (AFNOR). (1981). Céréales, légumineuses et produits dérivés. Détermination des cendres par minéralisation. Standard NF. V03-760.
- Aguirre, M., Collins, M.D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 473-477.
- Akingbala, J.O., Rooney, L.W., Faubion, J.M. (1981a). Physical, chemical and sensory evaluation of *ogi* from sorghum of differing kernel characteristics, *Journal of Food Science* 46, 1532-1536.
- Akingbala, J.O., Rooney, L.W., Faubion, J.M. (1981b). Laboratory procedures for the preparation of *ogi*, a Nigerian fermented food. *Journal of Food Science* 46, 1523-1526.
- Akinrele, I. A. (1970). Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21, 619-25.
- Akinrele, I. A., Bassir, O. (1967). The nutrient value of *ogi*, a Nigerian infant food. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 279-280.
- Akinrele, I. A., Edwards, C.C. (1971). An assessment of the nutritive value of maize soy mixture "soy *ogi*" as a weaning food in Nigeria. *British Journal of Nutrition* 26, 177-185.

- Alnwick, D., Moses, S., Schmidt, O. G. (Eds.) (1988). Improving young child feed in eastern and southern Africa: Household level food technology. Proceedings of a workshop held in Nairobi, Kenya, 11–16th October 1987, IDRC-265e. Ottawa: *International Development Research Centre*.
- Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independant methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5464-73.
- Ampe, F., Miambi, E. (2000). Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *International Journal of Food Microbiology* 60, 91-7.
- Andersen, L. (1998). Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: 44th ICoMST, pp. 826-827.
- AOAC (2003). Crude fat in feeds, cereal grains and forages (hexane extraction). Association of Official Analytical Chemists 06.
- Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J., Selinger, L.B. (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods* 39, 17-22.
- Baehler, P., Baenziger, O., Belli, D., Braegger, C., Déléze, G., Furlano, R., Laimbacher, J., Spalinger, J., Studer, P. (2008). Recommandations pour l'alimentation du nourrisson. *Paediatrica* 2008, 19:22-24.
- Banigo, E.O., Deman, T.M., Duits Chaever, C.L. (1974). Utilization of high lysine corn for processing system. *Cereal Chemistry* 51, 559-572.
- Banigo, E.O.I., Muller, H.G. (1972). Manufacture of *ogi* a Nigerian cereal porridge: comparative evaluation of corn, sorghum and millet grain. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 5, 217.
- Banigo, E.O.I., de Man, J.M., Duitschaever, C.L. (1974). Utilization of high-lysine corn for the manufacture of *ogi* using a new, improved processing system. *Cereal Chemistry* 51:559-572.
- Barrientos, L., Scott, J.J., Murthy, P.P.N. (1994). Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology*, 106 (4):1489-1495. [doi:10.1104/pp.106.4.1489].
- Belton, P. S., Taylor, J. R. N. (2004). Sorghum and millets: Protein sources for Africa. *Trends in Food Science and Technology* 15, 94-98.
- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., Martínez-Cañamero, M., López, R. L., Ortega, E., Gálvez, A. (2008). Bacteriocin-producing *Lactobacillus*

- strains isolated from *poto poto*, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology* 127: 18-25.
- Ben Omar, N., Ampe, F. (2000a). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3664-73.
- Ben Omar, N., Ampe, F., Raimbault, M., Guyot, J.P., Tailliez, P. (2000b). Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Systematic and Applied Microbiology* 23, 285-91.
- Besançon, P. (1999). Safety of complementary foods and bioavailability of nutrients. In DopM.C., Benbouzid D., Trèche S., de Benoist B., Verster A., Delpeuch F., éd.: *Complementary feeding of young children in Africa and the middle-East*, Geneva, World Health Organization. Pp 59-73.
- Beta, T., Rooney, L.W., Marovatsanga, L.T., Taylor, J.R.N. (2000). Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum. *Journal of Cereal Science* 31, 295-302.
- Black, R., Allen, L.H., Bhutta, Z.A., Caulfield, L.E., de Onis, M., Ezzati, M., Mathers, C., Rivera, J. (2008). Maternal and Child Undernutrition. Global and regional exposures and health consequences study group. *Lancet*-2008.
- Blandino, A., Al-Aseeri, Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. Review. *Food Research International* 36, 527-543.
- Bohn, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9 (3), 165-191.
- Bookwalter, G.N., Peplinski, A.J., Pfeifer, V.F. (1968). Using a Bostwick consistometer to measure consistencies of processed corn meals and their CSM blends. *Cereal Science Today*, 13 (11), 407-410.
- Brown, K.H. (1997). Complementary feeding in developing countries: factors affecting energy intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56 (1A), 139-148.
- Burton, G.W., Wallace, A.T., Rachie, K.O. (1972). Chemical composition and nutritive value of pearl millet (*Pennisetum typhoides*), *Crop Science*, 12:187.
- Busto, O., Valero, Y., Guasch, J., Borrull, F. (1994). Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. *Chromatographia*, 38 (9-10), 571-578.

- Butte, N.F., Wong, W.W., Hopkinson, J.M., Heinz, C.J., Mehta, N.R., Smith, E.O.B. (2000). Energy requirements derived from total energy expenditure and energy deposition during the first 2 years of life. *American Journal of Clinical Nutrition* 72, 1558-1569.
- Calderon, M., Loiseau, G., Guyot, J.P. (2001). Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetic of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology* 90, 508-516.
- Callon, C., Delbes, C., Duthoit, F., Montel, M.C. (2006). Application of SSCP-PCR fingerprint to profile the yeast community in raw milk Salers cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 72-80.
- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods: a world perspective. *Food Research International* 27, 253.
- Campbell-Platt, G., Cook, P.E. (1995). Fermented Meats. *Blackie Academic and Professional, London*.
- Canganella, F., Andrade, C., Antranikian, G. (1994). Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new Ferividobacterium species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42, 239-245.
- Carrera-Silva, E.A., Silvestroni, A., LeBlanc, J.G., Piard, J.C., Giori, S., Sesma, F. (2006). A thermostable alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties. *Current Microbiology* 53, 374-378.
- Ceralpha method: For measurement of cereal and microbial alpha-amylase. ICC Standard N°. 303. Megazyme. Internet: [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com).
- Cerefer, (2003). European Commission, Annual Report of the European INCO-DEV Project (5th FP), Contract N°ICA4-CT2002-100471: « Meeting consumer requirements for cereal based fermented foodstuffs with improved nutritional and sanitary quality and shelf-life in Africa », Oct 2002-2003. Report available at: <http://www.mpl.ird.fr/cerefer>.
- Chandrasekhara, M.R., Swaminathan, M. (1957). The enzymes of pearl millet (*Pennisetum typhoideum*) malt. *International Amylases Journal Science Ind. Res.*, 160:35.
- Chauhan, B.M., Suneja, N. Et Bhat, C.M. (1986). Nutritional value and fatty acid composition of some high-yielding varieties of bajra. *Bulletin Grain Technology*, 24:44-49.
- Chen, J., Huo, G. (2008). Screening and identification of thermostable alphagalactosidase-producing lactic acid bacteria and characteristics of its enzyme. In *Abstracts / Journal of Biotechnology* 136, 717-742
- Chevalier, L. (2005). Nutrition: principes et conseils. 2è édition, Masson, 260p. ISBN : 2-294-02159-2.

