



**HAL**  
open science

## Potentiel nutritionnel du microbiote d'aliments fermentés à base de céréales : le cas des folates

Fabien Saubade

► **To cite this version:**

Fabien Saubade. Potentiel nutritionnel du microbiote d'aliments fermentés à base de céréales : le cas des folates. Alimentation et Nutrition. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT172 . tel-01688503

**HAL Id: tel-01688503**

**<https://theses.hal.science/tel-01688503>**

Submitted on 19 Jan 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA  
Et de l'unité de recherche Nutripass

Spécialité : Agroressources, Procédés, Aliments,  
Bioproduits

Présentée par **Fabien Saubade**

Potentiel nutritionnel du microbiote  
d'aliments fermentés à base de céréales :  
le cas des folates

Soutenue le 02-12-2016 devant le jury composé de

M. Christophe Lacroix, Professeur, ETH-Zurich	Rapporteur
Mme. Monique Zagorec, Directrice de recherche, INRA	Rapporteuse
M. Bruno Blondin, Professeur, Montpellier SupAgro	Examineur
Mme. Delphine Sicard, Directrice de recherche, INRA	Examinatrice
Mme. Marie-Christine Champomier-Verges, Directrice de recherche, INRA	Examinatrice
M. Jean-Pierre Guyot, Directeur de recherche, IRD	Directeur de thèse



## Dédicace

Je dédie ce travail à ma mère **Christiane Saubade** sans qui je n'aurais pas pu réaliser mes rêves. Merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces années et d'avoir toujours cru en moi.

## Remerciements

Je remercie l'**IRD** et l'**UMR Nutripass** pour m'avoir accueilli et soutenu financièrement pendant mes trois années de thèse. Je remercie également les membres de l'école doctorale **GAIA (Marc Bouvy, Valérie Micard, Estelle Monteil, Cendrine Jay-Allemand ...)** pour avoir accepté mon inscription en thèse et pour m'avoir accueilli au conseil de l'école doctorale en tant que représentant des doctorants.

Je remercie **Jean-Pierre Guyot** pour avoir accepté de diriger ma thèse et pour m'avoir donné l'opportunité de participer à plusieurs congrès, dont deux internationaux.

J'adresse mes vifs remerciements et toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse **Christèle Humblot** pour son implication, le temps qu'elle m'a consacré (même pendant ses vacances), son encadrement de qualité et sa patience. Merci pour tes précieux conseils, pour tout ce que tu m'as enseigné et pour avoir partagé ta passion pour la science. Tu as toujours su régler les problèmes avec une efficacité remarquable et trouver les mots pour remonter le moral dans les moments difficiles. J'espère pouvoir égaler un jour ton organisation exceptionnelle et ta réflexion scientifique.

J'adresse mes sincères remerciements à **Youna Hemery**, co-encadrante de ma thèse, pour le soutien qu'elle m'a apporté tant au niveau des expériences au laboratoire, que pour la rédaction et l'organisation de la thèse en général. Merci pour le temps que tu m'as consacré et la patience dont tu as fait preuve. J'espère pouvoir être un jour aussi précis et rigoureux que toi.

J'adresse mes remerciements à **Bruno Blondin, Christophe Lacroix, Delphine Sicard, Marie-Christine Champomier-Verges** et **Monique Zagorec** pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie **Gérard Loiseau, Sylvie Avallone, Sylvie Lortal et Sylvie Rabot** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse

Je remercie **Isabelle Rochette** pour les dosages HPLC de l'éthanol, et des acides lactique et acétique.

Je remercie **Christian Picq** pour avoir partagé son bureau avec moi en début de thèse. Je continuerai d'entendre ton rire où que je sois. Et n'hésite pas à me prévenir si tu refais du gâteau !

Je tiens en particulier à remercier **Catherine Philibert**, secrétaire de l'UMR Nutripass pour son aide inestimable pour les différents points administratifs de ma thèse et en particulier pour ceux qu'il a fallu gérer dans l'urgence.

Je ne peux pas tous les citer ici, mais j'adresse mes remerciements à l'ensemble des **permanents de l'UMR Nutripass** pour m'avoir accueilli dans l'unité, pour avoir accepté de répondre à mes questions, et pour avoir partagé leur savoir.

Je remercie **Luca Cocolin** et tous les membres de son laboratoire pour m'avoir accueilli pendant deux semaines. Je remercie tout particulièrement **Ilario** pour m'avoir enseigné les bases de la bioinformatique avec tant d'enthousiasme, et pour tout ce qu'il a fait pour moi à Turin.

Merci **Wichien Sriwichai** pour avoir partagé le bureau avec moi pendant ces trois années. Nous avons commencé nos thèses en même temps et nous les finiront en même temps. C'était un plaisir de partager du temps avec toi, que ce soit au laboratoire que sur le terrain de volley. Je n'oublierai pas tes talents culinaires et j'espère avoir l'occasion de te rendre visite en Thaïlande.

Merci **Maria del Carmen Ponce De Leon Rodriguez** pour avoir essayé de me réconcilier avec les piments. Bon courage pour le reste de ta thèse ! J'espère qu'un jour je pourrais te rendre visite au Mexique.

Merci aux doctorants des autres équipes de l'IRD pour tous les moments passés ensemble pendant ces trois ans : **Céline Pesce** (merci pour ta bonne humeur), **Chloé Guérin** (merci d'avoir toujours été à l'écoute), **Emilie Froussart** (tes petits dessins improvisés et vidéos marrantes me manqueront beaucoup), **Hélène Pidon** (je ne suis jamais autant allé au cinéma que pendant ma thèse grâce à toi), **Jérémy Lavarenne** (Tu m'auras fait découvrir des jeux très intéressants), **Lucie Poulin** (et sa trompette), **Lucille Toniutti** (toutes tes petites mésaventures m'auront bien fait rire), **Mathilde Dupeyron** (aller faire les courses sera bien triste sans toi), **Mathilde Hutin** (finalement je n'ai toujours pas goûté le fameux Youm-Youm), **Rémi Tournebize** (et ses discours philosophiques), et **Sixtine Passot** (on ne se voyait pas souvent, mais c'était toujours un plaisir).

Un grand merci à tous les stagiaires, doctorants et CDD de passage à l'IRD : **Alejandra Londero**, **Alexis Cuenot-Hodister** (merci pour ta joie de vivre et les parties de JDR), **Anna Greppi** (merci pour ton dynamisme), **Cécile Renaud**, **Cybèle Maka Taga**, **Fabrice Bationo**, **Insaf Berrazega**, **Jerôme Dandel**, **Manon LeMerrer** (Tarte Tatin, Tarte Tatin !), **Morgane Chaperon** (Tarte Tatin, Tarte Tatin !), **Rachida M'rabat**, **Radhouene Doggui**, **Sann Sotheary**, **Sondos Njoumi**, **Tissem...**

Je remercie **Khai Khuang Cheong**, **Quentin Aemig** et **Ziad Almaksour** avec qui nous avons organisé la journée de l'école doctorale SPSA (actuelle filière APAB de l'école doctorale GAIA).

Je tiens à remercier particulièrement mon grand-père **Georges Bidalot** pour l'amour qu'il m'a porté. J'aurais tant aimé que tu vois la fin de ma thèse. Merci à ma grand-mère **Claudine Bidalot** pour l'amour sincère qu'elle me porte. Merci à ma sœur **Elodie Saubade**, qui malgré la distance m'a toujours soutenu. Je suis content que tes rêves commencent enfin à se réaliser. Merci à mon parrain **Jean-Jacques Bidalot** qui nous a quittés trop tôt, je suis fier de partager mon deuxième prénom avec toi. Merci à mes oncles **Gérard Bidalot** et **Patric Bidalot**, que je ne vois malheureusement pas assez souvent. Un grand merci aux autres membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

Merci à tous les gens qui m'ont aidé à me défouler au volley et au kung-fu après les longues journées au laboratoire : **Adrien, Alexandre Olive, Alexandra, Cédric, Frédéric, Léa, Yann, Yannick**

Et comme on dit, le meilleur pour la fin, je remercie vivement tous mes amis de l'ESIAB (mais qui restera l'ESMISAB dans nos cœur) qui m'ont soutenu pendant ces trois ans, même si ils me pensent fou : **Anaïs Caujole** (on peut toujours compter sur toi pour avoir des idées géniales), **Axelle Carton, Benjamin Lebreton** (mon binôme et meilleur ami pour toujours), **Céline Goalec** (on dirait que tu commence à trouver ton chemin), **Fabien Pichon** (et ses goûts musicaux si ... particuliers), **Jeanne Caujolle** (je suis content qu'on se soit revu après la prépa, tu auras vu une meilleure facette de ma personnalité), **Maha Hichri, Marina Belan** (mon auvergnate préférée et meilleure amie), **Marion Barhomeuf, Marion Navarri, Yann Wolfs ...**

Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué à ma thèse d'un point de vue scientifique et/ou moral et que je n'ai pu citer ici.

## Table des matières

Chapitre 1 : Introduction générale .....	17
Chapitre 2 : revue bibliographique .....	25
1- La fermentation, un procédé ancestral .....	27
1-1- Les avantages de la fermentation .....	27
1-2- Les inconvénients de la fermentation .....	28
1-3- Les aliments fermentés .....	29
2- Les aliments céréaliers fermentés, des aliments de base.....	30
2-1- Consommation des aliments céréaliers fermentés dans le monde .....	30
2-2- Caractéristiques nutritionnelles des aliments céréaliers fermentés .....	32
3- Le microbiote des aliments céréaliers fermentés.....	35
3-1- Méthodes d'étude du microbiote des aliments fermentés.....	35
3-2- Les principaux micro-organismes responsables de la fermentation des aliments céréaliers .....	36
3-3- Variabilité du microbiote des aliments céréaliers fermentés .....	38
4- Impact du microbiote sur la qualité nutritionnelle des aliments.....	41
4-1- Méthodes d'étude des propriétés nutritionnelles des micro-organismes.....	41
4-2- Métabolisme des glucides .....	42
4-3- Dégradation des tanins.....	43
4-4- Synthèse de caroténoïdes .....	44
4-5- Synthèse de riboflavine et de folates .....	45
5- Les folates .....	46
5-1- Structure moléculaire des folates .....	46
5-2- Métabolisme des folates .....	48
6- Les carences en folates .....	49
6-1- Effets sur l'organisme .....	49
6-2- Recommandations .....	50



6-3- Prévalence des carences.....	51
6-4- Stratégies de lutte contre les carences en folates .....	52
7- Les folates dans l'alimentation.....	53
7-1- Les sources alimentaires de folates .....	53
7-2- Stabilité des folates et influence des procédés .....	57
7-3- Absorption et biodisponibilité des folates .....	63
7-4- Méthodes de dosage des folates .....	65
8- Production de folates par les micro-organismes .....	67
8-1- Voie de biosynthèse des folates .....	67
8-2- Synthèse de folates par les micro-organismes en milieu de culture.....	70
8-3- La biofortification des aliments à l'aide des micro-organismes .....	73
9- Pistes de recherche pour augmenter les teneurs en folates dans les aliments fermentés..	76
9-1- Sélectionner des souches productrices de folates et utiliser des co-cultures .....	76
9-2- Optimiser la durée de l'étape de fermentation .....	79
9-3- Ajouter des précurseurs de la synthèse de folates .....	79
9-4- Optimiser la composition du milieu .....	81
9-5- Limiter les pertes lors des procédés .....	81
Chapitre 3 : Matériel et méthodes .....	83
1- Méthodes microbiologiques.....	85
1-1- Milieux de culture et d'incubation .....	85
1-2- Micro-organismes utilisés.....	88
2- Echantillonnage et préparation de bouillies à base de mil.....	89
3- Techniques moléculaires.....	92
3-1- Extraction d'ADN .....	92
3-2- Recherche de gènes impliqués dans des fonctions d'intérêt nutritionnel.....	93
3-3- Quantification de bactéries lactiques par PCR en temps réel .....	94
4- Dosages des folates.....	95

5- Dosages d'éthanol, acide lactique et acétate.....	96
6- Analyses statistiques.....	97
Chapitre 4 : Résultats.....	99
1- Le potentiel nutritionnel d'une bouillie fermentée traditionnelle à base de mil : le cas particulier des folates.....	101
1-1- Introduction.....	101
1-2- Publication : PCR screening of an African fermented pearl-millet porridge metagenome to investigate the nutritional potential of its microbiota .....	105
2- Influence de la fermentation et des autres procédés sur la teneur en folate d'un aliment céréalier fermenté africain traditionnel.....	126
2-1- Introduction.....	126
2-2- Publication : Influence of fermentation and other process steps on the folate content of a traditional African cereal- based fermented food .....	129
3- Potentiel de synthèse de folates par des souches de BL et de levures dans un aliment céréalier fermenté traditionnel .....	153
3-1- Introduction.....	153
3-3- Publication: Potential probiotic <i>Pichia kudriavzevii</i> strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. ....	157
Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives .....	181
Chapitre 6 : Références bibliographiques.....	190
Annexe 1 : Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods .....	227
Annexe 2 : Influence of spontaneous fermentations on the folate content of a pearl-millet based gruel .....	267
Annexe 3 : Influence of fermentation and other process steps on the folate content of a traditional African pearl-millet based fermented food .....	271



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments dans les graines de céréales les plus produites au niveau mondial selon la FAOSTAT (2015). Les données viennent de différentes tables de composition des aliments (Souci et al., 2000; Stadlmayr et al., 2012). Les valeurs sont exprimées pour 100 g de base humide.....	33
Tableau 2 : Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments dans deux aliments céréaliers fermentés : le pain de Seigle et le <i>ben-saalga</i> (Mouquet-Rivier et al., 2008; Souci et al., 2000). Les valeurs sont exprimées pour 100 g de base humide. ND : non déterminé .....	34
Tableau 3 : Besoins moyens estimés (EAR) et ingérés en nutriments recommandés (RNI), pour l'acide folique exprimé comme équivalent en folates alimentaire, pour différent groupes d'âge, FAO/WHO (2005).....	51
Tableau 4 : Contribution théorique de différents produits alimentaires à la consommation de folates au niveau mondial .....	55
Tableau 5 : Distribution des vitamères de folates dans différentes catégories d'aliments .....	60
Tableau 6 : Influence des procédés de fabrication des aliments sur la teneur en folates : exemples d'étapes courantes de procédés.....	62
Tableau 7: Espèces de bactéries lactiques capables de produire des folates en milieu de culture .....	71
Tableau 8 : Production de folates par les BL dans des aliments fermentés, en l'absence d'autres micro-organismes. ND : non déterminé. * Les valeurs de teneurs en folates sont exprimées dans la base humide .....	75
Tableau 9 : Composition du milieu MRS .....	85
Tableau 10 : Composition du milieu YGC .....	86
Tableau 11 : Composition du milieu PCA.....	86
Tableau 12 : Composition du « folic acid casei medium ».....	87
Tableau 13 : List of primers used to screen the food metagenomes .....	112
Tableau 14 : Primers used to quantify the genus or species of bacteria from pearl-millet porridge samples thanks to real time PCR. The primers were designed to match the gene coding for 16S rRNA.....	113
Tableau 15 : Distribution of genes involved in carotenoid, folate and riboflavin synthesis, starch metabolism and tannase synthesis in metagenomes extracted from pearl-millet porridges. Red boxes: the gene was not detected; Green boxes: the gene was detected; Grey	

boxes: the gene was detected, but more than one band was observed on the electrophoresis gel (non specific detection).....	116
Tableau 16 : Evolution of the folate content ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW) during the preparation of pearl-millet based porridges.....	141
Tableau 17 : pH and microbial counting in $\log_{10}$ (CFU/ml) at different steps of the preparation of <i>ben-saalga</i> .....	145
Tableau 18 : Genes of <i>P. kudriavzevii</i> involved in folate biosynthesis identified in a draft genome (GeneBank #ALNQ00000000.1), sequences of primers used to detect them and results of PCR assays.....	166
Tableau 19 : Probiotic properties of 8 selected <i>P. kudriavzevii</i> strains, as tested <i>in vitro</i> : <i>i</i> ) Survival rate of the strains after passage in synthetic gastric and pancreatic juices, measured by plate counting (CFU $\text{mL}^{-1}$ ). Survival rate was calculated by comparison to the initial yeast counts with those after gastric and pancreatic digestion; <i>ii</i> ) Adhesion rate of the strains to Caco-2 cell lines. All the results are expressed as mean percentage $\pm$ standard error of three independent experiments. ....	172

## Liste des figures

Figure 1 : Disponibilité alimentaire (en g/personne/jour) de différentes catégories d'aliments en A) Europe et B) Afrique, en 2011 (FAOSTAT, 2015) .....	31
Figure 2 : Structure de a) l'acide folique et b) des autres vitamines de folates .....	47
Figure 3 : Métabolisme des folates, d'après Forges et al. (2008) .....	49
Figure 4 : Dégradation et interconversion des vitamines de folates sous différentes conditions. Cette figure a été adaptée à partir de celle d'Edelmann (2014) et est basée sur les données de différentes publications (Akhtar et al., 1999, 2003; Blair and Pearson, 1974; De Brouwer et al., 2007; Jägerstad and Jastrebova, 2013; Lucock et al., 1994; Mkeni and Beveridge, 1982; Paine-Wilson and Chen, 1979; Quinlivan et al., 2006; Strandler et al., 2015; Tyagi et al., 2009; Wilson and Horne, 1983). .....	59
Figure 5 : Voie de biosynthèse générale des folates avec les enzymes présentes chez <i>L. plantarum</i> WCFS1, d'après la base de données KEGG (Kanehisa et al., 2014). NI : non identifié (pas d'information disponible sur le gène codant l'enzyme impliquée dans la réaction indiquée, chez <i>L. plantarum</i> WCFS1) .....	69
Figure 6 : Transformation du mil en <i>ben-saalga</i> selon un procédé adapté du procédé traditionnel (AP) et un procédé par inoculation par pied de cuve (PC) .....	91
Figure 7 : Centrifugations différentielles d'échantillons complexes pour éliminer la matrice alimentaire et obtenir un culot bactérien .....	93
Figure 8 : Real-time PCR quantification of <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuconostoc</i> and <i>Weissella</i> in fermented pearl-millet based porridges, sampled after the fermentation and the heating steps. Concentrations of microorganisms below the detection limit are not shown in the figure. ....	119
Figure 9 : Folate content of the pearl-millet based porridge samples (FW: fresh weight basis) .....	121
Figure 10 : Processing of pearl-millet into <i>ben-saalga</i> according to a process adapted from the traditional process (AP) and a process with a backslopping step (BP). The steps that were carried out only during the experiment I are given in green, and those carried out only during the experiment II are given in blue. ....	136
Figure 11 : Evolution of the folate content during the different steps of the preparation of a pearl-millet based porridge (experiment I), compared to the initial folate content of the raw pearl-millet (in %). Different letters indicate significant differences for each series: Adapted process (small letters), Backslopping process (capital letters). ....	140

Figure 12 : Evolution of the dry matter content during the different steps of the pearl-millet processing into *ben-saalga*. A) Adapted process (Experiment I), B) Backslopping process (Experiment I), C) Adapted process (Experiment II), and D) Backslopping process (Experiment II). Percentages indicated above the blue boxes correspond to the dry matter content of the samples (g DM/100g sample). ..... 142

Figure 13 : Ethanol, acetic and lactic acid concentrations in water at the end of the soaking step, and in the fermented batter after 8h and 16h of fermentation, during the experiment II, for A) the process adapted from the traditional process and B) the modified process with a backslopping step. .... 146

Figure 14 : Tolerance rate of 93 yeast strains after 24 hours of incubation at 37 °C in YNB without aminoacids at different conditions (YNBx): i) pH 2 (black series), ii) 0.3 % (w/v) bile salts (grey series). The tolerance rate was calculated relative to their growth in YNB, which was used as a positive control for growth:  $A600\ YNBx / A600\ YNB \times 100$ . Results are expressed as mean + standard error of three independent experiments. .... 171

Figure 15 : Principal component analysis (PCA) of the data on the probiotic properties of eight selected *P. kudriavzevii* yeast strains. Projection of the variables (a.) and cases/isolates (b.) onto the plane formed by the first two factors deduced by PCA. .... 172

Figure 16 : Total folate production (ng mL<sup>-1</sup>) of eight *P. kudriavzevii* strains (M26, M28, M29, O9, G6, G5, M31, M30) after 8, 16 and 24 hours of growth in YNB without aminoacids. Initial folate content of the culture medium was subtracted. Extracellular folate (strike series) and intracellular folate (grey series) are expressed as mean and standard deviations of three independent experiments. For each series, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ): 8 hours (small letters), 16 hours (capital letters), 24 hours (x and y). .... 173

Figure 17 : Changes in viable counts and pH during the fermentation of pearl-millet fermented gruels after inoculation of cultures of selected yeasts and bacteria for 24 h, 30 °C. Four different gruels were inoculated with: A) *P. kudriavzevii* M28 + *Lb. fermentum* 8.2; B) *P. kudriavzevii* M28+ *Lb. fermentum* 6.9; C) *Lb. fermentum* 8.2; D) *Lb. fermentum* 6.9. a) pH measurements; b) Yeast counts; c) LAB counts are shown for each gruel during fermentation. Mean and standard deviation of three independent experiments are shown. .... 174

Figure 18 : Folate content (µg/100 g fresh weight basis) of pearl-millet gruel inoculated with folate producing LAB and yeasts during fermentation (24 h, 30 °C). Four different gruels: A) *P. kudriavzevii* M28+ *Lb. fermentum* 8.2 (black series); B) *P. kudriavzevii* M28+ *Lb.*

*fermentum* 6.9 (grey series); C) *Lb. fermentum* 8.2 (black squares series); D) *Lb. fermentum* 6.9 (grey dashed series). Results are the means and standard deviations of 3 independent experiments (n=3). Different letters show significant differences among the four gruels within the same time point (a, b, c); whilst K, V, W, X, Y, Z highlighted significant differences among the time points for each gruel (ANOVA and Duncan's post-hoc test:  $p < 0.05$ ). .....175





## **Chapitre 1 : Introduction générale**



En 1931, le Dr. Lucy Wills a recensé le traitement de sept cas d'anémies macrocytaires chez des femmes enceintes en Inde. Ces anémies sont caractérisées par une teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine élevée et des globules rouges anormalement grands (volume supérieure à 100 femtolitres). Quatre de ces cas ont été traités à l'aide de foie et les trois autres à l'aide de Marmite (un aliment aux extraits de levure). Toutefois, le facteur à l'origine du rétablissement des patientes n'a pas été identifié dans cette étude (Wills, 1931). Dix ans plus tard, Mitchell et al. (1941) ont extrait et purifié, à partir d'épinards, un composé qui est également présent dans le foie et des extraits de levure. Ils ont nommé ce composé « acide folique » en référence au terme latin *folium* signifiant feuille. Il a ensuite été démontré que la consommation d'acide folique permet une réponse hématopoïétique rapide, c'est-à-dire un renouvellement des cellules sanguines, associé à une augmentation de l'appétit, de la force et de la vigueur chez des patients atteints d'anémies macrocytaires (Spies, 1946).

Suite à ces premières découvertes, de nombreuses études se sont intéressées à l'acide folique, et différentes molécules présentant une structure et une activité vitaminique similaire à l'acide folique ont été décrites et regroupées dans le « groupe de l'acide folique » (Fraenkel et al., 1948; Hakala and Welch, 1957; Hall, 1947; Nathan and Cowperthwaite, 1955; Woods, 1953). Pour éviter les confusions entre acide folique et le groupe de l'acide folique, le terme « folates » a été proposé pour remplacer le terme « groupe de l'acide folique » (Metz, 1963). Le terme « acide folique » a été conservé pour désigner la molécule d'acide ptéroylmonoglutamique, même si certains auteurs continuent de parler d'acide folique pour désigner les différentes formes de folates. Il est également possible de parler de vitamine B9 pour désigner l'ensemble des molécules de folates.

L'implication de ces molécules dans différentes fonctions vitales du métabolisme cellulaire, comme la multiplication cellulaire par exemple, a été mise en évidence par de nombreux auteurs (Ball, 2005). Comme les cellules humaines sont incapables de produire des folates, un apport exogène est nécessaire pour prévenir les carences en folates. En plus des anémies mégalo-blastiques (une sous-catégorie des anémies macrocytaires), les carences en folates peuvent induire différentes pathologies, comme des cancers colorectaux, des maladies cardiovasculaires et des malformations du tube neural (Bailey et al., 2015). Il n'existe pas de données mondiales sur la prévalence des carences à ce jour, mais des carences en folates ont été détectées sur tous les continents, aussi bien dans des pays développés que dans des pays à

faible et moyen revenus (Arsenault et al., 2014; Assantachai and Lekhakula, 2007; Brunst et al., 2014; Harrington et al., 2008; Rosenthal et al., 2015; Sedehi, 2013).

La consommation d'aliments riches en folates est la principale source naturelle de folates. Les aliments les plus riches en folates sont, par ordre décroissant de concentration dans la base humide : le foie, les légumes à feuilles vertes, d'autres légumes verts tels que les asperges, les choux de Bruxelles et le brocoli, les légumineuses, les noix, les aliments à base de céréales, et quelques fruits tels que les oranges, les fraises et les cerises (FAO/WHO, 2005; Souci et al., 2000; USDA, 2015). Les graines de céréales ont des teneurs en folates en moyenne plus faibles que le foie ou les légumes à feuilles vertes, mais les céréales sont nettement plus fréquemment consommées que les autres catégories d'aliments et les aliments à base de céréales sont la principale source de calories dans de nombreux pays (FAO, 1995; FAOSTAT, 2015). Les aliments à base de céréales pourraient donc être une meilleure source de folates. Par exemple, les produits céréaliers, et en particulier le pain de seigle, contribuent à plus du tiers des ingérés en folates en Finlande (Kariluoto, 2008).

Pour prévenir les carences en folates, de l'acide folique est ajoutée au niveau industriel dans des farines de blé ou de maïs dans plus de 60 pays (Food Fortification Initiative, 2015). Ces programmes de fortification sont généralement efficaces. En effet, il a été estimé que la consommation d'acide folique en quantité suffisante dans les aliments fortifiés permettrait de prévenir jusqu'à 75% des malformations du tube neural les plus communes : la spina bifida et l'anencéphalie (Bell and Oakley, 2006, 2009). Toutefois, la consommation importante d'acide folique dans le cadre des programmes de fortification pourrait induire des effets négatifs dans certaines sous-populations. Par exemple, il a été démontré que la consommation de grande quantité d'acide folique peut masquer les symptômes de la carence en vitamine B12, ce qui peut entraîner la progression de la neuropathie jusqu'à un stade irréversible (FAO/WHO, 2005).

Une alternative à la fortification pourrait être l'enrichissement en folates des aliments céréaliers *in situ* grâce à la fermentation. La fermentation est un procédé ancestral, qui permet de conserver les aliments pendant de longues périodes à moindre coût (Campbell-Platt, 1994). La production de folates par des cultures starters de bactéries lactiques (BL) lors de la fermentation de produits laitiers a été démontrée (LeBlanc et al., 2008, 2011a). En revanche,

peu d'études se sont intéressées à la production de folates lors de la fermentation d'aliments céréaliers. La plupart d'entre elles se sont intéressées à l'impact des levures, qui sont connues pour produire de grandes quantités de folates, sur la teneur en vitamines B9 des aliments céréaliers fermentés (Hjortmo et al., 2008a, 2008b; Kariluoto et al., 2006a; Korhola et al., 2014). Toutefois, de nombreux aliments céréaliers fermentés traditionnels sont fermentés majoritairement par les BL, et dans une moindre mesure par les levures (Blandino et al., 2003; Franz et al., 2014; Oyewole, 1997).

Il serait donc intéressant d'étudier la contribution des aliments céréaliers fermentés aux ingérés en folates. Un projet européen, mené par l'UMR Nutrition et Alimentation des Populations Aux Suds (Nutripass) a été monté dans cette optique, et nommé « contribution des aliments fermentés à base de céréales aux ingérés en folates dans les pays européens et africains » (FoIEA ; [www.folea.eu](http://www.folea.eu)). Ce projet fait partie du réseau ERA-Net ERAfrica (« Développement de la collaboration conjointe Afrique-Europe pour la science et la technologie »), et est soutenu financièrement par la Commission européenne dans le cadre du septième programme cadre (ERAFRICA\_IC-027, FP-226154). Le projet FoIEA est réalisé en partenariat entre des laboratoires de cinq pays : l'Afrique du Sud, le Burkina Faso, l'Ethiopie, la Finlande et la France. L'objectif de ce projet est d'évaluer la possibilité d'augmenter les ingérés en folates de populations cibles en augmentant les teneurs en folates d'aliments céréaliers traditionnels grâce à la fermentation.

Ma thèse s'inscrit dans ce projet et a pour objectif de répondre à la question suivante : le microbiote d'un aliment céréalier fermenté d'Afrique de l'Ouest peut-il augmenter significativement la teneur en folates de l'aliment ? Comme il est impossible d'étudier les microbiotes de tous les aliments céréaliers fermentés d'Afrique de l'Ouest dans le cadre d'une seule thèse, une bouillie à base de mil (*Pennisetum glaucum*) nommée *ben-saalga*, a été sélectionnée comme modèle d'étude. Cet aliment est consommé par plus de la moitié de la population de Ouagadougou (Burkina Faso), et en particulier par les jeunes enfants (Mouquet-Rivier et al., 2008). Le procédé de préparation de cet aliment, la composition de son microbiote, ainsi que certaines de ses caractéristiques nutritionnelles ont déjà été décrits, ce qui en fait un bon modèle d'étude (Humblot and Guyot, 2009; Mouquet-Rivier et al., 2008; Tou et al., 2006).

Le manuscrit de thèse est divisé en cinq chapitres, dont le premier présente l'introduction générale.

Le chapitre 2 résume les connaissances dans la littérature sur les aliments céréaliers fermentés et particulièrement ceux consommés en Afrique d'une part et sur l'impact du microbiote sur la qualité nutritionnelle de ces aliments d'autre part. L'aliment modèle choisi pour cette étude est une bouillie à base de mil consommée régulièrement au Burkina Faso, appelée *ben-saalga*. Comme la fermentation de cet aliment est principalement due aux bactéries lactiques, la recherche bibliographique a été centrée sur ces micro-organismes. Les connaissances sur le lien entre les bactéries lactiques et la teneur en vitamine B9 des aliments fermentés ont fait l'objet d'une recherche approfondie, valorisée par une revue publiée, présentée en annexe 1.

Le chapitre 3 résume l'ensemble du matériel et des méthodes d'analyses utilisés au cours de cette thèse.

Le chapitre 4 présente les résultats obtenus dans le cadre de cette étude :

- Dans une première partie nous présentons les résultats obtenus sur le potentiel nutritionnel du microbiote d'une bouillie fermentée traditionnelle à base de mil, avec un focus particulier sur la synthèse de folates.

- Dans une deuxième partie nous présentons les résultats obtenus lors de l'étude de l'influence du procédé de fabrication (fermentation et autres étapes unitaires) sur la teneur en folate d'un aliment céréalier fermenté traditionnel à base de mil.

- Enfin, dans une troisième partie, nous présentons les résultats concernant le potentiel de synthèse de folates par des souches de BL et de levures dans un aliment céréalier fermenté traditionnel.

Le chapitre 5 présente une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse. En particulier, les limites de l'étude et les perspectives pour les futures recherches y sont exposées.

La recherche bibliographique menée sur la synthèse de vitamine B9 par les bactéries lactiques a fait l'objet d'une revue publiée dans *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont fait l'objet d'un article en cours de rédaction, et de deux articles acceptés pour publication dans *International Journal of Food Microbiology* et dans *Food Microbiology*.





## **Chapitre 2 : revue bibliographique**



# 1- La fermentation, un procédé ancestral

## 1-1- Les avantages de la fermentation

La fermentation est un procédé utilisé depuis au moins 6000 ans avant Jésus-Christ, qui permet de conserver les aliments pendant de longues périodes à moindre coût (Blandino et al., 2003; Campbell-Platt, 1994). En effet, s'ils sont présents dans l'aliment en quantité suffisante, les micro-organismes responsables de la fermentation sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes d'altération et des micro-organismes pathogènes (Dallas et al., 1991). Par exemple, de nombreuses bactéries lactiques (BL) sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes grâce entre autre à l'acidification du milieu (production d'acide lactique) et à la production de peroxyde d'hydrogène, de composés antifongiques et de bactériocines (Reis et al., 2012).

La fermentation impacte également la qualité nutritionnelle des aliments, selon les activités métaboliques des micro-organismes impliqués. Parmi les effets nutritionnels bénéfiques, nous pouvons noter l'amélioration de la digestibilité de l'amidon, des protéines, et l'augmentation de la teneur en caroténoïdes et en vitamines du groupe B (Aguilar-Zarate et al., 2014; LeBlanc et al., 2011a; Moslehi-Jenabian et al., 2010; Phadwal, 2005; Songré-Ouattara et al., 2008, 2009). L'impact du microbiote du *ben-saalga*, un aliment fermenté à base de mil consommé au Burkina Faso (Mouquet-Rivier et al., 2008), sur ces différentes caractéristiques nutritionnelles a été étudié au cours de cette thèse.

La fermentation joue également un rôle important dans le développement des caractéristiques organoleptiques (flaveur, saveur, texture...) des aliments (Nout, 2009; Oyewole, 1997). Dans le fromage par exemple, les BL peuvent produire des composés influant sur la saveur en dégradant les caséines du lait (Smit et al., 2005). Dans le *soumbala*, un condiment à base de graines de néré fermentées, consommé au Burkina Faso, 116 composés aromatiques ont été identifiés. Un lien entre les isolats de *Bacillus* responsables de la fermentation et les profils aromatiques de différents échantillons de *soumbala* a été mis en évidence (Ouoba et al., 2005).

Les aliments fermentés peuvent également apporter des probiotiques, c'est-à-dire « des micro-organismes vivants qui, ingérés en quantité suffisante, procurent un bénéfice sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2001a). Pour que les micro-organismes soient en quantité suffisante dans l'aliment, il faut que celui-ci ne soit pas cuit après fermentation. Les probiotiques ingérés peuvent protéger l'hôte contre des micro-organismes pathogènes, avoir des effets immunomodulateurs ou augmenter la biodisponibilité de certains micronutriments comme le fer et le zinc (Moslehi-Jenabian et al., 2010; Savino et al., 2015; Turpin et al., 2010).

### **1-2- Les inconvénients de la fermentation**

Lorsqu'elle est contrôlée, à l'aide de cultures starter et dans des environnements de fabrication propres par exemple, la fermentation permet la production d'aliments de qualité sanitaire, nutritionnelle et organoleptique régulière. Toutefois, de nombreux aliments sont encore fermentés de manière naturelle (ou spontanée) et peuvent être produits dans de mauvaises conditions hygiéniques, c'est notamment le cas des bouillies traditionnelles fermentées en Afrique (Holzapfel, 2002). Dans ce cas, une contamination par des micro-organismes d'altération ou des micro-organismes pathogènes est possible. Ces contaminations sont difficiles à prévoir, car elles peuvent provenir de la matière première, du matériel, de l'environnement, du manipulateur ou d'une mauvaise maîtrise du procédé (Motarjemi, 2002). Par exemple, certaines souches d'*Escherichia coli* entéropathogènes sont capables de résister aux pH acides (Lu et al., 2013). Ainsi, la qualité sanitaire des produits fermentés naturellement est difficile à prévoir et certains micro-organismes pathogènes peuvent être retrouvés dans l'aliment en fin de fermentation (Abriouel et al., 2008, 2011; Jeyaram et al., 2010; Parkouda et al., 2010). Dans le cas des aliments fermentés utilisés comme compléments à l'allaitement maternel, une cuisson est généralement réalisée, ce qui permet entre autre de diminuer la charge microbienne et donc de limiter le risque de contamination alimentaire. Toutefois, certains pathogènes comme *Bacillus cereus*, un contaminant fréquent des aliments fermentés traditionnels africains, est capable de survivre aux traitements thermiques sous la forme de spores (Humblot et al., 2012; Setlow, 2006).

Un autre désavantage de la fermentation naturelle peut être l'altération de la qualité organoleptique du produit. Par exemple, les arômes produits par les micro-organismes diffèrent selon les espèces, voire les souches présentes dans l'aliment. Par exemple, Yee et al.

(2014) ont démontré que des souches de différentes espèces de *Propionibacterium* isolées de fromage ont des productions de composés aromatiques significativement différentes. Cette variabilité peut être désirée dans certains cas, pour ne jamais obtenir exactement le même produit. Toutefois, cette variabilité induit le risque d'obtenir des produits avec des caractéristiques organoleptiques non satisfaisantes.

### 1-3- Les aliments fermentés

En considérant uniquement les fermentations dues aux développements de micro-organismes, les aliments peuvent être fermentés par des cultures starters, des pieds de cuves, ou de manière spontanée. De nombreux aliments fermentés en Afrique par exemple résultent d'une fermentation naturelle (ou spontanée), comme en témoignent les nombreuses revues sur le sujet (Blandino et al., 2003; Franz et al., 2014; Galati et al., 2014; Guyot, 2012; Nout, 2009). Il existe une grande variété d'aliments fermentés naturellement au niveau mondial qui diffèrent par les matières premières utilisées (lait, céréale, viande...), le lieu de production, le procédé, la nature du produit fini (solide, liquide, semi-liquide...) et le type d'utilisation (plat de base, boisson, aliment de complément à l'allaitement...). En plus de cette diversité, la dénomination des aliments fermentés en Afrique rend leur étude difficile. En effet, des produits portant des noms différents, comme le *ben-saalga*, le *ben-kida* et le *koko*, peuvent être produits à partir de la même matière première en utilisant des procédés légèrement différents (Lei and Jakobsen, 2004; Tou et al., 2006). De plus, un même aliment peut être produit à partir de différentes matières premières. Par exemple, une bouillie produite dans différents pays d'Afrique (Bénin, Nigéria, Togo et Ghana) appelée Ogi, peut être produite à partir de maïs, de sorgho ou de mil (Cocolin and Ercolini, 2008).

Certaines de ces différences, comme le type de matière première utilisée par exemple, affectent la composition en micro-organismes des microbiotes des aliments fermentés (Minervini et al., 2014). Selon les micro-organismes prédominant dans l'aliment, différents types de fermentations peuvent être observés. Par exemple, la fermentation lactique se produit lorsque les BL sont les micro-organismes prédominants. Lorsque le microbiote est principalement constitué de levures, comme dans la bière ou le vin par exemple il y a une production importante d'éthanol et on parle de fermentation alcoolique. Certains condiments, comme le *soumbala*, sont principalement fermentés par des bactéries du genre *Bacillus*, et on

parle alors de fermentation alcaline. Enfin, on parle de fermentation acétique dans les aliments principalement fermentés par des bactéries acétiques, comme le vinaigre par exemple. Les fermentations lactiques et alcooliques sont les plus couramment rencontrées dans les aliments fermentés traditionnels d’Afrique (Cocolin and Ercolini, 2008).

En plus de l’amélioration de la qualité sanitaire et de l’augmentation de la durée de conservation de l’aliment par la fermentation, les aliments fermentés présentent d’autres intérêts qui peuvent expliquer leur forte consommation dans certains pays. Par exemple, une étude a permis de déterminer les raisons pour lesquelles le *ben-saalga* et le *ben-kida*, deux bouillies à base de mil produites au Burkina Faso, sont consommées dans les ménages consommateurs identifiés (Mouquet-Rivier et al., 2008). Ces ménages ont donné pour raisons principales le goût (entre 30 et 35 %), la possibilité de consommer l’aliment directement après l’achat (entre 30 et 35 %), le côté traditionnel (entre 20 et 25 %) et le faible coût (entre 5 et 10 %). De plus, les aliments fermentés traditionnels africains, comme certaines bouillies fermentées à base de céréales par exemple, peuvent être utilisés comme aliments de complément à l’allaitement maternel pour les jeunes enfants (Blandino et al., 2003; Mouquet-Rivier et al., 2008).

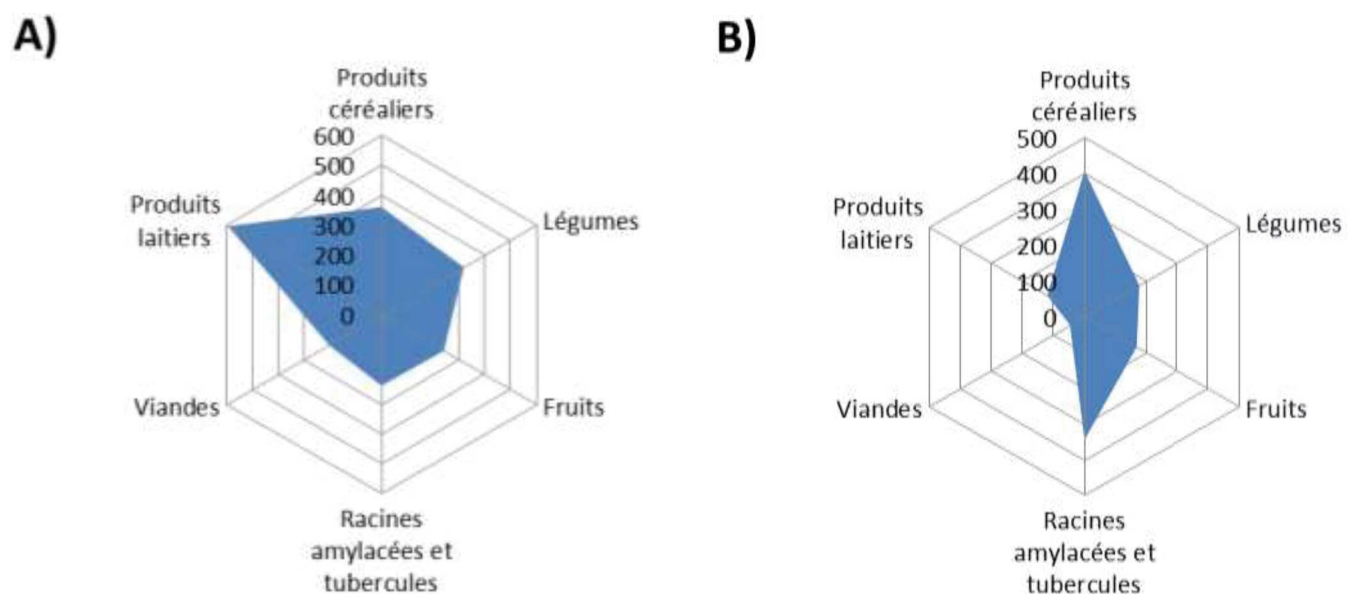
## **2- Les aliments céréaliers fermentés, des aliments de base**

### **2-1- Consommation des aliments céréaliers fermentés dans le monde**

Il n’existe pas de données mondiales sur la consommation d’aliments céréaliers fermentés, probablement en raison de la difficulté de récolter de telles données dans certains pays. Toutefois, vu la quantité de céréales produites et consommées au niveau mondial et la variété d’aliments céréaliers fermentés dans le monde, la consommation d’aliments céréaliers fermentés au niveau mondial pourrait être importante.

En effet, les céréales sont considérées par certains auteurs comme la principale source alimentaire mondiale, car elles contribuent à 50 % de l’apport en calories (Kearney, 2010). De plus, les céréales représentent la principale source de calories dans de nombreux pays sur tous les continents (FAO, 1995). En termes de quantité, la disponibilité moyenne entre 2001 et 2011 de différentes catégories d’aliments a été récupéré dans la base de données FAOSTAT

(2015). Les céréales sont la matière première agricole la plus disponible (950 tonnes/an), suivie par les légumes (812 tonnes/an), les produits laitiers (548 tonnes/an sans compter le beurre), les fruits (442 tonnes/an sans compter le vin), les racines et féculents (398 tonnes/an) et la viande (259 tonnes/an). Toutefois, la consommation de produits à base de céréales diffère selon le contexte géographique, agro-écologique et socio-économique. Par exemple, la Figure 1 présente la disponibilité alimentaire des catégories d'aliments les plus consommés en Europe et en Afrique entre 2001 et 2011 (FAOSTAT, 2015). En Afrique, les aliments à base de céréales (409g/personnes/jour) sont entre 1 et 9 fois plus disponibles que les autres catégories d'aliments. Ces données mettent en évidence l'importance des produits à base de céréales en Afrique, qui peuvent contribuer jusqu'à 70 % des ingérés énergétiques sur ce continent (Galati et al., 2014; Kearney, 2010). En revanche, en Europe, la disponibilité alimentaire des produits laitiers (593 g/personne/jour) est significativement plus élevée que celles des céréales (361 g/personne/jour).



**Figure 1 : Disponibilité alimentaire (en g/personne/jour) de différentes catégories d'aliments en A) Europe et B) Afrique, en 2011 (FAOSTAT, 2015)**

Différents livres et revues donnent une idée du grand nombre d'aliments céréaliers fermentés dans le monde (Beuchat, 1997; Blandino et al., 2003; Campbell-Platt, 1994; Franz et al., 2014; Guyot, 2012; Nout, 2009; Oyewole, 1997). Bien que n'existant pas au niveau mondial, des données de consommation sont disponibles pour certains aliments céréaliers fermentés dans certains pays. Par exemple, la consommation de *ben-saalga* et de *ben-kida* au Burkina Faso a fait l'objet de plusieurs études (Mouquet-Rivier et al., 2008, 2016). D'après Mouquet-



Rivier et al. (2008), 66 % des ménages à Ougadougou consomment cet aliment au moins une fois par mois et peuvent être considérés comme des ménages consommateurs. De plus, 92 % des ménages consommateurs consomment cet aliment au moins une fois par semaine. Ces bouillies sont en particulier utilisées comme aliments de complément pour les jeunes enfants. En effet, 80 % des enfants de moins de deux ans consomment ces bouillies au moins une fois par mois. En terme de quantité, il a été estimé que les enfants de moins de deux ans mangent entre 60 et 130 g de bouillie à base de mil par repas à Ouagadougou (Mouquet-Rivier et al., 2016). Il serait intéressant de réaliser des enquêtes plus précises sur la consommation d'aliments à base de céréales dans d'autres pays d'Afrique.

## **2-2- Caractéristiques nutritionnelles des aliments céréaliers fermentés**

Le nombre important d'aliments céréaliers fermentés existant de par le monde rend difficile la réalisation d'une synthèse de leurs caractéristiques nutritionnelles. De plus, si les caractéristiques nutritionnelles des aliments céréaliers fermentés consommés dans les pays développés, comme le pain de seigle par exemple, sont connues (Souci et al., 2000), celles de nombreux aliments céréaliers fermentés consommés dans les pays à faible et moyens revenus, et en particulier en Afrique restent à déterminer. En revanche, les caractéristiques nutritionnelles des principales céréales sont connues et le Tableau 1 en présente quelques exemples.

Les matières premières présentées dans le Tableau 1 ont des densités énergétiques et des teneurs en protéines relativement similaires. En revanche, les teneurs en lipides et en micronutriments sont nettement plus variables d'une céréale à l'autre. Par exemple, la teneur en fer du mil peut être significativement plus élevée que celle des autres céréales. La forte teneur en fer dans le mil et la forte variabilité observée pourraient être due à un apport exogène de fer par les poussières ou le sol ferreux (Abebe et al., 2007; Mouquet-Rivier et al., 2008). La teneur en folates varie également d'une céréale à l'autre et le seigle a une teneur en folates nettement plus élevée que les autres céréales.

Les aliments céréaliers fermentés peuvent avoir des caractéristiques nutritionnelles très différentes des graines à partir desquels ils sont produits. Ces différences peuvent être dues à la transformation subie par les céréales, ainsi qu'au mode de consommation (boisson, bouillie,

pain...). Par exemple, le degré de fractionnement des graines a un impact sur les teneurs en nutriments des farines obtenues (Slavin et al., 2001). Les boissons ou les bouillies ont une teneur en matière sèche nettement plus faible que le pain par exemple, ce qui peut induire des teneurs en macro- et micro-nutriments, ainsi que des densités énergétiques plus faibles dans les boissons et bouillies par effet de dilution.

**Tableau 1 : Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments dans les graines de céréales les plus produites au niveau mondial selon la FAOSTAT (2015). Les données viennent de différentes tables de composition des aliments (Souci et al., 2000; Stadlmayr et al., 2012). Les valeurs sont exprimées pour 100 g de base humide.**

	Avoine	Blé	Maïs	Mil	Orge	Riz	Seigle	Sorgho
<b>Energie et macronutriments</b>								
Energie (kcal/)	333	298	325	348-389	311	345	294	349
Protéines (g) (N x 6.25)	13	12	9	8-16	11	8	10	11
Lipides (g)	7-8	1-2	3-4	4-8	1-2	2-3	2-3	0-6
<b>Micronutriment</b>								
Fer (mg)	5-7	2-5	1,5	8-74	2-4	2-4	3-10	2-35
Zinc (mg)	3-5	2-10	1-3	2-4	2-4	1-2	1-5	1-6
Calcium (mg)	25-107	25-48	4-19	14-54	33-42	11-39	37-115	7-61
Folates (µg)	33	87	20-40	29-31	65	16	143	29

A titre d'exemple, le Tableau 2 présente les caractéristiques nutritionnelles du *ben-saalga* et du pain de seigle. Le pain de Seigle est consommé dans de nombreux pays développés, et notamment en Finlande où il représente la principale source en vitamine B9 (Kariluoto, 2008; Kariluoto et al., 2004). Le *ben-saalga* est l'un des aliments céréaliers fermentés traditionnels africains les plus étudiés. En effet, le procédé de fabrication de cet aliment, sa consommation au Burkina Faso et certaines de ses caractéristiques nutritionnelles ont été décrites lors d'études précédentes (Hama et al., 2011; Mouquet-Rivier et al., 2008, 2016; Tou et al., 2006). Des études ont même été menées dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle de cet aliment (Lestienne et al., 2005; Songré-Ouattara et al., 2009, 2010, Tou et al., 2007a, 2007b). Malgré toutes ces études, certaines teneurs en micronutriments du *ben-saalga* restent à déterminer, comme la teneur en vitamine B9 par exemple. Sachant que ces aliments céréaliers fermentés

traditionnels africains sont souvent utilisés comme aliments de compléments aux jeunes enfants, il serait intéressant d'étudier plus en détail leur composition nutritionnelle.

**Tableau 2 : Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments dans deux aliments céréaliers fermentés : le pain de Seigle et le *ben-saalga* (Mouquet-Rivier et al., 2008; Souci et al., 2000). Les valeurs sont exprimées pour 100 g de base humide. ND : non déterminé**

	Pain de Seigle	<i>Ben-saalga</i>
<b>Energie et macronutriments</b>		
Energie (kcal)	217	32
Protéines (g) (N x 6.25)	6,7	0,3-0,8
Lipides (g)	0,8-1,1	0,1-0,5
<b>Micronutriment</b>		
Fer (mg)	1,5-3,7	0,2-1,2
Zinc (mg)	0,6-1,3	0.1-0.3
Calcium (mg)	25-36	ND
Folates (µg)	16	ND

D'après le Tableau 2, le *ben-saalga* a une densité énergétique très faible (32 kcal/100g) par rapport au pain de Seigle (217 kcal/100g). D'après les données de Mouquet-Rivier et al. (2016), le *ben-saalga* pourrait procurer  $62 \pm 34$  kcal/jour et  $124 \pm 58$  kcal/jour pour des enfants de six à neuf mois et de 15 à 20 mois, respectivement. D'après Dewey and Brown (2003), les aliments de compléments doivent apporter aux enfants de moins de deux ans une valeur énergétique au minimum supérieure à 202 kcal/jour. La faible densité énergétique des bouillies fermentées à base de mil est due à la faible teneur en matière sèche de l'aliment. En effet, pour que ces bouillies soient consommables par des enfants de moins de deux ans, il faut que leur consistance soit semi-liquide. Sachant que ces bouillies sont cuites avant consommation, les productrices locales ajoutent beaucoup d'eau pour limiter l'épaississement au cours de la cuisson, épaississement dû à la gélatinisation de l'amidon. Les bouillies obtenues ont donc des teneurs en matière sèche comprises entre 5 et 10 g/100g de bouillie (Mouquet-Rivier et al., 2008). Les teneurs en protéines et en lipides sont plus faibles dans le *ben-saalga* et le pain de seigle par rapport à leur matière première qui sont le mil et seigle, respectivement.

Les teneurs en fer et en zinc dans ces deux aliments fermentés sont inférieures à celles des graines de départ. Mouquet-Rivier et al. (2008) ont dosé le fer dans des échantillons de mil et de *ben-saalga*. Malgré une teneur en fer élevée dans les gaines de mil (21 mg/100g de base humide), la teneur en fer dans le *ben-saalga* est significativement plus faible (inférieure à 1,2 mg/100g de base humide). D'après ces auteurs, la perte importante de fer est principalement due à une diffusion du fer dans l'eau pendant le trempage. Contrairement au pain de seigle, les teneurs de certains micronutriments du *ben-saalga*, comme le calcium et les folates, ne sont pas connues. Il serait intéressant de doser ces deux micronutriments dans le *ben-saalga*.

### **3- Le microbiote des aliments céréaliers fermentés**

#### **3-1- Méthodes d'étude du microbiote des aliments fermentés**

Le microbiote des aliments fermentés peut être analysé à l'aide de méthodes dites « culture-dépendantes ». Ces méthodes sont utiles pour dénombrer différents types de microorganismes cultivables. Elles permettent également d'isoler des souches pures dans le but soit d'étudier leur comportement et leur physiologie, soit de sélectionner des souches présentant des caractéristiques intéressantes pour les utiliser comme cultures starters. Toutefois, les méthodes de cultures sont chronophages et nécessitent l'utilisation d'un grand nombre de boîtes de Petri et de différents milieux de culture. De ce fait, l'étude d'un grand nombre d'échantillons est difficile à réaliser, et par exemple l'évolution de microbiotes complexes au cours du temps et/ou en fonction de la zone géographique est difficile à évaluer. De plus, les bactéries cultivables isolées du microbiote d'un aliment fermenté, ou d'un autre environnement, ne représentent qu'une fraction de ce microbiote (Robert et al., 2009). Ainsi, la diversité microbienne et l'abondance relative des espèces a souvent été sous-estimée (Wintzingerode et al., 1997).

L'évolution des méthodes dites « cultures-indépendantes » a permis d'étudier la diversité microbienne de nombreux échantillons en un temps réduit. Parmi la diversité de méthodes « cultures-indépendantes », nous avons décidé d'utiliser la PCR en temps réel pour quantifier les principales bactéries lactiques impliquées dans la fermentation du *ben-saalga* (Humblot et al., 2014; Turpin et al., 2011). La PCR en temps réel est une technique de biologie moléculaire dérivée de la réaction de polymérase en chaîne (PCR ; *Polymerase Chain*

*Reaction*) imaginée par Saiki et al. (1985). Pour avoir une vision globale de la composition du microbiote du *ben-saalga*, nous avons décidé de quantifier les bactéries lactiques dans l'aliment tel que consommé. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, les PCR en temps réel ont été réalisées à partir de l'ADN (acide désoxyribonucléique) total extrait de *ben-saalga* tels que consommé.