- Cheyens, E. (1996). Etude de cas sur les pratiques d'approvisionnement alimentaire des consommateurs de Ouagadougou. FAO, Cirad, Montpellier, France.
- Chouraqui, J.P., Van Egroo, L.D., Fichot, M.C. (2004). Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium Lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. *Journal Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 38:288-292.
- Church, F.C., Meyers, S.P. Srinivasan, V.R. (1980). Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii*. In *Developments in Industrial Microbiology* 56, 113-121.
- Cornu, A., Treche, S., Massamba, J.P., Delpeuch, F. (1993). Alimentation de sevrage et interventions nutritionnelles au Congo. Cahiers Santé (AUPELF-UREF), 3, 168-177.
- Cruz, R., Bastistela, J.C., Wosiacki, G. (1981). Microbial  $\alpha$ -galactosidase for soybean processing. *Journal of Food Science* 46, 1196-1200.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology* 87, 259-270.
- De Benoist, B. (1995). Le sevrage, un défi pour l'enfant et pour sa mère. In : Trèche S, de Benoist, B., Benbouzid, D., Verster, A., Delpeuch, F., eds : *l'alimentation de complément du jeune enfant*. Paris, 1995, Orstom, collection colloques et séminaires: 7-13.
- De Vos, W.M. (2005). Diversity of lactic acid bacteria. In Food Fermentation, ed by Nout R.M.J; De Vos W.M. and Zwietering M.H., Wageningen Academic Publishers. P21-28.
- de Vrese M, Barth CA. (1991). Postprandial plasma D-lactate concentrations after yogurt ingestion. *Zeitschr Ernährungswissenschaft* 30:131-137.
- De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology* 38, 105-112.
- Desphande, S.S., Sathe, S.K., Salunkle, D.K., Cornforth, D.P. (1982). Effect of dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans. *Journal of Food Science* 47:1846.
- Dewey, K.G., Brown, K.H. (2003). Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food and Nutrition Bulletin* 24 (1), 5-28.
- Dop, M.C., Benbouzid, D. (1999). Regional features of complementary feeding in Africa and Middle East. In Dop M.C., Benbouzid D., Trèche S., de Benoist B., Verster A., Delpeuch F., éd.: *Complementary feeding of young children in Africa and the middle-*

- East, Geneva, World Health Organization. Pp 43-58. Cornu, A., Trèche, S., Massamba, J., Delpeuch, F. 1993. Alimentation de sevrage et interventions nutritionnelles au congo. *Cahiers Santé* 3, 168-177.
- Diaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C. (2003). Microbial and physiological characterization of weak amylolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in *pozol*, a Mexican maize sourdough. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4367-4374.
- Doherty, C., Faubion, J.M., Rooney, L.W. (1982). Semi automated determination of phytate in sorghum and sorghum products. *Cereal Chemistry* 59: 373-378.
- Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C. (2003). Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied Environmental Microbiology* 69, 3840-3848.
- Egounlety, M., Aworh, O.C. (2003). Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering* 56, 249-254.
- Egounlety, M., Syarief, F. R. (1992). Study on supplementation of *ogi* with tempeh. *Nigeria Food Journal* 10, 92-102.
- Ejeta, G., Hassan, M.M., Mertz, E.T. (1987). In vitro digestibilities and amino acid composition of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and other cereals, *Applied Biology*, 84:6016.
- Ekpenyong, T. E., Babatunde, L., Oyenuga, V. (1977). Fortification of maize flour based diets with blends of cashew nut meal, African locust bean and sesame oil meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 710-716.
- Erdman, J.W. (1979). Oil seed phytates: Nutritional Implications. *Journal of the American oil Chemist Society* 56:736-741.
- Estelle, L., Ladrat, C., Ann, G., Georges, B., Francis, D. (1997). Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. *Animal Biology*. CR Acad. Sci. Paris 320, 893-898.
- FAO (1995). *Sorghum and Millets in Human Nutrition*. FAO, Rome. FAO/WHO/UNI. (2001). FAO Human energy requirements. Food and nutrition technical report series. Rome, octobre 2001.
- FAO (2008). L'insécurité alimentaire dans le monde. Consulté le 19 septembre 2009.
- FAOSTAT (2009). Agricultural data: <http://faostat.fao.org>. Consulté en juillet 2009

- FAOSTAT (2003). FAO Statistical databases. Food and Agriculture. Organisation of the United Nations/Rome, Italy/ Website://faostat.fao.org
- FAO/WHO (1994). Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. WHO Tech Rep Ser 539:1-40.
- FAO/WHO (1994). Codex Alimentarius. 2<sup>nd</sup> edition; 4.
- FAO/WHO (1974). Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. WHO Tech Rep Ser 539:1-40.
- FAO/WHO (1995). Workshop on fermentation as a household technology to improve food safety. FAO/WHO report. Pretoria, South-Africa.
- FAO/WHO (2002). Expert Consultation. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- FAO/WHO (2004). Report of a joint WHO/FAO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition.
- FAO/WHO/UNU (2001). FAO Human energy requirements. Food and nutrition technical report series. Rome, octobre 2001.
- FAO/WHO/UNU (2007). Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y.P. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375-410.
- Fliedel, G., Marti, A., Thiébaud, S. (1996). Caractérisation et valorisation du sorgho. Montpellier CIRAD-CA, 404p. ISBN 2-81614-217-1.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Fuller, R. (1994). Probiotics: an overview. In: Gibson, S.A.W. (Ed.), Human Health: The Contribution of Microorganisms. Springer, London, pp. 63–73.
- Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver G., de Giori, G.S. (1996a). Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology* 45:103-109.
- Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver, G., de Giori, G.S. (1996b). Influence of carbohydrates on  $\alpha$ -galactosidase activity of *Lactobacillus fermentum*. *Current Microbiology* 33, 302-305.
- Gilliland, S. E., Speck, M. L. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 15-18.

- Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B., Raimbault, M. (1991). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 379-383.
- Glover, D.V. (1976). Improvement of protein quality in maize. Washington, DC: US Agency for International Development.
- Gomez, M.I. (1989). A Resource Inventory of Indigenous and Traditional Foods in Zimbabwe, University of Zimbabwe Publication, Harare, pp. 13-18.
- Grases, F., March, J.G., Prieto, R.M., Simonet, B.M., Costa-Bauza, A., Garcia-Raja, A., Conte, A. (2000). Urinary phytate in calcium oxalate stones formers and healthy people, *Scand. Journal of Urology and Nephrology* 34, 162-164.
- Greiner, R., Konietzny, U. (2006). Phytase for food Application. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2), 125-140.
- Guimaraes, V.M., De Rezende, S.T., Mpreira, M.A., De Barros, E.G., Felix, C.R. (2001). Characterization of galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* 58, 67-73.
- Guyot, J.P., Mouquet-Rivier, C., Tou, E.H., Counil, E., Traoré, A.S., Trèche, S. (2003). Study of the processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. In: Brouwer, I., Traoré, A., Trèche, S. (Eds.), Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop «Food based approaches for a healthy nutrition in West Africa», Ouagadougou November 2003, pp. 437-444.
- Hahn, D.H., Rooney, L.W., Earp, C.F. (1984). Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Foods World* 29, 776-779.
- Haki, G.D., Rakschit, S.K. (2003). Review Paper: Developments in industrially important thermostables enzymes. *Biosource Technology*, 89, 17-34.
- Halm, M., Lillie, A., Spreusen, A.K., Jakobsen, M. (1993). Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology* 19, 135-143.
- Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (1997). Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83, 764-770.
- Hammes, W.P., Hertel, C. (2002). Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Res. Int.* 34, 165- 170.
- Harris, L. J. (1998). The microbiology of vegetable fermentation. In B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*, Vol. 1 (pp. 45–72). London: *Blackie Academic & Professional*.

- Haros, M., Bielecka, M., Honke, J., Sanz, Y. (2007). Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *International Journal of Food Microbiology* 117, 76-84.
- Haros, M., Bielecka, M., Sanz, Y. (2005). Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. *FEMS, Microbiology Letters*, 247 (2) 231-239.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F.K., Jakobsen, M. (1999). Use of conserved randomly amplified polymorphic DANN (RAPD) fragments and RAPD pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3213-21.
- Helland, M.H., Wicklund, T., Narvhus, J.A. (2004). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology* 91, 305-313.
- Hilu, K.W., De Wet, J.M.J., Seigler, D. (1978). Flavonoid patterns and systematic in Eleusine. *Biochemical Systematics and Ecology* 6, 247-249.
- Holzapel, W.H. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food control* 8 (5/6), 241-258.
- Holzapel, W.H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75, 197-212.
- Holzapel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41, 85-101.
- Horn, P.J., Schwartz, H.M. (1961). Kaffir-corn malting and brewing studies 9: amino acid composition of kaffir corn grain and malt. *Journal of Food Science* 40, 65.
- Hounhouigan, D.J., Jansen, J.M.M., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Rombouts, F.M. (1991). Production and quality of maize-based fermented dough in Benin urban area. Proceedings of regional workshop on traditional African foods. *Quality Nutrition* 25-29 Oct, 9-18.
- Hounhouigan D.J. Nout M.J.R., Nago C.M., Houben J.H., Rombouts F.M. (1993). Changes in the physico-chemical properties of maize during natural fermentation of Mawè. *Journal of Cereal Science* 17: 291-300.
- Hounhouigan, D.J. (1994). Fermentation of maize (*Zea mays* L.) meal for mawè production in Benin: Physical, chemical and microbiological aspects. PhD thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 83p.
- Huang, J.S., Bousvaros, A., Lee, J.W. (2002). Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci*, 47: 2625-2634.

- Hubert, J.C., Dupuy, P. (1994). Conservation des fruits et des légumes. In: de Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries Lactiques*, vol.2. Loriga, Uriage, pp.233-244.
- Huch (née Kostinek), M., Hanak, A., Specht, I., Dortu, C.M., Thonart, P., Mbugua, S., Holzappel, W.H., Hertel, C., Franz, C.M.A.P. (2008). Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentation for Gari production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 258-267.
- Hurrell, R.F., Juillerat, M.A., Reddy, M.B., Lynch, S.R., Dassenko, S.A. and Cook, J.D., (1992). Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *American Journal Clinic and Nutrition* 56: 573-578.
- Hurrell, R.F., Lynch, S., Bothwell, T., Cori, H., Glahn, R., Hertrampf, E. (2004). Enhancing the absorption of fortification iron. A SUSTAIN Task Force report. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* 74, 387-401.
- Hurrell, R.F., Reddy, M.B., Burri, J., Cook, J.D. (2002). Phytate degradation determines the effect of industrial processing and home cooking on iron absorption from cereal-based foods. *British Journal of Nutrition* 88, 117-123.
- Hymowitz T., Collins F.I., Panczer J., Walker W.M. (1972). Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agronomic Journal*, 64: 613-616.
- Institut National de la Statistique et de la Démographie. (1991). Enquête nationale stocks paysans et consommation de céréales, Ouagadougou, Burkina Faso.
- Institut National de la Statistique et de la Démographie (INSD), & Macro International. (2004). Enquête Démographique et de Santé (EDS), Burkina Faso. Allaitement et Etat Nutritionnel. Ed. G. S. Mariko, pp. 145-172.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88: 90-97.
- IUPAC-IUB. (1989). Numbering of atoms in myo-inositol. Recommendations 1988. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. *Biochemical Journal*, 258 (1):1-2.
- Jariwalla, R.J. (1999). Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Research*, 19 (5A):3699-3702.
- Jog, S.P., Garchow, B.G., Mehta, B.D., Murthy, P.P.N. (2005). Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440 (2):133-140. [doi:10.1016/j.abb.2005.05.029]
- Johansson, M.L., Sanni, A., Lonner, C., Molin, G. (1995). Phenotypically-based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigerian Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *International Journal of Food Microbiology* 25, 159-168.

- Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese: decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Netherlands Milk Dairy Journal* 41, 259-280.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research* 32: 141-144.
- Kim, J.H., Park, J.Y., Jeong, S.J., Chun, J.Y., Lee, J.H., Chung, D.K., Kim, J.H. (2005). Characterization of the  $\alpha$ -galactosidase gene from *Leuconostoc mesenteriode* SY1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 509-512.
- Klopfenstein, C.F., Hosney, R.C. (1995). Nutritional properties of sorghum and the millets, in: *Sorghum and Millets: Chemistry and Technology* (D.A.V. Dendy, ed.) AACC, St. Paul, MN.
- Konietzny, U., Greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science and Technology* 37, 791-812.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. (2005). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of *Gari*, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 527-540.
- 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., Betschart, A.A. (1987). Effect of phytate and other *myo*-inositol phosphate esters on  $\alpha$ -amylase digestion of starch. *Journal of Food Science* 52, 719-721.
- Kramer, M.S., Kakuma, R. (2004). The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review. *Adv Exp Med Biol* 554:63-77.
- Kratzer, F. H. (1965). Soybean protein mineral interrelationship. *Fed. Proc.* 24, 1498-1504.
- Lacerda, I.C., Miranda, R.L., Borelli, B.M., Nunes, A.C., Nardi, R.M., Lachance, M.A., Rosa, C.A. (2005). Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 105 (2), 213-219.
- LeBlanc, J.G., Garro, M.S., Savoy de Giori, G. (2004). Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal,  $\alpha$ -galactosidase activity and fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 119-123.

- Lei, V., Jakobsen, M. (2004). Microbiological characterization and probiotic potential of *koko* and *koko* sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of Applied Microbiology* 96 (2), 384-397.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2003). Exploring a functional starter culture. *New food* 2, 35-40.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 11, 67-78.
- Leske, K.I., Jevne, C.J., Coon, C.N. (1993). Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. *Poultry Science* 72, 664- 668.
- Lestienne, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C., Trèche, S. (2005). Effect of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry*, 89, 421-425.
- Lestienne, I., Buisson, M., Lullien-Pellerin, V., Picq, C., Trèche, S. (2007). Losses of nutrients and anti-nutritional factors during abrasive decortication of two pearl millet cultivars (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry* 100, 1316-1323.
- Liu, J.R., Chen, M.J., Lin, C.W. (2002). Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains in soymilk. *Journal of Food Science*, 67,104–108.
- Liu, B., Rafiq, A., Tzeng, Y., Rob, A. (1998). The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 415-422.
- Lolas, G.M., Markakis, P. (1975). Phytic acid and other phosphorus compounds of beans. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 23: 13-15.
- Lopez, Y., Gordon, D.T., Fields, M.L. (1983). Release of phosphorus from phytate by natural lactic acid fermentation. *Journal of Food Science* 48, 953-954.
- Lopez, H.W., Ouvry, A., Bervas, E., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C., Rémésy, C. (2000). Strains of lactic acid bacteria isolated from sour doughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 48, 2281-2285.
- 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.
- Lorri, W.S.M. (1993). Nutritional and microbiological evaluation of fermented cereal weaning foods. Doctoral thesis. Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden.

- Lücke, F.K. (1998). Fermented sausages. In: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 441-483.
- Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56, 105-115.
- Lutter, C.K., Dewey, K.G. (2003). Nutrient composition for fortified complementary foods: proposed nutrient composition for fortified complementary foods. *Journal of Nutrition* 133:3011S-3020S.
- Mack, D. (2004). D(-)lactic acid-producing probiotics, D(-)lactic acidosis and infants. *Canadian Journal of Gastroenterology* 18:671-675.
- Mahajan, S., Chauhan, B. M. (1987). Phytic acid and extractable phosphorous of pearl millet flour as affected by natural lactic acid fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 41, 381-386.
- Mbugua, S.K. (1981). Microbiological and biochemical aspects of Uji (an East African sour cereal porridge) fermentation, and its enhancement through application of lactic acid bacteria. PhD Thesis, Cornell University, 140 pp
- Mbugua S.K., Njenga J. (1992). The antimicrobial activity of fermented Uji. *Ecology of food and nutrition*, 28: 191-198.
- McDonough, C.M., Rooney, L.W. (2000). The millets. In: Kulp, K., Ponte, Jr., J.G. (Eds.), *Handbook of Cereal Science and Technology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.177-201.
- McDonough, C.M., Rooney, L.W., Earp, C.F. (1986). Structural characteristics of *Eleusine coracana* (Finger-millet) using scanning electron and fluorescence microscopy *Food Microst*, 5:247.
- Mensah, P., Tomkins, A. (2003). Household-level technologies to improve the availability and preparation of adequate and safe complementary foods. The United Nations University. *Food and Nutrition Bulletin* 24, 104-125.
- Miambi, E., Guyot, J.P., Ampe, F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 82, 111-20.
- Michaelsen, K.F., Friis, H. (1998). Complementary feeding. A Global Perspective. *Global issues in pediatric nutrition* 14, No.10.
- Mital, B.K., Shallenberger, R. S., Steinkraus, K. H. (1973).  $\alpha$ -Galactosidase Activity of Lactobacilli. *Applied Microbiology* 26, (5), 783-788.

- Mlingi, N.V.L. (1989). La reduction du volume des aliments de sevrage à base de manioc par la fermentation. In Alnwick D., Moses S., Schmidt O.G., éd : Pour améliorer l'alimentation des jeunes enfants en Afrique orientale et australe : une technologie à la portée des ménages, Compte rendu d'un atelier tenu à Nairobi, Kenya, 12-16 Octobre 1987, IDRC-265F, Ottawa : 239-251.
- Moïse et al. (1988). Feeding and weaning practices of infants and children less than two years at Cairo Governorate. *Bulletin Nutrition Inst.*, Cairo, Egypt, 8: 82-100.
- Morlon-Guyot, J., Guyot, J. P., Pot, B., Jacobe de Haut, I., Raimbault, M. (1998). A new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1101–1109.
- Mosha, A. C., Svanberg, U. (1990). The acceptance and intake of bulk-reduced weaning foods : The luganga village study. *Food and Nutrition Bulletin*, 12 (1), 69-74.
- Motarjemi, Y., Käferstein, F., Moy, G. Quevedo, F. (1999). Contaminated complementary food: a major risk factor for diarrhoea and associated malnutrition. In Dop M.C., Benbouzid D., Trèche S., de Benoist B., Verster A., Delpeuch F., éd.: *Complementary feeding of young children in Africa and the middle-East*, Geneva, World Health Organization. Pp 75-94.
- Motarjemi, Y., Nout, M.J.R. (1996). Food fermentation: a safety and nutritional assessment. *Bull. W.H.O.*, vol. 74. OMS, Geneve, pp. 553–559.
- Mouquet, C., Greffeuille, V., Trèche, S. (2006). Characterization of the consistency of gruels consumed by infants in developing countries: Assessment of the bostwick consistometer and comparaison with viscosity measurements and sensory perception. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57, 459-469.
- Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Guyot, J.P., Tou, E.H., Rochette, I., Trèche, S. (2008). Consumption pattern, biochemical composition and nutritional value of fermented pearl millet gruel in Burkina Faso. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59 (7): 716-729.
- Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A., Sørhaug, T. (2003a). Microbiological and fermentation characteristics of *togwa*, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 80, 187-199.
- Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Sørhaug, T. (2001). Changes in quality attributes during storage of *togwa*, a lactic acid fermented gruel. *Journal of Food Safety* 21, 181-194.
- Mugula, J.K., Sørhaug, T., Stepaniak, L. (2003b). Proteolytic activities in *togwa*, a Tanzanian fermentation food. *International Journal of Food Microbiology* 84, 1-12.
- Muralikrishna, G., Nirmala, M. (2005). Cereal  $\alpha$ -amylases, an overview. *Carbohydrate Polymers* 60, (2), 163-173.

- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer, G.A., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Nago, C.M. (1989). Technologies traditionnelles et alimentation au Bénin: aspects techniques, biochimiques et nutritionnels. Identification et caractérisation des principales filières et Technologies du secteur traditionnel de transformation alimentaire. Document FSA/UNB, Abomey-Calavi, Bénin, 97p.
- Nago, C.M., Tétégan, E., Matencio, F., Mestres, C. (1998). Effects of Maize type and fermentation conditions on the quality of Beninese Traditional *Ogi*, a fermented Maize slurry. *Journal of Cereal Science* 28: 215-222.
- Nago, C.M., Thuillier, C., Hounhouigan, D.J. (1993). Etude des systèmes techniques de transformation artisanale du maïs au Bénin. In: Alimentation, Techniques et Innovations dans les Régions Tropicales. Actes des Journées Scientifiques du CIRAD, Montpellier, Novembre 1992, Coordinateur: Muchnik J., Editions: l'Harmattan, pp.385-404.
- Nguyen, T.T.T., Loiseau, G., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S., Guyot, J.P. (2007a). Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children. *Food Chemistry* 100, 623-631.
- Nguyen, T.T.T., Guyot, J.P., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Loiseau, G. (2007b). Effect of high pressure homogenisation on the capacity of *Lactobacillus plantarum* A6 to ferment rice/soybean slurries to prepare high energy density complementary food. *Food Chemistry* 102, 1288-1295.
- Nkama, I. (1991). Traditional methods of production of high protein energy foods from grain legumes in the north eastern states of Nigeria. In S. Sefa-Dedeh (Ed.), *Association of African Universities proceedings of a seminar on development of high-energy foods from grain legumes* (pp. 124-133). Legon: University of Ghana.
- Nkama, I., Dappiya, S., Modu, S., Ndahi, W. (2000). Physical, chemical, rheological and sensory properties of akamu from different pearl millet cultivars.
- Nout, M.J.R. (1981). The role of lactic acid fermentation in the context of food manufacture in Kenya. In. Emejuaiwe, O.S., Ogundi, O., Sanni, O.S. *Global impacts of applied microbiology*. Academic Press Inc, London, England pp 169-175.
- Nout, M.J.R. (1992). Accelerated natural lactic fermentation of cereal-based formulas at reduced water activity. *International Journal of Food Microbiology* 16, 313-322.

- Nout, M. J. R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International* 27(3), 291-298.
- Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Havelaar, A. (1989). Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 8, 351-361.
- Nuraida, L., Wacher, M.C., Owens, J.D. (1995). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Wageningen Journal Microbiology Biotechnology* 11, 567-571.
- Nwankwo, D., Anadu, E., Usoro, R. (1989). Cassava fermenting organisms. *MIRCEN J*, 5:169-79.
- Odunfa, S. A., Adeyele, S. (1985). Microbiological changes during the traditional production of *ogi-baba*, a West African fermented sorghum gruel. *Journal of Cereal Science* 3, 173-180.
- Okagbue, R.N. (1995). Microbial biotechnology in Zimbabwe: Current status and proposals for research and development. *Journal of Applied Science in Southern Africa* 1, 148-158.
- Olusola, B.O. (1997). Lactic fermented Foods in African and their benefits. *Food control* 8, 5/6, pp 289-297.
- Oluwamukomi, M.O., Eleyinmi, A.F., Enujiugha, V.N. (2005). Effect of soy supplementation and its stage of inclusion on the quality of *ogi* a fermented maize meal. *Food Chemistry* 91, 651-657.
- Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., Takano, M. (1995). Characterization of starch-hydrolysing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda" and its amylolytic enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 124-130.
- OMS. (2008). Rapports de situation sur les questions techniques et sanitaires. 61<sup>ème</sup> assemblée mondiale de la santé.
- Onomi, S., Okazaki, Y., Katayama, T. (2004). Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68 (6):1379-1381. [doi:10.1271/bbb. 68.1379]
- Onyango, C., Henle, T., Hofmann, T., Bley, T. (2004). Production of high energy density fermented *uji* using a commercial alpha-amylase or by single-screw extrusion. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 37, 401-407.
- Oyewole, O.B. (1997). Lactic fermented Foods in Africa and their benefits. *Food Control* 8, 289-297.