La démarche utilisée au cours de cette thèse pour quantifier chaque genre ou espèce de bactérie lactique par PCR en temps réel est expliquée ici. Une paire d'amorces oligonucléotidiques, capables de s'hybrider à une région spécifique de l'ADN du genre ou de l'espèce de bactérie lactique recherchée, a été sélectionnée dans la littérature. La PCR en temps réel consiste en une succession de réactions qui se déroulent en trois étapes : i) l'ADN double brin extrait de l'aliment est dénaturé en ADN simple brin, ii) la paire d'amorces sélectionnée s'hybride sur l'ADN simple brin de part et d'autre de la région à amplifier, et iii) la région de l'ADN délimitée par la paire d'amorce est dupliquée à l'aide d'une enzyme nommée polymérase. L'amplification est exponentielle et à chaque cycle de PCR en temps réel, un signal fluorescent directement proportionnel à la quantité d'amplicons générés est émis. Le temps nécessaire pour observer une augmentation significative du signal fluorescent (Ct) est enregistré par l'instrument de mesure. Une gamme est réalisée à partir de l'ADN extrait d'une culture de concentration connue d'une souche de référence appartenant au genre ou à l'espèce recherchée. Cette gamme permet d'obtenir une relation linéaire entre la concentration en micro-organisme de départ et le Ct. Il est ainsi possible de déterminer la concentration du genre ou de l'espèce de bactérie lactique recherché dans l'aliment de départ.

### **3-2- Les principaux micro-organismes responsables de la fermentation des aliments céréaliers**

Les aliments céréaliers fermentés naturellement ont un microbiote complexe, c'est-à-dire composé de dizaines d'espèces différentes pour un même aliment, principalement constitué de bactéries lactiques (BL) et de levures (Blandino et al., 2003; Franz et al., 2014; Oyewole, 1997). Dans les aliments fermentés céréaliers qui ne sont pas des boissons alcoolisées, les BL sont les germes dominants du microbiote. Les BL sont des bactéries ubiquitaires à Gram positives, asporulées, aérotolérantes, catalases négatives, nitrate réductases négatives, et cytochromes oxydases négatives. De nombreuses BL ont le statut GRAS (*Generally*

*Recognised As Safe*/généralement reconnu comme sûr) selon la FDA, ou le statut QPS (*Qualified Presumption of Safety*/présomption d'innocuité reconnue) selon l'EFSA, c'est-à-dire que la consommation de ces micro-organismes n'engendre généralement pas de risque pour la santé (EFSA, 2016; FDA, 2016a). De plus, les BL ont toutes la capacité de produire de l'acide lactique à partir du glucose. Les espèces de bactéries appartenant au groupe des BL font partie des genres suivants : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles and Holzapfel, 1997). Le genre *Bifidobacterium* ne fait pas partie des BL au sens strict, mais les bactéries de ce genre continuent d'être considérées comme des BL dans de nombreuses études. Dans le cadre de cette étude, le genre *Bifidobacterium* sera considéré comme appartenant aux BL.

Dans de nombreux aliments céréaliers fermentés, tels que le pain de seigle, les fermentations sont orientées à l'aide de levain, c'est-à-dire un mélange de farine et d'eau fermenté par des BL et des levures (Corsetti and Settanni, 2007; De Vuyst and Neysens, 2005; De Vuyst and Vancanneyt, 2007; De Vuyst et al., 2009). Les levains sont rafraichis, c'est-à-dire qu'une partie du précédent levain est inoculé dans un mélange d'eau et de farine, jusqu'à l'obtention d'une pâte avec une qualité organoleptique et rhéologique acceptable. Cette méthode permet également de sélectionner les micro-organismes les plus adaptés au milieu et les levains matures ne contiennent qu'un nombre restreint d'espèces. Les microbiotes de ces aliments sont moins complexes que dans les aliments céréaliers fermentés naturellement, mais au moins 60 espèces de BL et de levures ont été isolées de différents levains (De Vuyst et al., 2014). De nombreuses publications tendent à montrer que le microbiote du levain dépend principalement des matières premières utilisées et des paramètres des procédés, comme la température, le pH, ou la procédure de rafraichissement (De Vuyst et al., 2014; Minervini et al., 2014).

Dans certains aliments tels que des produits laitiers et certains aliments céréaliers dans les pays occidentaux, les BL et les levures sont utilisées comme cultures starters. C'est-à-dire qu'un faible nombre de micro-organismes sélectionnés est ajouté en quantité connue dans l'aliment après une étape de pasteurisation ou de stérilisation. Par exemple, en France, le yaourt est fermenté uniquement par deux BL : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Ces cultures starters permettent d'améliorer et de standardiser la

qualité sanitaire et nutritionnelle des aliments (Campbell-Platt, 1994; Lücke, 2000). En revanche, les cultures starters sont peu utilisées pour la fermentation des produits céréaliers (Brandt, 2007; Cocolin and Ercolini, 2008).

En effet, dans les aliments céréaliers fermentés africains traditionnels par exemple, l'utilisation de cultures starters ou de levain est rare et donc les fermentations ne sont généralement pas contrôlées (Blandino et al., 2003; Nout, 2009). Les BL sont généralement les micro-organismes prédominants (Blandino et al., 2003; Franz et al., 2014; Oyewole, 1997). Par exemple, dans le *ben-saalga*, la concentration en BL atteint  $7,0 \pm 1,1 \log_{10}(\text{UFC})/\text{mL}$  en fin de fermentation, alors que la concentration en levures atteint  $5,5 \pm 0,7 \log_{10}(\text{UFC})/\text{mL}$  (Tou et al., 2006). Les aliments fermentés à base de mil (*Pennisetum glaucum*) sont principalement fermentés par les genres de BL suivants : *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Pediococcus* (Chao et al., 2013; Humblot and Guyot, 2009; Lei and Jakobsen, 2004; Owusu-Kwarteng et al., 2012). D'après ces mêmes études, *Lactobacillus fermentum* est généralement l'espèce dominante de ces aliments fermentés à base de mil.

### 3-3- Variabilité du microbiote des aliments céréaliers fermentés

La composition du microbiote varie d'un aliment céréalier à l'autre, comme en témoigne la liste, présentée par De Vuyst et al. (2014), de BL et de levures détectées dans des levains produits à partir de différentes céréales (blé, maïs, seigle ...) dans 27 pays de différents continents (Afrique, Amérique, Asie et Europe). De plus, la composition du microbiote d'un même aliment céréalier fermenté peut varier d'une unité de production à l'autre. Par exemple, les microbiotes d'échantillons de *ben-saalga* récoltés dans trois unités de production ont été analysés par pyroséquençage. Certains micro-organismes, appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* n'ont été détectés que dans l'échantillon d'une unité de production (Humblot and Guyot, 2009). De nombreuses recherches ont été menées sur les levains pour déterminer les origines possibles des microbiotes de ces aliments. D'après plusieurs revues, différents paramètres, comme la composition du microbiote et en nutriments de la matrice alimentaire, le microbiote de l'environnement de l'atelier, le pH, la durée et la température de fermentation, le ratio poids de levain/poids de farine, peuvent expliquer la variabilité des microbiotes des levains (De Vuyst et al., 2014; Minervini et al., 2014). Comme

le procédé de fabrication du *ben-saalga* diffère de ceux des levains (pas d'étape de rafraîchissement, temps de fermentation plus court, ...), certains paramètres détaillés dans les revues précédentes pourraient ne pas avoir d'impact sur la composition du microbiote du *ben-saalga*. En effet, un ratio poids de levain/poids de farine élevé combiné avec une durée de fermentation élevée (entre 24 et 48 h) peut favoriser la croissance des bactéries lactiques par rapport aux levures (Minervini et al., 2014). D'après Tou et al. (2006), le *ben-saalga* produit au Burkina Faso est fermenté entre 2 et 20h. C'est pourquoi tous les paramètres cités précédemment, excepté le ratio poids de levain/poids de farine sont détaillés dans les paragraphes suivant.

L'un des paramètres qui pourrait avoir un impact sur la composition du microbiote d'aliments céréaliers fermentés est la matière première. Par exemple, Minervini et al. (2012) ont mis en évidence un lien entre la composition en BL du microbiote de 19 levains et le type de céréale utilisée pour produire les farines (*Triticum aestivum* ou *Triticum durum*). D'après ces auteurs, cela pourrait être dû à la fois à des compositions différentes des microbiotes présents initialement sur les différents types de graines, mais aussi à des concentrations différentes en certains nutriments, comme les acides aminés libres. Dans le cas du *ben-saalga*, non seulement les graines peuvent provenir de différentes variétés de mil, mais en plus différentes épices sont ajoutées lors de la préparation de l'aliment selon l'unité de production (Tou et al., 2006). Le pH en début de fermentation, qui dépend principalement des matières premières utilisées, pourrait aussi avoir un impact sur le microbiote des aliments céréaliers fermentés. Par exemple, Brandt et al. (2004) ont montré qu'un pH en début de fermentation inférieur à 5, dans un levain à base de seigle inoculé par une culture starter, favorise la croissance de *Candida humilis* par rapport à *Lactobacillus sanfranciscensis*. Au contraire, pour un pH compris entre 5,6 et 5,8, le facteur de multiplication de *L. sanfranciscensis* était supérieur à celui de *C. humilis*.

Des données récentes tendent à montrer que le microbiote d'un même aliment céréalier fermenté varie selon le lieu de production. Par exemple, Owusu-Kwarteng et al. (2012), ont isolé des BL d'échantillons de *fura*, un aliment fermenté à base de mil, dans huit sites de production au Ghana. Seulement deux espèces de BL (*L. fermentum* et *Weissella confusa*) ont été détectées dans tous les sites de production, alors que quatre autres espèces de BL n'ont été détectés que dans les échantillons de certains sites de production. Le séquençage de



métagénomiques d'échantillons provenant de trois unités de productions de *ben-saalga* différentes au Burkina Faso ont mis en évidence des microbiotes différents en fonction de l'unité de production (Humblot and Guyot, 2009). Le microbiote ambiant des lieux de production, provenant entre autre de l'air, des ustensiles et des manipulateurs, pourrait avoir un impact plus important que le microbiote des matières premières. En effet, Scheirlinck et al. (2007) ont isolé et identifié les BL de 21 levains produits dans 11 boulangeries en Belgique à partir de différentes céréales (blé, épeautre et seigle). Une analyse en composante principale suivie d'une classification a permis de mettre en évidence que les levains provenant d'une même boulangerie ont une composition microbienne similaire, mais que les levains produits à partir des mêmes types de céréales peuvent avoir des microbiotes différents.

Ces différences de microbiotes pour un même aliment céréalier fermenté produit dans différents lieux de production pourraient aussi s'expliquer par des temps et des températures de fermentation différents (Minervini et al., 2014). Par exemple, différentes études menées sur des levains ont montré que des températures de fermentation comprises entre 30 et 40 °C favorisent la croissance des bactéries lactiques, alors que celle des levures est favorisée entre 25 et 27 °C (Gänzle et al., 1998). Dans le cas du *ben-saalga*, la température n'est pas contrôlée et le temps de fermentation peut varier entre 2 et 20 h d'une unité de production traditionnelle à l'autre (Tou et al., 2006).

Néanmoins, il est important de noter que certaines variations de microbiotes observées dans différentes études pourraient être dues aux méthodes d'analyse utilisées. En effet, parmi les études citées précédemment, certaines ont évaluées la variabilité des microbiotes d'aliments céréaliers en passant par une étape d'isolement sur milieu de culture. Or, il est désormais connu que les méthodes « cultures dépendantes » ne sont pas les plus adaptées, du fait des micro-organismes non-cultivables d'une part et des compétitions pour les nutriments entre micro-organismes sur les milieux de cultures d'autre part. Par exemple, aucune bactérie du genre *Weissella* n'a été isolée du *ben-saalga*, alors que des données de séquençage du métagénome de cet aliment ont mis en évidence la présence de bactéries appartenant à ce genre (Humblot and Guyot, 2009; Turpin et al., 2011).

## 4- Impact du microbiote sur la qualité nutritionnelle des aliments

### 4-1- Méthodes d'étude des propriétés nutritionnelles des micro-organismes

L'étude des propriétés nutritionnelles des micro-organismes des aliments passe généralement par leur isolement à partir de l'aliment étudié. Des tests phénotypiques peuvent ensuite être réalisés sur chaque micro-organisme isolé pour déterminer ses caractéristiques nutritionnelles. Dans le cas où de nombreux isolats doivent être testés et/ou de nombreuses caractéristiques nutritionnelles sont étudiées, les études phénotypiques peuvent prendre des mois. Le développement des méthodes d'étude des génomes et l'enrichissement des bases de données génomiques telles que KEGG (Kanehisa et al., 2014), ouvre d'autres perspectives d'étude.

En effet, il est possible d'estimer le potentiel métabolique d'un micro-organisme en recherchant un ou plusieurs gènes codant des enzymes impliquées dans la caractéristique nutritionnelle étudiée. Récemment, Turpin et al. (2016) ont recherché par PCR les gènes *crtE*, *crtN* et *crtM*, codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de caroténoïdes, dans les génomes d'une collection de 152 souches de BL isolées de *ben-saalga*. Ils ont également testé la production de caroténoïdes par ces mêmes souches dans du MRS. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la détection ou non du gène *crtE* et la capacité de production de caroténoïdes. En revanche, l'absence de détection des gènes *crtN* et *crtM* était corrélée avec l'absence de production de caroténoïdes. Parmi les souches possédant ces deux gènes dans leur génome, 60% étaient capables de produire des caroténoïdes. Cette approche pourrait donc permettre de pré-sélectionner les BL susceptibles de produire des caroténoïdes dans une collection de souches, en éliminant celles ne possédant pas les gènes *crtN* et *crtM*, et ainsi de limiter le nombre d'analyses en milieu de culture.

Dans le cadre de cette thèse, des gènes codant des enzymes impliquées dans différentes fonctions d'intérêt nutritionnel ont été recherchés directement dans le métagénome d'échantillons de *ben-saalga*. Cette démarche fait suite à la thèse de Williams Turpin (2011) qui a permis de développer cette méthode et de l'appliquer au métagénome de sept aliments amyliacés. Cette méthode pourrait permettre d'évaluer rapidement le potentiel nutritionnel du microbiote des aliments céréaliers fermentés. Les fonctions d'intérêt nutritionnel considérées ici sont présentées ci-dessous.

## 4-2- Métabolisme des glucides

Les céréales sont la principale source alimentaire d'énergie en Afrique (FAOSTAT, 2011). Les graines de céréales sont principalement constituées d'amidon, puisque ce macronutriment représente généralement entre 60 et 81 % de la matière sèche (USDA, 2016). Certaines bouillies, comme le *ben-saalga* par exemple, ont des densités énergétiques très faibles dues à des teneurs en matières sèches très faibles (<10 %). Cette faible teneur en matière sèche permet, entre autre, de limiter la gélatinisation de l'amidon pendant l'étape de cuisson finale et donc de conserver une consistance fluide adaptée aux jeunes enfants (Mouquet et al., 2006). La production de certaines enzymes par des bactéries lactiques dites amylolytiques pendant la fermentation peut permettre une hydrolyse partielle de l'amidon, et donc d'augmenter la teneur en matière sèche tout en conservant une consistance fluide (Nguyen et al., 2007; Songré-Ouattara et al., 2008).

Différentes enzymes pouvant être produites par les BL permettent de dégrader l'amidon. Pour comprendre leur mode de fonctionnement, il faut d'abord comprendre la structure de l'amidon. L'amidon est composé de deux polymères de glucose en proportions différentes : l'amylose (15 à 20 %), un polymère linéaire dans lequel les unités de glucose sont liées par une liaison  $\alpha$ 1-4, et l'amylopectine (80 à 85 %), un polymère similaire à l'amylose, mais ramifié à des résidus glucose par des liaisons  $\alpha$ 1-6. Les amylases, comme l' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1), sont capables d'hydrolyser au hasard les liaisons  $\alpha$ 1-4 à l'intérieur des chaînes de glucose composant l'amidon, produisant ainsi des oligosides de degrés de polymérisation variés et du maltose (Eom et al., 2009; Humblot et al., 2014). La maltose phosphorylase (EC 2.4.1.8) est capable de dégrader le maltose en molécules de glucose. Certaines enzymes comme l' $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.10) et l'amylopectine phosphorylase (EC 2.4.1.1), hydrolysent uniquement les liaisons  $\alpha$ 1-4 situées aux extrémités des chaînes d'amidon. La néopullulanase (EC 3.2.1.135) permet d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ 1-6 et donc de cliver les ramifications.

Certains glucides, comme les  $\alpha$ -galactosides (raffinose, le stachyose et le verbascose...), pouvant être présents dans les aliments à base de céréales, sont considérés comme des facteurs antinutritionnels. Les  $\alpha$ -galactosides sont des oligosaccharides composés d'au moins un galactose lié par une liaison  $\alpha$  à du saccharose. Comme les cellules humaines ne produisent

pas d' $\alpha$ -galactosidase, l'enzyme capable de cliver les  $\alpha$ -galactosides, ces oligosides sont fermentés, et donc utilisés, dans le tractus digestif par certains micro-organismes du microbiote intestinal, ce qui peut provoquer entre autre des flatulences et une diminution de l'énergie disponible (Ebert and Witt, 2016). Toutefois, les  $\alpha$ -galactosides consommés en faible dose ont un effet prébiotique, c'est-à-dire qu'ils peuvent favoriser la croissance et/ou l'activité de certains probiotiques, et donc avoir des effets nutritionnels positifs (Martínez-Villaluenga et al., 2008).

#### 4-3- Dégradation des tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques hydrosolubles capables de chélater certaines macromolécules, comme les protéines, et les minéraux, réduisant ainsi leur biodisponibilité (Aguilar-Zarate et al., 2014). Les tanins sont donc des facteurs antinutritionnels présents naturellement dans de nombreux aliments et notamment dans les produits végétaux comme les céréales, les fruits, le thé et le vin (Bravo, 1998). La consommation de tanins pourrait avoir plusieurs conséquences négatives, comme une diminution du taux de croissance et des dommages au niveau de la muqueuse du tractus gastro-intestinal (Chung et al., 1998). D'après de nombreuses études, les tanins pourraient inhiber la croissance des bactéries du microbiote intestinal, en exerçant différents effets sur les BL, comme un stress oxydant et la disruption de l'enveloppe bactérienne (Bossi et al., 2007; Cecconi et al., 2009; Curiel et al., 2011; Smith et al., 2005). Toutefois, chez les ruminants, une consommation de tannins condensés inférieure à 5 g/kg de matière sèche de fourrage pourrait prévenir le ballonnement (McMahon et al., 2000).

Toutefois, certaines bactéries sont capables de d'hydrolyser les liaisons esters entre les molécules d'acide gallique et les polyols des tanins hydrolysables grâce à la production d'une enzyme nommée tanin acylhydrolase (EC 3.1.1.20) (Chung et al., 1998; Iwamoto et al., 2008). C'est le cas de *Lactobacillus plantarum* VP08, qui est capable de se développer en utilisant l'acide tannique comme seule source de carbone (Cecconi et al., 2009). Le gène codant pour cette enzyme a été identifié chez *L. plantarum* ATCC 14917<sup>T</sup> et nommé *tanLpl* (Iwamoto et al., 2008). Toutefois, d'autres gènes pourraient être impliqués dans la synthèse de cette enzyme, puisque la souche *L. plantarum* ATCC 8041<sup>T</sup> ne possède pas de gènes similaires à *tanLpl* mais est capable de dégrader les tanins (Aguilar et al., 2007).

#### 4-4- Synthèse de caroténoïdes

D'après Lindshield (2012), les caroténoïdes sont des composés liposolubles de 40 molécules de carbones (tétraterpénoïdes), dont la couleur varie du jaune au rouge. Certains auteurs considèrent que les triterpénoïdes, composés de 30 atomes de carbones, sont également des caroténoïdes (Garrido-Fernández et al., 2010; Turpin et al., 2016). Dans le cadre de cette étude, nous considérerons que les triterpénoïdes font partie des caroténoïdes. Il existe une grande variété de caroténoïdes, puisqu'au moins 600 caroténoïdes sont connus. Les aliments riches en caroténoïdes sont principalement les aliments à base de plantes, puisque les cellules végétales sont capables de produire de grandes quantités de caroténoïdes (Lindshield, 2012). Certains aliments fermentés peuvent également en contenir puisque certaines bactéries et levures sont capables de produire ces molécules (Perera and Yen, 2007). D'après Khachik et al. (2009), seulement 42 caroténoïdes sont présents dans les fruits, légumes et légumineuses les plus couramment consommés, tels que les oranges, les tomates et les haricots. Pourtant, ces mêmes auteurs n'ont retrouvés que 14 caroténoïdes dans un extrait de plasma sanguin, et d'après Lindshield (2012) seulement 20 caroténoïdes ont été retrouvés dans différents tissus humains. D'après Lindshield (2012), le faible nombre de caroténoïdes retrouvés dans le plasma sanguin pourrait être dû soit à la méthode de détection des caroténoïdes dans le plasma sanguin qui pourrait ne pas être optimale, soit au fait que seul un petit groupe de caroténoïdes peuvent être absorbés et métabolisés.

De nombreuses études ont montré que la consommation d'aliments riches en caroténoïdes pourrait réduire le risque de développer certains cancers, comme celui de la prostate par exemple, et de maladies cardiovasculaires (Gaziano and Hennekens, 1993; Hwang and Bowen, 2002; Mayne, 1996; Sharoni et al., 2012; Stacewicz-Sapuntzakis and Bowen, 2005).

D'après la base de données KEGG (Kanehisa et al., 2014) les caroténoïdes sont synthétisés par les plantes et certains micro-organismes à partir de trois précurseurs : le D-glycéraldéhyde-3-phosphate, le pyruvate et l'acétyl-CoA. La première étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes implique au moins huit gènes et conduit à la formation du farnésyl-pyrophosphate et du géranylgeranyl-pyrophosphate à partir des trois précurseurs précédemment cités. Cinq autres gènes sont ensuite impliqués dans la voie de biosynthèse des triterpénoïdes à partir du farnésyl-pyrophosphate. Entre autre, les gènes *crtN* et *crtM* codent

des enzymes impliquées dans la synthèse du presqualène diphosphate, du 4,4'-diapophytoène, du 4,4'-diaponeurosporène et du 4,4'-diapolycopène. Plusieurs dizaines de gènes sont impliqués dans la voie de biosynthèse des tétraterpénoïdes, comme le lycopène, à partir du géranylgeranyl-pyrophosphate.

#### **4-5- Synthèse de riboflavine et de folates**

Les vitamines du groupe B sont des molécules hydrosolubles jouant des rôles essentiels, principalement en tant que coenzymes, dans le métabolisme cellulaire humain (Burgess et al., 2009). Parmi ces vitamines, la production de riboflavine (vitamine B2) et de folates (vitamine B9) par les micro-organismes ont fait l'objet de nombreuses études. Les folates et leur production par les micro-organismes seront développés plus en détail dans les parties suivantes.

La riboflavine est le précurseur de deux coenzymes : la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN). Ces coenzymes sont des transporteurs d'électrons dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction et jouent un rôle dans le métabolisme de plusieurs vitamines comme la niacine, les folates, la vitamine B6 et la vitamine D (Pinto and Cooper, 2014). Une consommation de riboflavine inférieure à 1,2 mg/jour pour un adulte peut induire une carence en riboflavine (FAO/WHO, 2001b). Les carences en riboflavines, aussi appelées ariboflavinose, pourraient avoir des effets néfastes comme le développement de certains cancers, comme le cancer de l'œsophage par exemple, et de maladies cardiovasculaires (Powers, 2003). Les ariboflavinoses existent encore dans certains pays comme la Chine, la Côte d'Ivoire et l'Éthiopie (Amare et al., 2012; Rohner et al., 2007; Shi et al., 2014). La riboflavine peut être retrouvée dans certains aliments tels que les produits laitiers, les céréales, les abats, et les poissons gras (Powers, 2003). Les aliments fermentés peuvent également être de bonnes sources de riboflavine, puisque certaines BL sont capables de produire cette vitamine (Capozzi et al., 2012; LeBlanc et al., 2013).

Les bactéries productrices de riboflavine peuvent être sélectionnées en les mettant en contact avec un analogue toxique de la riboflavine, nommé roséoflavine, qui ne permet la croissance que des souches productrices (Burgess et al., 2006). Mais des méthodes cultures indépendantes peuvent également être envisagées. D'après la base de données KEGG (Kanehisa et al., 2014), la guanosine 5'-triphosphate (GTP) et le ribulose 5-phosphate sont les

deux précurseurs de la synthèse de riboflavine. Il a été démontré chez *Bacillus subtilis* que quatre gènes sont impliqués dans la synthèse de riboflavine à partir de ces précurseurs : *ribA*, *ribB*, *ribG* et *ribH* (Burgess et al., 2009). Un cinquième gène, nommé *ribC*, code pour une enzyme impliquée dans la synthèse de FMN et FAD à partir de la riboflavine. Ces mêmes gènes sont également présents chez la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 (Bolotin et al., 2001).

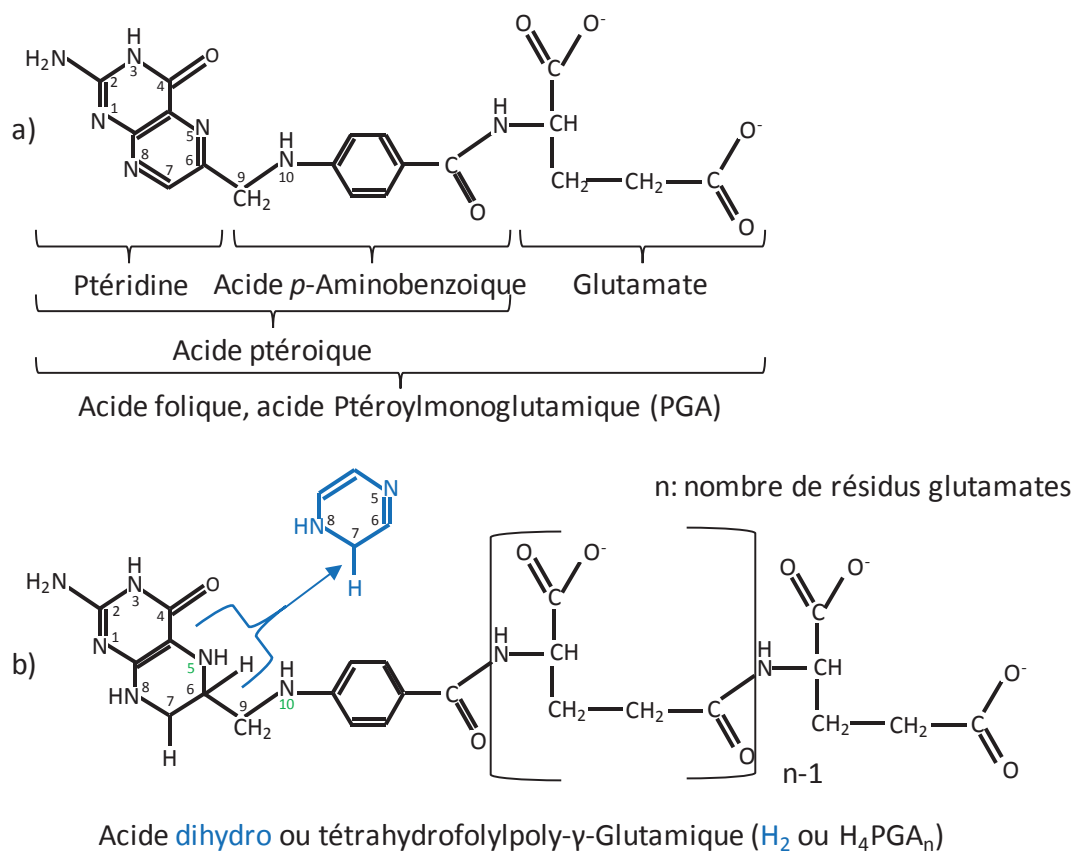
## 5- Les folates

### 5-1- Structure moléculaire des folates

Le terme folates désigne l'ensemble des formes vitaminiques, nommées vitamères, constituant la famille de la vitamine B9 (Ball, 2005). Les folates sont tous constitués d'un noyau ptérine lié par un pont méthylène à l'acide para-aminobenzoïque, ce dernier étant lui-même lié à une ou plusieurs molécules d'acide L-glutamique par un lien peptidique (Figure 2). Les ptérines sont des molécules appartenant au groupe des ptéridines et qui ont pour particularité d'être substituées en position 2 et 4 par une fonction amine et une fonction kéto ou énol, respectivement (Van Daele et al., 2016). L'ensemble constitué du noyau ptérine et de l'acide para-amino-benzoïque sont désignés sous le terme d'acide ptéroïque. La liaison entre l'acide ptéroïque et au moins une molécule de glutamate est nécessaire pour qu'une activité vitaminique soit observable (Araújo et al., 2015).

Parmi les vitamères de folates, l'acide folique (pteroylmonoglutamic acid ou PGA) peut être soit la forme de synthèse des folates, soit le produit de dégradation de certains vitamères de folates. L'acide folique ne possède qu'une molécule de glutamate, contrairement aux autres vitamères de folates qui possèdent généralement entre cinq et sept résidus de glutamate. De plus, le noyau ptéridine de l'acide folique est complètement oxydé, alors que pour les autres vitamères de folates, il est généralement soit partiellement réduit (aux positions 7,8) dans le cas des dihydrofolates, soit complètement réduit (aux positions 5,6,7,8) dans le cas des tétrahydrofolates. Les vitamères de folates peuvent également être substitués soit à la position N5 par des groupes formyl, méthyl ou formimino, ou à la position N10 par un groupe formyl (Blakley, 1987). Il peut également y avoir un pont dû à des groupes méthylène ou méthényle entre les positions N5 et N10. En considérant que la chaîne de polyglutamate ne peut pas être

constituée de plus de sept résidus, le nombre théorique de molécules de folates présentes dans la nature serait proche de 150 (Ball, 2005).



Substituent monocarboné	Position	Etat d'oxidation	Vitamères
Méthyl —CH <sub>3</sub>	N-5	Méthanol	5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folate 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> folate
Méthylène —CH <sub>2</sub> —	N-5, N-10	Formaldéhyde	5,10-CH <sub>2</sub> -H <sub>4</sub> folate
Méthényl —CH=	N-5, N-10	Formate	5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folate
Formyl —CHO	N-5 ou N-10	Formate	5-HCO-H <sub>4</sub> folate 10-HCO-H <sub>4</sub> folate 10-HCO-H <sub>2</sub> folate 10-HCO-PGA
Formimino HN=CH—	N-5	Formate	5-HN=CH-H <sub>4</sub> folate

Figure 2 : Structure de a) l'acide folique et b) des autres vitamères de folates

5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate : 5-méthyltétrahydrofolate ; 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folate : 5-méthylidihydrofolate ; 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folate : 5,10-méthylénetétrahydrofolate ; 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate : 5,10-méthényltétrahydrofolate ; 5-HCO-H<sub>4</sub>folate : 5-formyltétrahydrofolate ; 10-HCO-H<sub>4</sub>folate : 10-formyltétrahydrofolate ; 10-HCO-H<sub>2</sub>folate : 10-formylidihydrofolate ; 10-HCO-PGA : acide 10-formylfolique ; 5-HN=CH-H<sub>4</sub>folate : 5-formiminotétrahydrofolate



Les molécules de tétrahydrofolates sont asymétriques au niveau du carbone C6 (Ball, 2005). Il existe donc deux stéréoisomères nommés 6S et 6R. Seul le stéréoisomère 6S se retrouve dans la nature et est biologiquement actif. Les méthodes chimiques de synthèse des tétrahydrofolates (hydrogénation catalytique ou réduction chimique) ne permettent d'obtenir que des mélanges des deux stéréoisomères. C'est une des raisons pour lesquelles la forme de folates synthétisée est la forme la plus oxydée : l'acide folique.

### **5-2- Métabolisme des folates**

Les folates sont des coenzymes impliqués de nombreuses réactions de transfert d'unités monocarbonées essentielles à la survie des cellules, comme la synthèse de certains acides nucléiques et la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (Figure 3). Seuls les tétrahydrofolates sont biologiquement actifs, mais chaque vitamère de tétrahydrofolate est impliqué dans une réaction différente selon le groupement carboné qu'il porte. Par exemple, le 5,10-méthylènetétrahydrofolate est le cofacteur de la thymidylate synthétase qui permet la transformation du désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). La reméthylation de l'homocystéine est due à la méthionine synthétase qui utilise le groupement carboné du 5-méthyltétrahydrofolate.

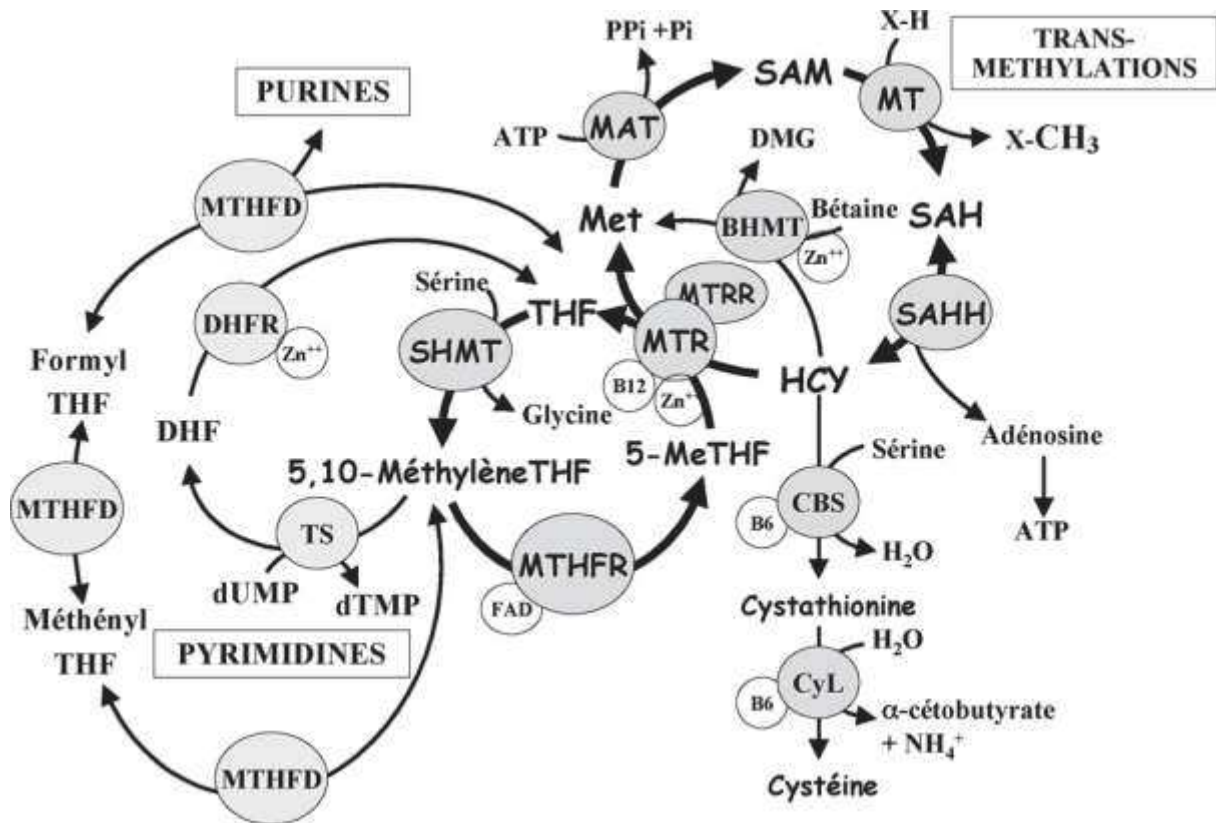


Figure 3 : Métabolisme des folates, d'après Forges et al. (2008)

THF : tétrahydrofolate ; MTR : méthionine synthétase ; Met : méthionine ; HCY : homocystéine ; MTHFR : méthylène-tétrahydrofolate réductase ; MAT : méthionine adényltransférase ; MT : méthyltransférases ; X : substrat à méthyler ; SAHH : S-adenosylhomocystéine hydrolase ; dUMP : désoxyuridine 5'-monophosphate ; dTMP : désoxythymidine 5'-monophosphate ; TS : thymidylate synthase ; DHFR : dihydrofolate réductase ; MTHFD : 5,10-méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase ; CBS : cystathionine-bêta-synthétase ; CyL : cystathionine lyase

## 6- Les carences en folates

### 6-1- Effets sur l'organisme

Les cellules humaines ne peuvent pas synthétiser de folates. Ainsi, dans le cas d'un apport exogène en folates insuffisant, des carences en folates peuvent être observées, induisant l'apparition de différentes pathologies. Parmi les pathologies les plus étudiées, les carences en folates peuvent causer des malformations congénitales, telles que des défauts de fermeture du tube neural (NTD), ainsi que des anémies mégalo-blastiques et certains cancers, comme le cancer de la prostate (FAO/WHO, 2005; Metz, 1963). En effet, nous avons vu précédemment

que certains vitamères de folates jouent un rôle important dans la réplication et la réparation de l'ADN. Ainsi, une carence en folates peut affecter la multiplication cellulaire qui est particulièrement importante lors du développement embryonnaire, et lors de la production de cellules sanguines. De plus, si les mécanismes de réparation de l'ADN sont affectés, des mutations peuvent apparaître dans l'ADN, pouvant conduire au développement de cellules cancéreuses.

## **6-2- Recommandations**

Les recommandations pour les ingérés en folates, basés sur les besoins en folates de différents groupes d'âge, sont donnés dans le Tableau 3. Pour chaque groupe d'âge, deux valeurs peuvent être utilisées : le besoin moyen estimé (EAR) et l'apport recommandé en nutriments (RNI). L'EAR correspond à l'ingéré journalier nécessaire pour couvrir les besoins de 50 % de la population du groupe d'âge considéré. La RNI correspond à l'ingéré journalier nécessaire pour couvrir les besoins de 97,5 % de la population du groupe d'âge considéré. Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons uniquement les RNI. Les principales populations à risque sont les jeunes enfants de moins de deux ans et les femmes enceintes (FAO/WHO, 2005). Toutefois, les besoins en folates des femmes enceintes lors des premières semaines de grossesse, période pendant laquelle les NTD se développent, sont très importants, en raison de la croissance importante du fœtus (Crider et al., 2011). Si les stocks des femmes enceintes ne sont pas optimaux en début de grossesse, ils risquent de s'épuiser rapidement lors des premières semaines de grossesse. C'est pourquoi dans cette étude nous allons considérer le groupe des femmes en âge de procréer avec une RNI de 600 µg/jour (au lieu de 400 µg/jour), les jeunes enfants de 0 à 12 mois avec une RNI de 80 µg/jour et les jeunes enfants de un à deux ans avec une RNI de 150 µg/jour. Ces valeurs seront utilisées pour les calculs des besoins en folates.

**Tableau 3 : Besoins moyens estimés (EAR) et ingérés en nutriments recommandés (RNI), pour l'acide folique exprimé comme équivalent en folates alimentaire, pour différent groupes d'âge, FAO/WHO (2005)**

Groupe	EAR ( $\mu\text{g}/\text{jour}$ )	RNI ( $\mu\text{g}/\text{jour}$ )
Bébés et enfants		
0-6 mois <sup>a</sup>	65	80
7-12 mois	65	80
1-3 ans	120	150
4-6 ans	160	200
7-9 ans	250	300
Adolescents, 10-18 ans	330	400
Adultes		
19-65 ans	320	400
65+ ans	320	400
Grossesse	520	600
Lactation	450	500

<sup>a</sup> Basé sur une consommation de lait humain de 0,75 L/jour

### 6-3- Prévalence des carences

A ce jour, il n'existe pas de données globales sur la prévalence des carences en folates dans le monde. Toutefois, des carences en folates ont été détectées dans des pays aussi différents que le Burkina Faso, le Guatemala, l'Iran, l'Irlande, la Thaïlande et les Etats-Unis d'Amérique par exemple (Arsenault et al., 2014; Assantachai and Lekhakula, 2007; Brunst et al., 2014; Harrington et al., 2008; Rosenthal et al., 2015; Sedehi, 2013). Les carences en folates n'affectent pas les mêmes groupes d'âge selon le pays (McLean, 2008). Par exemple, lors d'une étude dans le milieu rural au Burkina Faso, la consommation alimentaire d'enfants âgés de 36 à 59 mois et de leur mère a été mesurée à l'aide de questionnaires de rappels quantitatifs de 24 h et a permis d'estimer que la probabilité d'adéquation du statut en folates de ces populations varie selon les saisons. La médiane de la probabilité d'adéquation du statut en folates était nulle pour les mères pendant les saisons de soudure et de post-récolte et pour les enfants pendant la saison de soudure. En revanche, la médiane de la probabilité d'adéquation du statut en folates était de 0,98 pour les jeunes enfants pendant la saison de post-récolte (Arsenault et al., 2014). En Irlande, l'estimation des ingérés en folates par des hommes et des

femmes à l'aide d'un questionnaire de fréquence de consommation alimentaire a permis d'estimer que 40% de la population irlandaise est en dessous de l'apport nutritionnel recommandé pour les ingérés en folates (Harrington et al., 2008). Dans la population urbaine des Etats-Unis, Brunst et al. (2014) ont estimé que 16% des femmes enceintes ont des ingérés en folates insuffisants. Des analyses de la concentration en folates dans le sérum sanguin de femmes en âge de procréer ont montré que 5,1 % des femmes au Guatemala et environ 30 % des femmes en Iran avaient des carences en folates (Rosenthal et al., 2015; Sedehi, 2013). En Thaïlande, Assantachai and Lekhakula (2007) ont évalué la concentration en folates dans le sérum sanguin de sujets âgés de 60 ans ou plus et ont détecté des carences en folates dans 39 % de cette population. Toutes ces études mettent en évidence que la carence en folates est toujours un problème de santé publique qui affecte différentes catégories d'âge, quel que soit le contexte socio-économique, au niveau mondial.

#### **6-4- Stratégies de lutte contre les carences en folates**

Les principales stratégies utilisées à ce jour pour lutter contre les carences en folates sont i) la supplémentation, ii) la fortification alimentaire et iii) la diversification alimentaire (Bailey et al., 2003; Bhutta et al., 2013). La supplémentation est une stratégie efficace, mais utilisée sur de courtes périodes. Par exemple, la supplémentation journalière en acide folique est recommandée pour les femmes enceintes, pour réduire le risque de faible poids de l'enfant à la naissance, de malformation au niveau du tube neural et d'anémie de la mère (WHO, 2012). Dans le cas des programmes de fortification alimentaire, l'acide folique est ajoutée au niveau industriel dans des farines de blés ou de maïs, dans le but d'augmenter les ingérés en folates de toute la population du pays ou de la région ciblée, et donc de prévenir les carences en folates. En 2015, les programmes de fortifications étaient obligatoires dans 63 pays et autorisés dans 4 (Food Fortification Initiative, 2015). Il a été estimé que la consommation d'acide folique en quantité suffisante dans les aliments fortifiés permettrait de prévenir jusqu'à 75 % des NTD les plus communes : la spina bifida et l'anencéphalie (Bell and Oakley, 2009). Cependant, les programmes de fortification ne sont pas toujours suffisamment efficaces. En effet, Youngblood et al. (2013) ont estimé que moins de 25,5 % des NTD, qui pourraient être prévenus à l'aide de la consommation d'acide folique, le sont réellement. De plus, il a été démontré que la consommation de grandes quantités d'acide folique peut

masquer les symptômes de la carence en vitamine B12, ce qui peut entraîner la progression de la neuropathie jusqu'à un stade irréversible (FAO/WHO, 2005).

La diversification alimentaire, c'est-à-dire ici la consommation en quantité suffisante d'aliments riches en folates, pourrait être un moyen durable de lutter contre les carences en folates. Cette stratégie serait particulièrement intéressante dans les pays qui refusent ou ne peuvent pas mettre en place des programmes de fortification des aliments. Les principales sources alimentaires de folates sont décrites dans le paragraphe suivant. Cependant, les aliments riches en folates ne sont pas toujours disponibles, selon la saison et les contextes géographiques, agro-écologiques et socio-économiques. Les limites des différentes stratégies permettent d'expliquer pourquoi il y a toujours des carences en folates dans de nombreux pays. C'est pourquoi il serait intéressant de mettre au point une solution alternative durable, facile à mettre en place et si possible basée sur les aliments.

## **7- Les folates dans l'alimentation**

### **7-1- Les sources alimentaires de folates**

Il est généralement considéré que les aliments suivants sont les meilleures sources alimentaires de folates, due à leur teneur en folates élevée : le foie (136-963  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de base humide), les légumes à feuilles vertes (88-187  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH), d'autres légumes verts tels que les asperges (108  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH), les choux de Bruxelles (101  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH) et le brocoli (114  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH), les légumineuses (140-540  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH non transformés), les noix (39-169  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH), les aliments à base de céréales (26-170  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH pour les produits à base de grains entiers), et quelques fruits tels que les oranges (27-42  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH), les fraises (36-65  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH) et les cerises (52-75  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH) (FAO/WHO, 2005; Souci et al., 2000; USDA, 2015). Dans le cas des céréales, les folates sont situés dans la couche à aleurone et dans le germe, ce qui permet d'expliquer pourquoi les farines raffinées contiennent moins de folates (10-17  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH) que les produits à base de grains entiers (Pomeranz, 1988; Souci et al., 2000). Cependant, des aliments contenant de faibles teneurs en folates, mais étant fréquemment consommés pourraient être de meilleures sources alimentaires de folates que certains aliments riches en folates, mais rarement consommés. Donc, pour estimer si un aliment pourrait être une bonne source de folates, à la fois sa teneur en folates et son volume

de consommation devraient être prises en compte. C'est pourquoi les valeurs théoriques d'ingérés en folates ( $\mu\text{g}/\text{individu}/\text{jour}$ ) ont été calculées en prenant les teneurs en folates de différents aliments ( $\mu\text{g}/100\text{g BH}$ ) et leur disponibilité moyenne au niveau mondial entre 2001 et 2011 ( $\text{g}/\text{individu}/\text{jour}$ ).

Les résultats obtenus, présentés dans le Tableau 4, suggèrent que les céréales sont le groupe d'aliment le plus fréquemment consommé, ce qui serait principalement dû à la forte consommation de blé et de riz au niveau mondial. Les légumes sont le deuxième groupe d'aliment le plus disponible, suivi par les produits laitiers, les fruits, les racines et les tubercules amylicés et les viandes. Les plus fortes teneurs en folates sont retrouvées dans les abats et en particulier dans le foie qui est l'organe de stockage des folates. En excluant les abats, les teneurs en folates des produits carnés sont généralement inférieures à  $20 \mu\text{g}/100\text{g BH}$ . Les légumes à feuilles vertes et les légumineuses présentent généralement des teneurs en folates comprises entre 80 et  $400 \mu\text{g}/100\text{g BH}$ . Le Tableau 4 met en évidence que les catégories d'aliments qui ont les plus fortes teneurs en folates ne sont pas ceux qui contribuent le plus aux ingérés en folates théoriques. Par exemple, même si les abats et les légumineuses présentent des teneurs en folates élevées, leur valeur de contribution aux ingérés théoriques en folates sont similaires à celles d'autres aliments tel que les produits à base de riz et ceux à base de maïs, dont la teneur en folates est plus faible. Cela est dû à la plus forte consommation d'aliments à base de céréales au niveau mondial, par rapport aux légumineuses et aux abats.

**Tableau 4 : Contribution théorique de différents produits alimentaires à la consommation de folates au niveau mondial**

Catégorie d'aliment	Aliment	Disponibilité alimentaire moyenne <sup>a</sup> (g/personne/jour)	Teneur en folates <sup>b</sup> (µg/100g BH)	Ingérés en folates théoriques (µg/personne/jour)
	<b>Total (sans la bière)</b>	<b>402</b>	ND	NC
Produits céréaliers	Blé et produits dérivés	182	10-87	18-159
	Riz (équivalent blanchi)	146	10-16	15-23
	Maïs et produits dérivés	46	10-26	5-12
	Sorgho et produits dérivés	10	30-38	3-4
	Mil et produits dérivés	9	8-50	0.8-5
	<b>Total</b>	<b>17</b>	ND	NC
Légumineuses	Haricots	6	140-360	9-23
	Pois	2	151-340	3-7
	<b>Total (sans les aliments amylicés et les tubercules)</b>	<b>343</b>	11-187	38-641
Légumes	Légumes à feuilles vertes	ND	88-187	NC
	<b>Total (sans le vin)</b>	<b>187</b>	ND	NA
Fruits	Oranges, Mandarines	33	7-29	2-10
	Bananes	28	13-17	4-6
	Pommes et produits dérivés	24	3-12	0.8-3
	<b>Total</b>	<b>169</b>	ND	NC
Racines amylicées et tubercules	Patates et produits dérivés	90	22-40	20-36
	Manioc et produits dérivés	37	16-56	6-21
	Patates douces	26	7-43	2-11
Fruits à coque	<b>Total</b>	<b>5</b>	39-169	2-9
	<b>Total</b>	<b>109</b>	ND	NC
Viandes	Viande de porc	41	3-10	1-4
	Volaille	35	4-16	1-6
	Viande bovine	26	1-10	0.3-3
	Abats*	6	4-592	0.2-36
Poissons et produits de la mer	<b>Total</b>	<b>48</b>	1-37	0.5-18
	<b>Total (Lait, yaourts, fromages et petit-lait)</b>	<b>219</b>	1-66	2-145
Produits laitiers	<b>Lait non transformé</b>	<b>ND</b>	0,8-7	NC
	<b>Fromage</b>	<b>ND</b>	10-65	NC

<sup>a</sup> : Les données de disponibilité alimentaire ont été obtenues depuis la base de données FAOSTAT sur la période 2001-2011 (FAOSTAT, 2015)

<sup>b</sup> : Les teneurs en folates des aliments proviennent principalement de la table de composition de Souci et al. (2000), et en cas de données manquantes, d'autres bases de données ont été utilisées (Stadlmayr et al., 2012; USDA, 2015). ND : Non déterminé (Les données n'étaient pas disponibles dans les bases de données utilisées) ; NC : Non calculé ; BH : base humide

\* : Parmi les abats, certains produits sont riches en folates, comme le foie et le rognon, et d'autres ont des concentrations en folates plus faibles, comme le cœur et la cervelle.



Un aliment peut être considéré comme une bonne source en vitamine s'il permet de procurer aux populations consommatrices au moins 10 % de l'apport nutritionnel recommandé (RDA ; qui est équivalent à la RNI) par repas selon la FDA (2016), ou 15 % de la RNI par repas selon la FAO/WHO (2005). Ainsi, pour des femmes enceintes, ou éventuellement pour des femmes en âge de procréer, une bonne source de folates devrait procurer au minimum 60 µg par repas. D'après les valeurs d'ingérés théoriques en folates du Tableau 4, seulement certains produits à base de blé, certains légumes et certains produits laitiers pourraient procurer plus de 60 µg/personne/jour. Cependant, pour les produits à base de blé, si on exclut les produits à base de grains entiers (87 µg de folates /100g BH), la valeur théorique d'ingérés en folates serait seulement de 38 µg/personne/jour. LeBlanc et al. (2008) ont démontré que la consommation de quelques produits laitiers fermentés pourrait permettre de couvrir plus de 10 % des besoins en folates de femmes enceintes. Même si les légumes à feuilles vertes sont généralement considérés comme l'une des meilleures sources en folates, la valeur d'ingérés théoriques pour cette catégorie d'aliment ne peut pas être calculé à cause d'un manque de données de consommation.

Ces données présentent un intérêt car elles permettent de mieux appréhender la contribution de différents produits alimentaires à la consommation de folates. Toutefois, elles ne reflètent peut-être pas la réalité, car les régimes alimentaires peuvent fortement varier d'une région à l'autre. Ainsi, le contexte nutritionnel devrait être pris en compte pour déterminer la meilleure source alimentaire en folates d'une région donnée. En effet, nous avons vu dans la deuxième partie de ce chapitre que les céréales sont la base de l'alimentation en Afrique, alors que les produits laitiers sont nettement plus consommés en Europe (Figure 1). Ainsi, les céréales pourraient être la source principale en folates dans de nombreux pays africains, alors que les produits laitiers pourraient grandement contribuer aux ingérés en folates dans certains pays européens.

Une grande partie des produits laitiers et des aliments à base de céréales sont consommés après avoir été fermentés (Blandino et al., 2003; Campbell-Platt, 1994; Guyot, 2012; Nout, 2009; Oyewole, 1997). Par exemple, dans certains pays européens, les produits laitiers fermentés (fromages, yaourts ...) peuvent représenter jusqu'à 43 % de la consommation en produits laitiers (de 160 à 478 g/jour) pour les adultes (Hjartaker et al., 2002). Au Burkina Faso, il a été estimé que 31 % de la population consomme quotidiennement des bouillies à

base de mil (Mouquet-Rivier et al., 2008). Certaines études ont montré que la consommation d'une portion (225 mL) de certains produits laitiers fermentés par des BL pourrait contribuer à 10 %, voire 15 % de la RDA pour les adultes (Laiño et al., 2013, 2014). Cependant, selon les BL impliquées dans la fermentation, certains produits laitiers fermentés pourraient avoir des teneurs en folates plus faibles et par conséquent contribuer à moins de 10 % de la RDA pour les adultes (Laiño et al., 2012). Certains produits laitiers fermentés pourraient contribuer à seulement 2 % de l'ingéré alimentaire recommandé pour les femmes en âge de procréer (Crittenden et al., 2003). D'après Kariluoto (2008), les produits à base de céréales et principalement les pains de seigle, contribuent à plus d'un tiers des ingérés en folates quotidiens dans la population finlandaise. De nombreuses études suggèrent que les aliments fermentés ont généralement des teneurs en folates plus élevées que les matières premières ayant servi à les produire (Ekinci, 2005; Forssén et al., 2000; Murdock and Fields, 1984). Cela nous amène à penser que les produits laitiers fermentés et les produits céréaliers fermentés pourraient être des sources intéressantes de folates en Europe et en Afrique respectivement. Cependant, certaines étapes lors des procédés de transformation pourraient induire des pertes en folates soit à cause de l'instabilité des folates, soit à cause de l'éviction de parties riches en folates comme les couches externes des graines de céréales.

## **7-2- Stabilité des folates et influence des procédés**

Différents facteurs induisent l'inter-conversion et/ou la dégradation des folates, ce qui peut conduire à une perte irréversible de l'activité vitaminique. D'après la littérature, les principaux facteurs sont : la température, l'exposition aux agents oxydants, le pH, l'exposition aux ultra-violets et à la lumière et l'interaction avec d'autres composés des aliments, tels que les cations métalliques. La Figure 4 résume les effets de ces facteurs, qui peuvent être rencontrés lors de la préparation et le stockage des aliments, sur les différents vitamères de folates. L'acide folique peut être retrouvé dans les aliments non fortifiés, en tant que produit de dégradation du tétrahydrofolate. L'acide folique est le vitamère le plus stable avec le 10-HCO-PGA (Ball, 2005; Strandler et al., 2015). Les vitamères de folates réduits substitués sont relativement stables, et en particulier ceux substitués à la position N5. D'après Strandler et al. (2015), cela pourrait être dû à un encombrement stérique, dû au groupement carboné en N5, qui permettrait de limiter l'accès de l'oxygène ou d'autres agents oxydants au noyau ptéridine. Au contraire, les folates réduits non substitués, donc pour lesquels le noyau

ptéridine n'est pas protégé, sont plus facilement oxydés. Beaucoup de vitamères de folates sont plus ou moins stables en fonction du pH. Par exemple, les vitamères réduits non substitués sont moins stable entre pH 4 et pH 6, alors que l'acide folique est stable aux pH neutres et basiques, mais pas aux pH inférieurs à 5 (Gregory, 1989). A pH acide, le 5-formyltétrahydrofolate et le 10-formyltétrahydrofolate sont cyclisés pour former le 5,10-méthényltétrahydrofolate (Tabor and Wyngarden, 1959).

Comme les différents vitamères de folates n'ont pas la même stabilité, les pertes en folates dans différents aliments exposés aux mêmes facteurs, dans les mêmes conditions, pourraient être différentes selon la composition en vitamères de l'aliment. En effet, la composition en vitamères varie d'un aliment à l'autre (Tableau 5). Dans toutes les catégories d'aliments, le principal vitamère est le 5-méthyltétrahydrofolate, et dans une moindre mesure le 5-formyltétrahydrofolate et le 10-HCO-PGA. Par exemple, le tétrahydrofolate est instable lorsqu'il est exposé aux fortes températures (Wilson and Horne, 1983). Dans certaines légumineuses et produits à base de foie, ce vitamère peut être prédominant et donc les pertes en folates pourraient être importantes durant la cuisson de ces aliments.

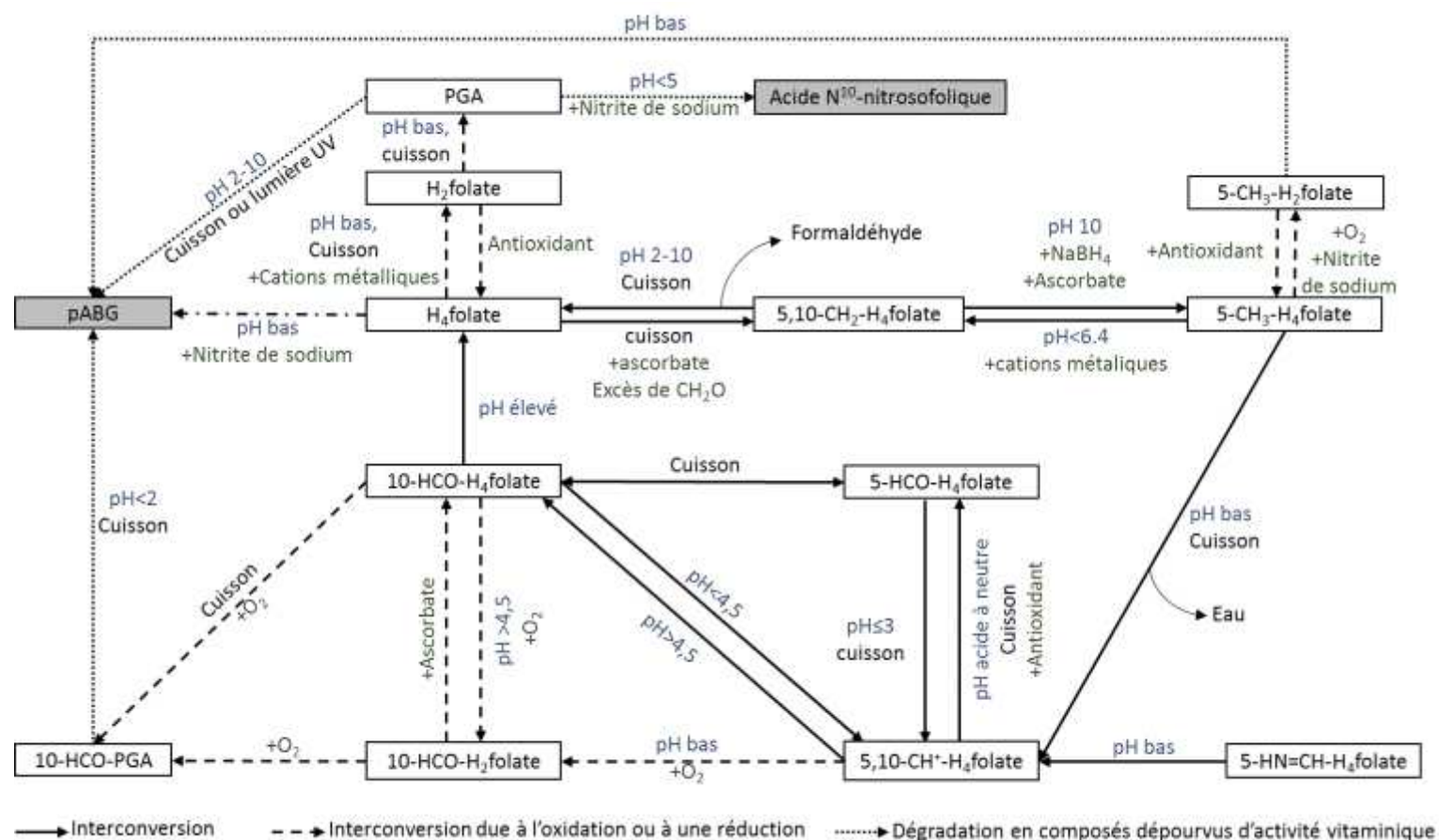


Figure 4 : Dégradation et interconversion des vitamères de folates sous différentes conditions. Cette figure a été adaptée à partir de celle d'Edelmann (2014) et est basée sur les données de différentes publications (Akhtar et al., 1999, 2003; Blair and Pearson, 1974; De Brouwer et al., 2007; Jägerstad and Jastrebova, 2013; Lucock et al., 1994; Mnkeni and Beveridge, 1982; Paine-Wilson and Chen, 1979; Quinlivan et al., 2006; Strandler et al., 2015; Tyagi et al., 2009; Wilson and Horne, 1983). H<sub>4</sub>folate : tétrahydrofolate, 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate : 5-méthyltétrahydrofolate, 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folate : 5,10-méthényltétrahydrofolate, 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folate : 5,10-méthylènetétrahydrofolate, 5-HCO-H<sub>4</sub>folate : 5-formyltétrahydrofolate, 10-HCO-H<sub>2</sub>folate : 10-formyldihydrofolate, 10-HCO-folice acid : acide 10-formylfolique et pABG : para-aminobenzoylglutamate. Rectangles gris : composés dépourvus d'activité vitaminique

**Tableau 5 : Distribution des vitamères de folates dans différentes catégories d'aliments**

Catégories d'aliments	5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folate	5-CHO-H <sub>4</sub> folate	10-CHO-PGA	H <sub>4</sub> folate	Acide folique (PGA)	5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folate	10-HCO-H <sub>2</sub> folate	Teneur en folates totaux (µg/100g BH)	Références
<b>Céréales</b>	4-47 %	5-48 %	9-41 %	0-15 %	0-17 %	1-27 %	0-70 %	17 to 73	(Edelmann et al., 2012, 2013; Gujska et al., 2009; Kariluoto et al., 2004; Konings, 1999; Ringling and Rychlik, 2013)
<b>Légumineuses</b>	6-85 %	0-75 %	0-9 %	0-67 %	0-10 %	0-1 %	0-1 %	50 to 340	(Ringling and Rychlik, 2013; Rychlik et al., 2007; Shohag et al., 2012)
<b>Légumes feuilles</b>	20-74 %	6-49 %	1-58 %	0-24 %	0-1 %	0-15 %	0-34 %	54 to 227	(O'Hare et al., 2012; Phillips et al., 2014; Ringling and Rychlik, 2013; Shohag et al., 2011, 2012; Wang et al., 2013)
<b>Autres légumes</b>	17-85 %	4-53 %	0-14 %	7-27 %	0-23 %	0-2 %	1-3 %	16 to 103	(Phillips et al., 2006, 2014; Ringling and Rychlik, 2013; Rychlik and Adam, 2008; Rychlik et al., 2007; Shohag et al., 2012; Wang et al., 2013)
<b>Champignons</b>	0-90 %	10-60 %	0-40 %	NA	NA	NA	NA	1 to 70	(Phillips et al., 2011)
<b>Foie</b>	18-81 %	0-10 %	NA	10-81 %	0-1 %	NA	ND	375 to 1500	(Konings, 1999; Vahteristo et al., 1996)
<b>Produits laitiers</b>	6-100 %	0-93 %	16 %	0-33 %	3 %	0,3 %	6 %	4 to 104	(Forssén et al., 2000; Ringling and Rychlik, 2013)

NA : Non Analysé ; ND : Non Détectable

5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate : 5-méthyltétrahydrofolate ; 5-HCO-H<sub>4</sub>folate : 5-formyltétrahydrofolate ; 10-HCO-PGA : acide 10-formylfolique ; H<sub>4</sub>folate : tétrahydrofolate ; 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate : 5,10-méthényltétrahydrofolate ; 10-HCO-H<sub>2</sub>folate : 10-formyldihydrofolate.

Le Tableau 6 présente quelques exemples de l'évolution de la teneur en folates lors de différentes étapes de procédés. Lors des étapes de cuisson, et en particulier lors des cuissons hydrothermales durant lesquelles les folates peuvent diffuser dans l'eau, les pertes ne sont pas négligeables (Bassett and Samman, 2010; Bureau et al., 2015; Eitenmiller and Landen, 1999), en particulier lorsque le degré de fragmentation est important quand les aliments sont trempés dans l'eau. En effet, plus le rapport surface/volume est grand, plus les pertes en folates dues à la diffusion sont importantes (Czarnowska and Gujska, 2012). Lorsque les aliments sont exposés à l'oxygène ou à d'autres agents oxydants, comme durant le stockage qui peut durer plusieurs mois pour certains aliments, les folates peuvent s'oxyder (Sotiriadis and Hoskins, 1982). Pour prévenir les oxydations, les folates peuvent être protégés par des antioxydants soit présents initialement dans l'aliment, soit ajoutés durant la préparation de l'aliment, comme c'est le cas avec l'acide ascorbique. Par exemple, Sotiriadis and Hoskins (1982) ont montré que l'addition d'acide ascorbique dans des boîtes de conserves, contenant du niébé, du gombo ou des tomates, a permis de limiter significativement la perte de folates durant un stockage de six mois. L'exposition à la lumière peut également se produire durant la plupart des étapes des procédés de préparations d'aliments. Par exemple, de l'acide folique ajouté dans des jus a été significativement plus dégradé lors d'un stockage à la lumière par rapport à un stockage à l'obscurité (Frommherz et al., 2014). Cependant, certains composés présents naturellement dans les aliments, tels que la  $\beta$ -lactoglobuline, l'albumine de sérum bovin et l' $\alpha$ -lactalbumine, peuvent retarder la photo-décomposition des folates (Liang et al., 2013). La structure des aliments peut également jouer un rôle positif en piégeant les folates au sein de la matrice alimentaire, et donc en les protégeant des agents oxydants et de la lumière. Au contraire, le fractionnement de certains aliments, comme les graines de céréales, pourrait augmenter l'exposition des folates à ces facteurs et donc induire des pertes en folates importantes lors des étapes suivantes des procédés. De plus, les fractions riches en folates, comme le son et le germe, peuvent être enlevées durant la transformation des produits céréaliers, entraînant ainsi des pertes en folates (Monks et al., 2013). Toutefois, d'autres procédés peuvent permettre d'obtenir des fractions riches en folates à partir du son de blé (Hemery et al., 2011).

**Tableau 6 : Influence des procédés de fabrication des aliments sur la teneur en folates : exemples d'étapes courantes de procédés**

<b>Etapes</b>	<b>Aliment</b>	<b>Conditions</b>	<b>Influence sur la B9</b>	<b>Références</b>
Cuisson ou chauffage	Pain de seigle et de blé	200 °C/60 min	-25 %	Kariluoto et al. (2004)
	Soja	Blanchiment (85 °C/5 min)	-26 %	Arcot et al. (2002)
	Brocoli	25-140 °C/30 min	-22 à -49 %	Munyaka et al. (2010)
	Lait	Pasteurisation (62,5 °C, 30 min), micro-ondes (720 watts, 30 s), ou chauffage (40 °C, 10 min)	0 à -16 %	Donnelly-Vanderloo et al. (1994)
Cuisson hydrothermique	Haricots blancs	100 °C ; 10-40 min, dans de l'eau distillée/une mixture d'eau et d'huile (ratio graine/eau : 1/80 g/mL)	-11 à -85 %	Xue et al. (2011)
	Riz	Ebullition/durée non renseignée	-16 à -39 %	Wieringa et al. (2014)
Fractionnement	Riz	Degré de polissage : 10 %	-88 %	Monks et al. (2013)
	Blé	Séparation électrostatique des fractions de son de blé	-37 % à +23 %	Hemery et al. (2011)
Trempage	Haricots blancs	0-12 h ; ratio graine/eau à 1/3 ou 1/7	-1 à -45 %	Xue et al. (2011)
	Soja	24 h/30 °C dans de l'eau du robinet sans ajout de BL ou 16 h/20 °C dans de l'eau du robinet	-27 à -59 %	Mo et al. (2013)
Stockage	Niébé et gombo	Stocké en conserve pendant 3 à 24 semaines	-39 à -76 %	Sotiriadis and Hoskins (1982)
	Choux de Bruxelles	Pousses fraîches stockées à -21 °C pendant 31 à 188 jours	-6 à -48 %	Malin (1977)
	Différents légumes	3 à 12 mois/<-18 °C	0 à -99 %	Czarnowska and Gujska 2012
	Poudre de lait entier	60-70 °C/1 à 8 semaines	-53 à -100 %	Ford et al. (1983)
Germination	Grains de blé	20-35 °C ; 48 h	+200 à +336 %	Hefni and Witthöft (2011)
	Grains de Seigle	5- 25 °C ; 6 jours	+70 à +280 %	Kariluoto et al. (2006)
Fermentation	Lait écrémé fermenté	37 °C/14 à 40 h ; cultures pures de bactéries	-83 à +267 %	Crittenden et al. (2003)
	Togwa (bouillie à base de maïs)	30 °C/5 à 46 h ; cultures pures de levures	0 à +700 %	Hjortmo et al. (2008)

D'autres procédés peuvent permettre d'augmenter les teneurs en folates des aliments. Par exemple, lors de la germination des céréales et des légumineuses, des folates sont produits par les cellules végétales (Hefni and Witthöft, 2011; Hefni et al., 2015). La composition en vitamines des graines peut également évoluer durant la germination, et le 5-méthyltétrahydrofolate est généralement le vitamine principal en fin de germination (Koehler et al., 2007; Rychlik and Adam, 2008). Pendant la fermentation des aliments, les levures et certaines bactéries peuvent produire des folates et ainsi multiplier jusqu'à un facteur 7 la teneur en folates de l'aliment (Tableau 6), mais d'autres bactéries sont consommatrices de folates (LeBlanc et al., 2008; Moslehi-Jenabian et al., 2010). Les aliments fermentés ont un pH acide et la plupart des vitamines de folates sont moins stables à pH acide, et particulièrement pendant une cuisson ou en présence de cations métalliques. Ainsi, les folates produits par les micro-organismes, et particulièrement les folates réduits non substitués comme le tétrahydrofolate, pourraient être fortement dégradés dans le cas d'une étape de cuisson juste après une fermentation.

### **7-3- Absorption et biodisponibilité des folates**

La bioaccessibilité des folates peut être définie comme « la fraction qui est séparée de la matrice alimentaire et qui est accessible pour être absorbée au niveau intestinal », alors que la biodisponibilité sera définie comme « la fraction de nutriment ingéré qui est disponible pour être utilisée pour des fonctions physiologiques normales et pour le stockage » (Gregory III et al., 2005). Les folates sont absorbés principalement au niveau du jéjunum. Les vitamines de folates présents dans les aliments sont généralement des folylpolyglutamates qui doivent d'abord être déconjugués en monoglutamates pour être absorbés (Ball, 2005). La déconjugaison des folylpolyglutamates est contrôlée par la carboxypeptidase II (GCPII ; EC : 3.4.17.21), une enzyme présente au niveau de la bordure en brosse intestinale et stable à pH 6.5 (Chandler et al., 1986; Kanehisa et al., 2014). Les folates sont principalement absorbés par des transporteurs, même si, dans le cas de l'acide folique, une diffusion dans les cellules épithéliales est également possible lorsque les transporteurs sont saturés (Kelly et al., 1997; Zhao et al., 2011). D'après Reisenauer and Halsted (1987), la conjugase humaine est généralement présente en quantité suffisante au niveau de la bordure en brosse intestinale et donc n'est pas un facteur limitant pour l'absorption des folates. Les folates pourraient être synthétisés par certaines bactéries présentes dans le gros intestin, principalement sous la



forme de monoglutamates et pourraient ensuite être absorbés au niveau du côlon puis métabolisés (Rong et al., 1991).

Dans les matrices alimentaires, l'acide folique est à 85 % biodisponible (FAO/WHO, 2005). D'après différentes études, le taux de biodisponibilité des vitamines naturellement présents dans les aliments est compris entre 30 % et 98 % par rapport à l'acide folique pris comme référence (Brouwer et al., 1999, 2001; Hannon-Fletcher et al., 2004). Cependant, Gregory (2012) et McNulty and Pentieva (2004) ont mis en avant que la biodisponibilité des folates est un sujet complexe et que la variabilité observée pour les différents vitamines pourrait être due à i) l'utilisation d'essais biologiques sur des rongeurs, qui pourraient ne pas être adaptés pour l'estimation de la biodisponibilité des folates alimentaires chez l'humain, ii) les propriétés intrinsèques des matrices alimentaires citées ci-dessous, et iii) à des sensibilités différentes des divers vitamines aux pH acides rencontrés par exemple dans la phase gastrique.

En effet, la matrice alimentaire permettrait de protéger les folates contre la dégradation due à la lumière et aux agents oxydants, mais limiterait également la biodisponibilité des folates. Par exemple, Van het Hof et al. (1999) ont montré que la consommation de légumes finement hachés augmente de manière significative la teneur en folates du plasma en comparaison avec la consommation de légumes non hachés. La consommation d'aliments acides pourrait induire une diminution du pH du contenu du jéjunum en dessous du pH optimal de la GCPII. Cela pourrait donc induire une diminution de l'absorption des folates, à cause d'une déconjugaison incomplète des folylpolyglutamates au niveau de l'intestin. Par exemple, Tamura et al. (1976) ont observé que la biodisponibilité de folylpolyglutamates était inférieure à celle de l'acide folique dans du jus d'orange à pH 3,7, ou dans des solutions aqueuses contenant ou non de l'acide citrique. Au contraire, dans le jus d'orange ou dans les solutions aqueuses avec un pH ajusté à 6,4, la biodisponibilité des folylpolyglutamates n'était pas significativement différente de celle de l'acide folique. Toutefois, certains vitamines de folates sont instables à pH acide (Figure 4) et une dégradation de ces vitamines pourrait également expliquer la faible biodisponibilité observée à pH 3,7. La biodisponibilité des folates pourrait être diminuée ou augmentée par certains composés présents dans les aliments, tels que des cations métalliques (Ghishan et al., 1986). Par exemple, dans des conditions proches de la neutralité (pH=6,4) ou dans des conditions acides (pH=3,5), qui correspondent à des conditions physiologiques normales, les folates peuvent former des complexes avec le zinc (Lucock et al., 1994). De

nombreux composés présents dans les aliments sont suspectés de diminuer la biodisponibilité des folates en inhibant l'activité de la conjugase (Ball, 2005). Cependant, une activité de déconjugaison a été détectée dans certaines matières premières d'origine animale et végétale, telles que l'asperge et l'intestin de poulet respectivement (Leichter et al., 1979; Saini and Rosenberg, 1974). Ainsi, les folates présents dans ces aliments pourraient être davantage biodisponibles que dans d'autres aliments, car présents principalement sous la forme de monoglutamates.

#### **7-4- Méthodes de dosage des folates**

Pour déterminer si un aliment pourrait être une bonne source de folates, il est possible de doser les folates totaux dans l'aliment. Pour cela, il est recommandé d'utiliser la méthode de référence, basée sur un dosage microbiologique. Il est également possible de quantifier les différents vitamères pouvant être présents dans un aliment, en utilisant des méthodes de chromatographie liquide.

Quelle que soit la méthode utilisée, la première étape pour doser les folates dans des aliments consiste à extraire les folates de la matrice alimentaire et des cellules (végétales et/ou micro-organismes). Pour cela, une extraction tri-enzymatique est recommandée, en utilisant une amylase et une protéase pour déstructurer la matrice alimentaire, ainsi qu'une conjugase ( $\gamma$ -glutamylhydrolase) pour déconjuguer les chaînes de polyglutamates (Puwastien et al., 2005). En pratique, les échantillons sont tout d'abord chauffés dans un bain d'eau bouillante, ce qui permet à la fois de lyser les cellules et de cliver les liaisons entre les molécules de folates et certaines protéines (Hanson and Gregory, 2011). Ce chauffage présente aussi l'avantage de détruire les éventuelles enzymes qui pourraient intervenir dans la dégradation ou l'interconversion des vitamères de folates. Comme les folates peuvent s'oxyder et donc être dégradés plus rapidement à haute température, un tampon généralement constitué de HEPES/CHES, et contenant des antioxydants (2-mercaptoéthanol et acide ascorbique) est ajouté aux échantillons avant chauffage. Les pH des échantillons sont ensuite ajustés au pH optimal des enzymes ajoutées à l'étape suivante.

Dans le cas des aliments amylicés, comme les produits à base de céréale, l'amidon doit être hydrolysé pour une meilleure extraction des folates de la matrice alimentaire. C'est pourquoi

les échantillons sont incubés avec une  $\alpha$ -amylase. Une conjugase peut-être ajoutée en même temps que l' $\alpha$ -amylase, pour déconjuguer la chaîne de polyglutamate des folates. En effet, pour pouvoir être dosés, les folates doivent avoir moins de trois molécules de glutamate pour le dosage microbiologique à l'aide de la souche de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 et doivent être sous la forme de mono-glutamates pour les dosages par chromatographie. Une seconde incubation est ensuite réalisée en présence d'une protéase qui pourra finir de déstructurer la matrice alimentaire.

Les folates totaux extraits peuvent directement être dosés par méthode microbiologique. Cette méthode est basée sur l'utilisation de micro-organismes, comme *L. rhamnosus* ATCC 7469, dont la croissance dépend de la quantité de folates disponible dans le milieu. Plus précisément, une corrélation peut être établie entre la quantité de folates dans le milieu et la croissance de la souche, qui peut être mesurée par turbidimétrie. Toutefois, cette corrélation n'est observée que si les molécules de folates possèdent moins de trois unités de glutamate, car *L. rhamnosus* ATCC 7469 ne peut pas utiliser les autres formes. Une gamme de concentration en folates (généralement en acide folique) doit donc être réalisée lors de chaque série d'analyses. Cette méthode, bien qu'elle permette de quantifier de très faibles teneurs en folates, présente le désavantage d'être chronophage (l'analyse complète prend deux jours).

Pour doser les différents vitamines par chromatographie liquide, il est également nécessaire de réaliser préalablement une extraction enzymatique, puis les extraits de chaque échantillon doivent être purifiés pour éviter l'apparition de pics parasites sur les chromatogrammes (Kariluoto et al., 2001; Konings, 1999). Pour cela, des protéines capables de se lier aux folates (folate binding protein - FBP) extraites du lait bovin peuvent être utilisées. Ces FBP sont greffées à une matrice d'agarose puis immobilisées sur une colonne de chromatographie et l'échantillon à analyser est passé sur cette même colonne. L'échantillon purifié peut ensuite être analysé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), ou à ultra haute performance (UPLC) en utilisant des solutions pures de chaque vitamine comme standards. Le coût élevé de cette méthode ne permet pas de l'utiliser en routine.

## 8- Production de folates par les micro-organismes

Les parties 5 et 6 ont permis de montrer que l’approvisionnement en folates alimentaires n’est pas toujours suffisant. Les produits laitiers et céréaliers semblent être des sources de folates intéressantes en Europe et en Afrique respectivement. Ces aliments sont souvent fermentés, par des BL seules ou en co-cultures avec d’autres micro-organismes, avant consommation. Dans la partie suivante, nous allons discuter du potentiel des BL à augmenter les teneurs en folates des aliments fermentés.

### 8-1- Voie de biosynthèse des folates

La voie de biosynthèse générale des folates, avec en indication les enzymes présentes chez *L. plantarum* WCFS1, est présentée dans la Figure 5. Cette voie de biosynthèse est similaire à celle des cellules végétales et d’autres micro-organismes tels que les levures. D’après d’autres données récoltées sur la base de données KEGG (Kanehisa et al., 2014), l’essentiel des BL seraient incapables de produire des folates à cause de l’absence de certains gènes codant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des folates.

Il existe 17 réactions enzymatiques impliquées dans la voie de biosynthèse *de novo* des folates, ou 45 en considérant la synthèse des différents vitamères à partir du dihydrofolate (Kanehisa et al., 2014). Trois molécules sont généralement considérées comme des précurseurs de la synthèse des folates : l’acide para-aminobenzoïque (PABA), la guanosine triphosphate (GTP), et le glutamate. La voie de biosynthèse des folates peut être décrite en trois étapes : i) la conversion du D-érythrose-4-phosphate ou du phosphoénolpyruvate en PABA, ii) la conversion du GTP en 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxyméthyl-7,8-difhydropteridine-P2 (noyau ptéridine) et iii) la liaison entre le noyau ptéridine, le PABA et les unités de glutamates.

D’après la Figure 5, *L. plantarum* WCFS1, une souche de référence capable de produire des folates, n’a pas tous les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des folates. En effet, dans la première étape (correspondant à la synthèse de PABA), cette souche et d’autres BL de différents genres et espèces ont généralement tous les gènes impliqués dans la synthèse du PABA, excepté deux gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse du 4-amino-4-

deoxychorismate et du PABA à partir du chorismate (Kanehisa et al., 2014). Ces deux gènes ont été décrits dans la souche *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 : *pabA* (EC 2.6.1.85) et *pabC* (EC 4.1.3.38). Deux autres BL (*L. fermentum* IFO 3956 et *L. reuteri* JCM 1112), capables de synthétiser des folates *de novo*, ne possèdent ni les deux gènes précédemment cités, ni des gènes orthologues, ce qui suggère l'existence d'une voie alternative de biosynthèse du PABA dans ces souches (Kuratsu et al., 2010; Satoh et al., 2014). De plus, au moins un gène codant une enzyme impliquée dans la deuxième étape (i.e. la synthèse de la dihydronéoptéridine phosphate et de la dihydronéoptéridine à partir de la 7,8- dihydronéoptéridine 3'-triphosphate) est absent du génome de *L. plantarum* WCFS1 et d'autres BL appartenant à d'autres genres. Ces réactions pourraient être catalysées par des phosphatases non spécifiques qui peuvent être synthétisées par des BL et notamment par les *L. plantarum* (Zamudio et al., 2001). Les gènes impliqués dans la troisième étape sont généralement retrouvés chez toutes les BL (Kanehisa et al., 2014). En complément, il a été montré que les deux protéines hydroxyméthyl-dihydroptérine pyrophosphokinase (EC 2.7.6.3) et dihydroptéroate synthase (2.5.1.15) peuvent être utilisées comme des indicateurs de la synthèse de folates. En effet, une analyse génomique comparative a été réalisée à l'aide de centaines de génomes bactériens, et les gènes *folP* et *folK*, codant pour ces deux enzymes respectivement, ont été détectés chez tous les micro-organismes capables de synthétiser des folates *de novo*, mais sont généralement absents dans les génomes des micro-organismes incapables de produire des folates (de Crecy-Lagard et al., 2007).

D'après ces données de génétique, nous pouvons supposer que si certains précurseurs sont disponibles dans le milieu de culture ou dans l'aliment, de nombreuses BL seraient capables de synthétiser des folates. Donc ces résultats montrent que le potentiel de synthèse de folates par les BL a probablement été sous-estimé.

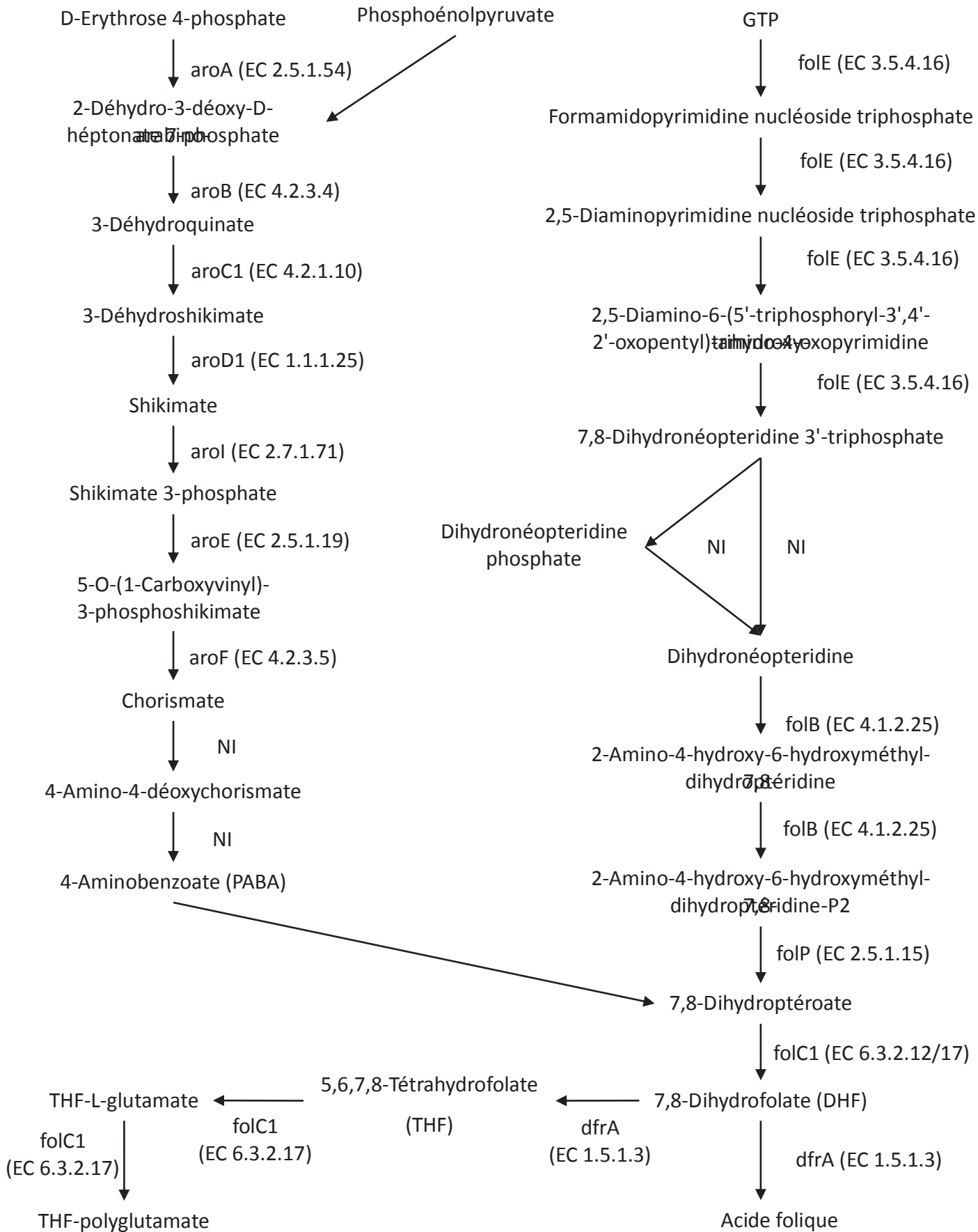


Figure 5 : Voie de biosynthèse générale des folates avec les enzymes présentes chez *L. plantarum* WCFS1, d'après la base de données KEGG (Kanehisa et al., 2014). NI : non identifié (pas d'information disponible sur le gène codant l'enzyme impliquée dans la réaction indiquée, chez *L. plantarum* WCFS1)

## 8-2- Synthèse de folates par les micro-organismes en milieu de culture

L'intérêt porté au potentiel de production de folates par les BL a augmenté de manière significative depuis l'an 2000 (Holasova et al., 2004; Lin and Young, 2000a, 2000b). En milieu de culture, la plupart des souches étudiées appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. L'intérêt porté à ces genres pourrait être dû i) à l'ubiquité des Lactobacilles, qui sont retrouvés dans une grande variété d'aliments, et ii) au caractère présumé probiotique des Bifidobactéries, qui pourraient être capable de produire des folates au niveau du côlon (Pompei et al., 2007). Le Tableau 7 donne une liste de toutes les espèces de BL testées en milieu de culture pour leur capacité à produire des folates. Les espèces les plus étudiées sont les *L. plantarum* et les *S. thermophilus* et les souches étudiées appartenant à ces deux espèces ont été isolées de différents aliments, tels que des produits laitiers, des légumes et des produits céréaliers.

Il n'est pas toujours possible de comparer les données de production de folates par les BL obtenues dans différentes études, du fait de différences dans les méthodes utilisées et de l'unité dans laquelle les résultats sont exprimés. Dans quelques articles, la production de folates a été mesurée dans la biomasse cellulaire et parfois aussi dans le surnageant du milieu de culture (D'Aimmo et al., 2012, 2014; Kariluoto et al., 2006a). Etant donné que la quantité de biomasse n'était pas renseignée dans ces études, la production totale de folates ne peut pas être estimée et donc ces résultats ne peuvent pas être comparés à ceux présentés dans le Tableau 7. Cependant, ces études donnent des résultats très intéressants qui peuvent être comparés avec les valeurs de production de folates en milieu de culture par les levures. Par exemple, la production de folates dans un milieu dépourvu de folates par 10 souches de *Bifidobacterium* variait de 500 à 9500 µg/100g de matière sèche (MS) de la biomasse cellulaire (D'Aimmo et al., 2012). La production de folates dans un milieu synthétique par 25 souches de *Saccharomyces cerevisiae* variait de 4000 à 14500 µg/100g MS de biomasse cellulaire (Hjortmo et al., 2005). Donc dans certaines conditions, la production de folates par les BL pourrait être similaire à celle des levures.

**Tableau 7: Espèces de bactéries lactiques capables de produire des folates en milieu de culture**

Espèces	Milieu (nombre de souches étudiées)	Production de folates (ng/mL)	Références
<i>B. adolescentis</i>	MRS (n=1)	-50 à 150	(Padalino et al., 2012)
	SM7 (n=10)	1 à 65	(Pompei et al., 2007)
<i>B. animalis</i>	SM7 (n=7)	26	(Pompei et al., 2007)
<i>B. bifidum</i>	SM7 (n=6)	1	(Pompei et al., 2007)
<i>B. breve</i>	SM7 (n=15)	1 à 3	(Pompei et al., 2007)
<i>B. catenulatum</i>	MRS (n=1)	0 à 25	(Padalino et al., 2012)
	SM7 (n=1)	3	(Pompei et al., 2007)
<i>B. dentium</i>	SM7 (n=1)	29	(Pompei et al., 2007)
<i>B. longum</i>	MRS (n=2)	10 à 30	(Lin and Young, 2000a)
	SM7 (n=17)	2	(Pompei et al., 2007)
<i>B. pseudocatenatum</i>	SM7 (n=3)	12 à 82	(Pompei et al., 2007)
<i>L. acidophilus</i>	FFM (n=8)	0 à 38	(Laiño et al., 2014)
	MRS (n=3)	1 à 20	(Lin and Young, 2000a; Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=5)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. amylovorus</i>	FFM (n=1)	75 à 87	(Laino et al. 2014)
<i>L. brevis</i>	SWP (n=9)	0 à 150*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. buchneri</i>	SWP (n=1)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. casei</i>	FFM (n=4)	0 à 2	(Laino et al. 2014)
	MRS (n=2)	-63 à -13	(Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=19)	0 à 20*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. coryniformis</i>	FFM (n=2)	80 à 100	(Masuda et al., 2012)
<i>L. curvatus</i>	SWP (n=6)	0 à 20*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. delbrueckii</i>	MRS (n=4)	-50 à 200	(Lin and Young, 2000a; Padalino et al., 2012; Sybesma et al., 2003a)
<i>L. fermentum</i>	FFM (n=15)	0 à 148	(Cárdenas et al., 2015; Laiño et al., 2014; Masuda et al., 2012)
	SWP (n=24)	-10 à 116*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. fructivorans</i>	SWP (n=1)	0 à 20*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. helveticus</i>	MRS (n=2)	2 à 89	(Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=3)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. johnsonii</i>	MRS (n=1)	28	(Nor et al., 2010)
<i>L. paracasei</i>	FFM (n=12)	0 à 40	(Laino et al., 2014)
	SWP (n=18)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. pentosus</i>	FFM (n=2)	0 à 4	(Masuda et al., 2012)



Tableau 7 : suite

Espèces	Milieu (nombre de souches étudiées)	Production de folates (ng/mL)	Références
<i>L. plantarum</i>	CDM (n=1)	36 à 60	(Nor et al., 2010)
	FFM (n=30)	0 à 108	(Laiño et al., 2014; Masuda et al., 2012)
	MRS (n=2)	-10 à 9030	(Hugenschmidt et al., 2011; Padalino et al., 2012; Park et al., 2014)
	SWP (n=28)	0 à 4413	(Hugenschmidt et al., 2010, 2011)
<i>L. reuteri</i>	CDM (n=1)	59	(Santos et al., 2008)
	SWP (n=3)	0 à 125*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. rhamnosus</i>	SWP (n=1)	-10 à 0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
	YPD (n=3)	<0*	(Herranen et al., 2010)
<i>L. sakei</i>	FFM (n=2)	101 à 107	(Masuda et al., 2012)
<i>Lc. lactis</i>	M17 (n=16)	57 à 291	(Sybesma et al., 2003a)
	YPD (n=2)	<0*	(Herranen et al., 2010)
<i>Leuconostoc lactis</i>	MRS (n=1)	45	(Sybesma et al., 2003a)
<i>Ln. paramesenteroides</i>	MRS (n=1)	44	(Sybesma et al., 2003a)
<i>Pediococcus parvulus</i>	FFM (n=10)	40 à 60	(Masuda et al., 2012)
<i>P. pentosaceus</i>	FFM (n=3)	0 à 40	(Masuda et al., 2012)
<i>S. thermophilus</i>	FFM (n=51)	0 à 170	(Laiño et al., 2012)
	MRS (n=1)	0 à 200	(Padalino et al., 2012)
	M17 (n=2)	4 à 202	(Lin and Young, 2000a; Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=33)	0 à 50*	(Hugenschmidt et al., 2010)
	YPD (n=1)	100 à 190	(Herranen et al., 2010)
<i>W. confusa</i>	FFM (n=1)	0 à 20	(Masuda et al., 2012)

MRS : de Man Rogosa et Sharp; YPD : extrait de levure, peptone, dextrose; SWP : perméat de lactosérum supplémenté, CDM : milieu chimiquement défini; TPY : tripticase, phytone, extrait de levure; FFM : milieu dépourvu de folates. \* : production extracellulaire seulement.

Le Tableau 7 montre que les folates peuvent être soit consommés, soit produits de manière très variable selon le milieu de culture et les souches de BL utilisées. Les plus fortes productions de folates en milieu de culture retrouvées dans la littérature sont dues à la souche *L. plantarum* JA71 (9030 ng/mL) dans du MRS (Park et al., 2014) et à la souche *L. plantarum* SM39 (4413 ng/mL) dans un perméat de lactosérum supplémenté (Hugenschmidt et al., 2011). La production de folates dépend en partie de la cinétique de croissance et des conditions de culture, en plus d'être un caractère souche dépendant. Par exemple, parmi huit souches de *L. acidophilus*, seulement deux étaient capables de se développer et de produire des folates après sept passages à 37 °C pendant 16 h, dans un milieu initialement dépourvu de folates (Laiño et al., 2014). D'après différentes études, les folates peuvent être synthétisés pendant la phase exponentielle de croissance, ou en début de phase stationnaire, pour être ensuite consommés (D'Aimmo et al., 2012; Iyer et al., 2010; Laiño et al., 2012, 2014; Padalino et al., 2012). De plus, la production de folates semble dépendre de la composition du milieu (Nor et al., 2010). Par exemple, la forte production de folates par la souche *L. plantarum* SM39 a été obtenue dans un milieu supplémenté avec 10 mg/L de PABA (Hugenschmidt et al., 2011), qui est considéré comme le précurseur limitant de la synthèse des folates par certains auteurs (Sybesma et al., 2003a). Les BL peuvent également produire de grandes quantités de folates dans des milieux où des folates sont présent dès le départ (Lin and Young, 2000a; Padalino et al., 2012; Sybesma et al., 2003a). Ainsi, pour sélectionner des souches productrices de folates, il est important de prendre en compte tous ces éléments.

L'étude de la synthèse de folates par des BL en milieu de culture est utile pour comprendre l'influence de différents paramètres, mais pourrait ne pas être adaptée à la sélection de souches dans le but d'enrichir des aliments en folates. En effet, différentes études ont montré que la composition du milieu a un impact sur la synthèse de folates. Donc, pour sélectionner des souches productrices de folates, il serait préférable d'étudier la production de folates par ces souches dans l'aliment considéré, ou au moins dans un milieu de culture avec une composition proche de l'aliment.

### **8-3- La biofortification des aliments à l'aide des micro-organismes**

Le Tableau 8 résume les résultats des études menées sur la production de folates par les BL dans les aliments. Dans au moins 11 études sur 18 une augmentation de la teneur en folates a été observée. La plupart des études ont été menées sur les produits laitiers, et dans une

moindre mesure sur les produits céréaliers et sur les légumes. Ce n'est pas représentatif de la grande variété d'aliments fermentés existant au niveau mondial. En particulier, les produits laitiers fermentés sont principalement consommés dans les pays développés, alors que les produits fermentés à base de céréales sont nettement plus consommés en Afrique. La production de folates dans les produits laitiers par des cultures pures de souches de BL a déjà fait l'objet d'une revue de la littérature (LeBlanc et al., 2008). D'après le Tableau 8, des co-cultures de souches de BL peuvent également être utilisées pour produire des folates dans les aliments. Par exemple, la production de yaourt nécessite l'utilisation de *S. thermophilus* et *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus*. Ces deux BL sont capables de produire des folates, même si d'après certains auteurs les *S. thermophilus* produisent les folates, alors que *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* les consomment (Van Hylckama Vlieg and Hugenholtz, 2007).

Peu d'études ont eu pour objectif d'étudier la production de folates par les micro-organismes dans les produits céréaliers fermentés. La plupart de ces études portaient sur la production de folates par les levures (Hjortmo et al., 2008a, 2008b), mais deux études ont montré que la teneur en folates de levains à base de seigle ou de d'avoine était augmentée lors d'une fermentation par des BL (Kariluoto et al., 2006a, 2014). Les études résumées dans le Tableau 8 ont montré que les BL peuvent produire entre 2 et 16  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH dans les aliments. En comparaison, d'après deux études, les levures peuvent produire entre 9 et 17  $\mu\text{g}/100\text{g}$  BH dans différentes matrices céréalières (Kariluoto et al., 2006a; Korhola et al., 2014). Donc les BL sont capables de produire des quantités de folates, dans les aliments, similaires à certaines levures. Il serait intéressant de réaliser davantage d'études sur la production de folates par les BL en co-culture ou non avec les levures.

**Tableau 8 : Production de folates par les BL dans des aliments fermentés, en l'absence d'autres micro-organismes. ND : non déterminé. \* Les valeurs de teneurs en folates sont exprimées dans la base humide**

Matière première		Aliment fermenté		Portion pour couvrir 10 % de la RNI pour une femme enceinte	Micro-organismes producteurs de folates	Référence
Type d'aliment	Teneur en folates*	Nom	Teneur en folates*			
Céréales	ND	Levain d'avoine	15-17 µg/100g	353-400 g	<i>L. rhamnosus</i>	(Kariluoto et al., 2014)
Céréales	4-6 µg/100g	Levain de seigle	8-13 µg/100g	462-750 g	<i>S. thermophilus</i>	(Kariluoto et al., 2006a)
Légumes	15-16 µg/100g	Mélange de betteraves fermentées	10-17 µg/100g	353-600 g	<i>L. plantarum, Lc. lactis, Ln sp.</i>	(Jägerstad et al., 2004)
Légumes	1±0.0 µg/100mL	Concombre fermenté	5-7 µg/100mL	857-1200 mL	<i>Lc. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri, 2011)
Fruits	1-2 µg/100mL	Jus de pastèque fermenté	2-3 µg/100mL	2000-3000 mL	<i>Lc. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri, 2011)
Lait	1-2 µg/100g	Lait fermenté	6-9 µg/100g	667-1000 g	<i>B. animalis and S. thermophilus</i>	(Crittenden et al., 2003)
Lait	2-3 µg/100g	Lait fermenté	3-6 µg/100g	1000-2000 g	<i>B. longum, S. thermophilus</i>	(Holasoova et al., 2005)
Lait	2-3 µg/100mL	Lait fermenté	5-10 µg/100mL	600-1200 mL	<i>B. longum</i>	(Lin and Young, 2000a)
Lait	3-5 µg/100 mL	Lait fermenté	25-28 µg/100mL	214-240 mL	<i>L. amylovorus, S. thermophilus and L. bulgaricus</i>	(Laiño et al., 2014)
Lait	ND	Lait fermenté	1-7 µg/100mL	857-6000 mL	<i>L. delbrueckii</i>	(Lin and Young, 2000b)
Lait	4-6 µg/100mL	Lait fermenté	8-18 µg/100mL	333-750 mL	<i>L. delbrueckii and S. thermophilus</i>	(Laiño et al., 2013)
Lait	Non détectable	Lait fermenté	6-7 µg/100g	857-1000 g	<i>L. lactis</i>	(Sanna et al., 2005)
Lait	ND	Lait fermenté	0.2-7 µg/100mL	857-30000 mL	<i>L. sp.</i>	(Dana et al., 2010)
Lait	11-12 µg/100g	Lait fermenté	12-13 µg/100g	462-500 g	<i>Lc. lactis</i>	(Ayad, 2009)
Lait	0.2-0.4 µg/100mL	Lait fermenté	0,2-2 µg/100mL	3000-30000 mL	<i>Lc. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri, 2011)
Lait	0.5-1 µg/100g	Lait fermenté	0.5-5 µg/100g	1200-12000 g	<i>S. thermophilus</i>	(Holasoova et al., 2004)
Lait	ND	Lait fermenté	2-5 µg/100mL	1200-3000 mL	<i>S. thermophilus</i>	(Iyer et al., 2011)
Lait	1-2 µg/100g	Lait fermenté	10-11 µg/100g	545-600 g	<i>S. thermophilus</i>	(Wouters et al., 2002)
Lait	4-5 µg/100g	Lait fermenté	5-20 µg/100g	300-1200 g	<i>S. thermophilus</i>	(Padalino et al., 2012)
Lait	2-3 µg/100mL	Lait fermenté	7-8 µg/100mL	750-857 mL	<i>S. thermophilus</i>	(Laiño et al., 2012)

Dans le but d'estimer si les aliments enrichis en folates, présentés dans le Tableau 8, peuvent être considérés comme de bonnes sources de folates, et pour estimer si l'augmentation de la teneur en folates dans ces aliments est suffisante pour couvrir les besoins nutritionnels, la quantité d'aliment qu'une femme enceinte doit ingérer pour couvrir ses besoins (en se basant sur la valeur de la RNI de 600 µg/jour) a été calculée. La plupart des valeurs obtenues ne sont pas réalistes. En effet, la quantité d'aliment que devrait consommer une femme enceinte par jour est parfois supérieure à 1kg pour certains aliments fermentés. Donc même si les BL sont capables d'augmenter de manière significative la teneur en folates des aliments, ce n'est pas toujours suffisant pour permettre de couvrir les besoins des populations. D'autres solutions permettant d'augmenter davantage la teneur en folates des aliments fermentés par les BL devraient être examinées plus en détail.

## **9- Pistes de recherche pour augmenter les teneurs en folates dans les aliments fermentés**

Les parties précédentes ont permis de mettre en évidence que la synthèse de folates par les BL dépend de la souche, de la durée de l'incubation et de la composition du milieu. Dans cette partie, nous allons étudier plus en détails ces paramètres et proposer des moyens d'optimiser la synthèse en folates par les BL dans les matrices alimentaires.

### **9-1- Sélectionner des souches productrices de folates et utiliser des co-cultures**

En plus de la sélection de souches capables de produire de grandes quantités de folates, l'utilisation de co-culture de BL pourrait être plus efficace que l'utilisation de cultures pures. Par exemple, dans du lait écrémé reconstitué, une co-culture de deux souches de *B. animalis* et *L. acidophilus* a produit 30 % de folates supplémentaire par rapport aux cultures pures de ces souches (Crittenden et al., 2003). Similairement, une co-culture de deux souches de *L. plantarum* et *P. freudenreichii* ont produit au moins 35 % de folates extracellulaires supplémentaires par rapport aux souches en cultures pures, dans du perméat de blé supplémenté (Hugenschmidt et al., 2011). Dans une autre étude, parmi plusieurs

combinaisons, la co-culture d'une souche de *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* avec deux souches de *S. thermophilus* a permis d'obtenir la plus forte teneur en folates dans du lait (Laiño et al., 2013). De même, parmi différentes combinaisons de souches, la co-culture d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et d'une souche de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* a permis d'obtenir la teneur en folates la plus élevée dans du fromage (Ayad, 2009).

Combiner des BL avec d'autres micro-organismes capables de synthétiser des folates, comme les levures, pourrait également être une piste intéressante pour augmenter les teneurs en folates des aliments. Peu d'études ont estimé l'impact de co-cultures de BL et de levures sur la teneur en folates d'aliments fermentés. Dans presque toutes ces études, les levures seules ou le microbiote naturel permettaient d'obtenir des teneurs en folates plus élevées que les co-cultures de souches sélectionnées. Par exemple, la co-culture de *L. rhamnosus* LC-705 et de *Saccharomyces cerevisiae* ABM5131, dans une solution de son d'avoine (3.5 %) supplémenté avec du glucose (2 %), a permis de produire six fois plus de folates que la BL seule, mais une quantité de folates similaire à la levure seule (Korhola et al., 2014). Dans une autre étude, la plus forte concentration en folates de levains produits à partir de farine de seigle a été obtenue avec le témoin non stérile (contenant des BL et des levures naturellement présentes) ou avec des monocultures de levures. Les concentrations en folates étaient significativement plus faibles avec les monocultures de BL (Kariluoto et al., 2006a). Sachant que de nombreux aliments fermentés, et en particulier ceux à base de céréales, sont fermentés principalement par des BL et dans une moindre mesure par des levures, il serait intéressant de mener davantage d'études sur le sujet.

D'après différentes revues, des techniques de génie génétique peuvent être utilisées pour obtenir des souches de BL capables de produire significativement plus de folates que la souche sauvage de départ. Ces souches modifiées peuvent même permettre d'obtenir des aliments plus riches en folates que si la souche sauvage avait été utilisée (Capozzi et al., 2012; LeBlanc et al., 2011a). De plus, il a été démontré que la consommation d'aliments fermentés avec des souches modifiées pour produire davantage de folates a permis d'augmenter le statut en folates de rats carencés (LeBlanc et al., 2010). Cependant, l'utilisation de micro-organismes modifiés génétiquement est limitée par la réglementation et des considérations éthiques.

Les BL ont évolué en relation avec leur habitat et leur capacité métabolique est le résultat à la fois d'une perte importante de gènes et de l'acquisition de gènes clés grâce à des transferts horizontaux de gènes (Makarova et al., 2006). Ainsi, isoler des souches provenant de différentes niches écologiques pourrait être un moyen d'obtenir des BL capables de produire de grandes quantités de folates sans avoir à les modifier génétiquement. Par exemple, les deux gènes *folK* (EC 2.7.6.3) et *folP* (EC 2.5.1.15) ont été détectés dans 96 souches de BL isolées d'échantillons de bouillies à base de mil (Turpin et al., 2011). D'après ces résultats, nous pouvons supposer que certaines de ces BL seront potentiellement capables de produire de grandes quantités de folates. Les BL des aliments céréaliers fermentés traditionnels africains n'ont été que peu étudiées pour la sélection de souches productrices de folates, mais nous pouvons supposer que de nombreuses souches intéressantes restent à découvrir. En complément, exercer une pression de sélection lors de l'isolement des BL en utilisant un milieu dépourvu de folates pourrait être un moyen de trouver des souches naturellement productrices de folates.

En plus de sélectionner des souches de BL capables de synthétiser de grandes quantités de folates, il serait intéressant de sélectionner celles qui produisent principalement les vitamères les plus stables. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, différentes étapes des procédés de transformation des aliments peuvent induire des pertes de folates par oxydation ou d'autres réactions. C'est notamment le cas lorsque l'aliment est fragmenté avant la fermentation (les folates seront donc plus exposés à la lumière et aux composés oxydants pendant la durée de cette étape), et lorsque l'aliment est cuit et/ou stocké après la fermentation. D'après les quelques données disponibles dans la littérature, la production de vitamères semble être une caractéristique variable d'une souche à l'autre (D'Aimmo et al., 2012). En effet, le 5-méthyltétrahydrofolate semble être le vitamère majoritairement produit par les BL, mais certaines BL peuvent produire principalement du tétrahydrofolate (D'Aimmo et al., 2014; Lin and Young, 2000a). D'après la Figure 4, différents vitamères, et notamment le tétrahydrofolate, peuvent être oxydés à pH acide. Dans le cas du tétrahydrofolate, cette oxydation à pH acide peut conduire au clivage de la molécule de folate et donc à une perte de l'activité vitaminique. Ainsi, la diminution de pH lors de la fermentation des aliments pourrait induire une interconversion, voire une dégradation des folates produits par les micro-organismes. Comme le 5-méthyltétrahydrofolate est plus stable que le tétrahydrofolate, il pourrait être intéressant, au moins dans certains aliments fermentés, de privilégier l'utilisation

de souches produisant principalement ce vitamère, et éventuellement au détriment de souches capables de synthétiser de plus grandes quantités de folates, mais principalement du tétrahydrofolate.

### **9-2- Optimiser la durée de l'étape de fermentation**

Comme nous l'avons vu précédemment, la production de folates par les BL varie en fonction du temps d'incubation. Par exemple, avec une souche de *L. plantarum*, la plus forte teneur en folates a été obtenue en début de phase stationnaire dans un milieu initialement dépourvu de folates (Masuda et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus avec une co-culture d'une souche de *L. plantarum* et d'une souche de *Propionibacterium* dans un milieu semi-synthétique contenant du perméat de lactosérum (Hugenschmidt et al., 2011). Au contraire, avec des souches de *Bifidobacterium* en mono-cultures, dans un milieu initialement dépourvu en folates, ou en co-culture avec des souches de *S. thermophilus*, dans du lait allégé reconstitué, ont atteint la plus forte teneur en folates pendant la phase de croissance exponentielle (D'Aimmo et al., 2012; Lin and Young, 2000a). De plus, la production des vitamères de folates varie avec le temps pour une même souche de levure, et nous pouvons supposer que c'est également le cas pour les BL (Kariluoto et al., 2014). Ces résultats indiquent que la durée de la fermentation devrait être optimisée pour chaque aliment fermenté.

### **9-3- Ajouter des précurseurs de la synthèse de folates**

Comme nous l'avons vu précédemment, les trois principaux précurseurs de la synthèse des folates sont : l'acide para-aminobenzoïque (PABA), la guanosine triphosphate (GTP) et le glutamate (Kanehisa et al., 2014). D'après la base de données KEGG (Kanehisa et al., 2014), de nombreuses BL seraient incapables de synthétiser le PABA. Le GTP est une molécule essentielle synthétisée par toutes les BL et donc n'est généralement pas considéré comme un facteur limitant dans la synthèse des folates. C'est probablement la raison pour laquelle seul l'effet du PABA, et parfois du glutamate, sur la production de folates par les BL a été étudié (Gangadharan and Nampoothiri, 2011; Hugenschmidt et al., 2011; Nor et al., 2010; Pompei et al., 2007; Santos et al., 2008; Sybesma et al., 2003a).