- Palacios, C.M., Haros, M., Sanz, Y., Rosell, C.M. (2008). Selection of lactic acid bacteria with high phytate degrading activity for application in whole wheat breadmaking. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 41, 82-92.
- Pandey, A., Szakaacs, G., Soccol, C., Rodriguez-Leon, J., Zoclo, V. (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology* 77, 203-214.
- Pedone, C., Arnaud, C., Postaire, E. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *International Journal of Clinical Practice* 54: 568-571.
- Perez-Escamilla, R. (1993). Update on the breastfeeding situation in Africa. *Nutrition Research* 13 (5) 597-609.
- Perlas, L., Gibson, R.S. (2002). Use of soaking to enhance the bioavailability of iron and zinc from rice-based complementary Foods used in the Philippines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 1115-1124.
- Phillippy, B.Q. (2006). Transport of calcium across Caco-2 cells in the presence of inositol hexakisphosphate *Nutrition Research*, 26(3):146-149 [doi:10.1016/j.nutres.2006.02.008].
- Pintado, J., Guyot, J.P., Raimbault, M. 1999. Lactic acid product from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain. *Enzyme and microbial Technology* 24, 590-598.
- Plahar, W.A., Nerquaye-Tetteh, G.A., Annan, N.T. (1999). Development of an integrated quality Assurance system for the traditional *Sardinella* sp. And anchovy fish smoking industry in Ghana. *Food Control* 10:15-25.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. (1998). Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for use as Probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
- Rachie, K.O., Majmudar, J.V. (1980). Pearl millet. Pennsylvanie University Press, University Park, PA.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126: 520-528.
- Rademaker, J.L.W., Hoolwerf, J.D., Wagendorp, A.A., te Giffel, M.C. (2006). Assessment of microbial population dynamics during yogurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting. *International Dairy Journal* 16, 457-466.
- Ramachandra, G., Virupaksha, T.K., Shadaksha, T.K., Shadaksharaswamy, M. (1977). Relationship between tannin levels and in vitro protein digestibility in finger millet

- (Eleusine coracana Gaertn). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25, 1101-1104.
- Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Vijay Kumar, E. (2008). A review: Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. *Biotechnology Advances* 26, 22-34.
- 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., Hurrell, R.F., Cook, J.D. (2000). *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 937-943.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K., Salunke, D.K. (1982). Phytates in legumes and Cereals. *Advances in Food Research* 28:1-92.
- Reichert, R.D. (1979). The pH sensitive pigments in pearl millet. *Cereal Chemistry* 56:291.
- Rodriguez-Sanoja, R., Morlon-Guyoy, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, J., Guyot, J.P. (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3350-6.
- Rooney, L.W. Serna-Salvador, S.O. (2000). Sorghum in Handbook of Cereal Science and Technology. Edited by Karel Kulp and Joseph G. Ponte, Jr. Second Edition Revised and Expanded. ISBN: 0-8247-8294-1.
- Rooney, L., Kirleis, A.W., and Murty, D.S. (1986). Traditional foods from sorghum: Their production, evaluation and nutritional value. In *Cereal Science and Technology* 8 (Y), 317-353, Pomeranz, ed. Am. Assoc. *Cereal Chemistry*, St. Paul, Mn.
- Rooney, L.W., and McDounough, C.M. (1987). Food quality and consumer acceptance of pearl millet. Pages 43-61 in: Proc. Int. Pearl Millet Workshop. Int. Crops Res. Inst. Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, A.P., India.
- Romero, R., Gazquez, D., Bagur, M. G., Sanchez-Vinas, M. (2000). Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871, 75-83.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria : safety functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Sandberg, A.S., Ahderinne, R. (1986). HPLC Method for Determination of inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates in Foods and Intestinal Contents. *Journal of Food Science* 51: 547.

- Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N-G, Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthen, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 240-246.
- 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.
- Sanders, M.E., Huis in't Veld, J.H.J. (1999). Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 293-315.
- Sandtröm, B., Sandberg, A.S. (1992). Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *Journal of Trace Elements Electrolytes in Health and Disease* 6, 99-103.
- Sankara Rao, D.S., Deosthale, Y.G. (1983). Mineral composition, ionizable iron and soluble zinc in malted grains of pearl millet and ragi. *Food Chemistry* 11:217-223.
- Sanni, A., Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P. (2002). New efficient amylase producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 72, 53-62.
- Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D.S., Møller, P.L., Traoré, A.S., Jakobsen, M. (2007). The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *Journal of Applied Microbiology* 103, 765-777.
- Sefa-Dede, S. (1984). An old processing method, a new protein food. *Food Nutrition Bulletin* 6, 77-80.
- Serraino, M. R., Thompson, L. U., Savoie, L., Parent, G. (1985). Effect of phytic acid on the *in vitro* rate of digestibility of rapeseed protein and amino acid. *Journal of Food Science* 50, 1689-1692.
- Setchell, K.D. (1988). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal Clinical and Nutrition* 68 (6 Suppl):1333S-1346S.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29 (7), 675-690.
- Shallenberger, R.S., Hand, D.B., Steinkraus, K.H. (1967). Changes in sucrose, raffinose and stachyose during tempe fermentation. In Proceedings of the Research Conference on Dry Beans, Bellaire, Michigan. US Department of Agriculture (pp. 68-71). Report, ARS-74-41.
- Simango, C. (1997). Potential use of traditional fermented foods for weaning in Zimbabwe. *Journal Science Medicine* 44, 1065-1068.

- Simango, C., Rukure, G. (1991) Survival of *Campylobacter* and pathogenic *Escherichia coli* in Mahewu, a fermented cereal gruel. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 399-400.
- Simwenba, C.G., Hosene, R.C., Vanrriano-Marsten, E., Zeleznak, K. (1984). Certain B vitamin and phytic acid contents of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32:31.
- Singh, M., Krikorian, A.D. (1982). Inhibition of trypsin activity *in vitro* by phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, 799-800.
- Slingerland, M. A., Stomph, T. J., Nout, M. J. R., Hoffland, E. (2005) In 15th International Plant Nutrition Colloquium. Li, C. J., F. S. Zhang, A. Dobermann, P. Hinsinger, H. Lambers, X. L. Li, P. Marschner, L. Maene, S. McGrath, O. Oenema, S. B. Peng, Z. Rengel, Q. R. Shen, R. Welch, N. von Wiren, X. L. Yan & Y. G. Zhu, Eds. Beijing, P.R. China: Tsinghua University Press, Beijing. pp 378-9.
- Steggerda, F.R., Richards, E.A., Rackis, J.J. (1966). Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. *Society of experimental Biology and Medicine* 121, 1235.
- Steinkraus, K. H. (1995). Handbook of indigenous fermented foods. NY:Marcel Dekker.
- Steinkraus, K.H. (1996). Handbook of Indigenous Fermented Foods, 2nd edn. Marcel Dekker, New York Revised and Expanded.
- Sreeramulu, G., Srinivasa, D.S., Nand, K., Joseph, R. (1996). *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. *Letters in Applied Microbiology* 23, 285-388.
- Sripriya, G., Antony, U., 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.
- Subramanian, V., Suryaprakash, S. (1981). Sugars of pearl millet (*Pennisetum americanum*), *Journal of Food Science* 46: 1614.
- Subramanian, V., Jamunathan, R., Ramaiach, C.D. (1986). Physical and chemical characteristics of pearl millet grains and their relationship to roti quality. *International Journal Food of Food Sciences* 51:1005.
- Sudarmadji, S., Markakis, P. (1977). The phytate and phytase of soybean tempeh. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 381-383.
- Svanberg, U., Sandberg, A.S. (1988). Improved iron availability in weaning foods. In *Improving Young Child Feeding in Eastern and Southern Africa - Household-Level Food Technology*, Proceedings of a workshop held in Nairobi. Kenya, October 1987, eds D. Alnwick, S. Moses and O.G. Schmidt, pp.366-373. IDRC-265e. Ottawa, Canada.

- 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, 405-408.
- Takasaki, Y. (1976a). Production and utilization of b-amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agricultural Biology and Chemistry*. 40, 1515-1522.
- Takasaki, Y. (1976b). Purification and enzyme properties of b-amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agricultural Biology and Chemistry*. 40, 1523-1530.
- Talamond, P., Gallon, G., Trèche, S. (1998). Rapid and sensitive liquid chromatography method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *Journal of Chromatography*, A 805, 143-147.
- Tamang, J.P., Nikkuni, S. (1996). Selection of starter cultures for the production of kinema, a fermented soybean food of the Himalaya. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 629-635.
- Taylor, J.R.N. (2004). Millet/Pearl. *Encyclopedia of Grain Science*. C. Wrigley. Oxford, Elsevier: 253-261.
- Temple, L., Gibson, R.S., Hotz, C. (2002). Use of soaking and enrichment for improving the content and bioavailability of calcium, iron and zinc in complementary foods and diets of rural Malawian weanlings. *Journal of Food Science* 67, 1926-1932.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., Huis In't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.
- Teodorovic, V., Buncic, S., Smiljanic, D. (1994). A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft* 74, 170-172.
- Thompson, L.U., Yoon, J.M. (1984). Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science* 49, 1128-1229.
- Tomkins, A., Alnwick, D., Haggerty, P. (1988). Fermented foods for improving child feeding in eastern and southern Africa. In : Alnwick D, Moses S, Schmidt OG eds : *Improving young child feeding in eastern and southern africa- Household-level food technology*. Ottawa International Development Research Centre, pp. 136-167.
- Tou, E. H., Guyot, J.P., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Counil, E., Traore, A. S., Trèche, S. (2006). Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into “ben-saalga”, a millet-based fermented gruel from Burkina Faso used as complementary food. *International Journal of Food Microbiology* 106, 52-60.
- Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C, Rochette, I, Traoré, A.S., Trèche, S., Guyot, J.P. (2007a). Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and

- energy density of *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chemistry* 100, 935-943.
- Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Picq, C., Traoré, A.S., Trèche, S., Guyot, J.P. (2007b). Improving the nutritional quality of *ben-saalga*, a traditional fermented millet-based gruel, by co-fermenting millet with groundnut and modifying the processing method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 40, 1561-1569.
- Trèche, S. (1995). Techniques pour augmenter la densité énergétique des bouillies. In : Trèche S, de Benoist B, Benbouzid D, Verster A, Delpeuch F, eds : *l'alimentation de complément du jeune enfant*. Paris, 1995, Orstom, collection colloques et séminaires: 7-13.
- Trèche, S. (2002). Complementary foods in developing countries: importance, required characteristics, constraints and potential strategies for improvement. In Kolsteren P, Hoerée T, Perez-Cueto eds: *Proceedings of the International Colloquium promoting growth and development of under fives*. Antwerpen: ITG Press: 132-148.
- Trèche, S., Giamarchi, P., Pezennec, S., Gallon, G., Massamba, J. (1992). Les bouillies de sevrage au Congo: composition, valeur nutritionnelle et modalités d'utilisation. Communication présentée aux 5èmes journées Internationales du GERM, 23-27 Novembre 1992, Balaruc, France.
- Trèche, S., Massamba, J. (1991). Modes de préparation et valeur nutritionnelle des bouillies de sevrage actuellement consommées au Congo. Communication présentée au Séminaire-atelier «les bouillies de sevrage en Afrique Centrale», Brazzaville, Avril 1991.
- Trèche, S., Mbome, I.L. (1999). Viscosity, energy density and osmolality of gruels for infants prepared from locally produced commercial flours in some developing countries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50, 117-125.
- Trèche, S., Mouquet-Rivier, C. (2008). Use of amylases in infant food. In R. Porta, P. Di Pierro, & L. Mariniello, *Recent research developments in food biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids* (pp. 213-245). Trivandrum: Research Signpost.
- Turck, D. (2005). Comité de nutrition de la Société française de pédiatrie. Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Archives de Pédiatrie*; 12S3:S145-65.
- Udayasekhara-Rao, D., Deosthale, Y. G. (1988). In-vitro availability of iron and zinc in white and coloured ragi. 1: role of tannin and phytate. Qual. Plant: *Plant Foods for Human Nutrition* 38, 35±41.
- Underwood, B.A., Hofvander, Y. (1982). Appropriate timing for complementary feeding of the breast-fed infant. A review. *Acta Paediatrica Scand, suppl*, 294, 32p.

- UNICEF (1995). Facts for life: a communication challenge. A joint WHO/UNICEF/UNESCO/UNFRA Statement, P & LA éd. 32p.
- UNICEF (2006). La nutrition : le fondement de la survie et du développement.
- UNICEF (2007). La situation des enfants dans le monde 2007.
- UNICEF (2008). La situation des enfants dans le monde 2008. 164p.
- United Nations University, 2003. *Food and Nutrition Bulletin*, vol 24, n° 1.
- Uribarri, J., Oh, M., Carroll, H. (1998). D-Lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine (Baltimore)* 77:73-82.
- USDA/HNIS (1989). Composition of Foods:Cereals Grains and Pasta, Agriculture Handbook 8-20. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- USDA/HNIS (1988). Provisional Table on the Dietary Fiber Content of Selected Foods, HNIS/PT-106. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiological Reviews*, 60, 407.
- Van Niel, C., Feudtner, C., Garrisson, M. (2002). Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, 109: 678-684.
- Van Soest, P. J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of Association Office of Analysis Chemistry* 46, 829-835.
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G.H.J., Ben Amor, K., De Vos, W.M. (2005). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and Bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 477-490.
- Viara, N., Elena, P., Elka, I. (1993). Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol.* 28, 277-289.
- Vieu, M.C., Traoré, T., Trèche, S. (2001). Effects of energy density and sweetness of gruels on Burkinabe infant energy intakes in free living conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52:213-218.
- Vihinen, M., Mantsala, P. (1990). Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Biotechnology Applied Biochemistry* 12, 427-435.