Même si de nombreuses BL sont capables de produire du PABA malgré l'absence des gènes *pabA* (EC 2.6.1.85) et *pabC* (EC 4.1.3.38) dans leur génome, beaucoup de BL ont besoin de PABA dans le milieu pour pouvoir produire des folates, ou pour pouvoir en produire davantage. Par exemple, (Sybesma et al., 2003a) ont montré que la plus forte production de folates dans un milieu chimiquement défini a été obtenue après l'ajout de 14 mg/L de PABA. Dans une autre étude, la concentration optimale en PABA dans du MRS modifié était proche de 1 mg/L pour une souche de *L. plantarum* (Nor et al., 2010). Lors de ces deux études, des concentrations optimales en PABA très différentes ont été obtenues, ce qui peut s'expliquer par différentes raisons. En effet, toutes les souches n'ont pas les mêmes besoins en PABA pour synthétiser des folates. Par exemple, il a été montré dans un milieu semi-synthétique dépourvu en folates que la concentration en PABA nécessaire pour la production de folates varie de 0,04 mg/L à 1,37 mg/L pour différentes souches de *Bifidobacterium* (Pompei et al., 2007). Le contenu initial en PABA des milieux riches tels que le MRS et les matrices alimentaires peuvent limiter la quantité de PABA à ajouter pour augmenter la production de folates.

Dans du lait écrémé, la concentration optimale en PABA ajouté était 10 mg/L pour une souche de *Lc. lactis* (Gangadharan and Nampoothiri, 2011). La même concentration optimale a été obtenue dans du jus de concombre pour une souche sauvage et une souche mutante de *L. reuteri*, permettant de multiplier la production de folates par deux et par cinq respectivement (Santos et al., 2008). Cependant, il est important de souligner qu'une trop forte concentration en PABA peut inhiber la production de folates (Pompei et al., 2007). Ainsi, il serait intéressant de mesurer la concentration en PABA de l'aliment étudié avant d'essayer d'augmenter sa concentration en folates à l'aide des BL.

D'après différentes études, l'addition de glutamate peut également permettre d'augmenter la production de folates par les BL. Par exemple, la production de folates par une souche de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* a été augmentée par l'ajout de glutamate (10 mg/L) dans du lait écrémé (Gangadharan and Nampoothiri, 2011). Cependant, le ratio PABA/glutamate semble avoir une importance. En effet, la production de folates par une co-culture de *L. plantarum* et de *P. freudenreichii* dans du perméat de lactosérum a été multipliée par dix suite à l'ajout de PABA (10 mg/L), mais l'ajout de glutamate (10 mg/L) en plus du PABA a légèrement diminué ce rendement. L'impact du ratio PABA/glutamate sur la production de folates par les BL

mériterait de faire l'objet de futures études. Toutefois, nous pouvons nous demander si l'ajout de ces précurseurs dans des produits alimentaires est réellement envisageable. Par exemple, d'après Ende (2015), la consommation de fortes doses de glutamate pourrait augmenter l'impulsivité et l'anxiété.

#### **9-4- Optimiser la composition du milieu**

Quelques études ayant pour objectif de mieux comprendre la production de folates dans des milieux de cultures ont étudié des paramètres autres que ceux précédemment cités. Par exemple, il a été démontré avec une souche de *S. thermophilus* que le taux de croissance est inversement corrélé avec la production de folates (Sybesma et al., 2003a). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de croissance comme le NaCl pourrait augmenter la production de folates par les BL. Pourtant, une autre étude a montré que l'utilisation de certains prébiotiques comme le sorbitol et le mannitol peut augmenter la production de folates par les BL (Gangadharan and Nampoothiri, 2011). Les sources de carbone et d'azote pourraient également jouer un rôle dans la production de folates par les BL. En effet, Nor et al. (2010) ont montré dans du MRS modifié que le lactose était une meilleure source en carbone pour la production de folates que le glucose et le maltose pour une souche de *L. plantarum*. Cependant, la concentration optimale en lactose semble varier d'une souche à l'autre (Iyer et al., 2010; Tomar et al., 2009). De l'extrait de viande était une meilleure source d'azote pour la production de folates que l'extrait de levure pour la souche précédente de *L. plantarum* (Nor et al., 2010). L'impact des inhibiteurs de croissance et des sources nutritives sur la production de folates par les BL mériterait de faire l'objet de futures études.

#### **9-5- Limiter les pertes lors des procédés**

Pour augmenter les teneurs en folates des aliments fermentés, il est également possible d'agir sur les étapes avant et après la fermentation. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, lors des procédés de préparation des aliments fermentés, les folates sont exposés à différents facteurs qui peuvent induire une diminution de la teneur en folates. Par exemple, limiter l'exposition à la lumière des produits alimentaires au cours des procédés, et particulièrement après une fragmentation des matières premières, pourrait permettre de limiter les pertes en folates. Une cuisson de l'aliment après fermentation pourrait induire une diminution de la

teneur en folates, mais aussi augmenter la biodisponibilité des folates. Il serait intéressant d'étudier l'impact de toutes les étapes du procédé sur la teneur en folates d'un aliment fermenté donné. L'étape qui a le plus fort impact sur la teneur en folates pourrait ainsi être déterminée et des modifications du procédé pourraient être envisagées en conséquence.

## **Chapitre 3 : Matériel et méthodes**



# 1- Méthodes microbiologiques

## 1-1- Milieux de culture et d'incubation

**Milieu MRS** (De Man et al., 1960) :

Le milieu De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) a servi au dénombrement et à la culture des bactéries lactiques (BL). La composition de ce milieu est donnée dans le Tableau 9. Pour préparer un litre de milieu MRS liquide, il faut solubiliser 55 g de poudre commerciale (MRS, Difco, Sparks, MD, USA) dans un litre d'eau Milli-Q. Le milieu homogénéisé est ensuite stérilisé à 121 °C pendant 15 min. Pour préparer 1 L de MRS gélosé, il suffit de préparer 1 L de MRS liquide en rajoutant 15 g d'agar (Agar, Difco, Sparks, MD, USA) avant la stérilisation.

**Tableau 9 : Composition du milieu MRS**

Ingrédient	g/L
Peptone de protéase	10,00
Extrait de bœuf	10,00
Extrait de levure	5,00
Dextrose (glucose)	20,00
Polysorbate 80	1,00
Citrate d'ammonium	2,00
Acétate de sodium	5,00
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	0,10
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> )	0,05
Phosphate dipotassique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,00

Le MRS est un milieu qui favorise la croissance des BL, mais sur lequel d'autres micro-organismes, comme les levures, peuvent se développer. Ainsi, pour dénombrer les BL d'un échantillon contenant un microbiote complexe, comme un aliment par exemple, il faut ajouter un antifongique au milieu MRS. Dans le cadre de certaines expériences de cette étude, le milieu MRS a été supplémenté avec du Delvocid (200 mg/mL).

**Milieu YGC** (Yeast extract, Glucose, Chloramphenicol) :

Le milieu YGC (Extrait de levure, glucose, chloramphenicol) a été utilisé pour la culture et le dénombrement spécifique des levures. La composition de ce milieu est présentée dans le Tableau 10. Pour préparer un litre de milieu YGC liquide, il faut dissoudre 40,1 g de poudre commerciale (Oxoid, France) dans un litre d'eau Milli-Q. Le milieu homogénéisé est ensuite stérilisé à 121 °C pendant 15 min. Pour préparer 1 L de YGC gélosé, il suffit de préparer 1 L de YGC liquide en rajoutant 15 g d'agar (Agar, Difco, Sparks, MD, USA) avant la stérilisation.

**Tableau 10 : Composition du milieu YGC**

Ingrédient	g/L
Extrait de levure	5,00
Glucose	20,00
Chloramphénicol	50

Le YGC est un milieu qui favorise la croissance des levures, mais sur lequel d'autres micro-organismes, comme les BL, peuvent se développer. Ainsi, pour dénombrer les levures d'un échantillon contenant un microbiote complexe, comme un aliment par exemple, il faut ajouter un antibiotique au milieu YGC. Dans le cadre de certaines expériences de cette étude, le milieu YGC a été supplémenté avec du Cloramphenicol (50 mg/mL).

**Milieu PCA** (Plate Count Agar) :

Le milieu PCA (gélose glucosée à l'extrait de levure) a été utilisé pour la culture et le dénombrement des bactéries mésophiles aérobies. La composition de ce milieu est présentée dans le Tableau 11. Pour préparer un litre de milieu PCA gélosé, il faut dissoudre 23,5 g de poudre commerciale (PCA, Difco, Sparks, MD, USA) dans un litre d'eau Milli-Q. Le milieu homogénéisé est ensuite stérilisé à 121 °C pendant 15 min.

**Tableau 11 : Composition du milieu PCA**

Ingrédient	g/L
Tryptone	5,0
Extrait autolytique de levure	2,5
Glucose	1,0
Agar agar bactériologique	12,0

**Milieu dépourvu de folates** (folic acid casei medium ; FACM) :

**Tableau 12 : Composition du « folic acid casei medium »**

<b>Ingrédient</b>	<b>Quantité dans un litre</b>
Hydrolisat de caséine dépourvu de vitamines	10,0 g
Glucose	40,0 g
Acetate de sodium	40,0 g
Phosphate dipotassique	1,0 g
Phosphate monopotassique	1,0 g
DL-tryptophane	0,2 g
L-asparagine	0,6 g
L-chlorhydrate de cystéine	0,5 g
Sulfate d'adénine	10,0 mg
Guanine hydrochloride	10,0 mg
Uracile	10,0 mg
Xanthine	20,0 mg
Polysorbate 80	0,1 g
Glutathione (réduit)	5,0 mg
Sulfate de magnésium (anhydre)	0,2 g
Chlorure de sodium	20,0 mg
Sulfate de fer	20,0 mg
Sulfate de manganèse	15,0 mg
Riboflavine	1,0 mg
Acide para-aminobenzoïque	2,0 mg
Chlorhydrate de pyridoxine	4,0 mg
Chlorhydrate de thiamine	400,0 µg
Pantothénate de calcium	800,0 µg
Acide nicotinique	800,0 µg
Biotine	20,0 µg

Le FACM a été utilisé pour les dosages de folates totaux par méthode microbiologique. La composition de ce milieu est présentée dans le Tableau 12. Pour préparer 100 mL de milieu liquide, il faut dissoudre 7,05 g de milieu commercial en poudre (folic acid casei medium,



Difco, Sparks, MD, USA) dans de l'eau Milli-Q grâce à un chauffage et une agitation magnétique. Le milieu est refroidi dans de la glace avant d'ajouter 75 mg d'acide ascorbique et d'ajuster le pH à 6,1 avec de l'acide acétique. Le milieu est ensuite stérilisé sous hotte par filtration (0,22 µm).

### **Milieu de dilution**

Les dilutions ont été réalisées dans du NaCl 0,9 % (poids/volume dans de l'eau Milli-Q) stérilisé à 121 °C pendant 15 min.

### **1-2- Micro-organismes utilisés**

Les souches de référence *L. plantarum* ATCC14917T, *L. fermentum* ATCC14931, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC10880, *Pediococcus pentosaceus* ATCC43200 et *W. confusa* ATCC10881T ont été utilisées comme témoin pour les PCR quantitatives.

Les souches de référence *L. brevis* DSM1268, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. fermentum* IFO3956, *L. johnsonii* NCC533, *L. plantarum* A6, *L. plantarum* ATCC 14917, *L. plantarum* WCFS1, *L. reuteri* LMG9213T et *P. pentosaceus* ATCC25745 ont été utilisées comme témoin positif pour la recherche de gènes impliqués dans différentes fonctions d'intérêt nutritionnel. De plus, *L. plantarum* WCFS1 est une souche de référence capable de synthétiser des folates *de novo*, et dont le génome a été entièrement séquencé (Kleerebezem et al., 2003).

Pour les dosages de folates totaux par méthode microbiologique, la souche de référence *L. rhamnosus* ATCC 7469 a été utilisée. Au moins un cryotube par jour d'expérience est nécessaire. C'est pourquoi des lots de 200 cryotubes contenant tous la même concentration de la souche de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 ont été préparés. Pour cela, une boîte de MRS gélosée a étéensemencée par stries et incubée pendant 48 à 72 h à 37 °C. Une colonie isolée est ensuite inoculée dans 5 mL de MRS liquide stérile à l'aide d'une anse stérile. Le milieu inoculé est ensuite incubé 16 h à 37 °C. A la fin de l'incubation, du milieu « folic acid casei medium » supplémenté en acide folique a été préparé comme décrit précédemment (Chapitre 3, partie 1), mais en dissolvant 4,7 g de milieu dans 100 mL d'eau Milli-Q, et en ajoutant 25 mg d'ascorbate de sodium et 50 ng d'acide folique à la place des 75 mg d'acide ascorbique. Ces 100 mL de milieu ont ensuite été inoculés, avec 150 µL de la pré-culture de

*L. rhamnosus* ATCC 7469 dans le MRS liquide, et incubés 18 h à 37 °C. Après l'incubation, 100 mL de glycérol 80% (v/v) stérile ont été ajoutés au milieu qui a ensuite été aliquoté dans 200 microtubes de 1 mL. Les cryotubes ont été stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Pour les tests de production de folates dans les bouillies à base de mil, les souches *Pichia kudriavzevii* M28, *L. fermentum* 8.2 et *L. fermentum* 6.9 ont été utilisées. La levure *P. kudriavzevii* M28 fait partie d'une collection de 93 souches de levures isolées d'un aliment céréalier fermenté traditionnel de l'Afrique de l'Ouest. Les souches *L. fermentum* 8.2 et *L. fermentum* 6.9 font parties d'une collection de 155 BL isolées de bouillies à base de millet dans 12 unités de production à Ouagadougou (Tou et al., 2006; Turpin et al., 2011). Des tests réalisés en laboratoire par un stagiaire sur ces 155 souches de BL ont mis en évidence que *L. fermentum* 8.2 est la souche capable de produire la plus grande quantité de folates dans du MRS (121 ng de folates/mL), tandis que *L. fermentum* 6.9 est la souche qui en consomme le plus (-3 ng de folates/mL) (Almoussa-Almaksour, 2013; Berrazega, 2015).

Pour pouvoir être utilisée, chaque souche de BL, excepté *L. rhamnosus* ATCC 7469, a été réactivée par stries sur boîte de MRS gélosé à partir d'un cryotube. Après une incubation de 48 à 72 h à 37 °C, du MRS liquide (5 mL) a été inoculé à partir d'une colonie isolée. Après une seconde incubation d'une nuit à 37 °C, la pré-culture obtenue pouvait être utilisée.

## **2- Echantillonnage et préparation de bouillies à base de mil**

### **Echantillonnage de *ben-saalga* et de *ben-kida***

Dix unités de production traditionnelle de *ben-saalga* et/ou *ben-kida*, réparties dans dix arrondissements sur les douze à Ouagadougou, ont été sélectionnées aléatoirement. Pour chaque unité de production, cinq échantillons de bouillies cuites et prêtes à être consommées ont été collectés à différents jours. Les échantillons ont été conservés à -20 °C jusqu'aux extractions d'ADN et de folates. Les 50 échantillons de bouillies à base de mil ont été annotés d'une lettre allant de A à J (pour désigner l'unité de production), suivi d'un numéro allant de 1 à 5 (pour désigner le jour de prélèvement). Deux échantillons ayant le même numéro n'ont pas nécessairement été collectés le même jour.

### **Procédé de préparation du *ben-saalga***

Toutes les bouillies produites en laboratoire au cours de cette étude ont été préparées à partir de grains de mil (*Pennisetum glaucum*) achetés au marché à Ouagadougou. Du *ben-saalga* a été préparé en laboratoire selon deux procédés décrits dans la littérature (Figure 6). Une partie du *ben-saalga* a été produit selon un procédé (AP), basé sur le procédé traditionnel décrit par Tou et al. (2006), normalisé pour être utilisé en laboratoire (Tou et al., 2007a). Le procédé modifié (BP) consiste en une pré-cuisson du filtrat, suivie d'une inoculation par pied de cuve, c'est-à-dire en utilisant du filtrat fermenté naturellement (AP) (Tou et al., 2007a). Les drèches, qui sont retirées lors de l'étape de tamisage, correspondent principalement aux couches externes (son) des graines.

### **Procédé de préparation de bouillies simples**

Pour tester l'effet de la cuisson des bouillies sur l'extraction d'ADN, des bouillies ont été préparées en laboratoire en ajoutant 10 volumes d'eau à de la farine obtenue à partir de graines de mil entières et en chauffant le mélange à 80 °C pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, les bouillies ont été inoculées avec *L. plantarum* WCFS1 ou *L. fermentum* MW2 (I-2029) et fermentées pendant 16 h à 37 °C. Après fermentation, les bouillies ont été cuites (80 °C, 10 min). Des échantillons ont été prélevés avant et après la seconde étape de cuisson.

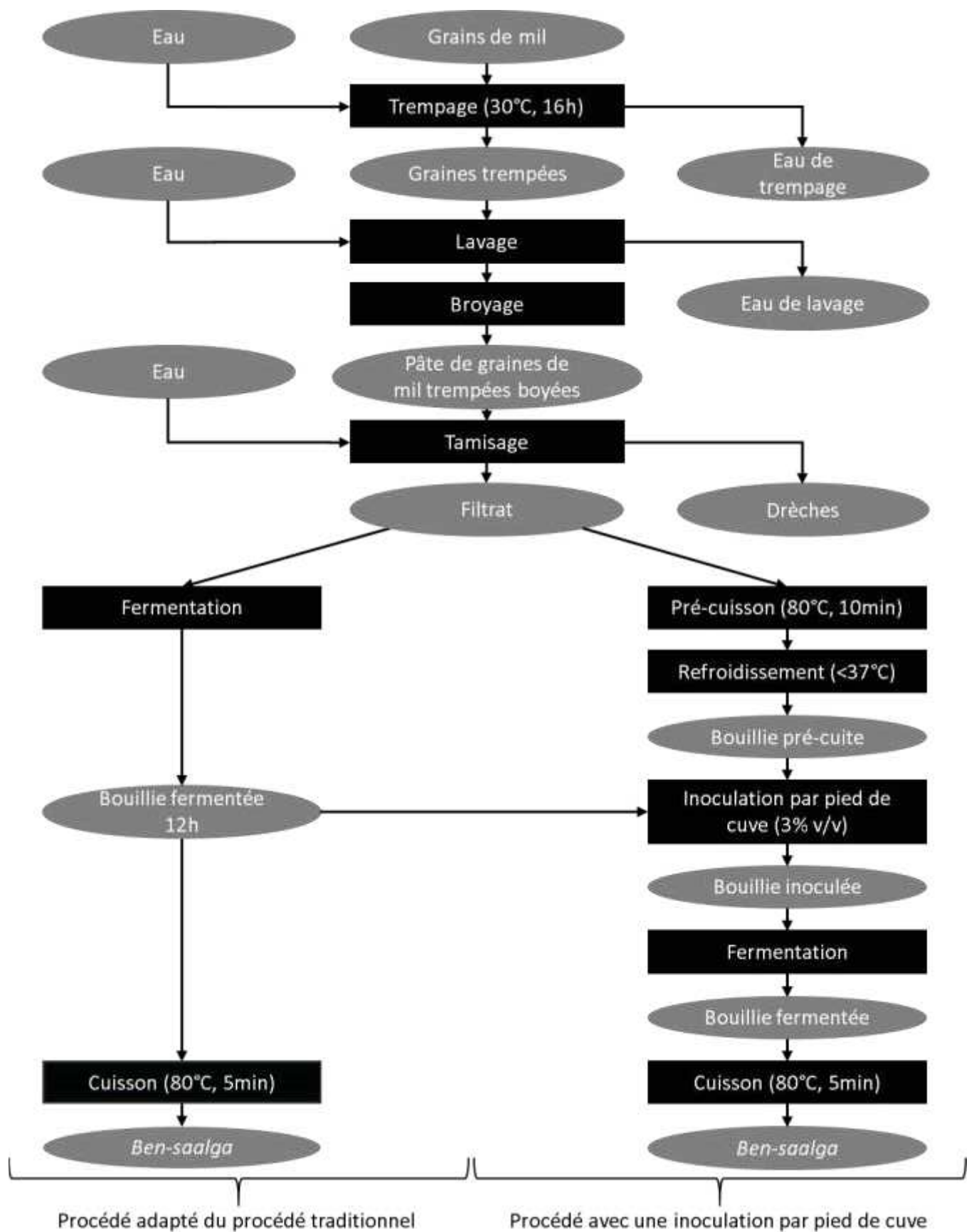


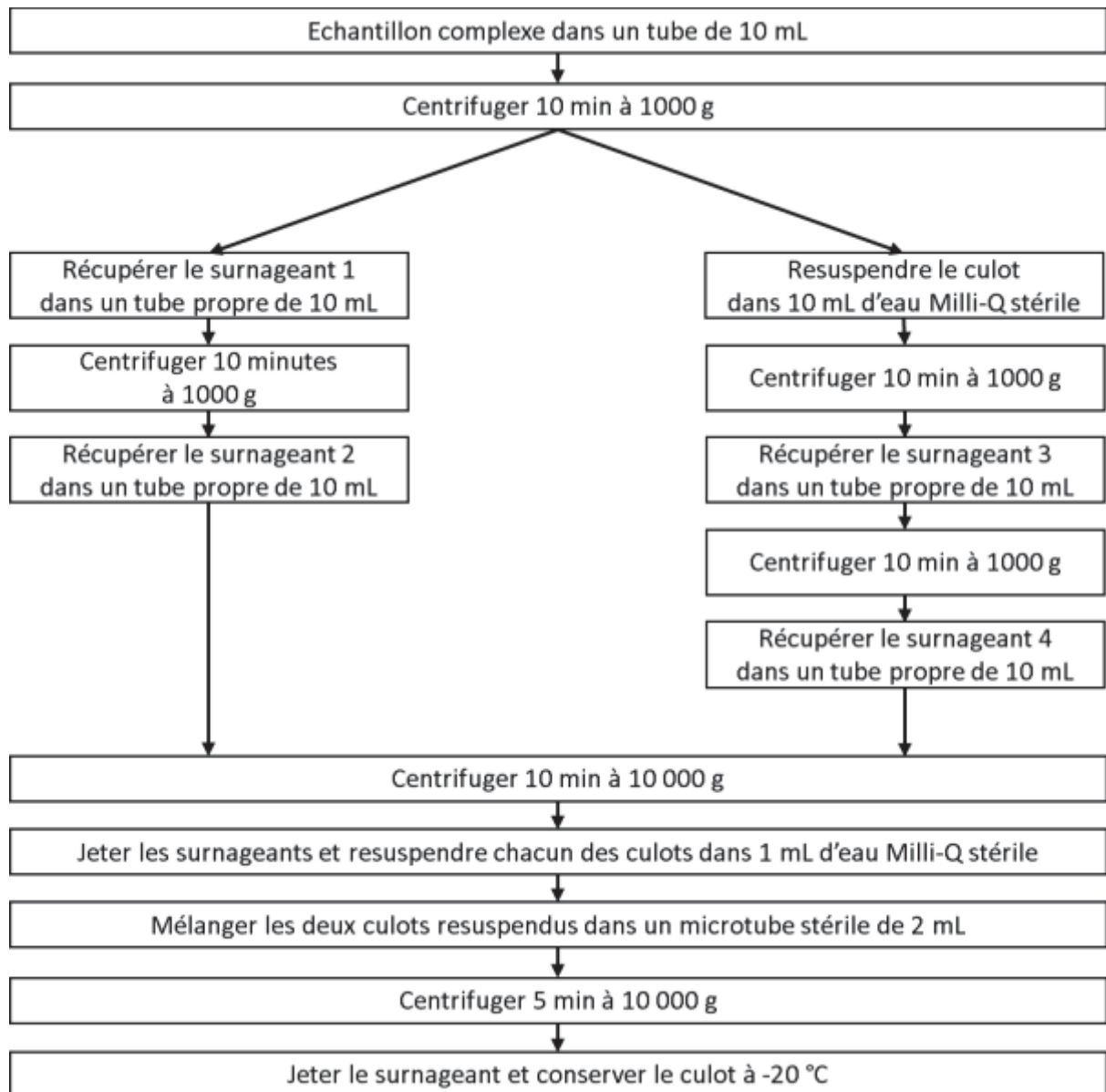
Figure 6 : Transformation du mil en *ben-saalga* selon un procédé adapté du procédé traditionnel (AP) et un procédé par inoculation par pied de cuve (PC)

### 3- Techniques moléculaires

#### 3-1- Extraction d'ADN

Des extractions d'ADN ont été réalisées sur des cultures de souches pures et sur des matrices alimentaires complexes (bouillies à base de mil). Quel que soit le type d'échantillon, l'extraction se déroule en deux étapes : une première étape qui consiste à concentrer les cellules bactériennes et une seconde étape qui consiste à extraire l'ADN des cellules. Dans le cas des cultures de souches pures, le culot bactérien est obtenu par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min. Dans le cas des matrices alimentaires complexes, des centrifugations différentielles, présentées dans la Figure 7, sont nécessaires pour éliminer la matrice alimentaire et obtenir un culot bactérien.

Une fois le culot bactérien obtenu, l'ADN total est extrait à l'aide du kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, Charbonnières, France). Pour cela, le culot bactérien est repris dans 480 µL d'EDTA 50 mM pH 8, puis 500 µL de billes de zirconium 0,1 mm (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutées. Ces billes permettent de réaliser une lyse mécanique des cellules (3 minutes à 30 Hz) à l'aide d'un Tissue Lyser (Quiagen). Une lyse enzymatique est ensuite appliquée grâce à l'addition de 120 µL de lysozyme à 20 mg/mL et de 10 µL de mutanolysine à 1 U/µL, suivi d'une incubation d'une heure à 37 °C. L'échantillon est ensuite chauffé à 80 °C pendant 5 minutes, après avoir ajouté 600 µL de « nuclei lysis solution ». Les ARN sont ensuite détruits grâce à l'ajout de 3 µL de RNase et une incubation d'une heure à 37 °C. Une centrifugation à 10 000 g pendant 5 min permet alors de récupérer un surnageant dépourvu d'ARN. Les protéines sont ensuite précipitées à l'aide de 200 µL de « protein precipitation solution » et éliminées grâce à une centrifugation de 3 minutes à 10 000 g. L'ADN est ensuite précipité à l'aide de 600 µL d'isopropanol, puis récupéré dans le culot bactérien après une centrifugation de 2 minutes à 10 000 g. Le culot d'ADN est ensuite rincé à l'éthanol 70 %, puis séché au speedVac® pendant au moins 20 minutes. Enfin, l'ADN est resuspendu dans 100 µL de « rehydratation solution » pendant une nuit à 4 °C.



**Figure 7 : Centrifugations différentielles d'échantillons complexes pour éliminer la matrice alimentaire et obtenir un culot bactérien**

### **3-2- Recherche de gènes impliqués dans des fonctions d'intérêt nutritionnel**

Une collection de gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation des tannins, le métabolisme de l'amidon, la synthèse de riboflavine et la synthèse de folates, a été recherchée dans les métagénomés des 50 échantillons de bouillies fermentées. Les paires d'amorces correspondantes à ces gènes ont été sélectionnées dans la littérature et sont présentées dans le Tableau 13. Comme la spécificité de ces amorces a déjà été vérifiée (Turpin, 2011), elles

n'ont été testées que sur l'ADN de témoins positifs, c'est-à-dire de micro-organismes de référence contenant le gène recherché, et sur des témoins négatifs (eau Milli-Q stérile).

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil Applied Biosystems Veriti™, d'après le procédé décrit précédemment par Turpin et al. (2011). L'ADN extrait (1 µL) a été ajouté à un milieu réactionnel (volume total : 25 µL) contenant 200 µM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,625 U de Taq DNA polymerase (Promega) et 1x taq buffer. Les conditions PCR utilisées sont les suivantes : une dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 5 minutes ; 40 cycles i) de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, ii) d'hybridation à une température (T<sub>m</sub>) dépendante de l'amorce utilisée pendant 10 secondes, iii) d'élongation à 72 °C pendant 15 secondes ; un cycle à 72 °C pendant 5 min. Les températures d'hybridation de chaque paire d'amorces sont présentées dans le Tableau 13.

### 3-3- Quantification de bactéries lactiques par PCR en temps réel

La fermentation du *ben-saalga* est due principalement à différentes bactéries, et en particulier à des BL appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*. Parmi les espèces du genre *Lactobacillus*, les deux espèces prédominantes sont *L. fermentum* et *L. plantarum*. Des amorces correspondant à ces groupes, genres et espèces ont été sélectionnées dans la littérature et vérifiées *in silico* (Table 14). D'autres BL constituent le microbiote de ces deux aliments fermentés, tels que les *Pediococcus*, les *Streptococcus* et les *Lactococcus* (Humblot and Guyot, 2009; Turpin et al., 2011). Les amorces testées pour détecter le genre *Pediococcus* permettent aussi de détecter l'espèce *L. plantarum* et n'ont donc pas été utilisées. Au moment de l'étude, aucune amorce n'a été trouvée dans la littérature pour la détection spécifique des genres *Streptococcus* et *Lactococcus*.

L'ADN des souches suivantes a été utilisé pour générer les matrices de quantification : *L. plantarum* ATCC14917T, *L. fermentum* ATCC14931, *Lc. mesenteroides* ATCC10880, *P. pentosaceus* ATCC43200, *W. confusa* ATCC10881T. L'ADN de chacune de ces souches a été extrait à partir d'une suspension de farine de mil dans de l'eau inoculée avec différentes concentrations de la souche. Les ADN extraits ont été analysés par PCR en temps réel en utilisant les amorces présentées dans le Tableau 14. Certaines amorces, indiquées dans le Tableau 14, ont dû être converties en leur complément inverse pour réaliser les PCR en temps

réel. De plus, pour vérifier que les amorces utilisées ne peuvent pas s'hybrider avec l'ADN chloroplastique, c'est-à-dire l'ADN contenu dans les cellules végétales, des suspensions non fermentées de mil et d'eau ont été cuites. L'ADN de ces bouillies a été extrait juste après l'étape de cuisson et toutes les amorces précédemment citées ont été testées avec cet ADN. Les valeurs des Ct obtenues étaient proches, voire supérieures à la valeur du Ct du témoin négatif. Dans certains cas, les valeurs des Ct obtenues avec l'ADN des bouillies simples étaient inférieures aux Ct obtenus avec l'ADN du témoin négatif et avec l'ADN de certains échantillons. Dans ces cas, la limite de détection a été fixée par rapport à la valeur de Ct obtenue avec l'ADN des bouillies simples.

Pour réaliser les réactions de PCR en temps réel, l'ADN extrait (5 µL) a été ajouté à un mix PCR (20 µL) contenant du « Mesa green q-PCR Master Mix Plus 1X » et 0,3 µM de chaque paire d'amorce (Eurogentec, Angers, France). Les conditions de PCR en temps réel utilisées sont les suivantes : 10 min à 95 °C, suivi de 40 cycles de i) 30 secondes à 95 °C et ii) 30 secondes à 55 °C et pour finir une courbe de dissociation de 55 °C à 95 °C. Des témoins négatifs, réalisés en utilisant de l'eau Milli-Q stérile à la place d'ADN, ont été inclus sur chaque plaque.

Les efficacités des PCR en temps réel sont comprises entre 79 % et 102 %, et les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,990. La limite de détection est comprise entre  $10^2$  et  $10^3$  équivalents de bactéries vivantes par gramme de bouillie, selon les paires d'amorces utilisées. Sur la figure des résultats, les concentrations en micro-organismes inférieures à la limite de détection n'ont pas été représentées.

#### **4- Dosages des folates**

Tous les dosages de folates totaux de cette étude ont été réalisés à l'aide d'une adaptation de la méthode microbiologique décrite par Kariluoto and Piironen (2009), avec les modifications suivantes. Après décongélation de l'échantillon, un gramme a été pesé dans un tube de centrifugation de 50 mL, et 15 mL de tampon d'extraction ont été ajoutés (50 mM de tampon Ches/50 mM de tampon Hepes, 10 mM de 2-mercaptoéthanol, 2 % (p/v) d'ascorbate de sodium, pH 7,85). L'air présent dans les tubes a été chassé par de l'azote, puis les tubes ont été soigneusement vortexés. Les tubes ont été chauffés à 100 °C pendant 10 min (et vortexés



deux fois pendant les 10 min), puis refroidis dans de la glace. Le pH de chaque tube a été ajusté à 4,7, avant d'ajouter 1 mL d'une solution d' $\alpha$ -amylase (Sigma-Aldrich A9857, 20 mg/ml dans de l'ascorbate de sodium à 1 %) et 2 mL d'une solution de conjugase (préparée à partir de rein de porc lyophilisé, 5 mg/mL dans de l'eau Milli-Q). L'air des tubes a de nouveau été chassé par de l'azote et les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 3 h dans un bain-marie avec agitation, dans l'obscurité. A la fin de l'incubation, 2 mL d'une solution de protéase (Sigma-Aldrich P5147, 3 mg/mL dans de l'ascorbate de sodium à 1 %) ont été ajoutés à chaque tube. L'air des tubes a encore été chassé par de l'azote et les tubes ont été incubés pendant 1 h dans les mêmes conditions que l'incubation précédente. A la fin de l'incubation, les tubes ont été chauffés à 100 °C pendant 5 min pour inactiver les enzymes, puis refroidis dans de la glace. Après avoir vortexé les tubes, leur pH a été ajusté à 6,1 avec du KOH 1 M. Le volume de chaque tube a ensuite été complété à exactement 50 mL avec de l'ascorbate de sodium à 0,5 % (pH 6,1). La concentration en folates des extraits a été déterminée dans des microplaques de 96 puits à l'aide de la méthode décrite par Kariluoto and Piironen (2009). La souche *L. rhamnosus* ATCC7469 a été utilisée comme organisme indicateur de croissance, l'acide folique (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) comme calibrant pour les gammes étalons, et le milieu « Folic Acid Casei Medium » (Difco, Sparks, MD, USA) comme milieu de culture pour les dosages. La reproductibilité de la méthode a été confirmée en analysant un échantillon de référence certifié dans chacune des séries (BCR 121 farine complète, IRMM, Geel, Belgium). Un blanc réactif a été analysé pour chaque lot d'échantillon extrait. Les teneurs en folates obtenues sont la moyenne de trois réplicats d'extraction.

## **5- Dosages d'éthanol, acide lactique et acétate**

La teneur en éthanol, acide lactique et acide acétique a été mesurée dans certains échantillons de bouillie fermentée à base de mil. Les échantillons ont été dilués dans de l'eau Milli-Q stérile, filtrés (filtres en acétate de cellulose de porosité 0.22  $\mu$ m), puis analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), en utilisant une colonne Aminex HPX 87H connectée au détecteur Waters 2410 réfractif index detector, selon la méthode décrite par (Agati et al., 1998). L'éluant utilisé était l'acide sulfurique (6 mmol/L), à un débit de 0,8 mL/min à 65 °C.

## **6- Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.1 (Rockville, MD, USA), ou avec le logiciel SPSS Statistics 22.0 (IBM Corporation, USA) dans le cas de la troisième publication. Des analyses de la variance (ANOVA) à un facteur, suivies par le test de la plus petite différence significative, ou par le test de Newman-Keuls ou par le test de Duncan ont été réalisés pour identifier les différences significatives entre les échantillons. Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives pour des valeurs p inférieures à 0,05. Des corrélations linéaires ont également été réalisées en utilisant la méthode de corrélation de Pearson, avec un intervalle de confiance de 95 %.



## **Chapitre 4 : Résultats**



# 1- Le potentiel nutritionnel d'une bouillie fermentée traditionnelle à base de mil : le cas particulier des folates

## 1-1- Introduction

De nombreux aliments à base de céréales sont utilisés comme complément à l'allaitement maternel en Afrique, comme des bouillies de mil fermenté au Burkina Faso par exemple (Mouquet-Rivier et al., 2008; Svanberg, 1995). Le *ben-saalga*, une bouillie à base de mil du Burkina Faso, a fait l'objet de nombreuses études au sein de l'UMR Nutripass. Cet aliment a une faible densité énergétique (32 kcal/100 g BH), ainsi que de faibles teneurs en macro- et micro-nutriments (Mouquet-Rivier et al., 2008). Cela pourrait expliquer en partie les carences en micronutriments présentes au Burkina Faso. En effet, les probabilités de couvrir les besoins en dix micro-nutriments, comme les folates par exemple, chez des enfants âgés de 36 à 59 mois et chez leur mères au Burkina Faso sont dans la majorité des cas inférieures à 50 % (Arsenault et al., 2014; Becquey and Martin-Prevel, 2010).

La principale raison de la faible qualité nutritionnelle du *ben-saalga* est la faible teneur en matière sèche, qui est généralement comprise entre 5 et 8 g/100g de bouillie (Mouquet-Rivier et al., 2008). En effet, pour que les jeunes enfants puissent consommer ces bouillies, la consistance de ces dernières doit être suffisamment fluide. Pour atteindre une telle consistance, les productrices locales doivent ajouter une grande quantité d'eau, afin d'éviter un épaississement de la bouillie lors de la gélatinisation de l'amidon pendant la cuisson, faisant ainsi diminuer la qualité nutritionnelle de l'aliment.

Sachant que certains micro-nutriments, tels que les vitamines, peuvent être consommés et/ou produits par différents micro-organismes, la fermentation pourrait également avoir un effet sur la qualité nutritionnelle des bouillies à base de mil. Le microbiote du *ben-saalga* est essentiellement constitué de BL appartenant aux genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Humblot and Guyot, 2009). Des isollements de bactéries ont mis en évidence la prédominance de *L. fermentum*, ainsi que la présence des espèces *L. paraplantarum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *Lc. mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* et *P. pentosaceus* (Turpin et al., 2011). Toutefois, les concentrations des principaux genres et espèces impliqués dans la fermentation du *ben-saalga* ne sont pas

connues. Des levures sont également impliquées dans la fermentation du *ben-saalga*, mais dans une moindre mesure (Tou et al., 2006).

L'évaluation du potentiel nutritionnel d'isolats de BL du *ben-saalga* a fait l'objet de la thèse de Turpin (2011). Des gènes codant des enzymes impliquées dans différentes fonctions d'intérêts nutritionnels ont été recherchés dans une collection de 155 souches de BL isolées du *ben-saalga*. Ce criblage génétique a entre autre permis de mettre en évidence un fort potentiel génétique de synthèse de la vitamine B9, puisque les deux gènes *folP* et *folK* ont été détectés dans 96 % des 155 souches. Ce potentiel a depuis été vérifié par un stagiaire de Master 2 à l'aide de tests phénotypiques et 62 % des souches sont capables de produire des folates dans du MRS (Almoussa-Almaksour, 2013; Saubade et al., 2014). La thèse de Turpin (2011) a également permis d'initier une approche d'écologie microbienne pour mettre en évidence le potentiel nutritionnel d'aliments fermentés traditionnels. Cette approche consiste à rechercher des gènes codant des enzymes impliquées dans différentes fonctions d'intérêt nutritionnel directement dans le métagénome d'aliments fermentés naturellement. Toutefois, ces gènes n'ont été recherchés que dans sept échantillons d'aliments fermentés et aucun lien entre la détection des gènes et la qualité nutritionnelle de l'aliment n'a été recherché.

Dans l'optique de vérifier si ce criblage génétique pourrait permettre d'évaluer rapidement le potentiel nutritionnel du microbiote d'un aliment fermenté, la première étape de ma thèse a consisté à rechercher les gènes d'intérêt nutritionnel, mais cette fois dans les métagénomomes de 50 échantillons de bouillies à base de mil collectés à Ouagadougou. Pour vérifier si un lien peut être établi entre le potentiel génétique et la composition du microbiote, les principaux genres et espèces de BL ont été dosés par PCR en temps réel. Enfin, pour vérifier si le potentiel génétique peut être corrélé avec la qualité nutritionnelle de l'aliment, les folates ont été dosés en raison du fort potentiel de synthèse des folates par les BL isolées du *ben-saalga*.

Les principaux résultats de cette partie ont été valorisés sous la forme d'un article accepté pour publication dans *International Journal of Food Microbiology*. Une partie de ces résultats a également été valorisé sous la forme d'une communication orale lors du congrès international FoodMicro 2014 (Nantes) et de posters présentés en 2015 lors de la journée de l'école doctorale SPSA (devenu la filière APAB de l'école doctorale GAIA, Université de Montpellier) et lors du « 4th African Food and Nutrition Forum » à Addis Abeba (Ethiopie).

**Article accepté**

Saubade F., Humblot C., Hemery Y.M. and Guyot J-P. (2016). PCR screening of an African fermented pearl-millet porridge metagenome to investigate the nutritional potential of its microbiota. *International Journal of Food Microbiology*

**Communication orale**

Saubade F., Almousa-Almaksour Z., Hemery Y., Humblot C., Picq C., and Guyot J-P. (2014). Is it possible to increase the folate content in cereal based fermented foods using lactic acid bacteria? Food Micro 2014, 24th International ICFMH conference (Nantes, September 1-4 2014), Book of abstracts, p. 635.

**Poster (Annexe 2)**

Saubade F., Hemery Y., Guyot J-P., Humblot C. (2015). Influence of spontaneous fermentations on the folate content of a pearl-millet based gruel. 4th African Food and Nutrition Forum: "Global response for sustainable food systems in the post-Millennium Development Goal Era" (27–29 October 2015, Addis Ababa, Ethiopia)





**1-2- Publication : PCR screening of an African fermented pearl-millet porridge metagenome to investigate the nutritional potential of its microbiota**



**PCR screening of an African fermented pearl-millet porridge metagenome to investigate the nutritional potential of its microbiota**

**Fabien Saubade, Christèle Humblot, Youna Hemery, Jean-Pierre Guyot\***

IRD; UMR 204 (Nutripass), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5,  
France

\* Corresponding author:

Phone: +33 467416285, Fax: +33 467416157, Email: [jean-pierre.guyot@ird.fr](mailto:jean-pierre.guyot@ird.fr)

## Abstract

Cereals are staple foods in most African countries, and many African cereal-based foods are spontaneously fermented. The nutritional quality of cereal products can be enhanced through fermentation, and traditional cereal-based fermented foods (CBFFs) are possible sources of lactic acid bacteria (LAB) with useful nutritional properties. The nutritional properties of LAB vary depending on the species and even on the strain, and the microbial composition of traditional CBFFs varies from one traditional production unit (TPU) to another. The nutritional quality of traditional CBFFs may thus vary depending on their microbial composition.

As the isolation of potentially useful LAB from traditional CBFFs can be very time consuming, the aim of this study was to use PCR to assess the nutritional potential of LAB directly on the metagenomes of pearl-millet based fermented porridges (*ben-saalga*) from Burkina Faso. Genes encoding enzymes involved in different nutritional activities were screened in 50 metagenomes extracted from samples collected in 10 TPUs in Ouagadougou.

The variability of the genetic potential was recorded. Certain genes were never detected in the metagenomes (genes involved in carotenoid synthesis) while others were frequently detected (genes involved in folate and riboflavin production, starch hydrolysis, polyphenol degradation). Highly variable microbial composition – assessed by real-time PCR – was observed among samples collected in different TPUs, but also among samples from the same TPU. The high frequency of the presence of genes did not necessarily correlate with *in situ* measurements of the expected products. Indeed, no significant correlation was found between the microbial variability and the variability of the genetic potential. In spite of the high rate of detection (80%) of both genes *folP* and *folK*, encoding enzymes involved in folate synthesis, the folate content in *ben-saalga* was rather low (median: 0.5 µg/100g fresh weight basis). This work highlighted the limit of evaluating the nutritional potential of the microbiota of traditional fermented foods by the only screening of genes in metagenomes, and suggests that such a screening should be completed by a functional analysis.

**Key-words:** Vitamin B9, Real-time PCR, *Lactobacillus fermentum*, Yeasts, *Pennisetum glaucum*, Starch metabolism

## 1. Introduction

Cereal based fermented foods (CBFFs) are staple food products in many African countries (Guyot, 2012). Some are used as complementary foods for children under five during the period of breast feeding (Mouquet-Rivier et al., 2008; Svanberg, 1995). These foods are mainly fermented by naturally occurring lactic acid bacteria (LAB) (Guyot, 2012; Minervini et al., 2015). For example, the bacteria responsible for spontaneous fermentation in different foods (*ben-saalga*, *koko*, *fura*) made from pearl-millet (*Pennisetum glaucum*) belong to genus *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Pediococcus*, with *Lactobacillus fermentum* frequently found to be the dominant species (Humblot and Guyot, 2009; Lei and Jakobsen, 2004; Owusu-Kwarteng et al., 2012). It has been shown that the composition of the microbiota of pearl-millet based fermented foods can vary from one traditional production unit (TPU) to another (Humblot and Guyot, 2009; Owusu-Kwarteng et al., 2012). These differences could be due to different factors, including the raw materials used for the preparation of the CBFF (Owusu-Kwarteng et al., 2012).

As reported in a review by Singh et al. (2015), the nutritional quality of cereals can be enhanced through fermentation by LAB. A set of genes coding for enzymes involved in nutritional functions was screened in 152 LAB strains isolated from *ben-saalga* and showed that the presence or absence of certain genes depended on the species (Turpin et al., 2011). For example, the genes *folP* and *folK* encoding enzymes involved in the synthesis of folate were detected in 100% of the *L. fermentum* strains (n=70) isolated from *ben-saalga*. On the contrary, the gene *malL* encoding an enzyme involved in the hydrolysis of dextrans and isomaltose was detected only in 7% of the same strains. Therefore, if the genetic potential of these strains is confirmed by phenotypical analysis, the nutritional quality of this CBFF could vary depending on the LAB species responsible for the fermentation. Considering the variations in the composition of the microbiota, the nutritional quality may also vary from one TPU to another.

The genetic potential of the bacteria responsible for fermentation may be estimated by PCR screening of genes in metagenomes extracted directly from fermented foods (Turpin et al., 2011). However, in the preliminary work of Turpin et al. (2011) this method was only tested on five samples of pearl-millet based fermented porridges. The objective of the present work was to evaluate the nutritional potential of bacteria directly on the metagenomes of 50

samples collected in 10 TPUs in Burkina Faso using PCR screening. The main bacteria involved in the fermentation of the CBFF products were quantified using real-time PCR. Finally, to validate genetic screening using one simple function, we measured the folate (vitamin B9) content of the samples to check for a relationship between an identified genetic potential and the nutritional reality. Folate is of particular importance since folate deficiency leads to neural tube defects, congenital malformations and megaloblastic anemia, and is still prevalent in many countries (Arsenault et al., 2014; Becquey and Martin-Prevel, 2010; Blount et al., 1997; Rouget et al., 2005; Viñas et al., 2011; Wickramasinghe, 2006).

## **2. Material and methods**

### **2.1. Samples of fermented porridges**

The traditional processing of pearl-millet into *ben-saalga* is well known (Tou et al., 2006). The final steps are spontaneous fermentation, mainly due to LAB (*Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Pediococcus*) and to a lesser extent yeasts, and a cooking step before consumption (Humblot and Guyot, 2009; Tou et al., 2006). Ten traditional production units (TPUs) were randomly selected in different parts of Ouagadougou (Burkina Faso) based on a previous survey (Tou et al., 2006). For each TPU, five samples of porridges were collected after the cooking step (as consumed), on different days. Therefore, the 5 samples collected in a same TPU corresponded to fermentations that occurred on five different days. They were conserved at -20 °C until DNA and folate extraction. The 50 pearl-millet porridge samples were coded with a letter from A to J (corresponding to the TPU) followed by a number from 1 to 5 (corresponding to the day of sampling). Although for example, samples A1 and B1, are both numbered 1, this does not necessarily mean they were collected on the same day.

### **2.2. Nucleic acid extraction**

Total DNA was extracted from 20 g of porridge in two steps after serial centrifugation to eliminate starch and using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Charbonnières, France) with an additional lysis step using an amalgamator with zirconium beads (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), as previously described (Turpin et al., 2011).

DNA concentrations and purity were estimated by measuring absorbance at 260 and 280 nm (NanoVue™, GE Healthcare, Uppsala Sweden). The DNA samples were then stored at -20 °C until PCR and real-time PCR analysis.

### **2.3. PCR amplification for the detection of genes of interest**

A set of genes of nutritional interest was selected. These genes are involved in the synthesis of carotenoids, folate and riboflavin (vitamin B2), in starch metabolism, and tannase synthesis. The genes were detected by PCR using primers selected from a previous work (Turpin et al., 2011) and are listed in Tableau 13. PCR conditions were the same as those described in Turpin et al. (2011).



**Tableau 13 : List of primers used to screen the food metagenomes**

General function	Gene	Predicted function	Primer name	Primer sequence 5' to 3'	Primer reference
Carotenoid synthesis	<i>crtN</i>	dehydrosqualene desaturase	crtN/crtM	F_CGCGGAATTCATGAAGCAAGTATCGATTATTGGC R_GATCGAATTCTTAAGCCTCCTTAAGGGCTAGTTC	(Garrido-Fernández et al., 2010) (Garrido-Fernández et al., 2010)
	<i>crtM</i>	dehydrosqualene synthase			
	<i>rbscrtN</i>	dehydrosqualene desaturase	RbscrtN/crtM	F_CTAGGGTACCAAGGGGGAGATTTACTGATGAAGC R_GATCGAATTCTTAAGCCTCCTTAAGGGCTAGTTC	
	<i>crtM</i>	dehydrosqualene synthase			
Folate synthesis	<i>folP</i>	dihydropteroate synthase / dihydropteroate pyrophosphorylase	folP1	F_CCAAsGrCsGCTTGCATGAC R_TkACGCCGGACTCCTTTTwy	(Turpin et al., 2011)
	<i>folK</i>	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine diphosphokinase	folKlfe	F_CCATTTCCAGGTGGGGAATC R_GGGGTGGTCCAAGCAAACCTT	(Turpin et al., 2011)
Riboflavin synthesis	<i>ribA</i>	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase // GTP cyclohydrolase II	ribA2	F_TTTACGGGCGATGTTTTAGG R_CGACCCTCTTGCCGTAATA	(Turpin et al., 2011)
	<i>ribB</i>	riboflavin synthase subunit alpha	ribBlfe1	F_AGTAAACGGAACGGGCAAGC R_GTTGACCAGGGCACCAACTG	(Turpin et al., 2011)
	<i>ribG</i>	diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deiminase	ribG	F_TGGkAAGACGCKCCKTGT R_TTCACCAAyCArAATyGCTTGA	(Turpin et al., 2011)
	<i>ribH</i>	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	ribHlfe1	F_AGGGCGAAACCGACCACTAC R_CGATTGGGCAGTCATCGAAC	(Turpin et al., 2011)
Starch metabolism	<i>agl</i>	alpha-glucosidase	a-glu-lp11	F_GCsAAAATGCTAGCGACymT R_CCACTGCATyGGyGTACgy	(Turpin et al., 2011)
			a-glu-lfe1	F_AACCTGGTGAAATGGCAGAC R_TGGTCATTCCCAGTTCCTC	(Turpin et al., 2011)
	<i>α-amy</i>	alpha amylase	a-amy-lp11	F_AGATCAGGCGCAAGTTCAGT R_TTTTATGGGCACACCACTCA	(Turpin et al., 2011)
			amyEV2	F_CATCAACTGCCACTGCAACT R_CGCTTTAGGTCACGACGAAT	(Humblot et al., 2014)
	<i>dexC</i>	neopullulanase	neopul-lp11	F_CCAGACGAGCAAGAACAACA R_ATTGGCGATACGCCACTTAC	(Turpin et al., 2011)
			neopul-lfe1	F_ACTTTTTCTGCAGCCTGGTGT R_ACGGCCATTAAACTGTTCGTC	(Turpin et al., 2011)
	<i>glgP</i>	glycogen phosphorylase	gP-Lp11	F_GCGGGTGTTCAAAGTATCGT R_TCTCGAGGGCCTCTGTAAA	(Turpin et al., 2011)
	<i>malL</i>	oligo-1,6-glucosidase	O1,6glu-lp11	F_GCGGGTGTTCAAAGTATCGT R_TCTCGAGGGCCTCTGTAAA	(Turpin et al., 2011)
	<i>malP</i>	maltose phosphorylase	MP-lac1	F_TGCCAyAAyGARtGGGARAT R_ACsCkATCwGCCCCArAAAC	(Turpin et al., 2011)
	Tannase	<i>tanlp1</i>	tannin acylhydrolase	tanlp1	F_TGCTAAGCACTGGCGGATTC R_GGCACAAGCCATCAATCCAG

## 2.4. Real-time PCR for the quantification of LAB

Different Bacteria, and especially LAB, are involved in the fermentation of *ben-saalga*, including *Lactobacillus* (especially *L. plantarum* and *L. fermentum*), *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Pediococcus* (Humblot and Guyot, 2009; Turpin et al., 2011). We selected primers corresponding to these groups, genera and species in the literature, and checked them *in silico*. We were unable to find any primers sufficiently specific for *Lactococcus* and *Pediococcus* since *in silico*, their sequences matched other genera or species present in our ecosystem. The primers validated *in silico* are listed in the Tableau 14.

**Tableau 14 : Primers used to quantify the genus or species of bacteria from pearl-millet porridge samples thanks to real time PCR. The primers were designed to match the gene coding for 16S rRNA.**

Name	Sequences 5'-3'	Targets	References
338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Bacteria	Muyzer et al. (1993)
338r*	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacteria	Muyzer et al. (1993)
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal	Muyzer et al. (1993)
Lab677r	CACCGCTACACATGGAG	<i>Lactobacillus</i>	Heilig et al. (2002)
Lab772r	YCACCGCTACACATGRAGTTCCACT	<i>Lactobacillus</i>	Omar and Ampe (2000)
Lab158f	TGGAAACAGRTGCTAATACC	LAB	Omar and Ampe (2000)
Lferm72f*	CCTGATTGATTTTGGTCGC	<i>L. fermentum</i>	Omar and Ampe (2000)
Lpla72f	ATCATGATTTACATTTGAGTG	<i>L. plantarum</i>	Chagnaud et al. (2001)
leu200f*	CGGCGTCACCTAGAGATGGATC	<i>Leuconostoc</i>	Omar and Ampe (2000)
S-G-Wei-0121-a-S-2	CGTGGGAAACCTACCTCTTA	<i>Weissella</i>	Jang et al. (2002)
S-G-Wei-0823-a-A-18	CCCTCAAACATCTAGCAC	<i>Weissella</i>	Jang et al. (2002)

\* Primers from the literature were converted into their reverse complement

The strains *L. plantarum* ATCC14917T, *L. fermentum* ATCC14931, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC10880, *Pediococcus pentosaceus* ATCC43200 and *Weissella confusa* ATCC10881T were used to generate quantification matrixes, by extracting DNA from samples of pearl-millet flour suspensions in water mixed with each bacterium at different concentrations. The specificity of each previously selected primer (Tableau 14) was checked by real-time PCR using the DNA extracted from the reference strains and a negative control (sterile water). When necessary, the primers were converted into their reverse complement to perform real-time PCR. For each reaction, 5 µL of the extracted template-DNA was added to 20 µL of PCR mix containing 1 x Mesa green q-PCR Master Mix Plus and 0.3 µM of each primer (Eurogentec, Angers, France). The PCR conditions used were 10 min at 95 °C and 40

cycles of 15 s at 95 °C, then 1 min at 55 °C, followed by a dissociation curve from 55 °C to 95 °C. No template controls (NTC), using water instead of DNA, were included in each plate. The efficiency of the real-time PCR ranged from 79% to 102% and the correlation coefficients were higher than 0.990. The detection limit was between  $10^2$  and  $10^3$  bacteria equivalent (Colony forming unit, CFU) per g of porridge depending on the primer. The primers validated on DNA extracted from reference strains were used for DNA extracted from the 50 samples to estimate bacterial concentrations.

## 2.5. Total folate assay

The total folate content of the 50 samples was determined in triplicate using the microbiological assay described by Kariluoto and Piironen (2009), modified as follows. Frozen samples were thawed, 1 g was weighed in a 50-ml centrifuge tube, 15 ml of extraction buffer were added (50 mM Ches/50mM Hepes buffer, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2% (w/v) sodium ascorbate, pH 7.85), the tubes were flushed with nitrogen and thoroughly vortexed. The tubes were heated at 100 °C for 10 min, then cooled on ice. The pH was adjusted to 4.7 with acetic acid and 1 ml of  $\alpha$ -amylase (Sigma-Aldrich A9857, 20 mg/ml in 1% sodium ascorbate) and 2 ml of conjugase (prepared from desiccated hog kidney, 5 mg/ml in water) were added. The tubes were flushed with nitrogen and incubated for 3 h at 37 °C in a shaking water bath in the dark. Then 2 ml of protease (Sigma-Aldrich P5147, 3 mg/ml in 1% sodium ascorbate) were added. The tubes were flushed with nitrogen and incubated at 37 °C in a shaking water bath in the dark for 1 h. At the end of the incubation, the tubes were heated at 100 °C for 5 min to inactivate the enzymes, then cooled on ice. The pH was adjusted to 6.1 with KOH, the volume was brought to exactly 50 ml with 0.5 % sodium ascorbate (pH 6.1), and the tubes were centrifuged at 20,000 g at 4 °C for 30 min. The supernatants were then diluted with 0.5% sodium ascorbate (pH 6.1), and the method described by Kariluoto and Piironen (2009) was used to determine the total concentration of folate using 96-well microtiter plates, with *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 as the growth indicator organism, folic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) as the calibrant, and Folic Acid Casei Medium (Difco, Sparks, MD, USA) as the assay medium. After 18 h of incubation at 37 °C, turbidity was measured with a microplate reader at 590 nm and the values were compared to a standard curve to calculate the concentration of folate. The reliability of the method was confirmed by analyzing a certified reference material (BCR 121 Wholemeal flour, IRMM,

Geel, Belgium). A blank sample and the reference sample were analyzed in each set of samples.

The dry matter content of each sample was determined in triplicate by drying the samples in an oven at 105 °C until constant weight.

## **2.6. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Statgraphics Plus 5.1 software (Rockville, MD, USA). One-way analyses of variance (ANOVA), followed by least significant difference tests (LSD), were carried out to identify the differences between samples. Differences were considered statistically significant for p-values <0.05. Linear correlation tests were also carried out using Pearson's correlation method with a 95% confidence interval. Correlation coefficients (r) were considered significant at p-values <0.05. A principal component analysis (PCA) was performed with R 3.2.2 on the real-time PCR data and a Hierarchical Clustering on Principle Components (HCPC) was also carried out, to separate the samples into statistically different groups, depending on the composition of their microbiota.

## **3. Results**

### **3.1. Detection of genes coding for enzymes involved in nutritional functions**

The nutritional potential of the microbiota of the 50 samples was assessed by screening for the presence or absence of 15 genes. The results of gene detection are presented in Tableau 15. Even if the primers used were designed to be species specific, there were a few nonspecific detections among the 50 metagenomes. In this study, we considered that a gene was detected even if the detection was nonspecific.

**Tableau 15 : Distribution of genes involved in carotenoid, folate and riboflavin synthesis, starch metabolism and tannase synthesis in metagenomes extracted from pearl-millet porridges. Red boxes: the gene was not detected; Green boxes: the gene was detected; Grey boxes: the gene was detected, but more than one band was observed on the electrophoresis gel (non specific detection).**

General function	Carotenoids		Folate		Riboflavin				Starch metabolism						Tannases
gene	<i>crtN/crtM</i>	<i>folP</i>	<i>folK</i>	<i>ribA</i>	<i>ribB</i>	<i>ribG</i>	<i>ribH</i>	<i>agl</i>	<i>α-amy</i>	<i>amyE</i>	<i>dexC</i>	<i>g/gP</i>	<i>malL</i>	<i>malP</i>	<i>tanIpl</i>
A1															
A2															
A3															
A4															
A5															
B1															
B2															
B3															
B4															
B5															
C1															
C2															
C3															
C4															
C5															
D1															
D2															
D3															
D4															
D5															
E1															
E2															
E3															
E4															
E5															
F1															
F2															
F3															
F4															
F5															
G1															
G2															
G3															
G4															
G5															
H1															
H2															
H3															
H4															
H5															
I1															
I2															
I3															
I4															
I5															
J1															
J2															
J3															
J4															
J5															

The frequency of detection of the different genes in the metagenomes varied depending on the function. Indeed, the operon *crtNM*, encoding dehydrosqualene desaturase and dehydrosqualene synthase, was never detected, suggesting that the LAB present in the *ben-saalga* samples were not able to synthesize carotenoids. The genetic potential of these LAB to synthesize tannases was higher since the gene *tanlpl*, encoding a tannin acyl hydrolase, was detected in 56% of the metagenomes. The LAB displayed a good genetic potential to hydrolyze starch, since the genes *agl*, *glgP* and *dexC* (encoding alpha-glucosidase, glycogen phosphorylase and neopullulanase, respectively) were detected in 74%, 94% and 86% of the metagenomes, respectively. However, the genes  $\alpha$ -*amy* and *amyE* (encoding intra and extracellular alpha-amylases, respectively) were detected in only 24% and 0% of the metagenomes, respectively. The genetic potential to hydrolyze maltose and dextrin was lower, since the genes *malP* and *malL* (encoding maltose phosphorylase and oligo-1,6-glucosidase, respectively) were detected in 26% and 54% of the metagenomes respectively. Four genes are required for the biosynthesis of riboflavin (Burgess et al., 2009; Capozzi et al., 2012), and some, such as *ribH* (encoding 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase), were very frequently detected (92%) in the metagenomes. However, the low frequency of detection of the gene *ribG* (encoding diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deiminase; 38%), indicates that the LAB in these samples of *ben-saalga* have a low genetic potential to synthesize riboflavin. Conversely, since the two genes *folP* and *folK* (encoding dihydropteroate synthase/dihydropteroate pyrophosphorylase and 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase, respectively) were detected in 80% of the samples, the LAB responsible for the *ben-saalga* fermentation have a high genetic potential to synthesize folate.

### 3.2. Quantification of targeted LAB populations by real-time PCR

Primers available in the literature and checked *in silico* were tested to quantify Bacteria, the LAB group and the LAB genus and species commonly associated with pearl-millet based fermented foods by real-time PCR (Tableau 14). Quantification of Bacteria, LAB group and the *Lactobacillus* genus was not possible since there was no linear relationship between the number of bacteria cells and the number of cycles needed to reach a detectable amount of PCR products (Ct). After *in silico* verification, we found that primers designed for Bacteria LAB and *Lactobacillus* also matched chloroplasts from sorghum, which is very close to pearl-

millet. Thus, we decided not to use them in this study. Only the calibration curves obtained for the *Leuconostoc* and *Weissella* genus and *L. plantarum* and *L. fermentum* species enabled further analysis of the porridge samples (Tableau 14).

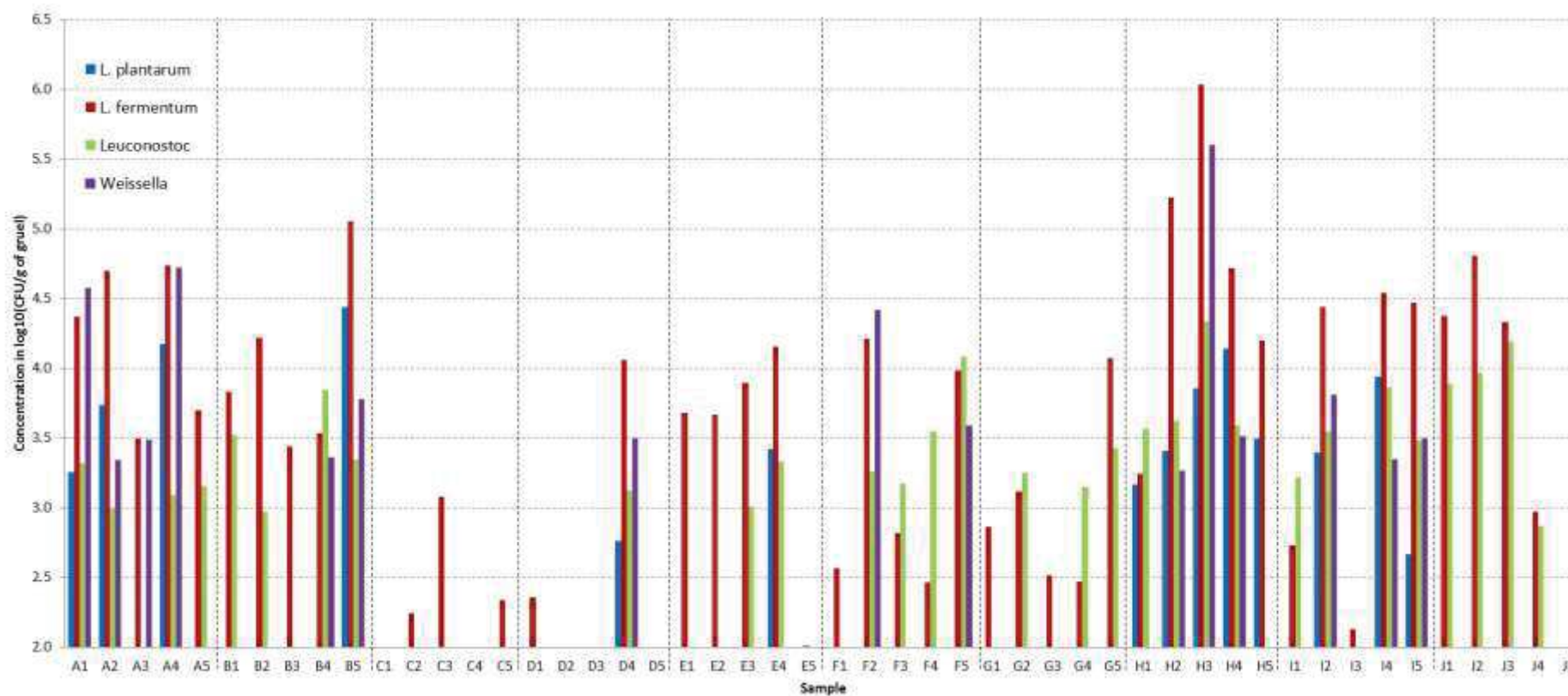


Figure 8 : Real-time PCR quantification of *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc* and *Weissella* in fermented pearl-millet based porridges, sampled after the fermentation and the heating steps. Concentrations of microorganisms below the detection limit are not shown in the figure.



The concentration of microorganisms varied with the sample and was generally lower than  $10^5$  CFU/g of porridge (Figure 8). *L. fermentum* was detected in 88% of the samples and was the dominant microorganism. *Leuconostoc* sp. was detected in 60% of the samples, but in none of the samples from TPU C. *L. plantarum* was detected in 32% samples, but in none of the samples from TPU C, F, G and J. *Weissella* sp. was detected in 30% samples, but in none of the samples from TPU C, E, G and J.

The microbiota differed among the samples from the different TPUs. For example, the samples produced in TPU C had the lowest concentrations of microorganisms. In this TPU, only *L. fermentum* was detected. In contrast, the highest concentrations of microorganisms were found in the samples from TPU H. In this TPU, all the genera and species screened were detected. In addition, we observed that the microbiota in the samples produced by the same TPU varied depending on the day the samples were taken. A principal component analysis, followed by a Hierarchical Clustering on Principle Components, was performed (data not shown) on the real-time PCR data, but it showed that the five samples of a same TPU were never grouped together, and thus that the TPUs could not be discriminated on the basis of the samples microbiota.

### **3.3. Folate content of the pearl-millet porridges**

The dry matter content of the 50 samples ranged from 3% to 9% (median: 5.6%). ANOVA showed that the dry matter content of samples differed significantly ( $p < 0.05$ ), depending on the TPU.

The folate content of the samples (Figure 9) varied from 0 to 3.3  $\mu\text{g}/100\text{g}$  fresh weight basis (median: 0.5  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW). We observed high variability among the samples produced by the same TPU. To determine if the folate content of samples produced by two different TPUs differed, we also compared the TPUs by pairs. The total folate contents of the samples differed significantly ( $p < 0.05$ ) among the different TPUs. A linear correlation test showed that there was a low ( $r = 0.3$ ) but statistically significant correlation ( $p < 0.05$ ) between the folate content and the dry matter content of the porridge samples. On the other hand, there was no significant correlation ( $p > 0.05$ ) between the concentrations of the four main microorganisms investigated and the folate content of the samples.

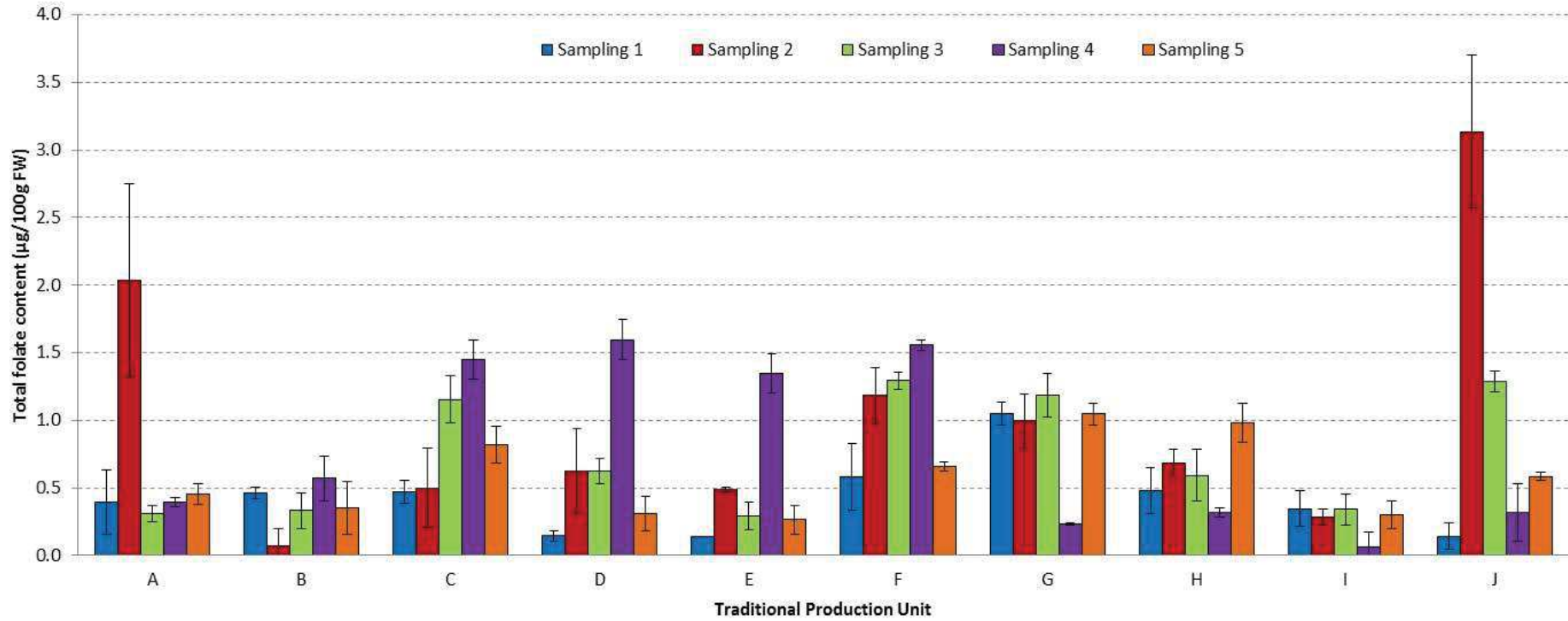


Figure 9 : Folate content of the pearl-millet based porridge samples (FW: fresh weight basis)

## 4. Discussion

In this study, we estimated the genetic potential of the *ben-saalga* microbiota for different nutritional functions. We also quantified the main LAB described as being responsible for the fermentation of *ben-saalga*: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc* and *Weissella* (Humblot and Guyot, 2009; Turpin et al., 2011). As the genetic potential to synthesize folate was found to be high, we quantified the folate content of the samples, to see if there was any relation between the composition of the main microorganisms investigated, the genes encoding for enzymes involved in folate synthesis and the folate content of the pearl-millet based porridges.

Rather high variability of genetic potential was observed among the samples taken from different TPUs, and also among samples taken from the same TPU. Some genes were detected frequently, such as *agl*, *glgP* and *dexC* (coding for enzymes involved in starch metabolism), while others were not detected at all, such as *crtN* and *crtM* (coding for enzymes involved in carotenoid synthesis). Since the genes *agl*, *glgP* and *dexC* were often detected, the genetic potential of the microbiota of the porridge to metabolize starch appears to be high. However, in a previous study, the three genes were all detected in the non-amyolytic strain *L. plantarum* WCFS1 together with the gene  $\alpha$ -*amy* coding for an intracellular alpha-amylase, whereas the gene *amyE* coding for an extracellular alpha-amylase was detected only in the amyolytic strain *L. plantarum* A6 (Humblot et al., 2014). In the present study, the gene *amyE* was not detected in any of the metagenomes. Taken together, these results suggest poor amyolytic potential of the LAB in the porridge.

The genetic potential for the synthesis of carotenoids also appears to be low, since the operon *crtNM* was not detected in our study, whereas it was detected in 37% of LAB wild strains isolated from *ben-saalga* (Turpin et al., 2016). However, this previous work showed that the potential for carotenoid synthesis by these LAB is low, since only 36 LAB strains among the 58 with positive PCR detection were able to produce carotenoids in MRS culture broth. In addition, even the highest carotenoid producing strain produced low amounts of carotenoids in a food matrix made from pearl-millet ( $< 77 \mu\text{g}$   $\beta$ -carotene equivalent per 100 g of dry cell weight).

Concerning microbial diversity, our results are in good agreement with previous studies that showed that *L. fermentum* was the dominant species found in different pearl-millet based fermented foods, including *ben-saalga*, (Lei and Jakobsen, 2004; Owusu-Kwarteng et al., 2012; Turpin et al., 2011). Indeed, in this study, *L. fermentum* was the dominant species from the four main species analyzed. Variability in the species investigated was observed among samples produced by different TPUs, which is in good agreement with the literature, but also among samples from the same TPU (Humblot and Guyot, 2009; Owusu-Kwarteng et al., 2012). Different factors could explain this microbial variability, for example the variability of the raw materials used. Vogelmann et al. (2009) demonstrated on sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava that the raw materials have an impact on the composition of the microbiota. According to Tou et al. (2006), porridge producers in Burkina Faso use different aromatic ingredients, such as ginger and pepper, in addition to pearl-millet grains, which could also modify the microbial composition. As reviewed by Minervini et al. (2014), other parameters, such as the duration and temperature of fermentation can also influence the composition of the microbiota. The fermentation of *ben-saalga* has a mean duration of 11 h (overnight fermentation) with extreme values (2 to 20 h) only in very few TPU, and the temperature is not controlled (Tou et al., 2006). In our study, the different samplings in each TPU were carried out on five different days, on the final product ('ready to use' porridge, after cooking, at the end of the fermentation). Therefore, the observed variability in the analyzed parameters (microbial variability, folate content, etc.) reflects that of the food as eaten by the consumer.

The variability of the concentrations of the main LAB responsible for the fermentation of *ben-saalga* could have an influence on the variability of the genetic potential of the microbiota. However, the statistical analyses did not allow us to establish clear correlations between the concentration of each individual LAB, and the detection of each gene.

In the present study, the genes *folP* and *folK* (coding for folate synthesis) were detected in 80% of the samples, suggesting that the LAB responsible for the *ben-saalga* fermentation have a high genetic potential to synthesize folate. A complementary mRNA based analysis on the dough before cooking would have indicated if those genes were expressed or not. But to determine if this genetic potential is consistent with the presence of the corresponding micronutrient, we measured total folate content in all 50 samples. However, the folate content

of the pearl-millet based porridges was very low (median: 0.5 µg/100g FW) in comparison to other fermented foods (Souci et al., 2000). This porridge thus cannot be considered as a good source of folate, since 1- to 3-year-old children would have to eat about 3,000 g of porridge per day to reach only 10% of their recommended folate intakes, which is 150 µg/day for 1- to 3-year-old children (FAO/WHO, 2005). Considering that the process requires the addition of a large quantity of water to the dough, leading to a dry matter content of < 10%, the folate originally present in the food matrix was diluted. Nevertheless, from the folate content of the raw pearl-millet (29 µg/100g FW; Stadlmayr et al. 2012), we calculated that the final folate content should be higher than 2.5 µg/100g FW, if there was no loss of folate and only a dilution. This means that folate was probably degraded during the processing of pearl-millet into *ben-saalga*, due to the high sensitivity of this vitamin to oxidation, light, and variations in pH (Strandler et al., 2015). It may also be possible that folate was produced during fermentation, but in small quantities (not sufficient to compensate for the losses), or that it was consumed by the LAB during fermentation. Indeed, folate is involved in essential functions such as metabolism of amino acids, nucleotides synthesis and DNA replication, and therefore each microorganism needs to consume folate to grow (Ball, 2005). Numerous LAB strains belonging to different species such as *L. fermentum* and *L. plantarum*, as well as yeasts, are considered as folate-producing microorganisms since they are able to synthesize higher amount of folate than they consume (Hjortmo et al., 2005; Hugenschmidt et al., 2010; Masuda et al., 2012). But other LAB are considered to be folate-consuming microorganisms, since some of the genes coding for enzymes involved in the synthesis of folate are lacking in these LAB (Rossi et al., 2011). Therefore, the *in situ* content of folate might have been the result of a balance between auxotrophy and prototrophy.

To conclude, this study highlighted not only the variability of the composition of the microbiota among samples of fermented porridges produced by different TPUs, but also the variability of the composition of the microbiota among the samples produced by the same TPU. This work also shows that it is difficult to draw conclusions concerning the genetic potential of the microbiota of a naturally fermented food only by analyzing genes in metagenomes. The high frequency of the presence of genes does not necessarily correlate with *in situ* measurements of the expected product, e.g. relation between detection of genes coding for enzymes involved in folate synthesis and the low *in situ* folate content, observed here. In the case of folate, this could be due to the presence of folate-consuming LAB strains.

The choice of another compound, whose consumption by microorganisms is not possible may be more appropriate when using genetic screening. Further studies could aim at optimizing the fermentation step in order to increase the folate content of pearl-millet based porridges. On the contrary, the absence of detection of some genes such as *amyE* appears to be linked with the absence of the corresponding function in the microbiota responsible for the fermentation. Such lack of detection would help, in further studies, to decide whether isolation of LAB with specific nutritional properties from fermented food should be considered or not.

### **Acknowledgements**

The authors thank Christian Picq for collecting the samples in Ouagadougou, and for his help with the DNA extraction.

This work was carried out in the framework of the FoIEA project ([www.folea.eu](http://www.folea.eu)), which is part of the ERA-Net «Developing African-European joint collaboration for Science and Technology » (ERAfrica), financially supported by the European Commission (ERAFRICA ERAFRICA\_IC-027, FP-226154).

Fabien Saubade acknowledges a PhD grant from the French Ministry of Education and Research.

## 2- Influence de la fermentation et des autres procédés sur la teneur en folate d'un aliment céréalier fermenté africain traditionnel

### 2-1- Introduction

Les gènes *folP* et *folK*, codant des enzymes impliquées dans la synthèse de folates, ont été détectés dans 80 % des métagénomés extraits de bouillies à base de mil lors de l'étude précédente. La détection de ces gènes ne signifie pas nécessairement qu'ils soient exprimés. Toutefois, ces résultats suggèrent que les BL du *ben-saalga* ont un fort potentiel de synthèse de folates, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus précédemment avec des souches pures isolées d'échantillons de *ben-saalga* (Saubade et al., 2014; Turpin et al., 2011). Pourtant, nous avons montré lors de l'étude précédente, que la teneur en folates du *ben-saalga* (médiane : 0,5 µg/100g BH) est très faible pour un aliment de complément à l'allaitement maternel. En effet, pour qu'un aliment puisse être considéré comme une bonne source de folates, il doit pouvoir contribuer à couvrir au moins 10 % des apports recommandés journaliers en folates (un équivalent de la RNI) du consommateur, en un seul repas (FDA, 2016b). Même avec la bouillie la plus riche en folates de l'étude précédente (3 µg/100g BH), un enfant âgé de 0 à 12 mois ou de 1 à 3 ans devrait consommer 267 g et 500 g de bouillies par repas, respectivement, pour atteindre 10% de son apport recommandé journalier. Or, il a été estimé que les enfants de moins de deux ans mangent entre 60 et 130 g de bouillie à base de mil par repas à Ouagadougou (Mouquet-Rivier et al., 2016).

L'étude précédente n'a pas permis d'établir de lien entre le potentiel génétique de synthèse des folates et les teneurs en folates dans l'aliment. Cela pourrait être dû à une consommation des folates par les micro-organismes lors de la fermentation. En effet, même si les levures et de nombreuses BL sont capables de produire des folates, de nombreuses autres BL consomment les folates (LeBlanc et al., 2008; Moslehi-Jenabian et al., 2010; Saubade et al., 2016). Or, la détection des deux gènes *folP* et *folK* dans un métagénome signifie qu'il pourrait y avoir des BL capables de synthétiser des folates dans l'aliment correspondant, mais ne permet pas d'affirmer qu'il n'y a pas de BL consommatrices.

Une autre explication pourrait être des pertes de folates lors de différentes étapes du procédé de préparation du *ben-saalga*. En effet, il a été démontré que différentes étapes du procédé

traditionnel décrit par Tou et al. (2006), peuvent avoir des impact positifs ou négatifs sur la teneur et la bioaccessibilité de certains macro- et micro-nutriments (Lestienne et al., 2005; Mouquet-Rivier et al., 2008). Notamment, cet aliment est fortement dilué avant l'étape de fermentation (teneur en matière sèche inférieure à 10 %), ce qui pourrait entraîner une diminution de la teneur en certains micronutriments, comme les folates par exemple, par effet de dilution. C'est pourquoi différentes études ont dans le passé été menées au sein de notre Unité dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle de cet aliment en augmentant la teneur en matière sèche. Par exemple, des bouillies à base de mil ont été inoculées par pied de cuve avec ou sans malt, permettant d'obtenir des bouillies avec une densité énergétique proche, voire supérieure à 84 kcal/100g de bouillie (qui est la valeur minimale à atteindre pour un aliment de complément pour deux prises alimentaires quotidiennes), tout en conservant une consistance fluide (Tou et al., 2007a). Lors de deux autres études, des bouillies à base de mil et d'arachide ou de mil et de soja ont été inoculées par pied de cuve ou avec la souche amylolytique *L. plantarum* A6 (Songré-Ouattara et al., 2009, 2010). Les bouillies obtenues avaient une consistance fluide et une densité énergétique allant de 75 à 89 kcal/100g de bouillie. Les folates peuvent également être dégradés lorsqu'ils sont exposés à différents facteurs (température élevée, pH, lumière, oxygène et autres agents oxydants...), ce qui peut se produire lors de différentes étapes de procédés comme lors d'une cuisson ou du fractionnement de graines de céréales par exemple (Strandler et al., 2015).

L'impact des différentes étapes du procédé traditionnel, ainsi que les étapes du procédé impliquant une inoculation par pied de cuve, sur la teneur en folates des bouillies à base de mil n'a jamais été étudié. C'est pourquoi la deuxième étape de ma thèse a consisté à estimer les pertes en folates au cours des différentes étapes du procédé de préparation du *ben-saalga* selon les deux procédés décrit précédemment. Pour cela, des bouillies ont été réalisées en laboratoire (Montpellier) et les teneurs en folates ont été mesurées à chaque étape du procédé, de manière à comprendre l'origine des pertes, et mettre en évidence les effets respectifs de la fermentation et des autres étapes sur la vitamine B9.

Les résultats de cette partie ont été valorisés sous la forme d'un article qui sera soumis dans une revue internationale en 2016. Une partie de ces résultats a également été valorisé sous la forme d'une communication orale lors du congrès international « Sourdough 2015 » et d'un



poster présenté à la journée des doctorants de la filière APAB de l'école doctorale GAIA en 2016.

**Projet d'article**

Saubade F., Hemery Y., Humblot C., and Guyot J-P. (2016). Influence of fermentation and other process steps on folate content of a traditional African pearl-millet based fermented food. *A soumettre*

**Communication orale**

Saubade F., Hemery Y., Humblot C., and Guyot J-P. (2015). Influence of fermentation and other process steps on folate content of a traditional African pearl-millet based fermented food (Nantes, VIth Sourdough Symposium 30 September-2 October 2015)

**Poster (Annexe 3)**

Saubade F., Hemery Y., Humblot C., and Guyot J-P. (2016). Influence of fermentation and other process steps on folate content of a traditional African pearl-millet based fermented food. Montpellier, Journée de la filière APAB de l'école doctorale GAIA, 14 Juin 2016

**2-2- Publication : Influence of fermentation and other process steps on the folate content of a traditional African cereal- based fermented food**



# **Influence of fermentation and other process steps on the folate content of a traditional African cereal-based fermented food**

Fabien Saubade<sup>1</sup>, Youna M. Hemery<sup>1</sup>, Jean-Pierre Guyot<sup>1</sup>, Christèle Humblot<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Research for Development (IRD); UMR 204 Food and nutrition research in the global south (NUTRIPASS), IRD / University of Montpellier / SupAgro, Montpellier, France

Corresponding author:

\* Christèle Humblot: [christele.humblot@ird.fr](mailto:christele.humblot@ird.fr)

Tel: +33 467416248, Fax: +33 467416157

## Abstract

Folate deficiency can induce various diseases (neural tube defects, megaloblastic anemia...) and still occurs in both developed and developing countries. Cereal-based food products are staple foods in many countries, and therefore could be interesting sources of folate. The production of folate by microorganisms has been demonstrated in some cereal-based fermented foods (CBFFs), but it has never been studied in an African traditional CBFF. The microbiota of *ben-saalga*, a pearl-millet based fermented porridge frequently consumed in Burkina Faso, has a good genetic potential for the synthesis of folate, but the folate content of this food product is rather low, suggesting that a folate loss occurs during the different process steps. The objective of this study was therefore to quantify the evolution of the folate content during the preparation of *ben-saalga*. The traditional processing of pearl-millet into *ben-saalga* involves numerous steps: washing, soaking, grinding, kneading, sieving, (spontaneous) fermentation and cooking. Two types of porridges were prepared, by using a process adapted from the traditional process (AP), and a modified process based on a fermentation by backslipping (BP). The dry matter and total folate contents were measured at each step of the process, and a mass balance assessment was carried out during the unit operations, in order to follow the loss and gains of folate during the process. A production of folate was observed during the soaking of the pearl-millet grains (+26% to +31%), but the folate concentration of the sieved batter (2.5 to 2.9 µg/100g FW) was drastically lower than that of the milled soaked grains (17.3 to 19.4 µg/100g FW), and the fermentation had no significant impact on the folate content, as the final folate content of the porridges was of 2.2 and 1.5 µg/100g FW, for AP and BP porridges respectively. This study allowed to better understand the impact on vitamin B9 of the different process steps involved in the preparation of *ben-saalga*, and to suggest various modifications of the process in order to increase the low folate content of this fermented porridge.

**Key-words:** *Pennisetum glaucum*, real-time PCR, nutrition, lactic acid fermentation, African food

## 1. Introduction

Cereal-based food products are staple foods in many parts of the world, in both developed countries and low- and middle-income countries (FAO, 1995; FAOSTAT, 2011). For example, in West Africa in 2011, cereal-based food products were the main contributors to the energy supply (FAOSTAT, 2011). In West Africa, numerous cereal-based foods made from maize, sorghum or millets are fermented (Guyot, 2012). Indeed, fermentation is an ancestral way of preserving food products that increases their sanitary and nutritional quality (Nout, 2009). Fermentation is also often considered as a good way to increase the vitamin B content of food products (Blandino et al., 2003; LeBlanc et al., 2011a; Nout, 2009; Saubade et al., 2016). For example, yeasts and many lactic acid bacteria (LAB) are able to synthesize folate *de novo* (LeBlanc et al., 2008; Moslehi-Jenabian et al., 2010; Saubade et al., 2016).

Folate, or the B9 vitamin family, is present in non-negligible amounts in cereal grains (from 29 to 143  $\mu\text{g}/100\text{g}$  fresh weight basis), mainly in the germ and outer layers (Pomeranz, 1988; Souci et al., 2000). There are many forms of vitamin B9, called vitamers. Folate is involved in essential functions such as amino acid metabolism and DNA replication and repair, and is thus needed for cell division (Ball, 2005). Folate deficiency leads to many pathologies, such as neural tube defects, megaloblastic anemia and colorectal cancer (Bailey et al., 2015; FAO/WHO, 2005; Liew, 2016). This deficiency is still a global health problem, as it has been recorded in both developed and low- and middle-income countries, on every continents (McLean et al., 2008; Viñas et al., 2011; Youngblood et al., 2013). For example, Arsenault et al. (2014) and Becquey and Martin-Prevel (2010) showed that, in Burkina-Faso, the median probability of adequacy of folate intakes for women of childbearing age was equal to zero in both rural and urban areas. The median probability of adequacy of folate intakes for 36- to 59-month-old children was equal to zero during the lean season, but then reached 0.98 during the post-harvest season, when their diet was more diversified.

The production of folate in fermented dairy products has been extensively studied (Laiño et al., 2012, 2013, 2014, LeBlanc et al., 2008, 2011a; Padalino et al., 2012), but only a few studies have been conducted on the production of folate in cereal based fermented foods. Most of them focused on the effect of yeasts on the folate content of this food category

(Hjortmo et al., 2008a, 2008b), but two studies showed that the folate content of fermented rye and oat sourdoughs can be increased by LAB (Kariluoto et al., 2006a, 2014).

*Ben-saalga*, a pearl-millet based fermented porridge, is widely consumed in Burkina Faso and is especially used as complementary food for infants and young children (Mouquet-Rivier et al., 2008). Indeed, Mouquet-Rivier et al. (2008) assessed that 66% of the households in Ouagadougou can be considered as “consumers” of pearl-millet based porridges and that 69% of the children under the age of 2 years in those households consumed this food every day. The processing of pearl-millet into *ben-saalga* was described by Tou et al. (2006), and improvements of the process were proposed in order to increase the energy density of *ben-saalga* (Songré-Ouattara et al., 2010; Tou et al., 2007a, 2007b). For example, Songré-Ouattara et al. (2009) reported that a gruel made with pearl-millet and groundnut grains reached an energy density of  $80 \pm 24$  kcal/100g with a suitable liquid consistency for feeding young children (Bostwick flow of 120 mm/30s), when fermented by backslopping. The genetic potential for various nutritional functions of the microbiota of *ben-saalga* was studied by Turpin et al. (2011). This study showed that the LAB isolated from *ben-saalga* have a good genetic potential for the synthesis of folate, since both genes *folP* and *folK*, encoding enzymes involved in folate synthesis, were detected in 96% of the tested strains. However, a recent study (Saubade et al., 2014) showed that the folate content of *ben-saalga* samples collected in Burkina Faso was very low (median: 0.5 µg/100g fresh weight basis), and that 1- to 3-year-old children should eat about 3000 g of porridge per day to reach 10 % of the recommended folate intakes, which would be unlikely.

As the folate content of raw pearl-millet grains is of 29 µg/100g FW (Stadlmayr et al. 2012), the final folate content of the *ben saalga* should be higher, if there was no loss of folate. This suggests that folate may be lost during the processing of pearl-millet into *ben-saalga*. Indeed, during food processing, many factors can influence the stability of folate, and can lead to degradation and irreversible loss of vitamin activity. This is the case of exposure to high temperature, oxidizing agents, unfavorable pH, UV and light, and interaction with other food components such as metal cations (Saubade et al., 2016; Strandler et al., 2011).

Given the high consumption of *ben-saalga* by infants and young children in Burkina Faso, a higher part of their folate requirements might be covered by this food product, if its folate

content was higher. Moreover, Turpin et al. (2011) showed that the LAB isolated from this food product exhibit a good genetic potential for the synthesis of folate. However, our previous studies showed that the folate content of *ben-saalga* is too low to significantly contribute to the recommended folate intake for young children, and that the folate content of *ben-saalga* is significantly lower than that of the raw material (pearl-millet), suggesting that a folate loss occurs during the different process steps. Therefore, in the present study, to better understand the evolution of the folate content during the processing of pearl-millet into fermented porridge, we prepared *ben-saalga* at laboratory scale and measured the folate content at each process step, and carried out a mass balance assessment during the various unit operations. This work will help to identify the process steps that induce folate loss, and to highlight the respective effects of the fermentation and other process steps on the vitamin B9 content.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Starting material**

The pearl-millet grains (*Pennisetum glaucum*) used as raw materials for the preparation of porridges were purchased at a local market in Ouagadougou, Burkina-Faso. The grains were sorted out to remove the stones and other impurities. Then the same batch of grains was used for all the experiments.

### **2.2. Preparation of pearl-millet based fermented porridges**

All the porridges of this study were prepared from 100g of raw pearl-millet grains. Two types of porridges were prepared at laboratory scale (Figure 10). The first type (AP) was prepared according to a process adapted from the traditional process described by Tou et al. (2006). This process consists of the following steps: soaking of the grains (16h in tap water; 30°C), washing, draining of the grains, milling, addition of water and sieving, fermentation of the batter (12h; 30°C) and cooking (5 min; 80°C). The draff, mainly made up of the grains outer layers (bran), was discarded during the sieving step.



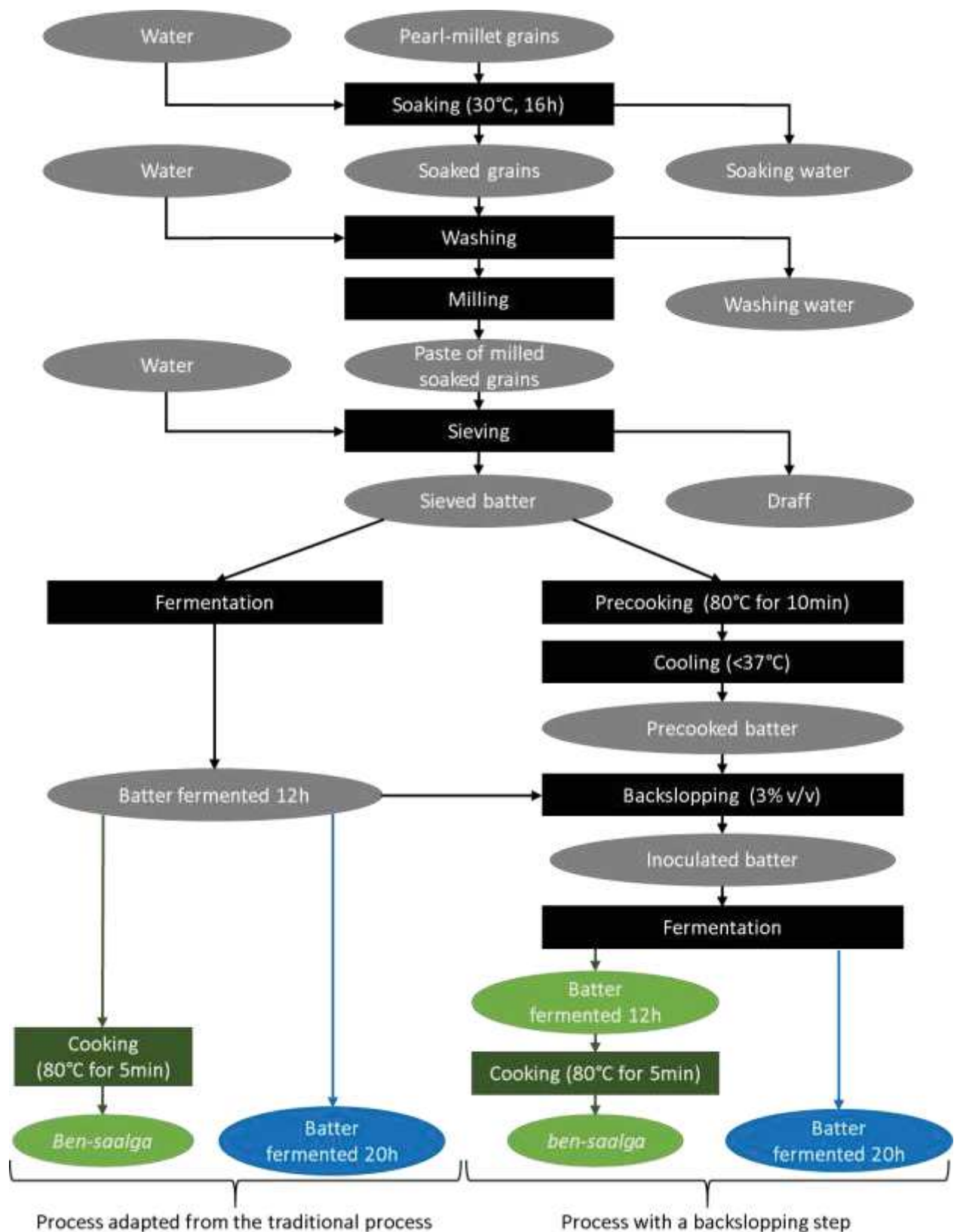


Figure 10 : Processing of pearl-millet into *ben-saalga* according to a process adapted from the traditional process (AP) and a process with a backslopping step (BP). The steps that were carried out only during the experiment I are given in green, and those carried out only during the experiment II are given in blue.

The second type of porridge (BP) was prepared using a process, based on a fermentation by backslopping, according to a modified process previously described (Songré-Ouattara et al., 2009, 2010; Tou et al., 2007a). This process differs from the first one by two additional steps before the fermentation step: a precooking step (10 min; 80°C), followed by a backslopping step, when the temperature of the porridge decreases below 37 °C. For the backslopping, a fraction of the naturally fermented porridge (AP) was used as a starter to inoculate the batter. The volume of starter added corresponded to 3% of the volume of the BP batter.

### **2.3. Sampling during the processes**

The AP and BP porridges were prepared in triplicates (on 3 different days), and samples were taken at different stages of the process, in order to evaluate the impact of the various steps on the folate content (Experiment I). In a second time, other AP and BP porridges were prepared in triplicate using the same processes with one difference: the fermentation time was extended to 20h, to assess the impact of the fermentation time on the folate content (Experiment II).

#### ***Experiment I: Influence of the various process steps on the folate content of porridges***

For the AP porridges, the samples collected were: raw pearl-millet grains, soaked grains, soaking water, washing water, paste of milled soaked grains, unfermented sieved batter, draff, fermented batter and cooked *ben-saalga*. For BP porridges, the same samples were collected and samples were also collected after the precooking step and after the backslopping step.

#### ***Experiment II: Influence of the fermentation time on the folate content of porridges***

In this case, the fermented batter was not cooked (Figure 10), and the samples were collected mainly during the fermentation step (sampling each 4 hours until 20h of fermentation). Water at the beginning and at the end of the soaking step was also collected in order to check if the results were similar to those of the experiment I.

### **2.4. Total folate assay**

The total folate content of the food products was determined using the microbiological assay described by Kariluoto and Piironen (2009), modified as follow. Frozen samples were thawed, 1g was weight in a 50 ml centrifuge tube, 15 ml of extraction buffer were added (50 mM

Ches/50mM Hepes buffer, 10mM 2-mercaptoethanol, 2% (w/v) sodium ascorbate, pH 7.85), and the tubes were flushed with nitrogen and thoroughly vortexed. The tubes were heated at 100°C for 10 min (and vortexed twice during heat extraction), then cooled on ice. The pH was adjusted to 4.7 with acetic acid and 1 ml of  $\alpha$ -amylase (Sigma-Aldrich A9857, 20 mg/ml in 1% sodium ascorbate) and 2 ml of conjugase (prepared from desiccated hog kidney, 5 mg/ml in water) were added. The tubes were flushed with nitrogen and incubated for 3h at 37°C in a shaking water-bath, in the dark. Then 2 ml of protease (Sigma-Aldrich P5147, 3 mg/ml in 1% sodium ascorbate) were added. The tubes were flushed with nitrogen and incubated in the same conditions for 1h. At the end of the incubation, the tubes were heated at 100°C for 5 min to inactivate the enzymes, then cooled on ice. The tubes were vortexed and the pH was adjusted to 6.1 with KOH. The volume was filled to exactly 50 ml with 0.5% sodium ascorbate (pH 6.1), and the tubes were centrifuged at 20000g for 30 min at 4°C. The supernatants were then diluted with 0.5% sodium ascorbate (pH 6.1), and the method described by Kariluoto and Piironen (2009) was used to determine the folate concentration, using 96-well microtiter plates, with *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 as the growth indicator organism, folic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) as the calibrant, and Folic Acid Casei Medium (Difco, Sparks, MD, USA) as the assay medium. Method performance was confirmed by analysing a certified reference material (BCR 121 Wholemeal flour, IRMM, Geel, Belgium). A blank sample and the reference sample were analyzed in each set of samples. Folate values are averages of three replicates.

## **2.5. Mass balance assessment during the unit operations**

In order to follow the losses and gains of folate during the process steps, a mass balance assessment was carried out. Therefore, the weight of each ingredient added, each intermediate product, and that of the final products was measured for both AP and BP porridges. The dry matter content of all the samples was also measured (by drying the samples at 105°C in open dishes until reaching constant weight) and expressed in g DM/100g sample. The weight of the samples taken for folate analyses (and other analyses), and that of the product lost during the milling step, were taken into account in the calculations (to assess what the weight would have been if there had been no sampling and sample loss during the process). These values of samples weights and dry matter were combined with the values of folate content, in order to calculate the amount of folate in the initial pearl-millet grains (in  $\mu\text{g}$ ), and in the intermediate

and final products (in  $\mu\text{g}$ ). Then, the folate content of the intermediate and final products was expressed in percentage, compared to the quantity of folate in the initial pearl-millet grains.

## **2.6. Microbial kinetics and analysis of organic acids**

Aerobic mesophilic bacteria and LAB were counted on plate count agar medium (PCA, Difco, Sparks, MD, USA) and de Man, Rogosa and Sharpe medium (MRS, Difco, Sparks, MD, USA), respectively. To identify the types of fermentation, samples taken during the soaking and fermentation steps of the experiment II were diluted 1:4 v/v with sterilized Milli-Q water, filtered (cellulose acetate filters;  $0.22\mu\text{m}$ ) and then analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for their ethanol, lactic and acetic acid contents, according to the method described by Agati et al. (1998).

## **2.7. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Statgraphics Plus 5.1 software (Rockville, MD, USA). One-way analyses of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls tests, were carried out to identify the differences between samples. Differences were considered statistically significant for  $p\text{-values} < 0.05$ .

# **3. Results**

## **3.1. Influence of the various process steps on the folate content of *ben-saalga***

The evolution of the folate content during the various steps of the preparation of *ben-saalga* is presented in Figure 11. The results are expressed in percentage, compared to the initial amount of folate in the 100g of pearl-millet grains used as raw material ( $26.2 \pm 2.1\mu\text{g}$ ).

Tableau 16 and Figure 11 show that a folate loss in soaking water was observed (-17% and -19%, for AP and BP respectively), probably due to leaching in soaking water. Tableau 16 also shows that, when expressed on a fresh weight basis, the folate content of the soaked grains did not significantly vary, compared to that of the initial pearl-millet grains. However, as shown in Figure 12, the pearl-millet grains absorbed water during the soaking step, resulting in an

increase of their weight (+50.8%) and a decrease of the dry matter content from 87% to 61-62%, but Figure 11 shows that the total amount ( $\mu\text{g}$ ) of folate in the soaked grains was significantly higher (+26% to +31%) than that of the initial pearl-millet grains, suggesting a folate production during the soaking step.

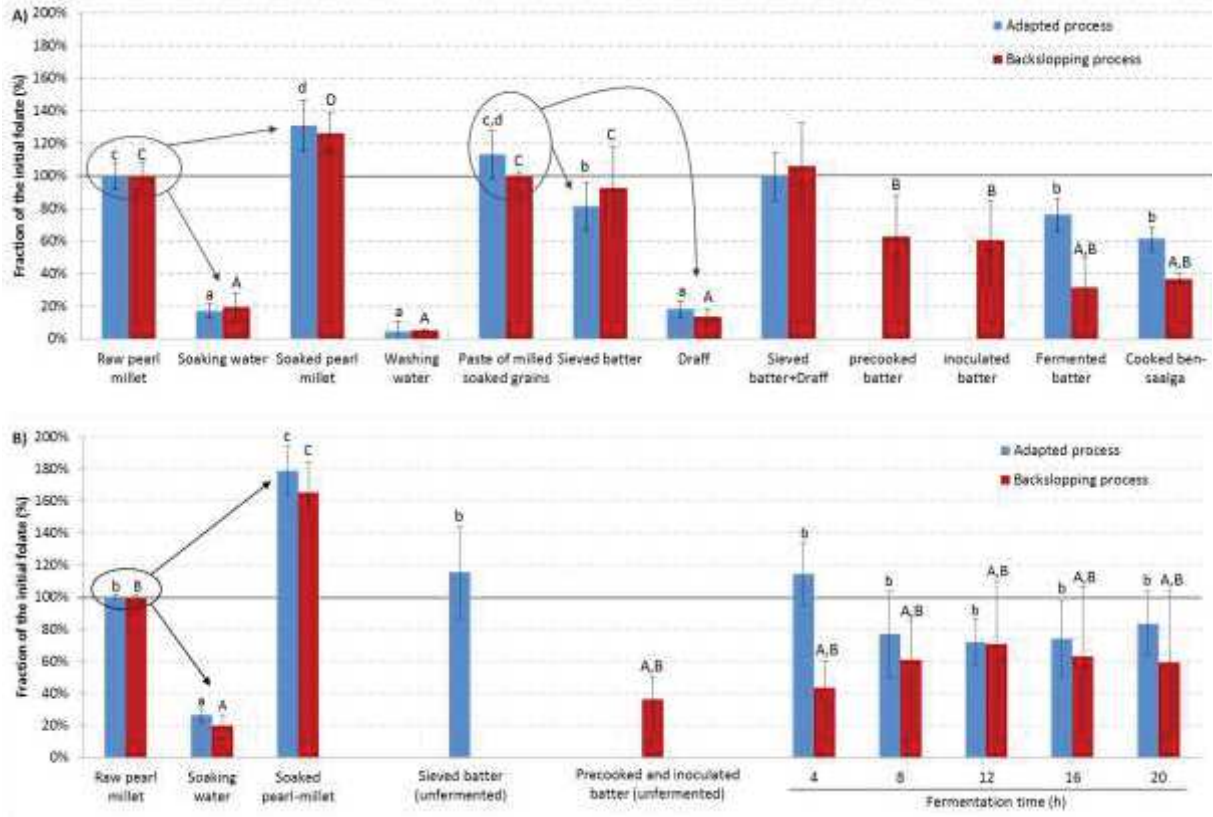


Figure 11 : Evolution of the folate content during the different steps of the preparation of a pearl-millet based porridge (experiment I), compared to the initial folate content of the raw pearl-millet (in %). Different letters indicate significant differences for each series: Adapted process (small letters), Backslopping process (capital letters).

Figure 11 shows that, after washing and milling, the folate content of the milled soaked gains was significantly lower than that of soaked grains in the case of the process with a backslopping step (BP; -21%), but not in the case of the adapted process (AP; -14%). After this folate loss, the folate content of the milled soaked grains was not significantly different from that of the initial raw pearl-millet grains.

During the sieving step, both the dry matter and the folate were divided up between the sieved batter and the draff (Figure 11 and Figure 12). This resulted in a folate loss, due to the removal of the draff. Moreover, Tableau 16 shows that, when expressed on a fresh weight

basis, the folate content of the sieved batter was drastically lower than that of the milled soaked grains (2.5 to 2.9  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW, instead of 17.3 to 19.4  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW). Indeed, as shown in Figure 12, five volumes of water are added to the milled soaked grains during the sieving step, and this dilution resulted in a low dry matter content in the sieved batters (8.4-8.6 g DM/100g) in comparison to the milled soaked grains (59.8 g DM/100g).

**Tableau 16 : Evolution of the folate content ( $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW) during the preparation of pearl-millet based porridges**

	<b>Adapted process</b>	<b>Backslopping process</b>
<b><i>Experiment I: impact of the process steps</i></b>		
Raw pearl-millet	26.2 $\pm$ 2.1	26.2 $\pm$ 2.1
Soaking water	5.1 $\pm$ 1.6	5.3 $\pm$ 2.4
Soaked grains	22.5 $\pm$ 2.7	21.8 $\pm$ 2.3
Washing water	0.4 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.1
Paste of milled soaked grains	19.4 $\pm$ 2.5	17.3 $\pm$ 0.7
Sieved batter	2.5 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.8
Druff	7.1 $\pm$ 0.9	5.5 $\pm$ 1.0
Precooked batter	SNI	2.3 $\pm$ 0.9
Precooked and inoculated batter	SNI	2.1 $\pm$ 0.9
Fermented batter	2.4 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.6
<i>Ben-saalga</i>	2.2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1
<b><i>Experiment II: impact of fermentation time</i></b>		
Raw pearl-millet	24.3 $\pm$ 0.4	24.3 $\pm$ 0.4
Soaking water	7.0 $\pm$ 0.9	5.2 $\pm$ 1.5
Soaked grains	27.5 $\pm$ 2.9	25.0 $\pm$ 2.5
Sieved batter	3.4 $\pm$ 0.7	NA
Precooked and inoculated batter	SNI	1.0 $\pm$ 0.4
Batter fermented 4h	3.3 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.5
Batter fermented 8h	2.2 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.7
Batter fermented 12h	2.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 1.1
Batter fermented 16h	2.2 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 1.2
Batter fermented 20h	2.4 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 1.3

*Results are given as means and standard deviations.*

*SNI: step not included in this process. NA: not analyzed*

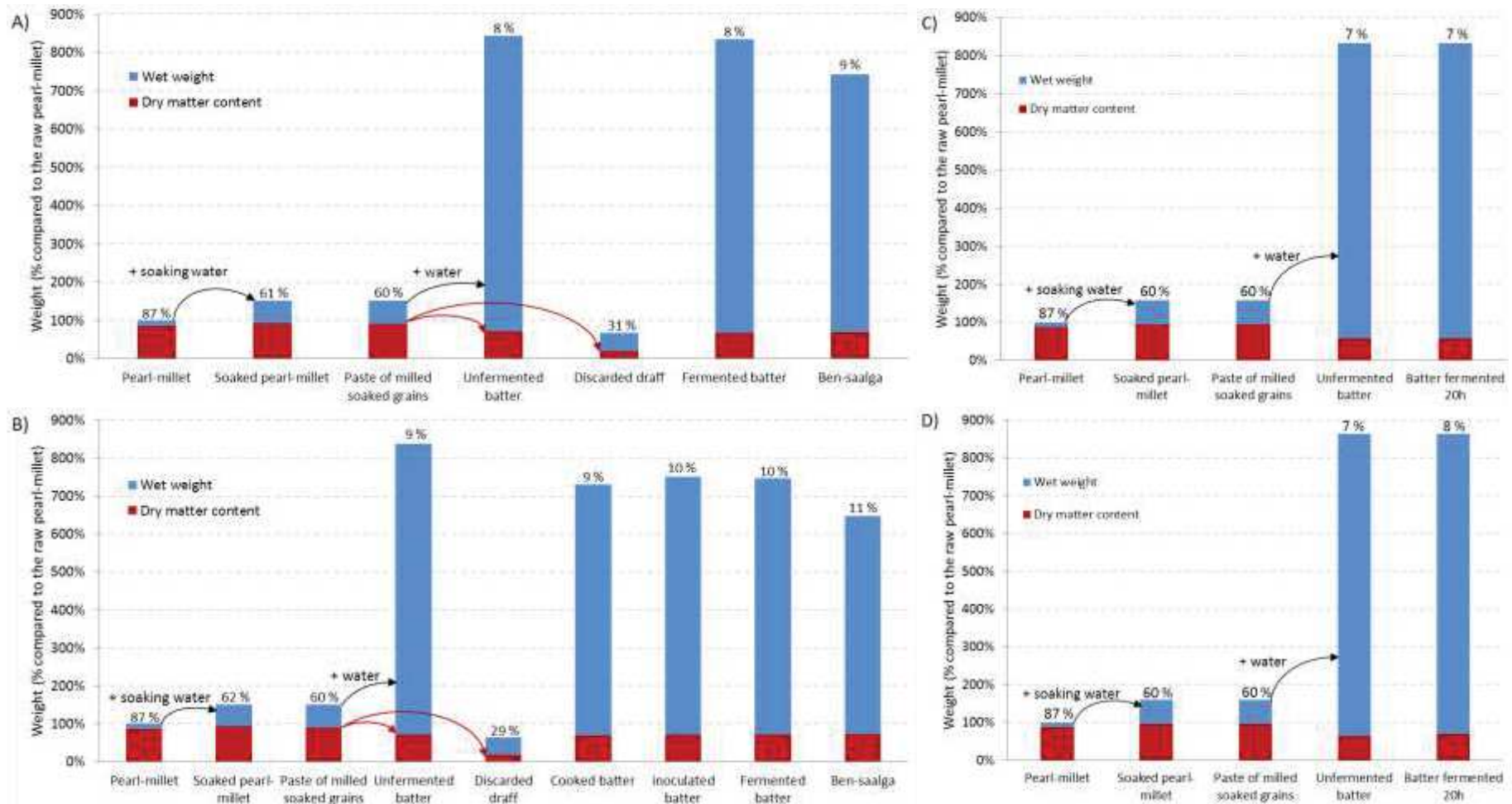


Figure 12 : Evolution of the dry matter content during the different steps of the pearl-millet processing into *ben-saalga*. A) Adapted process (Experiment I), B) Backslopping process (Experiment I), C) Adapted process (Experiment II), and D) Backslopping process (Experiment II). Percentages indicated above the blue boxes correspond to the dry matter content of the samples (g DM/100g sample).