- Vogel, S., Graham, M. (1979). Sorghum and Millet: food production and use. IDRC. International Development Research Centre. Ottawa. Workshop on Sorghum and Millet; Nairobi. 64p
- Vohra, A., Satyanarayana, T. (2003). Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23/1, 29-60.
- Vucenik, I., Shamsuddin, A.M. (2006). Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutrition and Cancer*, 55(2):109-125. [doi:10.1207/s15327914nc5502-1].
- Walker, A.F., Pavitt, F. (1989). Energy density of Third World weaning foods. BNF *Food and Nutrition Bulletin*, 14, 39-44.
- Wambach, K., Campbell, S.H., Gill, S.L. (2005). Clinical lactation practice: 20 years of evidence. *Journal Human Lactation*, 21:245–58.
- Waniska, R.D., Poe, J.H., Bandyopadhyay. (1989). Effects of growth conditions on grain molding and phenols in sorghum caryopsis. *Journal of Cereal Science* 10, 217-225.
- WHO (1995). Infant feeding recommendations. Bulletin of WHO, 73: 165.
- WHO (1998). Complementary feeding of young children in developing countries: A review of current scientific knowledge. World Health Organisation, Geneva, p. 228.
- WHO (2001). Iron Deficiency Anaemia, Assessment, Prevention, and Control. A guide for programme managers. World Health Organization, Geneva.
- WHO (2002). *Report of the expert consultation on the optimal duration of exclusive breastfeeding*. WHO/NHD/01.09, WHO/FCH/CAH/01.24, Geneva: World Health Organisation.
- WHO/UNICEF (2002). *Global strategy for infant and young child feeding*. Geneva: World Health Organisation.
- Windish, W.W., Mhatre, N.S. (1965). Microbial amylases. In Wayne WU, editor. *Advances in Applied Microbiology*, 7, 273-304.
- Yousif, N.M., Dawyndt, W.H., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M. (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from « hussuwa », an African fermented sorghum product. *Journal of Applied Microbiology* 98, 216-228.
- Yoon, M.Y., Hwang, H.J. (2008). Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α-D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology* 25, 815-823.

- Young, V.R. (1991). Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *Journal of American Dietetic Association* 91(7):828-835.
- Yusof, R.M., Morgan, J.B., Adams, M.R. (1993). Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L-lactate and nisin. *Journal of Food Protection* 70:241-243.
- Zorba, M., Hancioglu, O., Genc, M., Karapinar, M.G., Ova, G. (2003). The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochemistry* 38, 1405-1411.

**TITRE en anglais: Potentiality of lactic acid bacteria starter cultures to improve the nutritional quality of pearl millet fermented gruels**

---

**RESUME en anglais**

To improve the nutritional quality of infant gruels made of pearl millet mixed with either groundnut or soybean, lactic acid bacteria (LAB) selected for enzyme activities of interest in nutrition, such as amylase, phytase and  $\alpha$ -galactosidase, were used. For the sake of comparisons, natural fermentations were also performed. The use of an amylolytic LAB enabled to increase the energy density at values required for young children, by incorporating 15 to 18% of dry matter depending on the mixture (vs. 7 to 8% for the traditional gruels). Amylolytic LAB can also substitute for the use of malt frequently added as an amylase source in other processes. For the pearl millet-groundnut mixture, one of the strains was able to hydrolyse raffinose, stachyose and verbascose. As for the pearl millet-soybean mixture, these compounds were already hydrolysed before the fermentation step, suggesting the action of endogenous enzymes. Surprisingly, whatever the mixture pearl-millet-legume no phytate hydrolysis was observed with the phytasic strains, despite their high *in vitro* phytase activity. Therefore, in spite of a screening leading to select strains with high enzyme activities, their activity within the food matrix could be inhibited or limited depending on the strain and the food matrix. More investigations are necessary to better know what would be the influence of processes and food matrix composition on microbial activities, in order to be able to predict nutritional quality of a fermented gruel based on strain and matrix characteristics.

---

**Key-words :** complementary foods for young children, pearl millet, soybean, lactic acid bacteria, energy density, antinutritional factors, phytates,  $\alpha$ -galactosides.

## RESUME

L'amélioration de la qualité nutritionnelle de bouillies infantiles fermentées à base de mil en mélange avec de l'arachide ou du soja a été étudiée par une approche s'appuyant sur l'utilisation de bactéries lactiques sélectionnées pour des activités enzymatiques intéressantes en nutrition (amylasique, phytasique et  $\alpha$ -galactosidasique). Des fermentations naturelles ont aussi été réalisées à des fins de comparaison. L'utilisation d'une bactérie lactique amylolytique a permis d'obtenir une augmentation de la densité énergétique à des valeurs requises pour satisfaire les besoins du jeune enfant, par l'incorporation de matière sèche à des taux de 15 à 18% selon le mélange (contre 7 à 8% pour les bouillies traditionnelles). Cette utilisation permet de s'affranchir de l'ajout de malt fréquemment employé comme source d'amylases dans d'autres procédés. Pour le mélange mil-arachide, l'une des souches a été capable d'hydrolyser le raffinose, le stachyose et le verbascose, tandis que pour le mélange mil-soja, les analyses révèlent une pré-hydrolyse de ces composés avant fermentation suggérant l'action d'enzymes endogènes. En revanche, quel que soit le mélange mil-légumineuse, aucune hydrolyse des phytates n'a été observée avec les souches phytasiques, et ce malgré les fortes activités des souches déterminées *in vitro*. Ainsi, en dépit d'une sélection conduisant à retenir des souches à forte activité, leur activité au sein de la matrice alimentaire pourra être inhibée ou limitée selon les souches et la nature de la matrice. Des recherches sur l'influence des procédés de transformation et de la composition de la matrice sur les activités microbiennes devront être poursuivies, afin de pouvoir prédire la qualité d'une bouillie infantile fermentée selon les caractéristiques des souches et de la matrice employées.

---

**DISCIPLINE :** Nutrition et Sciences des Aliments

---

**MOTS-CLES:** Aliment de complément du jeune enfant, mil, soja, arachide, bactéries lactiques, densité énergétique, facteurs antinutritionnels, phytates,  $\alpha$ -galactosides.

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE:**

Institut de Recherche pour le Développement  
UMR 204 « Prévention des Malnutritions et des Pathologies Associées »  
BP 64501, 34394 Montpellier, France.

---