When backlopping was used (BP), the batter was precooked after the sieving step, which resulted in a folate loss in the precooked batters (from -24 % to -42 % loss), compared to sieved batters (Figure 11). Figure 12 shows that this step also induced a loss of weight, due to water evaporation (-12.9 %), but not a significant increase in dry matter content. Tableau 16 shows that the inoculation by backslopping had no significant effect on the folate content of the batters, as the folate content of the samples was 2.3 and 2.1  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW before and after inoculation, respectively. The inoculation induced a slight increase of the weight of the batter, but no significant change of its dry matter content.

Whatever the process used, the fermentation did not influence the dry matter content (Figure 12). However, Figure 11 and Tableau 16 show that, if the fermentation step did not significantly influence the folate content of the batter in the case of the adapted process (spontaneous fermentation), when backslopping was used (BP), the folate content drastically decreased, from  $2.9 \pm 0.8 \mu\text{g}/100\text{g}$  FW to  $1.1 \pm 0.6 \mu\text{g}/100\text{g}$  FW (for sieved batter and fermented batter, respectively). Then, the cooking step did not significantly impact the folate content of the samples, compared to the uncooked fermented samples (Figure 11 and Tableau 16). At the end of the process, the folate content of the pearl-millet based porridges (*ben-saalga*) was 2.2  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW and 1.5  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FW, for AP and BP respectively.

### **3.2. Evolution of the folate content during the fermentation of *ben-saalga***

A second set of experiments was carried out in order to better understand the impact of the microbiota on the folate content during the fermentation of *ben-saalga*. Figure 2 shows that losses of folate due to leaching in soaking water were also observed (-20% to -26% loss), but the amount of folate in the soaked grains was once again significantly higher than that of the initial pearl-millet grains (65% to 79%). When the results are expressed in percentage compared to the amount of folate in the 100 g of initial pearl-millet grains (Figure 11), we can see that in the case of the adapted process, the total amount of folate in the unfermented batter (sieved batter) was not significantly different of that of the initial pearl-millet grains, whereas when backslopping was used, the amount of folate in the unfermented batter (precooked and inoculated batter) was much lower (-64%) than that of the initial pearl-millet grains.



Tableau 16 shows that the folate content at the beginning of the fermentation step was  $3.4 \pm 0.7 \mu\text{g}/100\text{g FW}$  for AP (sieved batters) and  $1.0 \pm 0.4 \mu\text{g}/100\text{g FW}$  for BP (precooked and inoculated porridges). The fermentation step was then carried out for 20h, and samples were taken every 4h for folate analysis. Figure 11 shows that, in the case of the adapted process, the total amount of folate in the fermented batter seemed to slightly decrease after 4h of fermentation, but this decrease was not statistically significant, and the total amount of folate after 20h fermentation was not significantly different of that of the initial pearl-millet grains. When backslopping was used, the variations of folate content from one triplicate to another were very high, and no statistically significant effect of the fermentation on the folate content of the porridges was observed (Tableau 16 and Figure 11). The folate content at the end of the fermentation step was  $2.4 \pm 0.5 \mu\text{g}/100\text{g FW}$  for AP, and  $1.7 \pm 1.3 \mu\text{g}/100\text{g FW}$  for BP.

### 3.3. Fermentation kinetics

The pH values and microbial concentrations during the fermentation steps of the first set of experiments are given in Tableau 17. The pH values of the batters at the beginning of the fermentation (around 7.0) were similar for both AP and BP. At the end of the fermentation, the pH was slightly higher in the case of AP ( $4.8 \pm 0.3$ ) than in the case of BP ( $4.2 \pm 0.3$ ). The microbial concentrations in the sieved batters of the two processes were comprised between 6 and 7  $\log_{10}$  (CFU/ml). In the case of BP, the precooking step induced a decrease of the microbial concentration under 2  $\log_{10}$  (CFU/ml) for aerobic mesophilic bacteria and under 3  $\log_{10}$  (CFU/ml) for LAB, but thanks to backslopping inoculation, the microbial concentrations then reached 7.5  $\log_{10}$  (CFU/ml) for aerobic mesophilic bacteria and 7.7  $\log_{10}$  (CFU/ml) for LAB. At the end of the fermentation step, all the samples displayed microbial concentrations between 8.9 and 9.8  $\log_{10}$  (CFU/ml), and after the final cooking step, microbial concentration of the *ben-saalga* ranged from 3.6 to 4.3  $\log_{10}$  (CFU/ml).

The pH values and microbial concentrations were also measured during the second set of experiments, in the soaking water and during the fermentation step (Tableau 17). The pH values were close to 7 in the soaking water at the beginning and at the end of the soaking step, and in the sieved batters at the beginning of the fermentation, for both processes. During the fermentation, the pH quickly decreased to reach  $4.3 \pm 0.4$  in the case of BP, whereas in the case of AP the pH reached  $5.2 \pm 0.2$  after 12h of fermentation and did not decreased more. At

the beginning of the soaking step, no LAB were detected, but the concentration of aerobic mesophilic bacteria was  $3.9 \pm 0.1 \log_{10}$  (CFU/ml) for AP and  $4.0 \pm 0.4 \log_{10}$  (CFU/ml) for BP. At the end of the soaking step, all the microbial concentrations were comprised between 7.5 and  $8.8 \log_{10}$  (CFU/ml). For all the samples, the microbial concentrations were comprised between 6.0 and  $7.8 \log_{10}$  (CFU/ml) at the beginning of the fermentation, and between 8.6 and  $8.9 \log_{10}$  (CFU/ml) at the end of the fermentation. The aerobic mesophilic bacteria and the LAB concentrations were similar for both AP and BP, for each sampling time, during the fermentation.

**Tableau 17 : pH and microbial counting in  $\log_{10}$  (CFU/ml) at different steps of the preparation of *ben-saalga***

	Adapted process			Backslopping process		
	pH	MRS	PCA	pH	MRS	PCA
<b><i>Experiment I: impact of the process steps</i></b>						
Sieved batter	$7.1 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.4$	$6.3 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.2$	$6.9 \pm 0.1$	$6.5 \pm 0.3$
Cooked batter	SNI	SNI	SNI	$7.1 \pm 0.1$	< 2	$2.8 \pm 0.7$
Inoculated batter	SNI	SNI	SNI	$7.0 \pm 0.3$	$7.7 \pm 0.6$	$7.5 \pm 0.3$
Fermented batter	$4.8 \pm 0.3$	$8.9 \pm 0.4$	$9.0 \pm 0.2$	$4.2 \pm 0.3$	$9.2 \pm 0.2$	$9.8 \pm 0.4$
<i>Ben-saalga</i>	$4.7 \pm 0.3$	$3.6 \pm 0.3$	$3.7 \pm 0.4$	$4.3 \pm 0.3$	$4.3 \pm 2.1$	$3.7 \pm 2.2$
<b><i>Experiment II: impact of fermentation time</i></b>						
Water at the beginning of the soaking	$7.0 \pm 0.0$	< 2	$3.9 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.0$	< 2	$4.0 \pm 0.4$
Water at the end of the soaking	$6.5 \pm 0.0$	$8.5 \pm 0.2$	$8.7 \pm 0.2$	$6.5 \pm 0.3$	$7.5 \pm 0.7$	$8.8 \pm 0.4$
Unfermented batter	$7.0 \pm 0.0$	$6.0 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.1$	$7.1 \pm 0.1$	$7.8 \pm 0.7$	$7.3 \pm 0.3$
Batter fermented 4h	$6.8 \pm 0.0$	$7.5 \pm 0.6$	$7.4 \pm 0.2$	$5.9 \pm 0.2$	$8.4 \pm 0.2$	$8.6 \pm 0.1$
Batter fermented 8h	$5.7 \pm 0.1$	$8.6 \pm 0.3$	$8.5 \pm 0.1$	$5.0 \pm 0.4$	$8.6 \pm 0.2$	$8.7 \pm 0.3$
Batter fermented 12h	$5.2 \pm 0.2$	$8.9 \pm 0.1$	$8.8 \pm 0.1$	$4.7 \pm 0.5$	$8.8 \pm 0.2$	$8.8 \pm 0.1$
Batter fermented 16h	$5.1 \pm 0.2$	$8.7 \pm 0.5$	$8.9 \pm 0.2$	$4.5 \pm 0.6$	$8.6 \pm 0.2$	$8.6 \pm 0.1$
Batter fermented 20h	$5.1 \pm 0.3$	$8.6 \pm 0.2$	$8.7 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.4$	$8.7 \pm 0.3$	$8.9 \pm 0.3$

*SNI: step not included in this process.*

*MRS: De Man, Rogosa and Sharpe (LAB); PCA: plate count agar (aerobic mesophilic bacteria)*

During the second set of experiments, the ethanol, acetic acid and lactic acid concentrations were measured at the end of the soaking step, and after 8h and 16h of fermentation (Figure 13). In the soaking water, for both processes, the ethanol concentration was drastically higher than the acetic acid and lactic acid concentrations. This shows that yeasts were the

predominant microorganisms during the soaking step. For AP batters, after 16h of fermentation the lactic acid concentration was slightly higher than the ethanol concentration, whereas in the case of the BP batters the lactic acid concentration was significantly higher than the ethanol concentration after 8h and 16h of fermentation. This indicates that, in this study, LAB were the predominant microorganisms during the fermentations of the pearl-millet based porridges, even if the yeast concentration might be close to the LAB concentration in the case of the AP porridges.

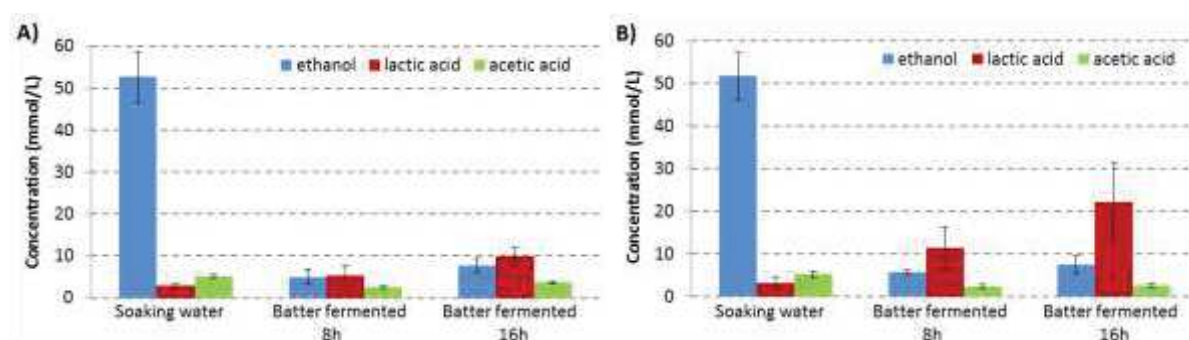


Figure 13 : Ethanol, acetic and lactic acid concentrations in water at the end of the soaking step, and in the fermented batter after 8h and 16h of fermentation, during the experiment II, for A) the process adapted from the traditional process and B) the modified process with a backslopping step.

#### 4. Discussion

In the present study, the evolution of the folate content of *ben-saalga*, a pearl-millet based fermented porridge, was followed during the different steps of the process, from grains to porridge. The steps that mainly influenced – either positively or negatively – the folate content of the product were identified. The soaking step was the only step where a folate production was recorded. The folate concentration drastically decreased during the sieving step (Table 16). The fermentation had no significant impact on the folate content. However, after the precooking and the fermentation in the case of the process with a backslopping step (BP), the folate content of the fermented batter was significantly lower than that of the sieved batter (Figure 11A).

During the soaking step, in both sets of experiments, an increase of the total folate content of the grains (from +26% to +79%) was recorded (Figure 11). This folate content increase might be due to a folate production by the grains. Indeed, previous studies showed that during the

germination of rye and wheat grains, folate can be produced by the grains, resulting in an increase of their folate content ranging from +70 % to +280 % and from +200 % to +336 %, respectively (Hefni and Witthöft, 2011; Kariluoto et al., 2006b). The lower folate production measured in the present study may be due to the conditions used for the soaking step. Indeed, the rye and wheat grains used in the previous studies were germinated by alternating soaking and incubation under high relative humidity conditions (Hefni and Witthöft, 2011; Kariluoto et al., 2006b). These conditions promote the germination since germination can be inhibited when grains are immersed (Chaussat and Deunff, 1975). During the processing of pearl-millet into *ben-saalga*, the grains remain in the water until the end of the soaking step (Tou et al., 2006). Another explanation for the folate production during the soaking step might be the presence of naturally occurring yeasts. Indeed, numerous studies showed that yeasts are able to highly increase the folate content (up to +700 %) of cereal based fermented foods (Hjortmo et al., 2008b; Korhola et al., 2014). During the processing of pearl-millet into *ben-saalga*, the ethanol content of the soaking water shows that a fermentation due to yeasts occurred during the soaking step. Folate production by yeasts during the soaking of cereal grains has never been investigated, but we can assume that yeasts would be mainly in free form in the soaking water. Therefore, when the soaking water was removed, the intracellular folate trapped inside yeast cells, and the extracellular folate produced by the yeasts were removed, along with a part of the folate produced by the pearl-millet grains that diffused in the water. That could explain why folate losses (-17 % to -26 %) were recorded during the soaking. As far as we know, folate losses during the soaking of cereal grains has never been studied, but folate losses comprised between -21% and -59% were observed during the soaking of soybeans (Arcot et al., 2002; Mo et al., 2013).

The highest decrease of folate concentration (Tableau 16) occurred during the sieving step. This can be explained by i) the removal of the grains outer layers (draff) that contain a non negligible amount of folate, and ii) the addition of a high volume of water in the sieved batter. Indeed, according to Mouquet et al. (2006), porridges should have a fluid consistency (Bostwick flow of 120 mm/30 s) to be suitable for young children. To reach this fluid consistency, producers in Burkina Faso add a high volume of water to the porridge to limit the gelatinization during the cooking step (Mouquet-Rivier et al., 2008). This induces a low dry matter content (below 8 g DM/100 g), a low energy density (below 32 kcal/100 g), as well as a dilution of the micronutrients.

The fermentation step did not seem to have a significant effect on the total folate content of the batter, in both sets of experiments, whatever the duration of the fermentation. The results of this study showed that LAB were the predominant microorganisms during the fermentation of the batters, even if yeasts were also present. This is in good agreement with the results obtained by Tou et al. (2006), who counted  $7.0 \pm 1.1$  log CFU/ml for LAB and  $5.5 \pm 0.7$  log CFU/ml for yeasts in samples of ready-to-eat *ben-saalga* produced in Burkina Faso. According to Turpin et al. (2011), LAB isolated from *ben-saalga* have a good genetic potential to synthesize folate. In other studies, it has been shown that numerous LAB are able to produce folate in various culture media and food products, but that numerous other LAB consume folate (Laiño et al., 2014; LeBlanc et al., 2008, 2011a; Saubade et al., 2016). Yeasts are known to be good folate-producing microorganisms (Moslehi-Jenabian et al., 2010). According to all these data, we might assume that in the present study, either there was no folate production at all during the fermentation of the pearl-millet porridges, or there was a balance between folate auxotrophy and prototrophy. However, the microbiota of the porridges produced in this study might also be different from that of *ben-saalga* produced in Burkina Faso.

The precooking step (10 minutes at 80 °C) carried out before the backslopping step (BP), seemed to significantly decrease the folate content of the batter (Figure 11A). This could explain the lower folate content of the precooked and fermented batter compared to the sieved batter. Some folate vitamers are known to be unstable at high temperature (Ball, 2005). However, in the present study, the impact of the temperature on the folate content is not clear. Indeed, in the first set of experiments, the cooking step (5 minutes at 80°C) performed after the fermentation step had no significant impact on the folate content of both AP and BP porridges.

The folate concentration in the porridges produced in this study was very low (Tableau 16), whatever the process used, and was similar to the folate concentration previously recorded in *ben-saalga* samples collected in Burkina Faso (Saubade et al., 2014). This study allowed to identify the steps that mainly influenced the folate content of the porridge during the processing of pearl-millet into *ben-saalga*. In spite of the good genetic potential of the LAB involved in the fermentation of *ben-saalga* for the synthesis of folate (Turpin et al., 2011), no

folate production was recorded in the present study. These results led us to suggest different modifications of the process in order to increase the folate concentration of *ben-saalga*.

One way to increase the folate content of the grains would be to adapt the soaking step, in order to promote the germination, by alternating soaking and incubation under high relative humidity conditions. Moreover, previous studies showed that, for wheat and rye grains, the germination temperature, the incubation time and the cultivar have an impact on the folate production (Hefni and Witthöft, 2011, 2012; Kariluoto et al., 2006b). For example, wheat grains were germinated at 20, 25, 30 or 35 °C, and the highest folate production was recorded at 30°C (Hefni and Witthöft, 2011). In another study, different cultivars of rye and wheat grains were germinated at 25 °C for 48, 72 or 96 h, and in most cases the highest folate was reached after 48 or 72h of germination (Hefni and Witthöft, 2012). These parameters may be optimized to promote folate production during the germination of pearl-millet grains.

In the present study, a loss of folate was observed during the sieving step, and in a previous work, a loss of other nutrients (lipid, protein, iron and zinc) was also identified by Mouquet-Rivier et al. (2008), due to the removal of the grains outer layers and germ during sieving. To take advantage of the nutritional potential of the draff, the suppression of the sieving step and the use of pearl-millet wholemeal flour might be considered for the preparation of *ben saalga*. However, even if the consumption of wholegrain products has been associated with reduced risks of many diseases, such as cardiovascular disease and atherosclerosis (Mellen et al., 2007, 2008), the use of wholemeal flour may have drawbacks. Indeed, wholegrain products are sometimes characterized by a bitter taste and a gritty texture (Heiniö et al., 2016) that may not be acceptable to the consumers, and the grains outer layers also contain a non-negligible amount of phytate, tannin, and fibers, that can act as antinutritional factors and decrease the bioaccessibility of minerals (Kumar et al., 2010). However, the fermentation of the product may help to overcome these drawbacks, as tannin and phytate can be degraded by microbial enzymes during lactic acid fermentation (Kumar et al., 2010; Yao et al., 2014).

Another way to increase the folate content of the porridge might be to increase its overall nutritional density, and thus its dry matter content. Different studies have previously focused on increasing the dry matter content of *ben-saalga* without changing its viscosity. Songré-Ouattara et al. (2010) showed that a modified process with an inoculation by backslopping, or

with starter culture of LAB co-culture, allowed to obtain porridges with high dry matter contents (from 14 to 18 g DM/100 g of porridge), with a fluid consistency well suited to young children, thanks to the amylolytic LAB present in the inoculum. In the present study, the use of an inoculation by backslopping (BP process) did not allow to increase the folate concentration of the porridge, compared to the AP process. Therefore, the use of cocultures of amylolytic LAB and folate-producing LAB could be tested, in order to increase the dry matter content of the porridge without changing its viscosity, while promoting folate production during the fermentation.

As reviewed previously (Saubade et al., 2016), there are various ways to promote the folate production during the fermentation step. As written above, the inoculation of the batter with starter cultures of one – or more – folate-producing microorganisms could allow increasing the folate content. Even if we observed no significant impact of the fermentation on the folate content of *ben-saalga*, whatever the duration of the fermentation, it has been shown in different culture media that the production of folate by starter cultures of LAB depends on the period of incubation. For example, the highest folate concentration was reached at the beginning of the stationary phase with a *Lactobacillus plantarum* strain in a broth containing folic acid medium (Masuda et al., 2012). The highest folate concentrations were obtained during the exponential growth phase with *Bifidobacterium* strains in single culture in a folate free medium or co-cultivated with *S. thermophilus* in reconstituted non-fat dry milk (D'Aimmo et al., 2012; Lin and Young, 2000a). If the use of starter culture is considered to improve the folate production during the fermentation of pearl-millet porridges, it could also be interesting to optimize the duration of the fermentation step. Moreover, according to the KEGG database, some genes encoding enzymes involved in folate synthesis are lacking in numerous LAB (Kanehisa et al., 2014). Consequently, numerous LAB can not produce folate, or in low amount, if at least one of the three precursors for the synthesis of folate (para-aminobenzoic acid, guanosine triphosphate and glutamate) is absent in the medium. In skim milk, folate production by a *Lactococcus lactis* was increased by adding either 10 mg/L of PABA, or 10 mg/L of glutamate. The addition of at least one of the three precursors for the synthesis of folate to the sieved batter may therefore stimulate the folate production by LAB and consequently increase the folate content of *ben-saalga*. The use of other food components, such as growth inhibitory compounds (NaCl) or prebiotics (sorbitol, mannitol),

might also promote folate production by LAB during the fermentation (Gangadharan and Nampoothiri, 2011; Sybesma et al., 2003a).

Finally, an obvious way to limit the folate loss during the process would be to limit the exposure of folate to factors that can induce their degradation, such as light, oxidizing agents, heat, and low pH (Saubade et al., 2016; Strandler et al., 2015). For example, the use of closed containers may limit the exposure to light, and the use of natural antioxidant compounds could help protecting folate against oxidizing agents. Baobab fruit pulp, which is known to be rich in vitamin C and is consumed in many West African countries, including Burkina Faso, might be added by *ben-saalga*'s producers in the sieved batter, to act as a natural antioxidant (Chadare et al., 2009). Some folate vitamers are pH-sensitive, such as reduced unsubstituted vitamers that exhibit the lowest stability between pH 4 and 6. A loss of folate may also occur during the fermentation, since the pH decreased under 4.5 in the porridges (Tableau 17). However, acidic pH may be one of the parameters inhibiting the growth of some pathogens commonly found in *ben-saalga*, such as *Bacillus cereus* (Güven and Benlikaya, 2005; Humblot et al., 2012; Reis et al., 2012). Therefore, it may not be advisable to limit the acidification by LAB during the fermentation of *ben-saalga*, even if it may allow to limit the folate loss.

To conclude, this study allowed to better understand the impact on vitamin B9 of the different process steps involved in the preparation of *ben-saalga*. The steps that mainly influenced – positively or negatively – the folate content of the porridge were identified. As the folate content of this porridge was very low, various solutions were proposed to increase its vitamin content. Some of the process modifications listed may actually be difficult to implement in the field, where *ben saalga* is mostly produced in very small production units ran by women. For example, the use of starter cultures of amylolytic LAB to increase the dry matter content without changing the consistency of the porridges would imply to use a higher quantity of pearl-millet grains to produce the same amount of porridge. This could have an impact on the cost of the product, which seems currently difficult given the economic context. However, other solutions, such as promoting the grains germination or the use of natural antioxidants, might be considered.



## **Acknowledgements**

The authors thank Isabelle Rochette, for analysing the ethanol, acetic acid and lactic acid concentrations by HPLC, and Claire Mouquet-Rivier, for useful discussion on the nutritional quality of complementary foods in West Africa.

This work was carried out in the framework of the FOIEA project ([www.folea.eu](http://www.folea.eu)), which is part of the ERA-Net « Developing African-European joint collaboration for Science and Technology » (ERAfrica), financially supported by the European Commission under the 7<sup>th</sup> Framework Programme (ERAfrica ERAFRICA\_IC-027, FP-226154).

Fabien Saubade acknowledges a PhD grant from the French Ministry of Education and Research.

### **3- Potentiel de synthèse de folates par des souches de BL et de levures dans un aliment céréalier fermenté traditionnel**

#### **3-1- Introduction**

D'après les résultats de la partie précédente, la fermentation, qu'elle soit spontanée ou par pied de cuve, n'a pas d'effet significatif sur la teneur en folates du *ben-saalga*. Cette étape pourrait donc être optimisée pour augmenter la production de folates par les micro-organismes. Lors d'études précédentes au sein de l'UMR Nutripass, certaines propriétés nutritionnelles de bouillies à base de mil ont été améliorées grâce à des fermentations dues à des cultures starters. Pour cela, deux stratégies ont été envisagées : utiliser des souches isolées de l'aliment et qui possède la capacité recherchée, ou utiliser des souches de références qui possèdent la capacité recherchée et qui appartiennent à une espèce présente dans l'aliment. Par exemple, la capacité d'hydrolyser l'amidon ainsi que de dégrader les phytates et les  $\alpha$ -galactosides a été testé sur 155 isolats bactériens provenant d'échantillons de *ben-saalga*. Cette étude a permis entre autre de sélectionner deux souches de BL (*L. plantarum* 6.1 et 4.4) présentant une activité amylasique (Songré-Ouattara et al., 2008). L'utilisation de la souche de référence *L. plantarum* A6 a permis une hydrolyse plus efficace de l'amidon que la souche *L. plantarum* 6,1 isolée du *ben-saalga*, dans une bouillie à base d'un mélange de mil et d'arachide (Songré-Ouattara et al., 2009).

L'utilisation de cultures starters pourrait également être envisagée pour augmenter la production de folates lors de la fermentation de bouillies à base de mil. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, de nombreuses études ont démontré que la teneur en folates de nombreux produits laitiers a été significativement augmentée grâce à des fermentations dues à des cultures starters de BL (LeBlanc et al., 2008, 2011a). La production de folates par les BL dans d'autres catégories d'aliments, comme les céréales par exemple, a également été démontrée par différentes études (Gangadharan and Nampoothiri, 2011; Jägerstad et al., 2004; Kariluoto et al., 2006a, 2014).

Les levures sont de bonnes productrices de folates et de nombreux aliments céréaliers, comme le *ben-saalga* par exemple, sont fermentés naturellement par des BL et des levures (Moslehi-Jenabian et al., 2010; Tou et al., 2006). L'utilisation de co-cultures de BL et de levures

pourrait donc être envisagée pour augmenter les teneurs en folates des aliments céréaliers. D'après les rares études à ce sujet, il semblerait que la production de folates dans les aliments par des co-cultures de BL et de levures soit significativement supérieure à celle des BL seules, mais pas significativement différente de la production par les levures seules (Kariluoto et al., 2006a; Korhola et al., 2014).

Il a été démontré que les BL isolées du *ben-saalga* ont un fort potentiel de synthèse des folates, aussi bien d'un point de vue génétique qu'en milieu de culture (Saubade et al., 2014; Turpin et al., 2011). C'est pourquoi les souches les plus productrices de folates pourraient être utilisées comme culture starter. Des essais préliminaires ont même été réalisés dans le laboratoire préalablement à mon arrivée, pour étudier la production de folates par deux souches de BL (*L. plantarum* 6.2 et *L. fermentum* 8.2) dans une bouillie à base de mil (Almoussa-Almaksour, 2013). Ces teneurs ont permis d'augmenter faiblement la teneur des bouillies (5 µg/100g de base humide) en 24 h de fermentation, par rapport au mélange de mil et d'eau non fermenté (4µg/100g de base humide), même si cette augmentation reste trop faible. L'utilisation d'une co-culture de BL et de levures pour produire du *ben-saalga* n'a jamais été étudié et pourrait permettre d'augmenter davantage la teneur en folates de cet aliment.

L'objectif de ma troisième et dernière étape de thèse a donc été d'évaluer l'impact d'une culture starter constituée de BL et de levures sur la teneur en folates d'une bouillie à base de mil. Toutefois, aucune levure n'a été isolée du *ben-saalga* ou d'un autre aliment à base de mil du Burkina Faso. C'est pourquoi ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Turin qui possède une collection de levures isolées à partir d'aliments céréaliers fermentés traditionnels du Bénin (Greppi et al., 2013a, 2013b). Ce travail en commun a donné lieu à une co-publication lors du séjour post-doctoral de cette chercheuse italienne au sein de l'équipe Nutrition-Aliments de l'UMR Nutripass. Dans le cadre de cette publication, ma participation a été restreinte à l'étude de la production de folates par des BL et des levures dans les bouillies à base de mil.

Les résultats de cette partie ont été valorisés sous la forme d'un article accepté pour publication dans *Food Microbiology*.

**Article accepté**

Greppi A., Saubade F., Botta C., Humblot C., Guyot J-P., Cocolin L. (2016). Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Soumis*



**3-3- Publication: Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food.**



**Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food**

Anna Greppi <sup>1\*</sup>, Fabien Saubade <sup>2</sup>, Cristian Botta <sup>1</sup>, Christele Humblot <sup>2</sup>, Jean-Pierre Guyot <sup>2</sup>, Luca Cocolin <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural, Forest and Food Science, University of Torino, Grugliasco, Italy

<sup>2</sup> Institute of Research for Development (IRD); UMR 204 Food and nutrition research in the global south (NUTRIPASS), IRD / University of Montpellier / SupAgro, Montpellier, France

\*Corresponding author: [anna.greppi@hest.ethz.ch](mailto:anna.greppi@hest.ethz.ch)

\*Current address: Laboratory of Food Biotechnology, Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, 8092 Zürich, Switzerland



## **Abstract**

With the aim of selecting starter cultures with interesting probiotic potential and with the ability to produce folate in a food matrix, yeast strains isolated from fermented cereal-based African foods were investigated. A total of 93 yeast strains were screened for their tolerance to pH 2 and 0.3 % of bile salts. *Pichia kudriavzevii* isolates gave the best results. Selected *P. kudriavzevii* strains were tested for survival to the simulated human digestion and for adhesion to Caco-2 cells. Moreover, presence of folate biosynthesis genes was verified and production of extra and intra- cellular folate determined during growth in culture medium. 31 % of yeast strains could tolerate pH 2, while 99% bile salts. Survival rate after simulated digestion ranged between 11 and 45 %, while adhesion rate between 12 and 40 %. Folate production was mainly intracellular, maximum after 24 hours of growth. To be closer to traditional cereal-based fermentations, a *P. kudriavzevii* strain with good probiotic potential was co-inoculated with *Lactobacillus fermentum* strains in a pearl millet gruel. This resulted in *in situ* folate production that peaked after 4 hours. The use of strains with both probiotic and nutritional enrichment properties may have a greater impact for the consumers.

**Keywords:** yeasts; *Pichia kudriavzevii*; probiotics; food enrichment; folate, LAB.

## 1. Introduction

Cereal-based fermented foods in Africa are major contributors to the diet of populations. Fermented gruels are frequently used as complementary foods to breast-feeding for young children (Tou et al., 2007a). Nevertheless, their nutritional density is weak and do not fulfill the requirement of complementary foods for young children (Mouquet-Rivier et al., 2008). Besides being important in those fermentation processes, yeasts have shown numerous probiotics effects on human health (Łukaszewicz, 2012; Moslehi-Jenabian et al., 2010). Probiotics are defined as ‘live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host’ (FAO/WHO, 2001c) To evaluate the properties of putative probiotic strains it is recommended to perform preliminary *in vitro* assessment (FAO/WHO, 2001c, 2002). This assessment has traditionally paid special attention to the ecological origin of the strains, their tolerance to the hostile conditions of the stomach and the small intestine, and their ability to adhere to intestinal surfaces (Morelli, 2007). However, the ultimate criterion to select a successful probiotic strain is the ability to confer to consumers a health benefit. Among the potential benefits, yeasts can be used to produce vitamins or to increase the bioavailability of minerals (Łukaszewicz, 2012).

Folate, also known as vitamin B9, has an essential role in cellular metabolism and is relevant to the etiologies of chronic diseases and birth defects (Combs and Gerald, 2012). In particular, folate is active as coenzyme in single-carbon metabolism and it is involved in the methylations and formylations that occur as part of nucleotide biosynthesis (Combs and Gerald, 2012). Mammals do not synthesize their own folate and it needs to be obtained from the diet. In some diets, cereals, especially fermented whole grain products, are major contributors to folate intakes (Kariluoto et al., 2006a). Increase of folate content of cereal products during fermentation has been mainly associated with the growth of yeasts (Kariluoto et al., 2004; Osseyi et al., 2001). They are naturally able to produce high quantities of folate and have already been used successfully for biological enrichment of foods in folate via fermentation (Hjortmo et al., 2005, 2008a, 2008b, Kariluoto et al., 2004, 2006a; Korhola et al., 2014; LeBlanc et al., 2008; Patring et al., 2006; Witthöft et al., 1999). However, in natural fermentation of cereals, there is a coexistence of yeasts and bacteria, mainly lactic acid bacteria (LAB). Even if many LAB are folate consumers, several authors showed that some of them are able to produce folates in culture medium as well as in food (LeBlanc et al., 2008).

Together with their ability to produce folate, yeasts have also been used in food to increase mineral bioaccessibility, through hydrolysis of phytates by phytases (Kaur et al., 2007). We have previously showed that *Pichia kudrivazevii* strains possess a high ability to hydrolyze phytate (Greppi et al., 2015). Biofortification of foods via controlled fermentations by the use of culture starters would allow producing food products with improved vitamin and mineral contents at low cost, which is of particular importance in African countries where the resources of households are often limited. Moreover, if the starter cultures have also the ability to survive the GIT passage and adhere to intestinal cell, all its potential beneficial effects may also be achieved directly inside the human host, increasing its impact on the host health.

In the present study, the probiotic potential of a collection of yeast strains isolated from traditional African cereal-based fermented foods was investigated. Survival to human gastrointestinal tract (GIT) conditions and adhesion to human intestinal cells was assessed *in vitro*. In addition, the ability to synthesize folates was checked in a cultivation medium on a selection of the most interesting *P. kudrivazevii* strains using genetic and biochemical screening. Finally, the most efficient folate producer was inoculated in a pearl millet-based gruel, together with LAB strains previously selected for their folate-producing ability at genetic level and by measurement of folate production in culture medium, but not yet *in situ* (Saubade et al., 2014; Turpin et al., 2011). This fermentation model was used to mimic the natural conditions where yeasts and LAB co-exist in the same food matrix and was used to investigate *in situ* folate production.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strains

A total of ninety-three yeast strains, previously isolated from spontaneously fermented cereal-based traditional food of West Africa and identified as described by Greppi et al. (2013a, 2013b) were used. They were maintained in glycerol (30%) and YPD medium (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose (Biogenetics, Milan, Italy)).

Two LAB strains, namely *Lactobacillus fermentum* 8.2 and *L. fermentum* 6.9 isolated from an African pearl millet fermented porridge (*ben-saalga*) were also used for co-inoculation trials

(Saubade et al., 2014; Turpin et al., 2011). They were maintained in glycerol (40 %) and de Man Rogosa and Sharp medium (MRS, Difco, France).

## 2.2. Tolerance of yeasts to simulated human gastrointestinal tract (GIT)

### *Assay on tolerance to low pH and bile salts*

Tolerance to GIT conditions was investigated for all the 93 strains as described by Pedersen et al. (2012), with some modifications. Yeast colonies were pre-grown for 24 h at 30 °C in YPD. Yeast culture, set at  $A_{600} = 1$ , were inoculated in YNB (6.7 g L<sup>-1</sup> yeast nitrogen base (BD, Milan, Italy) without aminoacids and 20 g L<sup>-1</sup> glucose, pH 5.4), YNB pH 2.0 and YNB containing 0.3 % (w/v) of bile salts (Oxoid, Milan, Italy), pH 8. The experiment was performed on 200 µl 96-wells microtiter plates (Steroglass, Milan, Italy). The wells were inoculated in triplicates. YNB without inoculation was used as negative control. Absorbance at 600 nm was measured after 24 h of incubation at 37°C, to simulate a prolonged stress condition. The tolerance of the strains to pH 2.0 and 0.3 % of bile salts was measured relative to the growth in YNB. It was calculated according to the following equation:

$$\text{Tolerance rate (\%)} = A_{600} \text{ YNB}_x / A_{600} \text{ YNB} \times 100$$

where  $\text{YNB}_x$  = YNB at pH 2 or YNB with 0.3 % bile salts and YNB = normal growth medium, used as positive control. Three independent experiments were performed; mean and standard error were calculated.

### *Assay on survival in simulated in vitro human digestion*

Eight *P. kudriavzevii* strains with the highest phytase activity (Greppi et al., 2015) and with the highest tolerance to low pH and bile salts were chosen, and subjected to a simulated human GIT digestion using the protocol described by Bautista-Gallego et al. (2013), with slight modifications. Briefly, the simulated gastric juice was prepared daily by suspending pepsin (0.0133 g L<sup>-1</sup>) and lysozyme (0.01 g L<sup>-1</sup>) in a sterile buffer solution at pH 2.0 containing NaCl (2.05 g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.60 g L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0.11 g L<sup>-1</sup>) and KCl (0.37 g L<sup>-1</sup>). Pepsin and lysozyme were sterilized by filtration (0.22 µm). Simulated pancreatic juice was daily prepared by suspending bile salts (3 g L<sup>-1</sup>, Oxoid) and pancreatin (0.1 g L<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, Milan, Italy) in a sterile buffer at pH 8.0 consisting of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (50.81 g L<sup>-1</sup>) and of NaCl (8.5 g L<sup>-1</sup>). The pH was adjusted with a solution of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Yeasts were inoculated in 2 mL of sterile YPD medium and incubated at 37 °C for 12 h. Serial dilutions

were prepared and plated on YPD agar plates to enumerate the yeasts before the treatment (N0). The remaining overnight cultures were then centrifuged ( $10,000 \times g$ , 10 min), the pellet washed with isotonic solution to remove the medium and the cells were re-suspended in the synthetic gastric juice. After incubation for 3 h at 37 °C in an orbital shaker (~200 rpm) to simulate peristaltic movements, harvested cells were re-suspended in isotonic solution and serial dilutions prepared and plated for yeast enumeration (N1). Harvested cells from the gastric digestion step were washed with isotonic solution and re-suspended in the same volume of the simulated pancreatic juice. After shaking at 200 rpm overnight at 37 °C, the pellet was washed and re-suspended in isotonic solution. Serial dilutions were prepared, and plated onto YPD agar (N2). Plates were incubated at 30 °C for 48 h and thereafter counted. Percentages of survival were obtained comparing the initial yeast counts with those remaining viable at the end of the gastric and pancreatic step of simulated digestion. They were calculated according to the following equation:

$$\text{Survival rate (\%)} = \text{CFU}_{\text{N1 or 2}} / \text{CFU}_{\text{N0}} \times 100$$

where N1 or 2 = the total viable count of yeast strains after treatment by simulated gastric and pancreatic juices respectively; and N0 = the total viable count of yeast strains before treatment. Three independent experiments were performed, mean and standard error of the counts calculated.

### **2.3. Adhesion of yeasts to Caco-2 cell lines**

#### *Growth and maintenance of mammalian cell lines*

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 was purchased from ATCC (HTB-37™) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) foetal bovine serum (FBS),  $10 \text{ U m}^{-1}$  of penicillin,  $0.1 \text{ mg m}^{-1}$  of streptomycin and 2 mM of L-glutamine. All reagents were purchased from Sigma Aldrich. The cells were routinely grown in  $75 \text{ cm}^2$  culture flasks (BD biomedical, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.) in an incubator (Galaxy 170 s, Eppendorf, Italy) at 37 °C with humidified atmosphere of 5 %  $\text{CO}_2$  and 95 % air. The culture media were changed routinely and once the cells reached sub-confluence (80-90 %) they were subpassaged.

### *Adhesion assay on Caco-2 cells*

Selected yeast strains were grown overnight in 5 mL of YPD at 30 °C. Afterwards, cells were harvested in sterile phosphate buffered saline (PBS) and suspensions at  $A_{600} = 1$  were prepared in DMEM without antibiotics. This absorbance corresponds roughly to  $10^7$  yeast cells  $\text{mL}^{-1}$ , as determined by plating for the different strains studied. Anyhow, the concentration of each yeast suspension was quantified in each experiment by serial dilution and enumerated on YPD agar. The adhesion assay was performed as described by Botta et al. (2014) with minor modifications. Briefly, Caco-2 cells were seeded at 20 000 c/w in 96-well microtiter plates (BD biomedical) and grown in the conditions described above for 2-4 days until they formed a confluent monolayer. Before the experiment the confluent monolayer of cells was washed twice with PBS in order to remove traces of antibiotics. After which, 100  $\mu\text{l}$  of the yeast suspension was transferred into the wells and incubated for 90 minutes at 37 °C. Unattached yeasts were removed from the epithelial cells by three rinses with PBS. Afterwards, Caco-2 cells and attached yeasts were homogenized in each well with 100  $\mu\text{L}$  of Triton-X solution (0.25 % in PBS). After 30 minutes of incubation at 37 °C the solution with released yeasts was serially diluted and enumerated on YPD agar. In parallel, yeast cells from overnight culture were also treated with Triton-X and incubated in the same conditions as used in the experiments, to evaluate a possible effect of Triton-X on yeast cells vitality. The plates were incubated at 30 °C for 48 h. Adhesion ability was expressed as the percentage ratio between the yeast counts initially seeded and the counts after the washing steps ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ). All assays were repeated three independent times and mean and standard error were calculated.

## **2.4. Folate-producing capacity of yeasts**

### *Identification of genes*

Nineteen *P. kudriavzevii* genes involved in folate biosynthesis were identified in a draft genome of *P. kudriavzevii* (GeneBank #ALNQ00000000.1, [Chan et al., 2012]). The genes were identified on different contigs by aligning with Blast Program (Altschul et al., 1997) the protein sequences retrieved from both SGD and CGD databases, against the whole genome shotgun contigs (wgs) of *P. kudriavzevii*. For *FOL3*, *FOL2*, *FOL1*, *ABZ1*, *ABZ2*, *DRF1* and *CDC21* genes, responsible for the conversion of folate precursor (GTP) into tetrahydrofolate (THF), specific primers were designed by Primer 3 (version 4.0.0) (<http://primer3.ut.ee/>). Primers sequences are shown in Tableau 18.

### DNA extraction and PCR conditions

DNA of each strain was extracted from the pellet obtained from 1 mL of 24 h YPD pure culture and centrifuged at 14 000 x g for 10 min, 4 °C. The pellet of cells was subjected to DNA extraction according to the procedure described by Cocolin et al. (2000). DNA was quantified using the Nanodrop Instrument (Spectrophotometer ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) and diluted to a concentration of 100 ng mL<sup>-1</sup>. The PCR temperature profile was as follow: 5 min at 95 °C followed by 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 2 min at 72 °C. At the end, 10 min at 72 °C were performed. Amplicons were analyzed by visualization on 1.2 % agarose gel electrophoresis in 1X TAE (80 V, 25 min) after staining with ethidium bormide (10 mg mL<sup>-1</sup>). Amplified sequences were sent for sequencing (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) and results aligned in GenBank using the Blast Program (Altschul et al., 1997), for identification purposes.

**Tableau 18 : Genes of *P. kudriavzevii* involved in folate biosynthesis identified in a draft genome (GeneBank #ALNQ0000000.1), sequences of primers used to detect them and results of PCR assays.**

Folate Biosynthesis Genes of <i>Pichia kudriavzevii</i>						
Gene name	Enzymatic activity	Contig <sup>a</sup>	Primer name	Primer sequence	Amplicon size	PCR
<i>FOL3</i>	dihydrofolate synthase	624	FOL3-f	TTT-GGC-TCC-CTT-GGT-TAT-TG	241 bp	+
			FOL3-r	AGG-AAA-CGT-GGG-TTC-ACT-TG		
<i>FOL2</i>	GTP-cyclohydrolase I	148	FOL2-f	TCG-TGA-AGA-GGG-CAG-TTT-TT	200 bp	+
			FOL2-r	TTG-GAC-CTG-GAA-CCT-TCT-TG		
<i>FOL1</i>	dihydroneopterin aldolase	297	FOL1-f	TGC-TAA-AGT-TGC-CGA-GGA-GT	227 bp	+
			FOL1-r	CCT-CTT-GGT-TTC-TTC-GTT-CG		
<i>ABZ1</i>	aminodeoxychorismate synthase	298	ABZ1-f	CAG-GAC-CAG-GTT-CAC-CAA-CT	198 bp	+
			ABZ1-r	TGG-AAG-AAT-GGT-CAA-CCA-CA		
<i>ABZ2</i>	aminodeoxychorismate lyase	157	ABZ2-f	TCA-CTA-GCA-TTG-CCT-GTT-GG	188 bp	+
			ABZ2-r	CAT-GAG-AGC-GTT-CAT-GAG-GA		
<i>DRF1</i>	dihydrofolate reductase	112	DRF1-f	TGG-TGC-CAT-TGA-GGA-GAT-TT	201 bp	+
			DRF1-r	GCT-TCG-AGT-TCA-CAA-TGC-AA		
<i>CDC21</i>	thymidylate synthase	524	CDC21-f	CAC-AGA-CGC-AAA-ACT-CCT-CA	182 bp	+
			CDC21-r	CAT-TGG-TGT-AAT-CGC-TGT-GG		

<sup>a</sup> contig number of the shotgun genome in which the gene was identified

+ indicates the detection of PCR product

bp, base pair

### Growth conditions for the folate assay

Yeast pre-cultures were grown overnight at 30 °C in tubes containing 5 mL of YNB without aminoacids (folic acid content declared by the producer: 2 g L<sup>-1</sup>). They were then inoculated to 50 mL of the same medium, in amounts to obtain an initial absorbance of 0.02 at A<sub>600</sub> (UV-

1800 Shimadzu UV Spectrophotometer, Kyoto, Japan). The cells were grown on a shaker (Julabo SW22, Seelbach, Germany) at 30 °C, 180 rpm, for 24 h. After 8 h, 16 h and 24 h, 4.5 mL of yeast culture were transferred into a falcon tube and kept at -20 °C until folate extraction. For each condition, three independent experiments were performed.

#### *Folate extraction*

Folate content was determined for the supernatant (i.e. extracellular folate) and for the cell biomass together with the supernatant (i.e. total folate). Intracellular folate was calculated by subtraction of the two values. Folate extraction protocol was adapted from the method described by Sybesma et al. (2003b). The 4.5 mL of yeast-inoculated YNB without aminoacids broth were diluted twice with the extraction buffer (50 mM Ches/50mM HEPES buffer, pH 7.85) for total folate determination. Then, to release folate from the cells, the tubes were flushed with nitrogen and heated at 100 °C for 10 min. They were vortexed twice during heating, and cooled on ice. After adjustment to pH 4.7 with acetic acid, 2 mL of conjugase prepared from desiccated hog kidney (5 mg mL<sup>-1</sup> in water) was added. The tubes were incubated under shaking for 3 h at 37 °C. After adjustment of the pH to 6.1, the volume was filled to 50 mL with 0.5 % sodium ascorbate, and the tubes were centrifuged (13 000 rpm, 10 min, 4°C). For determination of extracellular folate, the same process was used on supernatant collected from yeasts inoculated to YNB without aminoacids. Collected supernatant and falcon tubes for determination of total folate were immediately stocked at -20 °C and folate quantification performed within 48 h.

#### *Folate quantification*

The determination of folate concentration was done following the method described by Kariluoto and Piironen (2009) using 96-well microtiter plates. The growth indicator organism was *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, the calibrant was folic acid (Sigma-Aldrich) and the assay medium was Folic Acid Casei Medium (Difco, Sparks, MD, USA). In each plate, a blank sample consisting of sodium ascorbate, a blank reactive consisting of extraction buffer and a positive sample consisting of YPD medium were analyzed. After 10 s shake at 240 rpm by a microtiter plate reader (LABSYSTEM Multiskan Ascent, Helsinki Finland), absorbance was read at 590 nm. Folate production by yeasts was calculated by subtracting the folate content of the medium (YNB without aminoacids). Values were calculated as averages of



three individual incubations, and each determination was the results of four technical replicates.

## 2.5. Inoculation of selected strains in pearl millet gruel

### *Microbial strains and materials*

Based on all the tests performed, one *P. kudriavzevii* strain was chosen to inoculate a pearl-millet gruel. In addition, to mimic conditions of some African cereal slurry fermentations (i.e. *ben-saalga*, *koko*) in which LAB are dominant, two *L. fermentum* strains, previously selected for folate-producing capacity *in vitro* (Saubade et al., 2014; Turpin et al., 2011), were also used. Pearl-millet (*Pennisetum glaucum*) used in the preparation of the gruels was purchased on a market in Ouagadougou (Burkina-Faso).

### *Preparation of gruels*

The gruels were prepared from pearl millet as described by Tou et al. (2007a). Briefly, the protocol comprises as main steps: soaking (16 h), washing, milling, sieving, pre-cooking and inoculation. The pre-cooking step consisted in heating for 10 min at 80 °C the unfermented slurry resulting from sieving. After the pre-cooking step, the gruel (10 % dry matter content) was divided into four sterile beakers, named gruel A, B, C and D, depending on the combination of LAB and yeast used. Each model was inoculated at a rate of 10 % (w/w) to the unfermented paste, when it had cooled down to 35 °C. Start concentration of  $10^6$  g<sup>-1</sup> yeast cells and  $10^7$  g<sup>-1</sup> bacteria cells was chosen to be close to field conditions (Tou et al., 2007a, 2007b).

For each combination, samples were taken at different times during the fermentation (from 0 to 24 h) for folate and pH measurements, together with microbiological enumeration. The dry matter content of gruels was determined at the end of the fermentation by oven drying at 105 °C to constant weight. Results are means of triplicate experiments.

### *Enumeration of LAB and yeasts*

Bacteria and yeasts were enumerated during fermentation in all process combinations after serial dilutions in 9 g L<sup>-1</sup> sodium chloride. LAB were enumerated on MRS plates supplemented with Delvacid (200 mg mL<sup>-1</sup>) to avoid the growth of yeasts. Yeasts were enumerated on yeast glucose chloramphenicol plates (50 mg mL<sup>-1</sup>; YGC, Oxoid, France), to

avoid the growth of LAB. All plates were incubated at 30 °C for 48 h. Results are means of triplicate enumerations in samples of each experiment.

#### *Total folate assay*

The folate content of the gruels at different fermentation times was quantified according to Kariluoto and Piironen (2009).

### **2.6. Statistics**

To detect differences among strains in each tested conditions (tolerance rate, survival rate, adhesion rate, and total folate production *in vitro* and *in situ*), statistical analysis was performed by one-way ANOVA analysis of variance (SPSS 22.0). When significant differences were detected, Duncan's post hoc test was performed. Data on probiotic tests were elaborated by principal component analysis (PCA) in R environment.

## **3. Results**

### **3.1. Probiotic properties of yeast strains**

The results obtained from the tolerance of the 93 yeast strains to pH 2 and to the presence of 0.3 % of bile salts are presented in Figure 14. In general, the isolates were more sensitive to the pH treatment (31% tolerate) than to the presence of bile salts (99% tolerate). Isolates belonging to the species *P. kudriavzevii* showed the best tolerance in both conditions. Thirty-eight percent of *P. kudriavzevii* isolates could grow in the presence of bile salts to the same or even higher extent than in the positive growth medium. On the contrary, *Saccharomyces cerevisiae* isolates were the less tolerant to both conditions, 90 % of the strains from this species did not tolerate pH 2. There were less yeasts in each of the other species, but in general, tolerance to both conditions were variable. The most interesting *P. kudriavzevii* strains in terms of tolerance to pH 2 and bile salts and of phytase-producing capacity (Greppi et al., 2015) were selected for further *in vitro* tests; namely, *P. kudriavzevii* M26, M28, M29, O9, G6, G5, M31, M30 (Tableau 19).

Concerning the survival rate in synthetic gastric and pancreatic juices among the selected strains, strain M28 survived significantly more after gastric juice incubation ( $40.3 \pm 14.5 \%$ ), while strain M26 was significantly more tolerant to the passage after pancreatic juice indicating the overall digestion survival rate ( $45.1 \pm 6.6 \%$ ). Results on adhesion rate capacities showed that only  $12.7 \pm 2.4 \%$  of the cells of strain M30 adhered on Caco-2 monolayer, significantly less ( $p < 0.05$ ) than all the other yeast strains. On the other hand, strains M28 and O9 have a significant ( $p < 0.05$ ) higher adhesion capacity, being  $38.9 \pm 2.7 \%$  and  $40.9 \pm 5.9 \%$ , respectively (Tableau 19). PCA analysis, showed in Figure 15, allowed the segregation of two strains (O9 and M28) characterized by high adhesion rate and another three (M29, G6 and M26) for their high survival rate after simulation of human overall digestion (passage after pancreatic juice).

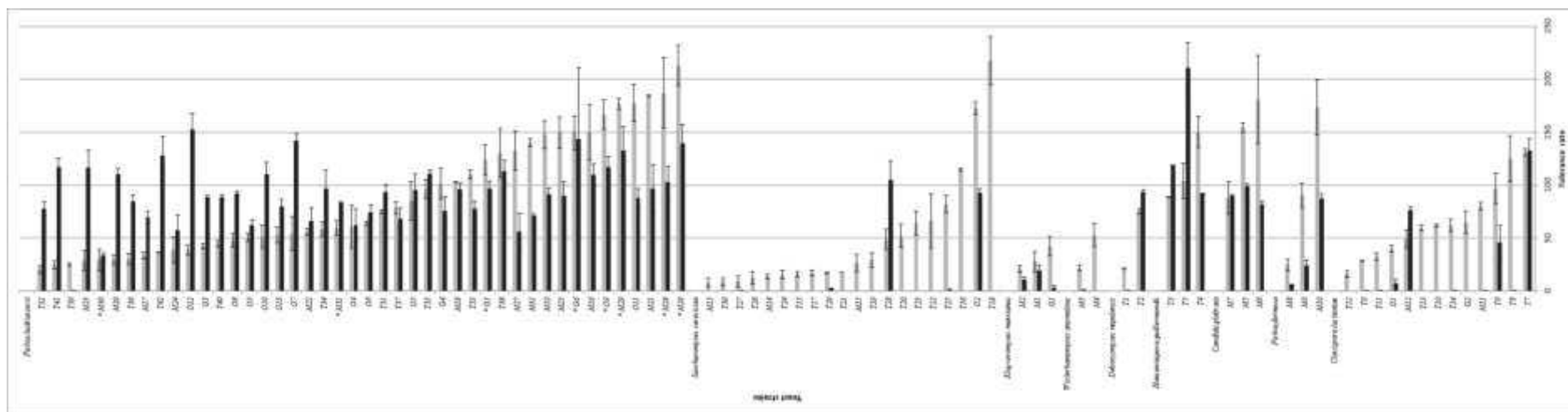


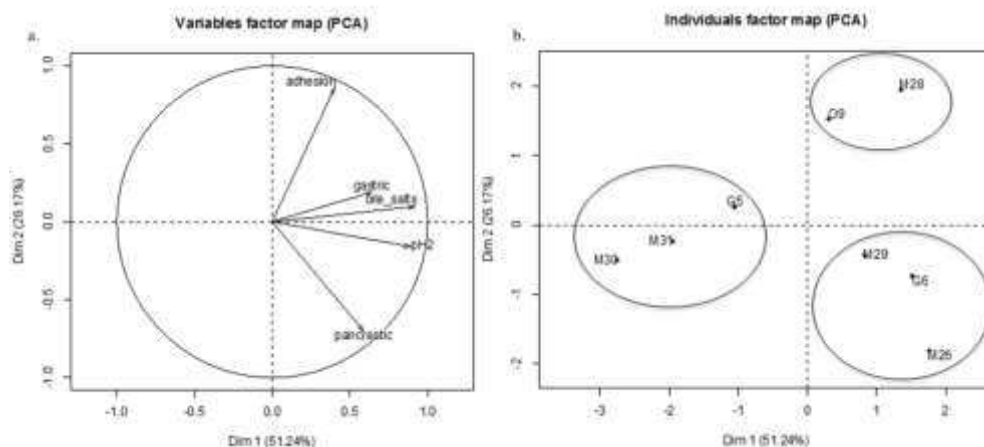
Figure 14 : Tolerance rate of 93 yeast strains after 24 hours of incubation at 37 °C in YNB without aminoacids at different conditions (YNBx): i) pH 2 (black series), ii) 0.3 % (w/v) bile salts (grey series). The tolerance rate was calculated relative to their growth in YNB, which was used as a positive control for growth:  $A600\ YNB_x / A600\ YNB \times 100$ . Results are expressed as mean + standard error of three independent experiments.

\* Strains selected for further in vitro test

**Tableau 19 : Probiotic properties of 8 selected *P. kudriavzevii* strains, as tested *in vitro*: i) Survival rate of the strains after passage in synthetic gastric and pancreatic juices, measured by plate counting (CFU mL<sup>-1</sup>). Survival rate was calculated by comparison to the initial yeast counts with those after gastric and pancreatic digestion; ii) Adhesion rate of the strains to Caco-2 cell lines. All the results are expressed as mean percentage  $\pm$  standard error of three independent experiments.**

Strains/Conditions	Survival Rate		Adhesion Rate
	Gastric juice	Pancreatic juice	Caco-2 cells
<i>Pichia kudriavzevii</i>			
M26	16.1 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	45.1 $\pm$ 6.6 <sup>d</sup>	14.9 $\pm$ 2.7 <sup>ab</sup>
M28	40.1 $\pm$ 14.5 <sup>c</sup>	19.5 $\pm$ 2.8 <sup>ab</sup>	38.9 $\pm$ 4.0 <sup>c</sup>
M29	20.2 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>	26.7 $\pm$ 2.8 <sup>bc</sup>	18.0 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>
O9	8.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	18.6 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	40.9 $\pm$ 5.9 <sup>c</sup>
G6	35.3 $\pm$ 5.0 <sup>bc</sup>	33.6 $\pm$ 6.9 <sup>c</sup>	17.8 $\pm$ 4.1 <sup>ab</sup>
G5	8.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	11.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	15.6 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>
M31	9.4 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	16.8 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	13.7 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>
M30	11.9 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	23.3 $\pm$ 2.8 <sup>abc</sup>	12.7 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>

For each condition, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among the strains (ANOVA and Duncan's test)



**Figure 15 : Principal component analysis (PCA) of the data on the probiotic properties of eight selected *P. kudriavzevii* yeast strains. Projection of the variables (a.) and cases/isolates (b.) onto the plane formed by the first two factors deduced by PCA.**

### 3.2. Folate production in YNB medium by selected yeasts strains

All the genes involved in folate biosynthesis were identified on the draft genome of *P. kudriavzevii*: *FOL3*, *FOL2*, *FOL1*, *ABZ1*, *ABZ2*, *DRF1*, *MET7*, *CDC21*, *MET13*, *ADE3*, *MIS1*, *SHM1*, *SHM2*, *LPD1*, *GCV2*, *GCV1*, *GCV3*, *MTD1* and *MET12* (data not shown). However, selected *P. kudriavzevii* strains were only screened for the presence/absence of the

7 main genes responsible for the conversion of folate precursor (GTP) into tetrahydrofolate (THF) (Tableau 18). The genes were identified in the shotgun genome sequence of *P. kudriavzevii* on different contigs and primers were designed to amplify the selected genes (Tableau 18). All the strains possessed the genes for *de novo* biosynthesis of folate.

Concerning folate quantification, the folate content of YNB medium was  $2.6 \pm 0.3 \text{ ng mL}^{-1}$ . This value was subtracted from the folate quantification of the strains in that medium. In general, all the tested strains showed a higher total folate production after 24 h (Figure 16). The comparison of the eight strains at each incubation time showed that net folate production was higher after 8 h for the strain G6 ( $14.0 \pm 1.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ), after 16 h for the strain M31 ( $139.6 \pm 43.3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and after 24 h for the strain M28 ( $173.7 \pm 33.6 \text{ ng mL}^{-1}$ ). For all the strains, the folate produced appeared to be almost completely intracellular.

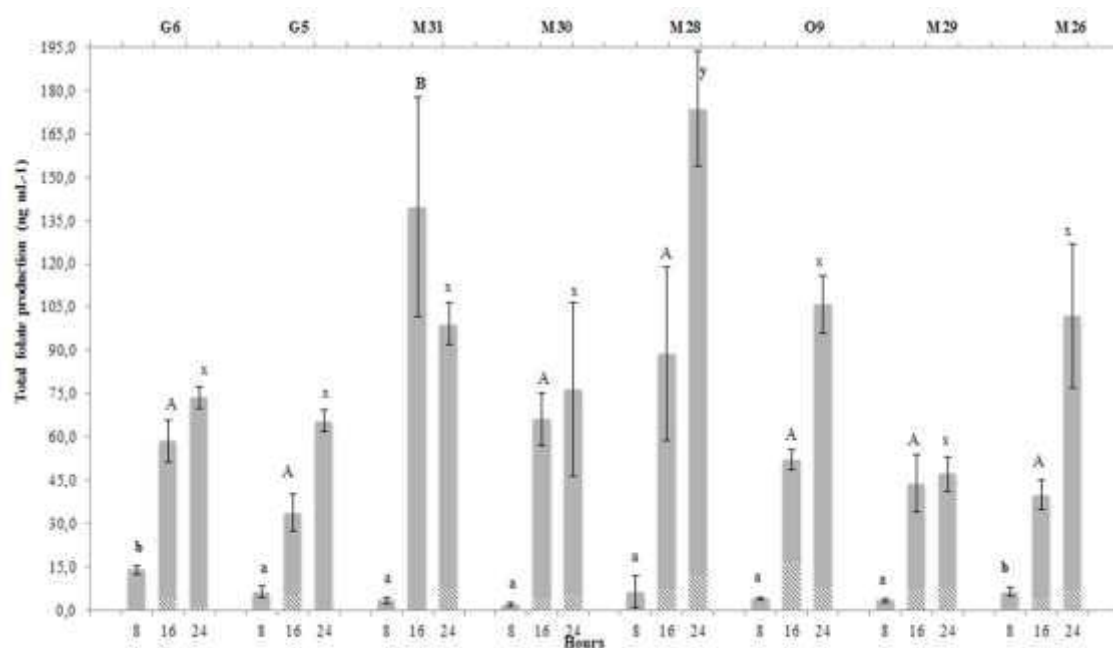


Figure 16 : Total folate production ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) of eight *P. kudriavzevii* strains (M26, M28, M29, O9, G6, G5, M31, M30) after 8, 16 and 24 hours of growth in YNB without aminoacids. Initial folate content of the culture medium was subtracted. Extracellular folate (white series) and intracellular folate (grey series) are expressed as mean and standard deviations of three independent experiments. For each series, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ): 8 hours (small letters), 16 hours (capital letters), 24 hours (x and y).

### 3.3. Inoculation of selected LAB and yeasts in a model of fermented pearl millet-based gruel

Based on the previous results, *P. kudriavzevii* strain M28 was chosen for inoculation in the gruels, together with *L. fermentum* 8.2 and 6.9 to mimic a real cereal-based African fermentation. In particular, Gruel A was inoculated with *L. fermentum* 8.2 + *P. kudriavzevii* M28, gruel B with *L. fermentum* 6.9 + *P. kudriavzevii* M28, gruel C with *L. fermentum* 8.2 alone and gruel D with *L. fermentum* 6.9 alone.

Results of microbial counts and pH after the inoculation of selected LAB and yeast strains in the gruels are presented in Figure 17. During fermentation, pH decreased quickly until 8 h and remained low until the end of fermentation when LAB were inoculated alone (C and D). On the other hand, when yeasts were present together with LAB, there was a slight increase of the pH from 16 h of fermentation (A and B).

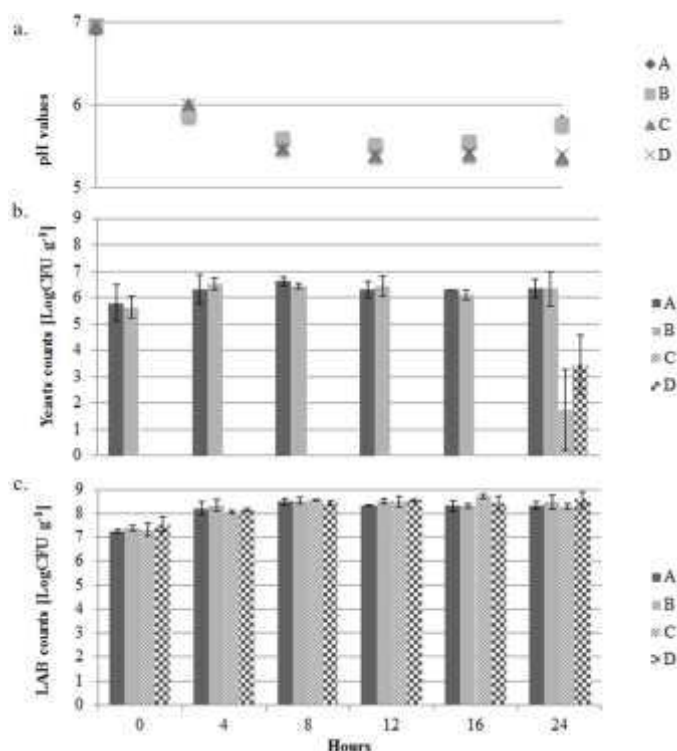


Figure 17 : Changes in viable counts and pH during the fermentation of pearl-millet fermented gruels after inoculation of cultures of selected yeasts and bacteria for 24 h, 30 °C. Four different gruels were inoculated with: A) *P. kudriavzevii* M28 + *Lb. fermentum* 8.2; B) *P. kudriavzevii* M28+ *Lb. fermentum* 6.9; C) *Lb. fermentum* 8.2; D) *Lb. fermentum* 6.9. a) pH measurements; b) Yeast counts; c) LAB counts are shown for each gruel during fermentation. Mean and standard deviation of three independent experiments are shown.

As expected, only slight yeasts development was measured after 24 h of fermentation in conditions C and D where no yeasts were inoculated. In gruels A and B, a significant ( $p < 0.05$ ) increase of yeasts concentrations was detected after 4 h and remained stable until 24 h reaching  $6.3 \pm 0.3$  and  $6.3 \pm 0.6$  log CFU mL<sup>-1</sup>. LAB concentration also increased in all conditions after 4 h of fermentation and reached a concentration of 8 log CFU mL<sup>-1</sup> until 24 h in presence or absence of yeasts.

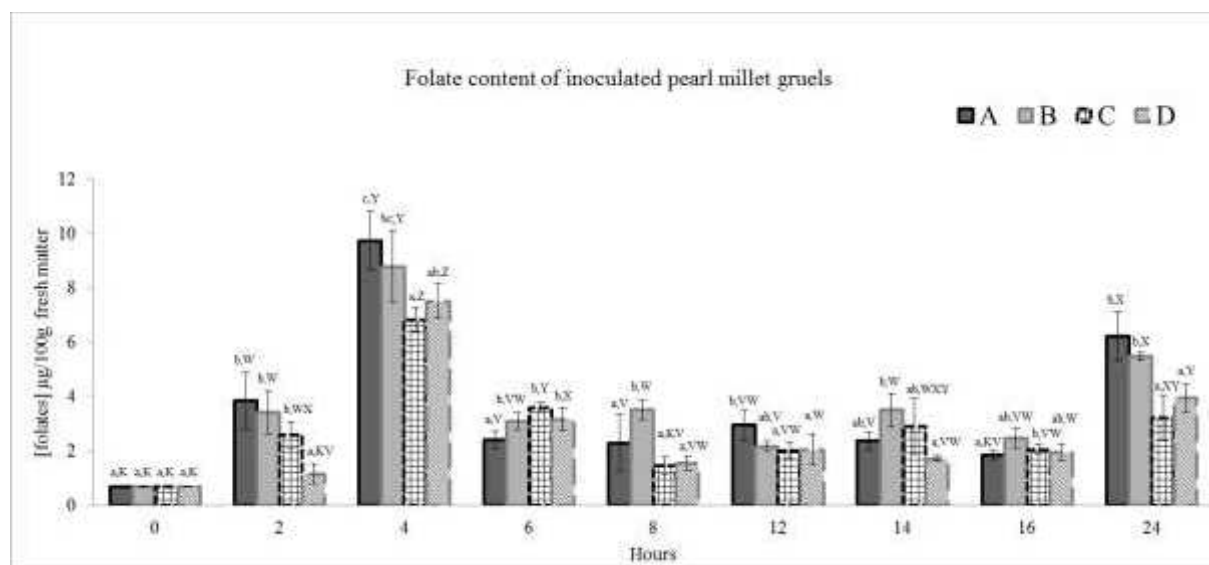


Figure 18 : Folate content ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  fresh weight basis) of pearl-millet gruel inoculated with folate producing LAB and yeasts during fermentation (24 h, 30 °C). Four different gruels: A) *P. kudriavzevii* M28+ *Lb. fermentum* 8.2 (black series); B) *P. kudriavzevii* M28+ *Lb. fermentum* 6.9 (grey series); C) *Lb. fermentum* 8.2 (black squares series); D) *Lb. fermentum* 6.9 (grey dashed series). Results are the means and standard deviations of 3 independent experiments ( $n=3$ ). Different letters show significant differences among the four gruels within the same time point (a, b, c); whilst K, V, W, X, Y, Z highlighted significant differences among the time points for each gruel (ANOVA and Duncan's post-hoc test:  $p < 0.05$ ).

Results on folate content of pearl millet fermented gruels after inoculation of selected strains are presented in Figure 18. Folate quantification showed that all the fermentations allowed a significant higher production of folate, as compared with the non-fermented dough (time 0 h). In addition, whatever the combination of microorganisms, there was a significant high production of folate after 4 h of fermentation. At this time points, gruel A and B produced significantly higher folate compared to gruel C and D. Moreover, folate production was significantly higher in gruel A co-fermented with *L. fermentum* 8.2 and *P. kudriavzevii* M28 than in gruel C fermented with the bacteria alone. Folate concentration decreased until 16 h, with some significant differences among the gruels at 6, 8, 12, 14 and 16 h (Figure 18, small



letters). A second significantly higher production of folate was detected at 24 h. Co-fermentations with yeast (gruels A and B) produced significant higher folate, compared to those without yeast (gruels C and D) (Figure 18).

#### 4. Discussion

Here, the probiotic potential of yeast strains isolated from fermented food has been studied as well as the potential of the same strains to nutritionally enrich the food product during fermentation.

Most of the published investigation on probiotics focused on bacteria, especially lactic acid bacteria. However, there is an increasing interest in finding new yeast strains with probiotic potentials (Hatoum et al., 2012; Kumura et al., 2004; Moslehi-Jenabian et al., 2010; Perricone et al., 2014). Presently, most probiotics are assessed by their ability to survive in, and subsequently colonize, the gastrointestinal environment. In fact, resistance to GIT conditions, as well as the ability to adhere to intestinal mucosa, is important to reach the target site in a viable state and to provide beneficial effects on the hosts (Ouwehand et al., 2002).

To reach the intestine, strains must first pass through the stomach, which provides a powerful barrier to the entrance into the gut. Most of the yeast isolates tested in this study were to some extent able to tolerate pH 2, which is an extreme value that is commonly used to mimic the pH encountered in the stomach, in fact a pH of 4 would have been more realistic. In the intestine, yeasts would be exposed to the presence of bile salts. The strains tested here appeared to tolerate better bile salts, compared to the acidic pH of the stomach, as already proven for other yeasts (Perricone et al., 2014). As almost 20 % of the yeasts strains could tolerate and grow with 0.3 % of bile salts in the medium even more than in an unmodified growth medium, we can hypothesized that the survival potential of those strains to GIT conditions would be rather good.

From the first screening on the tolerance to GIT conditions, *P. kudriavzevii* appeared to be the most promising. This species previously demonstrated a high persistence in cereal-based fermentations (Greppi et al., 2013a, 2013b) and a high capacity to secrete phytases (Greppi et al., 2015; Hellström et al., 2015, 2012). For these reasons, the most interesting *P. kudraivzevii* strains were selected and subjected to an *in vitro* simulation of human digestion. This was carried out with the successive use of complete synthetic gastric and pancreatic juices. After the passage in gastric juice, the strains that survived were subjected to pancreatic juice. In

general, all the selected strains could survive both conditions, maintaining a concentration compatible with their use as potential probiotics (between  $10^6$  and  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>). The most promising strains survived between 16.8 % and 45.1 % of the initial concentration (i.e.  $10^7$ - $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>). Thereafter, the ability of those strains to adhere to Caco-2 cells was evaluated. The adhesion rate of tested strains varied between 12 and 40 %, which corresponds to a concentration comprised between  $10^5$  and  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. These results were in agreement with previous screening of yeasts isolated from kefir (Kumura et al., 2004).

Once survived the GIT and eventually adhere to cell lines, yeast strains ingested via fermented food could provide some beneficial effects to the hosts. Among others, degradation of phytates and biofortification of folates are known (Moslehi-Jenabian et al., 2010) and might be really important in Africa, where deficiencies in micronutrients may be high. In fact, it has been shown that microbial phytase activity introduced by the diet is responsible for the degradation of phytates in the stomach and small intestine (Sandberg and Andlid, 2002). Considering the high phytase activity of the selected *P. kudriavzevii* strains (Greppi et al., 2015), their survival to *in vitro* GIT digestion and their ability to adhere to the intestinal cells, their potential as folate producers was evaluated. Folate deficiency is an important health problem in many parts of the world, particularly where there is poverty and malnutrition (Mitchell et al., 2012). Humans are autotrophic for this vitamin and must therefore satisfy their needs by the diet. The biosynthetic pathway of folate in yeasts is mostly characterized, and it is similar to that of other microorganisms (Walkey et al., 2015). The identification of genes involved in the biosynthesis of folate in a draft genome of *P. kudriavzevii* allowed the verification of the presence of the molecular requirements necessary to produce the vitamin. Moreover, since molecular tools for manipulation of yeasts genes expression are well developed these genes might be used as possible target to achieve the production of foods with increased level of folate as recently done for wine (Walkey et al., 2015). As expected, genes for *de novo* synthesis of folate were found in all isolates. All the tested strains were also able to produce folate *in vitro* during growth, but with significant differences among them, despite common genetic equipment. The higher production took place after 24 h, i.e. at the beginning of the stationary phases, and it appeared to be almost completely intracellular. This is in agreement with previous publications testing other yeast species (Kariluoto et al., 2006a). Low folate content in the supernatant may indicate the folates to be highly conjugated and therefore remaining intracellular (Hjortmo et al., 2005). The growth medium influence the folate production, yeasts grown in YPD as complex media produced much lower folate

content than in other synthetic growth media, and peptone seemed to reduce as much as 90 % of their production (Hjortmo et al., 2008a). For this reason, the production was hereby quantified in a minimal growth medium (YNB without aminoacids). In addition, the physiological state of the cells clearly affects the folate content and a high growth rate i.e. respiro-fermentative growth (0-10 hours) should be the most favorable to obtain high specific folate content for yeasts (Hjortmo et al., 2008a). This is the reason why the production was hereby quantified in different phases of the yeast growth.

It has been widely demonstrated how folate production in growth medium did not necessarily predict the production in a food matrix (Kariluoto et al., 2014). This is why it was mandatory to test the promising strains *in situ*. The most interesting yeast isolate (*P. kudriavzevii* M28) was then inoculated in a cereal-based gruel made from pearl millet as a model food. This is a model of fermented food highly consumed in West Africa (*ben-saalga*), which is nutritionally poor (Mouquet-Rivier et al., 2008; Tou et al., 2006). It is consumed after a minimum of 2 and a maximum of 20 hours of fermentation (Tou et al., 2006). As in traditional process there is a natural combination of yeasts and LAB, both microorganisms were inoculated for a fermentation lasting 24 hours to reflect the common production process. LAB strains inoculated belong to *L. fermentum* species and were previously isolated from pearl millet fermented slurry (Turpin et al., 2011). Those strains have genetic equipment required to synthesize folate and they are able to produce folate in culture medium (Saubade et al., 2014). Moreover, many *L. fermentum* strains present technological and probiotic traits (Owusu-Kwarteng et al., 2015).

Co-inoculation of *P. kudriavzevii* M28 with each strain of *L. fermentum* allowed the growth of both types of microorganisms to levels comparable to natural microbiota (Tou et al., 2007b). Moreover, no negative or positive effects of yeasts on LAB growth were observed. In fact, when single cultures of *L. fermentum* strains were used, they reached the same final concentrations as in yeast-LAB co-cultures.

In general, the concentration of folates in inoculated pearl millet fermentation peaked at 4 h of fermentation and decreased rapidly to stabilize at values between 2-4 µg/100 g fresh matter, probably due to an equilibrium between production and consumption by LAB strains. Increased production at 24 h might be due to cell autolysis in stationary phase. It may therefore be suggested that a fermentation of 4 hours could be the best solution to get the higher folate production in this model of fermented food. In addition to the strain selection, the duration of fermentation is indeed a lever to improve folate content of fermented foods. In

addition, fermentation of pearl millet gruels with combinations of the yeast and LAB strains resulted in folate levels significantly higher than in gruels fermented by LAB alone. The interactions between LAB and yeasts in the fermentation of cereal based fermented foods had been demonstrated (Kedia et al., 2007; Vieira-Dalode et al., 2008). Although one of the LAB strain consumed folate in culture medium, its effect in co-cultivations was minimal, as already reported (Kariluoto et al., 2006a).

## 5. Conclusions

Throughout Africa, food fermentations are still driven by indigenous microorganisms, which influence the nutritional, organoleptic and quality of final products. However, for improved safety, quality and beneficial health effects a trend has emerged which involves the isolation of indigenous strains from traditional fermented products to be used as functional starter cultures (Owusu-Kwarteng et al., 2015).

The final result of this study was the selection of a promising yeast strain as suitable starter for fermented cereal-based products. This strain possessed desirable probiotic characteristics *in vitro*. It was able to survive the conditions of the human GIT, to adhere to intestinal cell lines, and to produce folate and phytases. Therefore it seems to have a great promising ability to increase the nutritional quality of foods via natural fermentation as well as to exert probiotic beneficial effect in the human host. It is therefore a good candidate for further *in vivo* and functional studies.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. D.J. Hounhouigan and Dr. Wilfrid Padonou at the *Université d'Abomey-Calavi* (Cotonou, Benin) for the assistance during the isolation of the strains used in this study and Dr. Youna M. Hemery at IRD for her important inputs during folate quantification. Fabien Saubade acknowledges a PhD grant from the French Ministry of Education and Research. A part of this work was part of the FoIEA project (ERAFRICA ERAFRICA\_IC-027, FP-226154).



## **Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives**



L'objectif de cette thèse était d'estimer le potentiel nutritionnel du microbiote d'un aliment céréalier fermenté traditionnel, en se concentrant principalement sur les BL qui sont les micro-organismes prédominants de l'aliment étudié. Au vu du fort potentiel de synthèse des folates par les BL isolées du *ben-saalga*, l'impact du microbiote sur la teneur en folates de l'aliment a été étudié en particulier.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche de criblage génétique mise au point par Turpin et al. (2011). Dans cette précédente étude, des gènes codant des enzymes impliquées dans différentes fonctions d'intérêt nutritionnel ont été recherchés dans les métagénomes de sept aliments fermentés, ainsi que dans 155 souches de BL isolées du *ben-saalga*. Dans l'étude ci-présente, les métagénomes de 50 échantillons de *ben-saalga* provenant de 10 unités de production traditionnelles ont été étudiés. Les résultats obtenus pour certains gènes n'étaient pas toujours cohérents avec la détection de ces mêmes gènes dans les BL de la collection de 155 souches (Turpin et al., 2011). Par exemple, les gènes *crtN* et *crtM*, codant des enzymes impliquées dans la synthèse de caroténoïdes, n'ont jamais été détectés dans les 50 métagénomes étudiés lors de cette thèse. Turpin et al. (2016) ont détecté ces mêmes gènes dans 37 % des souches isolées du *ben-saalga*. Toutefois, dans du milieu MRS, 23 % des souches sont capables de produire des caroténoïdes, et même la souche la plus productrice produisait peu de caroténoïdes (moins de 80 µg d'équivalent de β-carotène/100 g de culot bactérien sec). Ainsi, l'absence de détection des gènes *crtN* et *crtM* dans les métagénomes est cohérent avec la faible capacité de production de caroténoïdes par les bactéries lactiques du *ben-saalga*. Au contraire, nous avons détecté les gènes *folP* et *folK* dans 80 % des métagénomes. Turpin et al. (2011) avaient détecté ces mêmes gènes dans 96 % des souches pures, et une autre étude a montré que 62 % de ces souches de BL sont capables de produire des folates dans du MRS (Almoussa-Almaksour, 2013; Saubade et al., 2014). Cependant, malgré ce fort potentiel de synthèse de folates par les BL du *ben-saalga*, la teneur en folates de l'aliment s'est avérée être très faible (entre 0 et 3 µg/100g de base humide) et aucun lien significatif n'a été mis en évidence entre la détection des gènes *folP* et *folK* et la concentration en folates.

Cette approche de criblage génétique pourrait permettre d'estimer la probabilité d'isoler des BL possédant les caractéristiques nutritionnelles dans un aliment fermenté donné, au moins en éliminant les micro-organismes ne possédant pas les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les fonctions d'intérêt nutritionnel considérées. Cela pourrait donc permettre



de gagner du temps lors d'études dont l'objectif serait d'isoler, à partir d'aliments fermentés traditionnels, des souches avec des propriétés nutritionnelles particulières. En revanche, cette approche ne permet pas d'estimer la production réelle d'un micronutriment, comme la vitamine B9, dans un aliment fermenté. L'utilisation de nouvelles approches génétiques, telles que le *shotgun metagenomic sequencing*, aurait pu permettre de rechercher un plus grand nombre de gènes codant des enzymes impliquées dans différentes fonctions d'intérêt nutritionnel, mais n'aurait pas permis de savoir si ces gènes sont exprimés, ce qui était déjà une limite de la recherche de gènes par PCR. Une analyse complémentaire basée sur le dosage des ARNm dans la pâte fermentée avant cuisson aurait pu indiquer si les gènes étaient exprimés ou non. Toutefois, pour déterminer si le potentiel génétique est cohérent avec la présence du micronutriment correspondant, il est nécessaire de doser le micronutriment dans la matrice alimentaire.

Les genres et espèces de BL constituant le microbiote du *ben-saalga*, ainsi que la variabilité inter-atelier, ont été décrits par Humblot and Guyot (2009) et Tou et al. (2006). Toutefois, les concentrations des principaux micro-organismes impliqués dans la fermentation de cet aliment céréalier fermenté n'ont jamais été déterminées. Dans cette thèse, nous avons quantifié ces BL (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc* et *Weissella*) par PCR en temps réel dans les métagénomes des 50 échantillons de bouillies à base de mil. Les études qui sont menées dans le but de déterminer la composition du microbiote d'aliments fermentés sont basées sur un nombre variable d'échantillons, mais généralement compris entre 6 et 28 (Kim et al., 2014; Koyanagi et al., 2011; Liu et al., 2015; Obodai and Dodd, 2006; Riquelme et al., 2015; Tofalo et al., 2012). Les concentrations obtenues pour les échantillons de *ben-saalga* sont faibles ( $<10^5$  équivalent de bactéries vivantes/g de bouillie) pour un aliment fermenté. Cela pourrait être dû à la faible teneur en matière sèche et donc à la faible teneur en nutriment de l'aliment, ce qui pourrait limiter la croissance bactérienne. Les données montrent également une variabilité du microbiote à la fois inter- et intra-atelier. De nombreux paramètres pourraient expliquer cette variabilité, comme les variations du procédé d'un atelier à l'autre, ou la variabilité des micro-organismes apportés par la matière première. Les données recueillies ne permettent pas de déterminer la source de cette variabilité. Pour, entre autre, décrire plus en détail le microbiote du *ben-saalga*, l'ADN extrait des 50 échantillons a été séquencé. Les amorces spécifiques des bactéries 338f/518r, qui amplifient les régions V3-V4 de l'ADN codant pour l'ARNr16S, ainsi que les amorces spécifiques des levures NL1/LS2,

qui amplifient les régions D1-D2 de l'ADN codant pour l'ARNr 26S, ont été utilisées (Bester et al., 2010; Klammer et al., 2008; Muyzer et al., 1993). Les résultats de ces séquençages seront analysés dans le cadre d'un autre travail faisant suite à cette thèse.

Comme nous l'avons vu précédemment, la teneur en folates du *ben-saalga* est très faible, en dépit du fort potentiel de synthèse de cette vitamine par le microbiote. De plus, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les concentrations en micro-organismes et la teneur en folates des bouillies. D'autres paramètres doivent donc influencer sur la teneur en folates de cette bouillie à base de mil. D'après la littérature, la teneur en folates du mil varie entre 29 et 85  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de base humide (Stadlmayr et al., 2012). D'après ces valeurs, la teneur théorique en folates dans le *ben-saalga*, en supposant qu'il n'y ait ni perte ni gain durant les différentes étapes du procédé, devrait être comprise entre 2,5 et 7,3  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  BH. La teneur réelle en folates du *ben-saalga* (entre 0 et 3  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  BH) est généralement inférieure à ces valeurs. Ainsi, nous pouvons supposer que le procédé de fabrication de cet aliment doit généralement induire des pertes en folates. D'après de nombreuses revues, les fermentations naturelles permettent généralement d'augmenter les teneurs en vitamines B des aliments (Blandino et al., 2003; Galati et al., 2014; Singh et al., 2015). Jusqu'à présent, l'impact d'une fermentation naturelle sur la teneur en vitamine B9 d'un aliment céréalier fermenté traditionnel africain n'avait jamais été étudié. Comme les recherches menées précédemment au laboratoire ont permis de mettre en évidence la forte capacité de production de folates par les BL majoritaires lors de la fermentation du *ben-saalga*, nous pouvons supposer que des folates seraient produits lors de la fermentation du *ben-saalga*, mais qu'il y aurait des pertes lors d'autres étapes du procédé de préparation de cet aliment. C'est pourquoi l'évolution de la teneur en folates du *ben-saalga* au cours des différentes étapes du procédé de préparation de cet aliment a été mesurée.

Deux étapes ont une forte influence sur la teneur en folates du *ben-saalga* : le trempage et le tamisage. Contrairement à ce qui était attendu, ni la fermentation naturelle, ni la fermentation par pied de cuve n'a eu d'impact significatif sur la teneur en folates de l'aliment. Nous pouvons supposer que lors de la fermentation de cet aliment, un équilibre se met en place entre les micro-organismes auxotrophes et les micro-organismes prototrophes pour les folates. De plus, les micro-organismes impliqués dans la fermentation des bouillies préparées en laboratoire ne sont probablement pas les mêmes que ceux présents dans les bouillies préparées

sur le terrain. Notamment, les concentrations en micro-organismes dans les échantillons du laboratoire sont 100 à 1000 fois plus élevées par rapport à celles des échantillons de *ben-saalga* récoltés sur le terrain. Cela pourrait être dû à une teneur en matière sèche nettement plus élevée dans les échantillons du laboratoire ( $9,4\pm 0,4\%$ ) par rapport à celle dans les échantillons du terrain ( $5,6\pm 1,2\%$ ). Ces différences pourraient également être dues à un biais induit par les méthodes utilisées. En effet, dans les échantillons du terrain seuls les principaux micro-organismes impliqués dans la fermentation du *ben-saalga* ont été dosés par PCR en temps réel, alors que des dénombrements des bactéries lactiques et des bactéries mésophiles aérobies ont été réalisés avec les échantillons produits en laboratoire. Les teneurs en folates d'échantillons de *ben-saalga* du terrain, prélevés à différents temps de fermentation, sont en cours d'analyse dans le cadre d'une autre thèse. Ces résultats permettront de vérifier si la fermentation naturelle réalisée sur le terrain a ou non impact sur la teneur en folates.

Dans d'autres aliments fermentés, l'utilisation de cultures starters a permis d'augmenter significativement les teneurs en folates (LeBlanc et al., 2008, 2011a; Saubade et al., 2016). C'est pourquoi nous avons voulu vérifier si cette stratégie pourrait aussi être appliquée au *ben-saalga*. Même si les BL sont les micro-organismes majoritaires dans le *ben-saalga*, les levures, qui sont connues pour produire de grandes quantités de folates, sont également présentes dans une moindre mesure (Tou et al., 2006). C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser comme cultures starters : soit des mono-cultures de BL, soit des co-cultures de BL et de levures. Des monocultures de levures ont également été envisagées, mais comme un développement de bactéries a tout de même été observé en moins de huit heures lors de ces essais, la production de folates n'a pas été étudiée. Comme aucune souche de levure n'a été isolée du *ben-saalga* au moment de l'étude, une souche de levure productrice de folates isolée du *Mawè*, un autre aliment céréalier fermenté d'Afrique de l'Ouest, a été utilisée. Au bout de quatre heures de fermentation, toutes les cultures starters ont permis une augmentation significative de la teneur en folates des bouillies. En particulier, les co-cultures de BL et de levures ont permis d'atteindre une concentration de  $10\ \mu\text{g}/100\text{g}$  de base humide. Toutefois, cette teneur reste encore trop faible pour un aliment de complément. Par exemple, des enfants burkinabé âgés de 15 à 20 mois peuvent consommer entre 120 et 130 g de bouillie par repas, deux fois par jour (Mouquet-Rivier et al., 2016). Ainsi, ces enfants pourraient ingérer entre 12 et  $13\ \mu\text{g}$  de folates par repas, soit entre 8 et 9 % de la RNI pour ce groupe d'âge, grâce aux bouillies fermentées par cultures starters. Selon la FDA (2016), cet aliment ne peut pas être

considéré comme une bonne source de folates, puisqu'il procure moins de 10 % de l'apport nutritionnel recommandé aux enfants de 15 à 20 mois. Ce résultat reste cependant prometteur, car d'après les recherches bibliographiques effectuées lors de la présente thèse, plusieurs paramètres de la fermentation peuvent être optimisés, comme la sélection de souches, l'augmentation de la teneur en matière sèche et la durée de la fermentation par exemple. Toutefois, avant de recommander l'utilisation de ces souches sur le terrain, leur impact sur la qualité organoleptique et surtout sur la qualité sanitaire de l'aliment devra être considéré. Notamment, le pH des bouillies produites est très élevé (> 5,3), et l'acidification pourrait ne pas être suffisante pour limiter la croissance des micro-organismes pathogènes.

Les souches utilisées pour les cultures starters ont été sélectionnées à partir de tests de production de folates en milieu de culture. Toutefois, il a été démontré que la synthèse de folates dépend de la composition du milieu (Nor et al., 2010). En effet, nous avons utilisé deux co-cultures de BL et de levures : une avec une souche de BL productrice de folates (*L. fermentum* 8,2) en milieu MRS et une avec une souche consommatrice de folates (*L. fermentum* 6,9) en milieu MRS. Pourtant les deux co-cultures ont donné des résultats similaires, sauf à six et huit heures de fermentation, où la bouillie fermentée par la co-culture *P. kudriavzevii* M28/*L. fermentum* 6,9 avait une teneur en folates significativement plus élevée. Dans le but de sélectionner des souches capables de produire de grandes quantités de folates, il serait préférable de tester la production de folates par ces souches dans du *ben-saalga* ou au moins dans un milieu de composition proche comme un mélange de farine de mil et d'eau. Lors des fermentations de *ben-saalga* par les co-cultures de BL et de levures, une augmentation significative de la teneur en folates a été observée au bout de 24 h. Dans d'autres aliments céréaliers fermentés la production maximale de folates a été atteinte au bout de deux semaines (Kariluoto et al., 2014). Il serait intéressant d'étudier l'impact d'une fermentation de plusieurs jours sur la teneur en folates du *ben-saalga*.

D'autres solutions pourront être envisagées pour augmenter la teneur en folates du *ben-saalga*, pendant l'étape de fermentation, lors des futures études au sein du laboratoire. Par exemple, il serait possible d'augmenter significativement la teneur en folates des bouillies en augmentant à la fois la teneur en matière sèche et la production de folates pendant la fermentation. Nous avons vu que l'inoculation de cocultures de micro-organismes producteurs de folates a permis de faire augmenter significativement la teneur en folates de bouillies à

base de mil. Une augmentation de la teneur en matière sèche permettrait d'augmenter la concentration en folates apportés par la pâte de graines de mil trempées décortiquées. Toutefois, pour éviter un épaississement trop important des bouillies pendant l'étape de cuisson, et donc assurer une consistance fluide, il serait nécessaire d'utiliser soit des amylases, soit des bactéries amylolytiques. C'est pourquoi l'utilisation d'une co-culture de bactéries lactiques productrices de folates et de bactéries amylolytiques sur la teneur en folates de bouillies fermentées à base de mil produites au Burkina Faso est testée dans le cadre d'une autre thèse en cours dans l'Unité. Dans la revue publiée cette année (annexe 1), d'autres solutions envisagées par différents auteurs sont détaillées. Par exemple, il est possible d'ajouter des précurseurs de la synthèse de folate (l'acide para-aminobenzoïque, la guanosine triphosphate et le glutamate), des composés inhibiteurs de croissance comme le NaCl, ou encore des prébiotiques comme le sorbitol et le mannitol...

Ma thèse était centrée sur l'impact du microbiote sur la teneur en folates du *ben-saalga*, mais les prochaines études menées au laboratoire pourront avoir pour objectif d'augmenter la production de folates, ou au moins de limiter les pertes, lors des autres étapes du procédé de préparation du *ben-saalga*. Par exemple, des folates sont produits pendant l'étape de trempage grâce à la germination des graines (Hefni and Witthöft, 2012; Kariluoto et al., 2006b). Il serait possible de stimuler la germination, et donc la production de folates, en alternant des phases d'immersion des graines de mil et des phases d'incubations dans des pièces à humidité relative élevée. Il serait aussi possible de limiter la dégradation des folates exposés à la lumière et aux agents oxydants en ajoutant des antioxydants dans la bouillie (Strandler et al., 2015). Par exemple, la pulpe de Baobab est riche en vitamine C et est disponible dans de nombreux pays africains dont le Burkina Faso (Chadare et al., 2009). Cet antioxydant naturel pourrait donc être ajouté dans les bouillies pour limiter les pertes en folates.

Certaines solutions proposées pourraient être difficile à mettre en place au Burkina Faso. Par exemple, pour pouvoir utiliser des cultures starters de micro-organismes producteurs de folates, il faudrait que des entreprises puissent en produire au Burkina Faso et que chaque productrice locale ait la possibilité d'en acheter régulièrement. Au vu du contexte économique, entre autre, du Burkina Faso, cette solution paraît difficile à mettre en œuvre. En revanche, d'autres solutions, comme l'ajout d'antioxydants naturels dans les bouillies, paraissent plus facilement réalisables.

En conclusion, cette thèse a permis de confirmer le fort potentiel de synthèse de folates par les BL responsables de la fermentation du *ben-saalga*. La fermentation naturelle n'a toutefois pas montré d'impact significatif sur la teneur en folates de l'aliment. L'utilisation de fermentation par pied de cuve en laboratoire n'a pas permis d'augmenter de manière significative la teneur en folates des bouillies fermentées. Par contre, des fermentations par des co-cultures de BL et de levures ont permis de multiplier par 14 la teneur en folates de l'aliment, en quatre heures de fermentation. Toutefois, cette augmentation reste insuffisante et comme perspectives de poursuite de ces travaux je propose que soit étudiée l'optimisation de différents paramètres liés à la fermentation (sélection de cultures starters productrices de folates, augmentation de la teneur en matière sèche couplée à l'action de bactéries amylolytiques, optimisation de la durée de la fermentation...). Par ailleurs, d'autres étapes du procédé (promotion de la germination, utilisation des graines entières...) pourraient également être étudiées. Certaines solutions proposées pour augmenter la teneur en folates du *ben-saalga* pourraient être difficile à appliquer dans le contexte du Burkina Faso. Toutefois, les résultats obtenus au cours de cette thèse, ainsi que les solutions proposées pourront servir à mieux comprendre les facteurs influençant les teneurs en folates des autres aliments céréaliers fermentés étudiés dans le cadre du projet FoIEA, tel que l'*injera* (en Ethiopie).

## **Chapitre 6 : Références bibliographiques**





- Abebe, Y., Bogale, A., Hambidge, K.M., Stoecker, B.J., Bailey, K., and Gibson, R.S. (2007). Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability. *J. Food Compos. Anal.* *20*, 161–168.
- Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2008). Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* *127*, 200–208.
- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., and Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *Int. J. Food Microbiol.* *144*, 487–496.
- Agati, V., Guyot, J. p., Morlon-Guyot, J., Talamond, P., and Hounhouigan, D. j. (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* *85*, 512–520.
- Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramírez-Coronel, A., and Contreras-Esquivel, J.C. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *76*, 47–59.
- Aguilar-Zarate, P., Cruz-Hernandez, M.A., Montanez, J.C., Belmares-Cerda, R.E., and Aguilar, C.N. (2014). Bacterial Tannases: Production, Properties and Applications. *Rev. Mex. Ing. Quimica* *13*, 63–74.
- Akhtar, M.J., Khan, M.A., and Ahmad, I. (1999). Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *19*, 269–275.
- Akhtar, M.J., Khan, M.A., and Ahmad, I. (2003). Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *31*, 579–588.
- Almoussa-Almaksour, Z. (2013). Les bactéries lactiques peuvent-elles contribuer à l'enrichissement en folates d'un aliment céréalier fermenté? Rapport de stage Master 2 Sciences, Technologies, Santé. Montpellier: Université Montpellier 1 - Université Montpellier 2 - Institut de Recherche pour le Développement. 33p.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

Amare, B., Moges, B., Moges, F., Fantahun, B., Admassu, M., Mulu, A., and Kassu, A. (2012). Nutritional status and dietary intake of urban residents in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Public Health* 12, 752.

Araújo, M.M., Marchioni, E., Villavicencio, A.L.C.H., Zhao, M., di Pascoli, T., Kuntz, F., and Bergaentzle, M. (2015). Mechanism of folic acid radiolysis in aqueous solution. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 599–603.

Arcot, J., Wong, S., and Shrestha, A.K. (2002). Comparison of folate losses in soybean during the preparation of tempeh and soymilk. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1365–1368.

Arsenault, J.E., Nikiema, L., Allemand, P., Ayassou, K.A., Lanou, H., Moursi, M., De Moura, F.F., and Martin-Prevel, Y. (2014). Seasonal differences in food and nutrient intakes among young children and their mothers in rural Burkina Faso. *J. Nutr. Sci.* 3, (e55): 1-9.

Assantachai, P., and Lekhakula, S. (2007). Epidemiological survey of vitamin deficiencies in older Thai adults: implications for national policy planning. *Public Health Nutr.* 10, 65–70.

Ayad, E.H.E. (2009). Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiol.* 26, 533–541.

Bailey, L.B., Rampersaud, G.C., and Kauwell, G.P.A. (2003). Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. *J. Nutr.* 133, 1961S–1968S.

Bailey, L.B., Stover, P.J., McNulty, H., Fenech, M.F., Gregory, J.F., Mills, J.L., Pfeiffer, C.M., Fazili, Z., Zhang, M., Ueland, P.M., et al. (2015). Biomarkers of Nutrition for Development—Folate Review12345. *J. Nutr.* 145, 1636S–1680S.

Ball, G.F.M. (2005). *Vitamins In Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. Chapter 13. Folate. p. 231-274 (CRC Press).

Bassett, M.N., and Samman, N.C. (2010). Folate content and retention in selected raw and processed foods. *Arch. Latinoam. Nutr.* 60, 298–305.

- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., and Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res. Int.* *50*, 135–142.
- Becquey, E., and Martin-Prevel, Y. (2010). Micronutrient Adequacy of Women's Diet in Urban Burkina Faso Is Low. *J. Nutr.* *140*, 2079S–2085S.
- Bell, K.N., and Oakley, G.P. (2006). Tracking the prevention of folic acid–preventable spina bifida and anencephaly. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *76*, 654–657.
- Bell, K.N., and Oakley, G.P. (2009). Update on prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *85*, 102–107.
- Berrazega, I. (2015). Production et consommation de la vitamine B9 par les bactéries lactiques isolées d'un aliment céréalier fermenté. Mémoire de fin d'études, Master Biologie Santé. Montpellier : Montpellier SupAgro - Université de Montpellier - Institut de Recherche pour le Développement. 38p.
- Bester, L., Cameron, M., du Toit, M., and Witthuhn, R.C. (2010). PCR and DGGE Detection Limits for Wine Spoilage Microbes. *South Afr. J. Enol. Vitic.* *31*, 26–33.
- Beuchat, L.R. (1997). Traditional fermented foods. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, and T.J. Montville, pp. 629-648. Washington, DC: ASM Press.
- Bhutta, Z.A., Salam, R.A., and Das, J.K. (2013). Meeting the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *Br. Med. Bull.* *106*, 7–17.
- Blair, J.A., and Pearson, A.J. (1974). Kinetics and mechanism of the autoxidation of the 2-amino-4-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropteridines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* *2* 80–88.
- Blakley, R.L. (1987). Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. *Eur. J. Biochem.* *168*, 251–253.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., and Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* *36*, 527–543.

- Blount, B.C., Mack, M.M., Wehr, C.M., MacGregor, J.T., Hiatt, R.A., Wang, G., Wickramasinghe, S.N., Everson, R.B., and Ames, B.N. (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 3290–3295.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmgren, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Sorokin, A. (2001). The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* *11*, 731–753.
- Bossi, A., Rinalducci, S., Zolla, L., Antonioli, P., Righetti, P.G., and Zapparoli, G. (2007). Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 787–795.
- Botta, C., Langerholc, T., Cencič, A., and Cocolin, L. (2014). In Vitro Selection and Characterization of New Probiotic Candidates from Table Olive Microbiota. *PLOS ONE* *9*, e94457.
- Brandt, M.J. (2007). Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiol.* *24*, 161–164.
- Brandt, M.J., Hammes, W.P., and Gänzle, M.G. (2004). Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* *218*, 333–338.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* *56*, 317–333.
- Brouwer, I.A., Dusseldorp, M. van, West, C.E., Meyboom, S., Thomas, C.M.G., Duran, M., Hof, K.H. van het, Eskes, T.K.A.B., Hautvast, J.G.A.J., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (1999). Dietary Folate from Vegetables and Citrus Fruit Decreases Plasma Homocysteine Concentrations in Humans in a Dietary Controlled Trial. *J. Nutr.* *129*, 1135–1139.
- Brouwer, I.A., van Dusseldorp, M., West, C.E., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2001). Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutr. Res. Rev.* *14*, 267–294.
- Brunst, K.J., Wright, R.O., DiGioia, K., Enlow, M.B., Fernandez, H., Wright, R.J., and Kannan, S. (2014). Racial/ethnic and sociodemographic factors associated with micronutrient

intakes and inadequacies among pregnant women in an urban US population. *Public Health Nutr.* *17*, 1960–1970.

Bureau, S., Mouhoubi, S., Touloumet, L., Garcia, C., Moreau, F., Bédouet, V., and Renard, C.M.G.C. (2015). Are folates, carotenoids and vitamin C affected by cooking? Four domestic procedures are compared on a large diversity of frozen vegetables. *LWT - Food Sci. Technol.* *64*, 735–741.

Burgess, C.M., Smid, E.J., Rutten, G., and van Sinderen, D. (2006). A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade micro-organisms. *Microb. Cell Factories* *5*, 24.

Burgess, C.M., Smid, E.J., and van Sinderen, D. (2009). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *Int. J. Food Microbiol.* *133*, 1–7.

Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods — a world perspective. *Food Res. Int.* *27*, 253–257.

Capozzi, V., Russo, P., Teresa Duenas, M., Lopez, P., and Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *96*, 1383–1394.

Cárdenas, N., Laiño, J.E., Delgado, S., Jiménez, E., Valle, M.J. del, Giori, G.S. de, Sesma, F., Mayo, B., Fernández, L., LeBlanc, J.G., et al. (2015). Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 4343–4353.

Cecconi, D., Cristofolletti, M., Milli, A., Antonioli, P., Rinalducci, S., Zolla, L., and Zapparoli, G. (2009). Effect of tannic acid on *Lactobacillus plantarum* wine strain during starvation: A proteomic study. *ELECTROPHORESIS* *30*, 957–965.

Chadare, F.J., Linnemann, A.R., Hounhouigan, J.D., Nout, M.J.R., and Boekel, M.A.J.S. v. (2009). Baobab food products: a review on their composition and nutritional value. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *49*, 254–274.

- Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L.A., Marecat, A., and Mercenier, A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* *44*, 139–148.
- Chan, G.F., Gan, H.M., Ling, H.L., and Rashid, N.A.A. (2012). Genome Sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a Potential Producer of Bioethanol and Phytase. *Eukaryot. Cell* *11*, 1300–1301.
- Chandler, C.J., Wang, T.T., and Halsted, C.H. (1986). Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* *261*, 928–933.
- Chao, S.-H., Huang, H.-Y., Kang, Y.-H., Watanabe, K., and Tsai, Y.-C. (2013). The diversity of lactic acid bacteria in a traditional Taiwanese millet alcoholic beverage during fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* *51*, 135–142.
- Chaussat, R., and Deunff, Y.L. (1975). germination des semences (Paris [etc.]: Gauthier-Villars).
- Chung, K.-T., Wong, T.Y., Wei, C.-I., Huang, Y.-W., and Lin, Y. (1998). Tannins and Human Health: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *38*, 421–464.
- Cocolin, L., and Ercolini, D. (2008). Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., and Mills, D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* *189*, 81–87.
- Combs, J., and Gerald, F. (2012). Chapter 16 - Folate. In *The Vitamins (Fourth Edition)*, (San Diego: Academic Press), pp. 349–375.
- Corsetti, A., and Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* *40*, 539–558.
- de Crecy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R.D., Noiriel, A., and Hanson, A.D. (2007). Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. *Bmc Genomics* *8*, 245.

- Crider, K.S., Bailey, L.B., and Berry, R.J. (2011). Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. *Nutrients* 3, 370–384.
- Crittenden, R.G., Martinez, N.R., and Playne, M.J. (2003). Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 217–222.
- Curiel, J.A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., Anglade, P., Baraige, F., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Muñoz, R., and de Felipe, F.L. (2011). Response of a *Lactobacillus plantarum* human isolate to tannic acid challenge assessed by proteomic analyses. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1454–1465.
- Czarnowska, M., and Gujska, E. (2012). Effect of Freezing Technology and Storage Conditions on Folate Content in Selected Vegetables. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67, 401–406.
- D’Aimmo, M. r., Mattarelli, P., Biavati, B., Carlsson, N. g., and Andlid, T. (2012). The potential of bifidobacteria as a source of natural folate. *J. Appl. Microbiol.* 112, 975–984.
- D’Aimmo, M.R., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B., and Andlid, T. (2014). Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe* 30, 169–177.
- Dallas, H.L., Tran, T.T., Poindexter, C.E., Hitchins, A.D., and Romanell, L.J. (1991). Competition of Food Bacteria with *Listeria Monocytogenes* During Enrichment Culture. *J. Food Saf.* 11, 293–301.
- Dana, M.G., Salmanian, A.H., Yakhchali, B., and Jazi, F.R. (2010). High folate production by naturally occurring *Lactobacillus* sp with probiotics potential isolated from dairy products in Ilam and Lorestan provinces of Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 5383–5391.
- De Brouwer, V., Zhang, G.-F., Storozhenko, S., Van Der Straeten, D., and Lambert, W.E. (2007). pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochem. Anal.* 18, 496–508.
- De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135.
- De Vuyst, L., and Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 43–56.

- De Vuyst, L., and Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* *24*, 120–127.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., and Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol.* *26*, 666–675.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M., and Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiol.* *37*, 11–29.
- Dewey, K.G., and Brown, K.H. (2003). Update on Technical Issues concerning Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries and Implications for Intervention Programs. *Food Nutr. Bull.* *24*, 5–28.
- Donnelly-Vanderloo, M., O'Connor, D.L., and Shoukri, M. (1994). Impact of pasteurization and procedures commonly used to rethermalize stored human milk on folate content. *Nutr. Res.* *14*, 1305–1316.
- Ebert, K., and Witt, H. (2016). Fructose malabsorption. *Mol. Cell. Pediatr.* *3*.
- Edelmann, M. (2014). Occurrence and natural enhancement of folate in oats and barley.
- Edelmann, M., Kariluoto, S., Nyström, L., and Piironen, V. (2012). Folate in oats and its milling fractions. *Food Chem.* *135*, 1938–1947.
- Edelmann, M., Kariluoto, S., Nyström, L., and Piironen, V. (2013). Folate in barley grain and fractions. *J. Cereal Sci.* *58*, 37–44.
- EFSA (2016). Présomption d'innocuité reconnue (QPS), by the European Food Safety Authority. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/qps>.
- Eitenmiller, R.R., and Landen, W.O. (1999). Chapter 11: Folate in: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. In CRC Press, p. 544.
- Ekinci, R. (2005). The effect of fermentation and drying on the water-soluble vitamin content of tarhana, a traditional Turkish cereal food. *Food Chem.* *90*, 127–132.



Ende, G. (2015). Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Relevance of Glutamate and GABA to Neuropsychology. *Neuropsychol. Rev.* 25, 315–325.

Eom, H.-J., Moon, J.-S., Seo, E.-Y., and Han, N.S. (2009). Heterologous expression and secretion of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase in *Leuconostoc citreum*. *Biotechnol. Lett.* 31, 1783–1788.

FAO (1995). Staple foods: What do people eat? In: *Dimensions of Need: An Atlas of Food and Agriculture* (Santa Barbara, Calif.: ABC-CLIO).

FAOSTAT (2011). FAOSTAT classic version. Food Balance Sheets.

FAOSTAT (2015). Food and agriculture organization of the United Nations Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/home/E>.

FAO/WHO (2001a). Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

FAO/WHO (2001b). Human vitamin and minerals requirements, Food and Agriculture Organization. Rome, 286pp.

FAO/WHO (2001c). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Retrievable from: [/http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics2/en/S](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/S).

FAO/WHO (2002). Guidelines for evaluation of probiotics in food. Retrievable from: [/http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/S](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/S).

FAO/WHO (2005). Vitamin and mineral requirements in human nutrition, Second edition. <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/>.

FDA (2016a). Generally recognized as safe (GRAS), by the U.S. Food and Drug Administration. Available on line: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>.

FDA (2016b). Labeling & Nutrition - Guidance for Industry: A Food Labeling Guide (10. Appendix B: Additional Requirements for Nutrient Content Claims).

Food Fortification Initiative (2015). Enhancing Grains for Healthier Lives (<http://www.ffinetwork.org/index.html>).

Ford, J.E., Hurrell, R.F., and Finot, P.A. (1983). Storage of milk powders under adverse conditions. *Br. J. Nutr.* *49*, 355–364.

Forges, T., Pellanda, H., Diligent, C., Monnier, P., and Gueant, J.-L. (2008). Do folates have an impact on fertility? *Gynecol. Obstet. Fertil.* *36*, 930–939.

Forssén, K.M., Jägerstad, M.I., Wigertz, K., and Witthöft, C.M. (2000). Folates and Dairy Products: A Critical Update. *J. Am. Coll. Nutr.* *19*, 100S–110S.

Fraenkel, G., Blewett, M., and Coles, M. (1948). BT, A New Vitamin of the B-Group and its Relation to the Folic Acid Group, and Other Anti-Anæmia Factors. *161*.

Franz, C.M.A.P., Huch, M., Mathara, J.M., Abriouel, H., Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., and Holzapfel, W.H. (2014). African fermented foods and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* *190*, 84–96.

Frommherz, L., Martiniak, Y., Heuer, T., Roth, A., Kulling, S.E., and Hoffmann, I. (2014). Degradation of folic acid in fortified vitamin juices during long term storage. *Food Chem.* *159*, 122–127.

Galati, A., Oguntoyinbo, F.A., Moschetti, G., Crescimanno, M., and Settanni, L. (2014). The Cereal Market and the Role of Fermentation in Cereal-Based Food Production in Africa. *Food Rev. Int.* *30*, 317–337.

Gangadharan, D., and Nampoothiri, K.M. (2011). Folate production using *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* with implications for fortification of skim milk and fruit juices. *LWT - Food Sci. Technol.* *44*, 1859–1864.

Garrido-Fernández, J., Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Hornero-Méndez, D., and Ruiz-Barba, J.L. (2010). Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* *140*, 34–39.

Gaziano, J.M., and Hennekens, C.H. (1993). The Role of Beta-Carotene in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *691*, 148–155.

- Ghishan, F.K., Said, H.M., Wilson, P.C., Murrell, J.E., and Greene, H.L. (1986). Intestinal transport of zinc and folic acid: a mutual inhibitory effect. *Am. J. Clin. Nutr.* *43*, 258–262.
- Gregory, J.F. (2012). Accounting for differences in the bioactivity and bioavailability of vitamins. *Food Nutr. Res.* *56*, 5809.
- Gregory, J.F. 3rd (1989). Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv. Food Nutr. Res.* *33*, 1–101.
- Gregory III, J.F., Quinlivan, E.P., and Davis, S.R. (2005). Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci. Technol.* *16*, 229–240.
- Greppi, A., Rantisou, K., Padonou, W., Hounhouigan, J., Jespersen, L., Jakobsen, M., and Cocolin, L. (2013a). Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int. J. Food Microbiol.* *165*, 200–207.
- Greppi, A., Rantsiou, K., Padonou, W., Hounhouigan, J., Jespersen, L., Jakobsen, M., and Cocolin, L. (2013b). Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and -independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* *165*, 84–88.
- Greppi, A., Krych, Ł., Costantini, A., Rantsiou, K., Hounhouigan, D.J., Arneborg, N., Cocolin, L., and Jespersen, L. (2015). Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *Int. J. Food Microbiol.* *205*, 81–89.
- Gujaska, E., Michalak, J., and Klepacka, J. (2009). Folate Stability in Two Types of Rye Breads During Processing and Frozen Storage. *Plant Foods Hum. Nutr.* *64*, 129–134.
- Güven, K., and Benlikaya, N. (2005). Acid Ph Produced by Lactic Acid Bacteria Prevent the Growth of *Bacillus Cereus* in Boza, a Traditional Fermented Turkish Beverage. *J. Food Saf.* *25*, 98–108.
- Guyot, J.-P. (2012). Cereal-based fermented foods in developing countries: ancient foods for modern research. *Int. J. Food Sci. Technol.* *47*, 1109–1114.

Hakala, M.T., and Welch, A.D. (1957). A polyglutamate form of Citrovorum factor synthesized by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *73*, 35.

Hall, D.A. (1947). The folic acid group of growth factors. *Biochem. J.* *41*, 287–294.

Hama, F., Icard-Vernière, C., Guyot, J.-P., Picq, C., Diawara, B., and Mouquet-Rivier, C. (2011). Changes in micro- and macronutrient composition of pearl millet and white sorghum during in field versus laboratory decortication. *J. Cereal Sci.* *54*, 425–433.

Hannon-Fletcher, M.P., Armstrong, N.C., Scott, J.M., Pentieva, K., Bradbury, I., Ward, M., Strain, J.J., Dunn, A.A., Molloy, A.M., Kerr, M.A., et al. (2004). Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* *80*, 911–918.

Hanson, A.D., and Gregory, I.J.F. (2011). Folate Biosynthesis, Turnover, and Transport in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *62*, 105–125.

Harrington, J., Perry, I., Lutomski, J., Morgan, K., McGee, H., Shelley, E., Watson, D., and Barry, M. (2008). *SLÁN 2007: Survey of Lifestyle, Attitudes and Nutrition in Ireland. Dietary Habits of the Irish Population*, Department of Health and Children. Dublin: The Stationery Office.

Hatoum, R., Labrie, S., and Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Food Microbiol.* *3*, 421.

Hefni, M., and Witthöft, C.M. (2011). Increasing the folate content in Egyptian baladi bread using germinated wheat flour. *LWT - Food Sci. Technol.* *44*, 706–712.

Hefni, M., and Witthöft, C.M. (2012). Effect of germination and subsequent oven-drying on folate content in different wheat and rye cultivars. *J. Cereal Sci.* *56*, 374–378.

Hefni, M.E., Shalaby, M.T., and Witthöft, C.M. (2015). Folate content in faba beans (*Vicia faba L.*)—effects of cultivar, maturity stage, industrial processing, and bioprocessing. *Food Sci. Nutr.* *3*, 65–73.

Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., and Vos, W.M. de (2002). Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 114–123.

- Heiniö, R.L., Noort, M.W.J., Katina, K., Alam, S.A., Sozer, N., de Kock, H.L., Hersleth, M., and Poutanen, K. (2016). Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – A review. *Trends Food Sci. Technol.* *47*, 25–38.
- Hellström, A., Qvirist, L., Svanberg, U., Veide Vilg, J., and Andlid, T. (2015). Secretion of non-cell-bound phytase by the yeast *Pichia kudriavzevii* TY13. *J. Appl. Microbiol.* *118*, 1126–1136.
- Hellström, A.M., Almgren, A., Carlsson, N.-G., Svanberg, U., and Andlid, T.A. (2012). Degradation of phytate by *Pichia kudriavzevii* TY13 and *Hanseniaspora guilliermondii* TY14 in Tanzanian togwa. *Int. J. Food Microbiol.* *153*, 73–77.
- Hemery, Y., Holopainen, U., Lampi, A.-M., Lehtinen, P., Nurmi, T., Piironen, V., Edelmann, M., and Rouau, X. (2011). Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part II: Electrostatic separation of particles. *J. Cereal Sci.* *53*, 9–18.
- Herranen, M., Kariluoto, S., Edelmann, M., Piironen, V., Ahvenniemi, K., Iivonen, V., Salovaara, H., and Korhola, M. (2010). Isolation and characterization of folate-producing bacteria from oat bran and rye flakes. *Int. J. Food Microbiol.* *142*, 277–285.
- Hjartaker, A., Lagiou, A., Slimani, N., Lund, E., Chirlaque, M.D., Vasilopoulou, E., Zavitsanos, X., Berrino, F., Sacerdote, C., Ocke, M.C., et al. (2002). Consumption of dairy products in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort: data from 35955 24-hour dietary recalls in 10 European countries. *Public Health Nutr.* *5*, 1259–1271.
- Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J., and Andlid, T. (2005). Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* *16*, 311–316.
- Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J., and Andlid, T. (2008a). Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *Int. J. Food Microbiol.* *127*, 32–36.
- Hjortmo, S.B., Hellström, A.M., and Andlid, T.A. (2008b). Production of folates by yeasts in Tanzanian fermented togwa. *FEMS Yeast Res.* *8*, 781–787.

- Holasova, M., Fiedlerova, V., Roubal, P., and Pechacova, M. (2004). Biosynthesis of folates by lactic acid bacteria and propionibacteria in fermented milk. *Czech J. Food Sci.* 22, 175–181.
- Holasova, M., Fiedlerova, V., Roubal, P., and Pechacova, M. (2005). Possibility of increasing natural folate content in fermented milk products by fermentation and fruit component addition. *Czech J. Food Sci.* 23, 196–201.
- Holzappel, W.H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 197–212.
- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S.M., Gnehm, N., and Lacroix, C. (2010). Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *Int. Dairy J.* 20, 852–857.
- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S.M., and Lacroix, C. (2011). Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. *Process Biochem.* 46, 1063–1070.
- Humblot, C., and Guyot, J.-P. (2009). Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA Gene Amplicons for Rapid Deciphering of the Microbiomes of Fermented Foods Such as Pearl Millet Slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4354–4361.
- Humblot, C., Perez-Pulido, R., Akaki, D., Loiseau, G., and Guyot, J.-P. (2012). Prevalence and Fate of *Bacillus cereus* in African Traditional Cereal-Based Foods Used as Infant Foods. *J. Food Prot.* 75, 1642–1645.
- Humblot, C., Turpin, W., Chevalier, F., Picq, C., Rochette, I., and Guyot, J.-P. (2014). Determination of expression and activity of genes involved in starch metabolism in *Lactobacillus plantarum* A6 during fermentation of a cereal-based gruel. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 103–111.
- Hwang, E.-S., and Bowen, P.E. (2002). Can the Consumption of Tomatoes or Lycopene Reduce Cancer Risk? *Integr. Cancer Ther.* 1, 121–132.

- Iwamoto, K., Tsuruta, H., Nishitani, Y., and Osawa, R. (2008). Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917T. *Syst. Appl. Microbiol.* *31*, 269–277.
- Iyer, R., Tomar, S.K., and Singh, A.K. (2010). Response surface optimization of the cultivation conditions and medium components for the production of folate by *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Res.* *77*, 350–356.
- Iyer, R., Tomar, S.K., Mohanty, A.K., Singh, P., and Singh, R. (2011). Bioprospecting of strains of *Streptococcus thermophilus* from Indian fermented milk products for folate production. *Dairy Sci. Technol.* *91*, 237–246.
- Jägerstad, M., and Jastrebova, J. (2013). Occurrence, Stability, and Determination of Formyl Folates in Foods. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 9758–9768.
- Jägerstad, M., Jastrebova, J., and Svensson, U. (2004). Folates in fermented vegetables—a pilot study. *LWT - Food Sci. Technol.* *37*, 603–611.
- Jang, J., Kim, B., Lee, J., Kim, J., Jeong, G., and Han, H. (2002). Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* *212*, 29–34.
- Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T.A., Devi, A.R., and Devi, S.S. (2010). Bacterial species associated with traditional starter cultures used for fermented bamboo shoot production in Manipur state of India. *Int. J. Food Microbiol.* *143*, 1–8.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* *42*, D199–D205.
- Kariluoto, S. (2008). Folates in rye: Determination and enhancement by food processing.
- Kariluoto, S., and Piironen, V. (2009). Total folate. In: *HEALTHGRAIN Methods: Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals*. Ed.: P. Shewry and J. Ward. St Paul, Minnesota, USA : AACC International, p 59-68.

- Kariluoto, M.S., Vahteristo, L.T., and Piironen, V.I. (2001). Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye. *J. Sci. Food Agric.* *81*, 938–942.
- Kariluoto, S., Vahteristo, L., Salovaara, H., Katina, K., Liukkonen, K.H., and Piironen, V. (2004). Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chem.* *81*, 134–139.
- Kariluoto, S., Aittamaa, M., Korhola, M., Salovaara, H., Vahteristo, L., and Piironen, V. (2006a). Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* *106*, 137–143.
- Kariluoto, S., Liukkonen, K.-H., Myllymäki, O., Vahteristo, L., Kaukovirta-Norja, A., and Piironen, V. (2006b). Effect of Germination and Thermal Treatments on Folates in Rye. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 9522–9528.
- Kariluoto, S., Edelmann, M., Nyström, L., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Kivelä, R., Herranen, M., Korhola, M., and Piironen, V. (2014). In situ enrichment of folate by microorganisms in beta-glucan rich oat and barley matrices. *Int. J. Food Microbiol.* *176*, 38–48.
- Kaur, P., Kunze, G., and Satyanarayana, T. (2007). Yeast Phytases: Present Scenario and Future Perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* *27*, 93–109.
- Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *365*, 2793–2807.
- Kedia, G., Wang, R., Patel, H., and Pandiella, S.S. (2007). Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochem.* *42*, 65–70.
- KEGG (2014). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, available online: <http://www.genome.jp/kegg/>.
- Kelly, P., McPartlin, J., Goggins, M., Weir, D.G., and Scott, J.M. (1997). Unmetabolized folic acid in serum: Acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am. J. Clin. Nutr.* *65*, 1790–1795.



- Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B., and Lusby, W.R. (2009). Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* *63*, 71–80.
- Kim, H.J., Kim, M.-J., Turner, T.L., Kim, B.-S., Song, K.-M., Yi, S.H., and Lee, M.-K. (2014). Pyrosequencing analysis of microbiota reveals that lactic acid bacteria are dominant in Korean flat fish fermented food, gajami-sikhae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *78*, 1611–1618.
- Klammer, S., Knapp, B., Insam, H., Dell’Abate, M.T., and Ros, M. (2008). Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. *Waste Manag. Res.* *26*, 173–187.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Kranenburg, R. van, Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 1990–1995.
- Koehler, P., Hartmann, G., Wieser, H., and Rychlik, M. (2007). Changes of Folates, Dietary Fiber, and Proteins in Wheat As Affected by Germination. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 4678–4683.
- Konings, E.J.M. (1999). A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J. Aoac Int.* *82*, 119–127.
- Korhola, M., Hakonen, R., Juuti, K., Edelmann, M., Kariluoto, S., Nyström, L., Sontag-Strohm, T., and Piironen, V. (2014). Production of folate in oat bran fermentation by yeasts isolated from barley and diverse foods. *J. Appl. Microbiol.* *117*, 679–689.
- Koyanagi, T., Kiyohara, M., Matsui, H., Yamamoto, K., Kondo, T., Katayama, T., and Kumagai, H. (2011). Pyrosequencing survey of the microbial diversity of “narezushi”, an archetype of modern Japanese sushi. *Lett. Appl. Microbiol.* *53*, 635–640.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., and Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* *120*, 945–959.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., and Shimazaki, K. (2004). Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. *J. Dairy Sci.* *87*, 4050–4056.

- Kuratsu, M., Hamano, Y., and Dairi, T. (2010). Analysis of the *Lactobacillus* Metabolic Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 7299–7301.
- Laiño, J.E., Guy LeBlanc, J., and Savoy de Giori, G. (2012). Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. *Can. J. Microbiol.* *58*, 581–588.
- Laiño, J.E., Juarez del Valle, M., Savoy de Giori, G., and LeBlanc, J.G.J. (2013). Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT - Food Sci. Technol.* *54*, 1–5.
- Laiño, J.E., Juarez del Valle, M., Savoy de Giori, G., and LeBlanc, J.G.J. (2014). Applicability of a *Lactobacillus amylovorus* strain as co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* *191*, 10–16.
- LeBlanc, J., de Giori, G.S., Smid, E., Hugenholtz, J., and Sesma, F. (2008). Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* *112*, 975–984.
- LeBlanc, J.G., Sybesma, W., Starrenburg, M., Sesma, F., de Vos, W.M., de Giori, G.S., and Hugenholtz, J. (2010). Supplementation with engineered *Lactococcus lactis* improves the folate status in deficient rats. *Nutrition* *26*, 835–841.
- LeBlanc, J.G., Laino, J.E., Juarez del Valle, M., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., and Sesma, F. (2011a). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* *111*, 1297–1309.
- LeBlanc, J.G., Laino, J.E., Juarez del Valle, M., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., and Sesma, F. (2011b). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* *111*, 1297–1309.
- LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* *24*, 160–168.

- Lei, V., and Jakobsen, M. (2004). Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *J. Appl. Microbiol.* *96*, 384–397.
- Leichter, J., Landymore, A., and Krumdieck, C. (1979). Folate Conjugase Activity in Fresh Vegetables and Its Effect on the Determination of Free Folate Content. *Am. J. Clin. Nutr.* *32*, 92–95.
- Lestienne, I., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., and Trèche, S. (2005). The effects of soaking of whole, dehulled and ground millet and soybean seeds on phytate degradation and Phy/Fe and Phy/Zn molar ratios. *Int. J. Food Sci. Technol.* *40*, 391–399.
- Liang, L., Zhang, J., Zhou, P., and Subirade, M. (2013). Protective effect of ligand-binding proteins against folic acid loss due to photodecomposition. *Food Chem.* *141*, 754–761.
- Liew, S.-C. (2016). Folic acid and diseases - supplement it or not? *Rev. Assoc. Médica Bras.* *62*, 90–100.
- Lin, M.Y., and Young, C.M. (2000a). Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* *10*, 409–413.
- Lin, M.Y., and Young, C.M. (2000b). Biosynthesis of folates by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruekii* ssp *bulgaricus*. *J. Food Drug Anal.* *8*, 195–199.
- Lindshield, B.L. (2012). Carotenoids. In: Erdman J.W. Jr., Macdonald I.A., and Zeisel S.H. (Eds.), *Present knowledge in nutrition*, 10th Edition, Wiley-Blackwell. pp. 185-198. In *Present Knowledge in Nutrition*, 10th Edition, (John Wiley & Sons), p.
- Liu, W., Zheng, Y., Kwok, L.-Y., Sun, Z., Zhang, J., Guo, Z., Hou, Q., Menhe, B., and Zhang, H. (2015). High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia. *BMC Microbiol.* *15*, 45.
- Lu, P., Ma, D., Chen, Y., Guo, Y., Chen, G.-Q., Deng, H., and Shi, Y. (2013). L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. *Cell Res.* *23*, 635–644.
- Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* *56*, 105–115.

- Lucock, M.D., Nayeemuddin, F.A., Habibzadeh, N., Schorah, C.J., Hartley, R., and Levene, M.I. (1994). Methylfolate exhibits a negative in-vitro interaction with important dietary metal cations. *Food Chem.* *50*, 307–310.
- Łukaszewicz, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast. In *Probiotics*, E. Rigobelo, ed. (InTech), p.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 15611–15616.
- Malin, J. (1977). Total Folate Activity in Brussels-Sprouts - Effects of Storage, Processing, Cooking and Ascorbic-Acid Content. *J. Food Technol.* *12*, 623–632.
- Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., and Vidal-Valverde, C. (2008). Alpha-Galactosides: Antinutritional Factors or Functional Ingredients? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *48*, 301–316.
- Masuda, M., Ide, M., Utsumi, H., Niuro, T., Shimamura, Y., and Murata, M. (2012). Production Potency of Folate, Vitamin B-12, and Thiamine by Lactic Acid Bacteria Isolated from Japanese Pickles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *76*, 2061–2067.
- Mayne, S.T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *Faseb J.* *10*, 690–701.
- McLean, E., de Benoist, B., and Allen, L.H. (2008). Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr. Bull.* *29*, 38–51.
- McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y., and Cheng, K.-J. (2000). A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* *80*, 469–485.
- McNulty, H., and Pentieva, K. (2004). Folate bioavailability. *Proc. Nutr. Soc.* *63*, 529–536.
- Mellen, P.B., Liese, A.D., Tooze, J.A., Vitolins, M.Z., Wagenknecht, L.E., and Herrington, D.M. (2007). Whole-grain intake and carotid artery atherosclerosis in a multiethnic cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Am. J. Clin. Nutr.* *85*, 1495–1502.

- Mellen, P.B., Walsh, T.F., and Herrington, D.M. (2008). Whole grain intake and cardiovascular disease: A meta-analysis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* *18*, 283–290.
- Metz, J. (1963). Folates in megaloblastic anaemia. *Bull. World Health Organ.* *28*, 517–529.
- Minervini, F., Cagno, R.D., Lattanzi, A., Angelis, M.D., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., and Gobbetti, M. (2012). Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of 19 Sourdoughs Used for Traditional/Typical Italian Breads: Interactions between Ingredients and Microbial Species Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 1251–1264.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2014). Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* *171*, 136–146.
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Celano, G., and Gobbetti, M. (2015). House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiol.* *52*, 66–76.
- Mitchell, H.K., Snell, E.E., and Williams, R.J. (1941). The concentration of “folic acid.” *J. Am. Chem. Soc.* *63*, 2284–2285.
- Mitchell, H.K., Snell, E.S., and Williams, R.J. (2012). Folate. The Vitamins. Chapter 16. in *B vitamins and folate : chemistry, analysis, function and effects.* 349–375.
- Mnkeni, A., and Beveridge, T. (1982). Thermal-Destruction of Pteroylglutamic Acid in Buffer and Model Food Systems. *J. Food Sci.* *47*, 2038–2041.
- Mo, H., Kariluoto, S., Piironen, V., Zhu, Y., Sanders, M.G., Vincken, J.-P., Wolkers-Rooijackers, J., and Nout, M.J.R. (2013). Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. *Food Chem.* *141*, 2418–2425.
- Monks, J.L.F., Vanier, N.L., Casaril, J., Berto, R.M., de Oliveira, M., Gomes, C.B., de Carvalho, M.P., Dias, A.R.G., and Elias, M.C. (2013). Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. *J. Food Compos. Anal.* *30*, 73–79.

- Morelli, L. (2007). In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int. Dairy J.* 17, 1278–1283.
- Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard, L., and Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* 2, 449–473.
- Motarjemi, Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 213–229.
- Mouquet, C., Greffeuille, V., and Treche, 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. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 459–469.
- Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Guyot, J.-P., Hassane Tou, E., Rochette, I., and Trèche, S. (2008). Consumption pattern, biochemical composition and nutritional value of fermented pearl millet gruels in Burkina Faso. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59, 716–729.
- Mouquet-Rivier, C., Traoré, T., Soma, A., Kaboré, C., and Trèche, S. (2016). Both encouraging feeding style and high energy density may increase energy intakes from fermented millet gruels eaten by infants and toddlers in Ouagadougou. *Appetite* 99, 245–253.
- Munyaka, A.W., Verlinde, P., Mukisa, I.M., Oey, I., Van Loey, A., and Hendrickx, M. (2010). Influence of Thermal Processing on Hydrolysis and Stability of Folate Poly- $\gamma$ -glutamates in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), Carrot (*Daucus carota*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Agric. Food Chem.* 58, 4230–4240.
- Murdock, F.A., and Fields, M.L. (1984). B-Vitamin Content of Natural Lactic Acid Fermented Cornmeal. *J. Food Sci.* 49, 373–375.
- Muyzer, G., Dewaal, E., and Uitterlinden, A. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Nathan, H.A., and Cowperthwaite, J. (1955). “Crithidia Factor”— A New Member of the Folic Acid Group of Vitamins. *J. Protozool.* 2, 37–42.

- Nguyen, T.T.T., Loiseau, G., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S., and 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 Chem.* *100*, 623–631.
- Nor, N.M., Mohamad, R., Foo, H.L., and Rahim, R.A. (2010). Improvement of Folate Biosynthesis by Lactic Acid Bacteria Using Response Surface Methodology. *Food Technol. Biotechnol.* *48*, 243–250.
- Nout, M.J.R. (2009). Rich nutrition from the poorest – Cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiol.* *26*, 685–692.
- Obodai, M., and Dodd, C. e. r. (2006). Characterization of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, nyarmie, by culture- and nonculture-based methods. *J. Appl. Microbiol.* *100*, 1355–1363.
- O’Hare, T.J., Pyke, M., Scheelings, P., Eaglesham, G., Wong, L., Houlihan, A., and Graham, G. (2012). Impact of low temperature storage on active and storage forms of folate in choy sum (*Brassica rapa* subsp. *parachinensis*). *Postharvest Biol. Technol.* *74*, 85–90.
- Omar, N. ben, and Ampe, F. (2000). Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 3664–3673.
- Osseyi, E.S., Wehling, R.L., and Albrecht, J.A. (2001). HPLC Determination of Stability and Distribution of Added Folic Acid and Some Endogenous Foliates During Breadmaking. *Cereal Chem. J.* *78*, 375–378.
- Ouoba, L. i. i., Diawara, B., Annan, N. t., Poll, L., and Jakobsen, M. (2005). Volatile compounds of Soumbala, a fermented African locust bean (*Parkia biglobosa*) food condiment. *J. Appl. Microbiol.* *99*, 1413–1421.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* *82*, 279–289.
- Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Glover, R.L.K., and Jespersen, L. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiol.* *32*, 72–78.

- Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., and Jespersen, L. (2015). Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiol.* *15*, 261.
- Oyewole, O.B. (1997). Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control* *8*, 289–297.
- Padalino, M., Perez-Conesa, D., López-Nicolás, R., Frontela-Saseta, C., and Ros-Berruezo, G. (2012). Effect of fructooligosaccharides and galactooligosaccharides on the folate production of some folate-producing bacteria in media cultures or milk. *Int. Dairy J.* *27*, 27–33.
- Paine-Wilson, B., and Chen, T.-S. (1979). Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions. *J. Food Sci.* *44*, 717–722.
- Park, S.-Y., Do, J.-R., Kim, Y.-J., Kim, K.-S., and Lim, S.-D. (2014). Physiological Characteristics and Production of Folic Acid of *Lactobacillus plantarum* JA71 Isolated from Jeotgal, a Traditional Korean Fermented Seafood. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* *34*, 106–114.
- Parkouda, C., Thorsen, L., Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Jensen, J.S., Diawara, B., and Jakobsen, M. (2010). Microorganisms associated with Maari, a Baobab seed fermented product. *Int. J. Food Microbiol.* *142*, 292–301.
- Patring, J.D.M., Hjortmo, S.B., Jastrebova, J.A., Svensson, U.K., Andlid, T.A., and Jägerstad, I.M. (2006). Characterization and quantification of folates produced by yeast strains isolated from kefir granules. *Eur. Food Res. Technol.* *223*, 633–637.
- Perera, C.O., and Yen, G.M. (2007). Functional Properties of Carotenoids in Human Health. *Int. J. Food Prop.* *10*, 201–230.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., and Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiol.* *38*, 26–35.
- Phadwal, K. (2005). Carotenoid biosynthetic pathway: molecular phylogenies and evolutionary behavior of crt genes in eubacteria. *Gene* *345*, 35–43.



- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M., and Haytowitz, D.B. (2006). Difference in Folate Content of Green and Red Sweet Peppers (*Capsicum annuum*) Determined by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 9998–10002.
- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., and Haytowitz, D.B. (2011). Folate composition of 10 types of mushrooms determined by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* *129*, 630–636.
- Phillips, K.M., Pehrsson, P.R., Agnew, W.W., Scheett, A.J., Follett, J.R., Lukaski, H.C., and Patterson, K.Y. (2014). Nutrient composition of selected traditional United States Northern Plains Native American plant foods. *J. Food Compos. Anal.* *34*, 136–152.
- Pinto, J.T., and Cooper, A.J.L. (2014). From Cholesterogenesis to Steroidogenesis: Role of Riboflavin and Flavoenzymes in the Biosynthesis of Vitamin D. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* *5*, 144–163.
- Pomeranz, Y. (1988). *Wheat: chemistry and technology*. Volume I. Chemical composition of kernel structures. pp. 97-158 (American Association of Cereal Chemists).
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., and Rossi, M. (2007). Folate Production by Bifidobacteria as a Potential Probiotic Property. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 179–185.
- Powers, H.J. (2003). Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am. J. Clin. Nutr.* *77*, 1352–1360.
- Puwastien, P., Pinprapai, N., Judprasong, K., and Tamura, T. (2005). International inter-laboratory analyses of food folate. *J. Food Compos. Anal.* *18*, 387–397.
- Quinlivan, E.P., Hanson, A.D., and Gregory, J.F. (2006). The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Anal. Biochem.* *348*, 163–184.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., and Penna, A.L.B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.* *4*, 124–140.
- Reisenauer, A., and Halsted, C. (1987). Human Folate Requirements. *J. Nutr.* *117*, 600–602.

- Ringling, C., and Rychlik, M. (2013). Analysis of seven folates in food by LC–MS/MS to improve accuracy of total folate data. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 17–28.
- Riquelme, C., Câmara, S., Enes Dapkevicius, M. de L.N., Vinuesa, P., da Silva, C.C.G., Malcata, F.X., and Rego, O.A. (2015). Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int. J. Food Microbiol.* 192, 86–94.
- Robert, H., Gabriel, V., and Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 53–59.
- Rohner, F., Zimmermann, M.B., Wegmueller, R., Tschannen, A.B., and Hurrell, R.F. (2007). Mild riboflavin deficiency is highly prevalent in school-age children but does not increase risk for anaemia in Côte d’Ivoire. *Br. J. Nutr.* 97, 970–976.
- Rong, N., Selhub, J., Goldin, B., and Rosenberg, I. (1991). Bacterially Synthesized Folate in Rat Large-Intestine Is Incorporated into Host Tissue Folyl Polyglutamates. *J. Nutr.* 121, 1955–1959.
- Rosenthal, J., Lopez-Pazos, E., Dowling, N.F., Pfeiffer, C.M., Mulinare, J., Vellozzi, C., Zhang, M., Lavoie, D.J., Molina, R., Ramirez, N., et al. (2015). Folate and Vitamin B12 Deficiency Among Non-pregnant Women of Childbearing-Age in Guatemala 2009–2010: Prevalence and Identification of Vulnerable Populations. *Matern. Child Health J.* 19, 2272–2285.
- Rossi, M., Amaretti, A., and Raimondi, S. (2011). Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients* 3, 118–134.
- Rouget, F., Monfort, C., Bahuau, M., Nelva, A., Herman, C., Francannet, C., Robert-Gnansia, E., and Cordier, S. (2005). Periconceptional folates and the prevention of orofacial clefts: role of dietary intakes in France. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 53, 351–360.
- Rychlik, M., and Adam, S.T. (2008). Glucosinolate and folate content in sprouted broccoli seeds. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1057–1064.

- Rychlik, M., Englert, K., Kapfer, S., and Kirchhoff, E. (2007). Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *J. Food Compos. Anal.* *20*, 411–419.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350–1354.
- Saini, P.K., and Rosenberg, I.H. (1974). Isolation of pteroyl-gamma-oligoglutamyl endopeptidase from chicken intestine with the aid of affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* *249*, 5131–5134.
- Sandberg, A.-S., and Andlid, T. (2002). Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Sci. Technol.* *37*, 823–833.
- Sanna, M.G., Mangia, N.P., Garau, G., Murgia, M.A., Massa, T.G., Franco, M.A., and Deiana, P. (2005). Selection of folate-producing lactic acid bacteria for improving fermented goat milk. *Ital. J. Food Sci.* *17*, 143–154.
- Santos, F., Wegkamp, A., Vos, W.M. de, Smid, E.J., and Hugenholtz, J. (2008). High-Level Folate Production in Fermented Foods by the B12 Producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 3291–3294.
- Satoh, Y., Kuratsu, M., Kobayashi, D., and Dairi, T. (2014). New gene responsible for para-aminobenzoate biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* *117*, 178–183.
- Saubade, F., Almousa-Almaksour, Z., Hemery, Y.M., Humblot, C., Picq, C., and Guyot, J.-P. (2014). Is it possible to increase the folate content in cereal based fermented foods using lactic acid bacteria? Food Micro 2014, 24th International ICFMH conference (Nantes, September 1-4 2014), Book of abstracts, p. 635.
- Saubade, F., Hemery, Y.M., Guyot, J.-P., and Humblot, C. (2016). Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *0*, 00–00.
- Savino, F., Fornasero, S., Ceratto, S., De Marco, A., Mandras, N., Roana, J., Tullio, V., and Amisano, G. (2015). Probiotics and gut health in infants: A preliminary case-control

observational study about early treatment with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Clin. Chim. Acta* 451, Part A, 82–87.

Scheirlinck, I., Meulen, R.V. der, Schoor, A.V., Vancanneyt, M., Vuyst, L.D., Vandamme, P., and Huys, G. (2007). Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6262–6269.

Sedehi, M. (2013). Deficiencies of the Microelements, Folate and Vitamin B12 in Women of the Child Bearing Ages in Gorgan, Northern Iran. *J. Clin. Diagn. Res.* 7, 1102–1104.

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525.

Sharoni, Y., Linnewiel-Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M., and Levy, J. (2012). Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 259–269.

Shi, Z., Zhen, S., Wittert, G.A., Yuan, B., Zuo, H., and Taylor, A.W. (2014). Inadequate Riboflavin Intake and Anemia Risk in a Chinese Population: Five-Year Follow Up of the Jiangsu Nutrition Study. *PLOS ONE* 9, e88862.

Shohag, M.J.I., Wei, Y., Yu, N., Zhang, J., Wang, K., Patring, J., He, Z., and Yang, X. (2011). Natural Variation of Folate Content and Composition in Spinach (*Spinacia oleracea*) Germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12520–12526.

Shohag, M.J.I., Wei, Y., Yu, N., Lu, L., Zhang, J., He, Z., Patring, J., and Yang, X. (2012). Folate Content and Composition of Vegetables Commonly Consumed in China. *J. Food Sci.* 77, H239–H245.

Singh, A. k, Rehal, J., Kaur, A., and Jyot, G. (2015). Enhancement of Attributes of Cereals by Germination and Fermentation: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 1575–1589.

Slavin, J.L., Jacobs, D., and Marquart, L. (2001). Grain Processing and Nutrition. *Crit. Rev. Biotechnol.* 21, 49–66.

Smit, G., Smit, B.A., and Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *Fems Microbiol. Rev.* 29, 591–610.

Smith, A.H., Zoetendal, E., and Mackie, R.I. (2005). Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. *Microb. Ecol.* 50, 197–205.

Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Humblot, C., Diawara, B., and Guyot, J.P. (2008). Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 395–400.

Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Diawara, B., and 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. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 258–264.

Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Humblot, C., Rochette, I., Diawara, B., and Guyot, J.-P. (2010). Ability of Selected Lactic Acid Bacteria to Ferment a Pearl Millet–Soybean Slurry to Produce Gruels for Complementary Foods for Young Children. *J. Food Sci.* 75, M261–M269.

Sotiriadis, P.K., and Hoskins, F.H. (1982). Vitamin retention during storage of processed foods. I. Effect of ascorbic acid on folates in cowpeas, okra and tomatoes. *Sci. Hortic.* 16, 125–130.

Souci, S., Fachmann, W., and Kraut, H. (2000). Food composition and nutrition tables, 6th revised and completed edition. CRC Press, p. 1182.

Spies, T. (1946). Treatment of macrocytic anemia with folic acid. Originally published as Volume 1, Issue 6390. *The Lancet* 247, 225–228.

Stacewicz-Sapuntzakis, M., and Bowen, P.E. (2005). Role of lycopene and tomato products in prostate health. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1740, 202–205.

Stadlmayr, B., Charrondiere, U.R., Enujiugha, V.N., Bayili, R.G., Fagbohoun, E.G., Samb, B., Addy, P., Barikmo, I., Ouattara, F., Oshaug, A., et al. (2012). West African Food Composition Table - Table de composition des aliments d’Afrique de l’Ouest. FAO, Rome, Italy. Available from <[http://www.fao.org/infoods/tables\\_africa\\_en.stm](http://www.fao.org/infoods/tables_africa_en.stm)> Accessed July 2016.

Stiles, M.E., and Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.

Strandler, H.S., Jastrebova, J., and Mattisson, I. (2011). Folate content in Swedish eggs: influence of breed, feed and processing. *Eur. Food Res. Technol.* *233*, 923–930.

Strandler, H.S., Patring, J., Jägerstad, M., and Jastrebova, J. (2015). Challenges in the Determination of Unsubstituted Food Foliates: Impact of Stabilities and Conversions on Analytical Results. *J. Agric. Food Chem.* *63*, 2367–2377.

Svanberg, U. (1995). Lactic acid fermented foods for feeding infants. In: Steinkraus K.H. (Ed), *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Second Edition, Revised and Expanded. CRC Press, pp. 310-321. p.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H.N., and Hugenholtz, J. (2003a). Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 4542–4548.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., Vos, W.M. de, and Hugenholtz, J. (2003b). Increased Production of Folate by Metabolic Engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 3069–3076.

Tabor, H., and Wyngarden, L. (1959). The enzymatic formation of formiminotetrahydrofolic acid, 5,10-methenyltetrahydrofolic acid, and 10-formyltetrahydrofolic acid in the metabolism of formiminoglutamic acid. *J. Biol. Chem.* *234*, 1830–1846.

Tamura, T., Shin, Y.S., Buehring, K.U., and Stokstad, E.L.R. (1976). The Availability of Foliates in Man: Effect of Orange Juice Supplement on Intestinal Conjugase. *Br. J. Haematol.* *32*, 123–134.

Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Angelozzi, G., Suzzi, G., and Corsetti, A. (2012). Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie Van Leeuwenhoek* *102*, 121–131.

Tomar, S.K., Srivatsa, N., Iyer, R., and Singh, R. (2009). Estimation of folate production by *Streptococcus thermophilus* using modified microbiological assay. *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* *64*, 260–263.

Tou, E.H., Guyot, J.P., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Council, E., Traoré, A.S., and 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. *Int. J. Food Microbiol.* *106*, 52–60.

Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Traoré, A.S., Trèche, S., and 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 Chem.* *100*, 935–943.

Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Picq, C., Traorè, A.S., Trèche, S., and 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. *LWT - Food Sci. Technol.* *40*, 1561–1569.

Turpin, W. (2011). Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté traditionnel à base de mil par une approche moléculaire. Université de Montpellier 2.

Turpin, W., Humblot, C., Thomas, M., and Guyot, J.-P. (2010). Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* *143*, 87–102.

Turpin, W., Humblot, C., and Guyot, J.-P. (2011). Genetic Screening of Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in a Fermented Pearl Millet Slurry and in the Metagenome of Fermented Starchy Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 8722–8734.

Turpin, W., Renaud, C., Avallone, S., Hammoumi, A., Guyot, J.-P., and Humblot, C. (2016). PCR of crtNM combined with analytical biochemistry: An efficient way to identify carotenoid producing lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* *39*, 115–121.

Tyagi, A., Penzkofer, A., Batschauer, A., and Wolf, E. (2009). Thermal degradation of (6R,S)-5,10-methenyltetrahydrofolate in aqueous solution at pH 8. *Chem. Phys.* *358*, 132–136.

USDA (2015). National Agricultural Library. USDA Nutrient Data Laboratory. <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/usda-nutrient-data-laboratory>.

USDA (2016). United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. USDA food composition databases.

Vahteristo, L., Ollilainen, V., and Varo, P. (1996). HPLC Determination of Folate in Liver and Liver Products. *J. Food Sci.* *61*, 524–526.

Van Daele, J., Blancquaert, D., Kiekens, F., Van Der Straeten, D., Lambert, W.E., and Stove, C.P. (2016). Degradation and interconversion of plant pteridines during sample preparation and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* *194*, 1189–1198.

Van het Hof, K.H., Tijburg, L.B.M., Pietrzik, K., and Weststrate, J.A. (1999). Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *Br. J. Nutr.* *82*, 203–212.

Van Hylckama Vlieg, J.E.T., and Hugenholtz, J. (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *Int. Dairy J.* *17*, 1290–1297.

Vieira-Dalode, G., Madode, Y.E., Hounhouigan, J., Jespersen, L., and Jakobsen, M. (2008). Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts as inoculum enrichment for the production of gowe, a sour beverage from Benin. *Afr. J. Microbiol. Res.* *2*, 179–186.

Viñas, B.R., Ribas Barba, L., Ngo, J., Gurinovic, M., Novakovic, R., Cavelaars, A., de Groot, L.C.P.G.M., van't Veer, P., Matthys, C., and Serra Majem, L. (2011). Projected Prevalence of Inadequate Nutrient Intakes in Europe. *Ann. Nutr. Metab.* *59*, 84–95.

Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M.J., and Hertel, C. (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int. J. Food Microbiol.* *130*, 205–212.

Walkey, C.J., Kitts, D.D., Liu, Y., and van Vuuren, H.J.J. (2015). Bioengineering yeast to enhance folate levels in wine. *Process Biochem.* *50*, 205–210.

Wang, C., Riedl, K.M., and Schwartz, S.J. (2013). Fate of folates during vegetable juice processing — Deglutamylation and interconversion. *Food Res. Int.* *53*, 440–448.

WHO (2012). Guideline: Daily iron and folic acid supplementation in pregnant women. Geneva, World Health Organization. [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines/daily\\_ifa\\_supp\\_pregnant\\_women/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines/daily_ifa_supp_pregnant_women/en/).



- Wickramasinghe, S.N. (2006). Diagnosis of megaloblastic anaemias. *Blood Rev.* 20, 299–318.
- Wieringa, F.T., Laillou, A., Guyonnet, C., Jallier, V., Moench-Pfanner, R., and Berger, J. (2014). Stability and retention of micronutrients in fortified rice prepared using different cooking methods. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1324, 40–47.
- Wills, L. (1931). Treatment of “pernicious anaemia of pregnancy” and “tropical anaemia.” *Br. Med. J.* 1, 1059–1064.
- Wilson, S.D., and Horne, D.W. (1983). Evaluation of ascorbic acid in protecting labile folic acid derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 6500–6504.
- Wintzingerode, F.V., Göbel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229.
- Withhöft, C.M., Forssén, K., Johannesson, L., and Jägerstad, M. (1999). Foliates-food sources, analyses, retention and bioavailability. *Scand. J. Nutr.* 43, 138–146.
- Woods, D.D. (1953). Folic acid and related compounds in the metabolism of microorganisms. *Br. Med. Bull.* 9, 122–125.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., and Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12, 91–109.
- Xue, S., Ye, X., Shi, J., Jiang, Y., Liu, D., Chen, J., Shi, A., and Kakuda, Y. (2011). Degradation kinetics of folate (5-methyltetrahydrofolate) in navy beans under various processing conditions. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 231–238.
- Yao, J., Guo, G.S., Ren, G.H., and Liu, Y.H. (2014). Production, characterization and applications of tannase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101, 137–147.
- Yee, A.L., Maillard, M.-B., Roland, N., Chuat, V., Leclerc, A., Pogačić, T., Valence, F., and Thierry, A. (2014). Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 60–68.

Youngblood, M.E., Williamson, R., Bell, K.N., Johnson, Q., Kancherla, V., and Oakley, G.P. (2013). 2012 Update on global prevention of folic acid–preventable spina bifida and anencephaly. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 97, 658–663.

Zamudio, M., González, A., and Medina, J. a. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 181–184.

Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M., and Goldman, I.D. (2011). Mechanisms of Membrane Transport of Folates into Cells and Across Epithelia. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 177–201.



**Annexe 1 : Lactic acid fermentation as a tool  
for increasing the folate content of foods**



## Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods

Fabien Saubade<sup>1</sup>, Youna M. Hemery<sup>1</sup>, Jean-Pierre Guyot<sup>1</sup>, and Christèle Humblot<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Research for Development (IRD); UMR 204 Food and nutrition research in the global south (NUTRIPASS), IRD / University of Montpellier / SupAgro, Montpellier, France

Corresponding author:

\* Christèle Humblot: [christele.humblot@ird.fr](mailto:christele.humblot@ird.fr)

+33(0)467416248

## Abstract

Folate is an essential micronutrient involved in numerous vital biological reactions. The dietary consumption of naturally occurring vitamin B9 is often inadequate in many countries, and supplementation or fortification programs (using synthetic folic acid) are implemented to alleviate folate deficiency. Other food-based alternatives are possible, such as the use of lactic acid bacteria (LAB) to synthesize folate during fermentation. Many studies have been conducted on this topic, and promising results were reported for some fermented dairy products. However, in other studies, folate consumption by LAB or rather low folate production were observed, resulting in fermented foods that may not significantly contribute to the recommended B9 intake. In addition, the optimum conditions for folate biosynthesis by LAB are still not clear. The aim of this review was thus to (i) clarify the ability of LAB to produce folate in food products, (ii) check if the production of folate by LAB in various fermented foods is sufficient to meet human vitamin B9 requirements and (iii) suggest ways to optimize folate production by LAB in fermented food products.

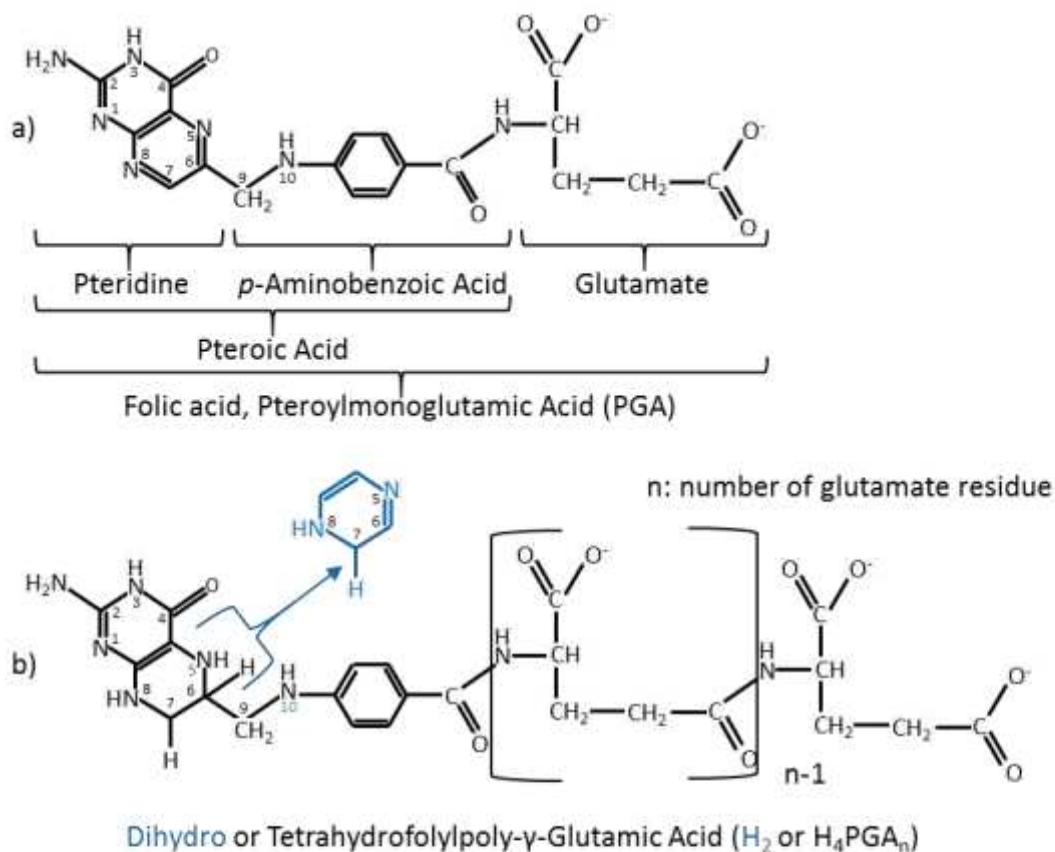
Keywords: bioaccessibility, vitamin B9, vitamer, cereal, *Lactobacillus*, yeasts, stability, process, strain, biosynthesis

## 1- Introduction

Folate, or the B9 vitamin family, is involved in essential functions such as amino acid metabolism and DNA replication and repair, and is thus essential for cell division (Ball, 2005). For example, some vitamin B9 forms (called vitamers) are involved in one-carbon transfer reactions that lead to the synthesis of adenine, guanine and thymine, three essential constituents of DNA. As humans are unable to synthesize folate *de novo*, too low intake of these vitamins leads to folate deficiency. In humans, among the diseases caused by folate deficiency, the most studied are megaloblastic anaemia, as well as congenital malformations, including neural tube defects (NTD) (FAO/WHO, 2005; Metz, 1963). Folate deficiency remains a health problem worldwide, and has been recorded in many countries on all continents, and in different nutritional contexts, both in developing and developed countries, and in different age groups (McLean et al., 2008; Viñas et al., 2011; Youngblood et al., 2013).

Folate (Figure 1) is composed of a pteridine moiety joined by a methylene bridge to para-aminobenzoic acid and linked to one or more molecules of L-glutamic acid (Ball, 2005). There are many forms of vitamin B9, called vitamers. Folic acid, the synthetic form of B9 vitamin, has only one glutamate residue, whereas the naturally occurring forms generally comprise a polyglutamate chain. Moreover, folic acid exhibits a fully oxidized pteridine ring, while the other vitamers are generally either partially reduced (at the 7,8-position) in the case of dihydrofolate forms, or fully reduced (at the 5,6,7,8-position) in the case of tetrahydrofolate compounds. The vitamers can also be substituted, either at the N5 position by formyl, methyl or formimino groups, or at the N10 position by a formyl group (Blakley, 1987). The N5 and N10 positions can also be bridged by methylene or methenyl groups.





One Carbon Substituent		Position	Oxidation State	Vitamins
Methyl	$-\text{CH}_3$	N-5	Methanol	5- $\text{CH}_3$ - $H_4$ folate 5- $\text{CH}_3$ - $H_2$ folate
Methylene	$-\text{CH}_2-$	N-5, N-10	Formaldehyde	5,10- $\text{CH}_2$ - $H_4$ folate
Methenyl	$-\text{CH}=\text{}$	N-5, N-10	Formate	5,10- $\text{CH}^+$ - $H_4$ folate
Formyl	$-\text{CHO}$	N-5 or N-10	Formate	5- $\text{HCO}$ - $H_4$ folate
				10- $\text{HCO}$ - $H_4$ folate
				10- $\text{HCO}$ - $H_2$ folate
				10- $\text{HCO}$ -PGA
Formimino	$\text{HN}=\text{CH}-$	N-5	Formate	5- $\text{HN}=\text{CH}$ - $H_4$ folate

Figure 1: Structure of a) folic acid, and b) naturally occurring folate

5- $\text{CH}_3$ - $H_4$ folate: 5-methyltetrahydrofolate; 5- $\text{CH}_3$ - $H_2$ folate: 5-methyltetrahydrofolate; 5,10- $\text{CH}_2$ - $H_4$ folate: 5,10-methylenetetrahydrofolate; 5,10- $\text{CH}^+$ - $H_4$ folate: 5,10-methenyltetrahydrofolate; 5- $\text{HCO}$ - $H_4$ folate: 5-formyltetrahydrofolate; 10- $\text{HCO}$ - $H_4$ folate: 10-formyltetrahydrofolate; 10- $\text{HCO}$ - $H_2$ folate: 10-formyldihydrofolate; 10- $\text{HCO}$ -PGA: 10-formylfolic acid; 5- $\text{HN}=\text{CH}$ - $H_4$ folate: 5-formiminotetrahydrofolate

The main strategies used to address the problem of vitamin deficiencies are (i) supplementation, (ii) food fortification, and (iii) dietary diversification (Bhutta et al., 2013). Daily folic acid supplementation in pregnant women is recommended to reduce the risk of low birth weight, maternal anemia and NTD (WHO, 2012). In fortification programs, folic acid is added to wheat and/or maize flour at the industrial level to increase the folate intake of the whole population of a country or region to prevent folate deficiency. In 2015, flour fortification with folic acid was mandatory in 63 countries and authorized in four countries (Food Fortification Initiative, 2015). It has been estimated that folic acid consumption in appropriate amounts in the fortified products could prevent up to 75% of the most common NTD: spina bifida and anencephaly (Bell and Oakley, 2009). However, food fortification programs are not always effective as Youngblood et al. (2013) estimated that currently, less than 25.5% of the folic acid preventable NTD are actually prevented. In addition, it has been shown that the absorption of high amounts of folic acid can mask the symptoms of vitamin B12 deficiency, which may result in the progression of neuropathy to an irreversible point (FAO/WHO, 2005).

Dietary diversification, by promoting the consumption of folate-rich foods such as liver and green leafy vegetables, is a possible sustainable way of preventing folate deficiency (FAO/WHO, 2005; Souci et al., 2000; USDA, 2015).. However, folate-rich foods are not always available, depending on the season, and on the geographic, agro-ecological and socio-economic context. In these cases, populations at risk, e.g. young children and pregnant women, may not be able to meet their folate requirements through their daily food intake (FAO/WHO, 2005). Folate deficiency thus still occurs frequently in many countries and sustainable solutions are needed.

In this context, the use of folate producing microorganisms to increase the B9 vitamin content of fermented foods could be an interesting approach. Different studies suggest that the folate content of food products could be increased by *in situ* fortification through fermentation (LeBlanc et al., 2008, 2011a; Moslehi-Jenabian et al., 2010). Fermented foods are consumed in many countries worldwide (Campbell-Platt, 1994). Numerous microorganisms are involved in the traditional fermentation processes, including lactic acid bacteria (LAB) and yeast (Beuchat, 1997). Yeasts are well known for their ability to produce folate during food fermentation (Moslehi-Jenabian et al., 2010), but the folate production capacity of LAB is not yet clear, as both folate production and folate consumption have been observed in culture media and in fermented foods (LeBlanc et al., 2008). Nevertheless, several studies have shown that the folate content of different food products was increased after fermentation by LAB selected for their folate biosynthesis capacities (Gangadharan and Nampoothiri, 2011; Holasova et al., 2004; Jägerstad et al., 2004; Kariluoto et al., 2006a). However, most of the published studies focused on the lactic acid fermentation of dairy products, and only a few of them investigated if the observed increases in vitamin B9 significantly contribute to the satisfaction of folate requirements.

In this review, we discuss the occurrence of folate in food products, the stability of folate vitamers during food processing, and their bioavailability. Next, we focus on the production of folate by LAB and (i) draw up a list of LAB strains able to produce folate in culture media and/or fermented foods, (ii) estimate the possible nutritional benefits of the consumption of fermented foods enriched in folate by LAB, in terms of contribution to the satisfaction of folate requirements, and (iii) suggest which parameters could be adjusted to improve folate production by LAB in fermented foods.

## 2- Folate: essential but sensitive molecules

### 2-1- Folate requirements

Recommendations for folate intakes are given in Table 1, based on the folate requirements of different age groups. Two values can be used for each age group, the Estimated Average Requirement (EAR) and the Recommended Nutrient Intake (RNI). EAR corresponds to the daily intake necessary to cover the needs of 50% of the people in the age group concerned. RNI corresponds to the daily intake necessary to cover the needs of 97.5% of the people in the age group concerned. An intake of 400  $\mu\text{g}$  of folate per day would satisfy the folate requirements of most of the population. However, 400  $\mu\text{g}$  is not enough to cover the needs of pregnant women, who represent one of the main populations at risk. Yet, adequate folate intake is particularly important during pregnancy, as folate deficiency has a high negative impact during the fetal development stage, when the cell multiplication is high (FAO/WHO, 2005). Therefore, the value of 600  $\mu\text{g}/\text{day}$ , which is the RNI for pregnant women, is used in the rest of this review as a reference for the calculation of folate requirements.

To our knowledge, no global data are available on the prevalence of folate deficiency worldwide, although the deficiency has been detected in countries as different as Burkina Faso, Guatemala, Iran, Ireland, Thailand and United States (Arsenault et al., 2014; Assantachai and Lekhakula, 2007; Brunst et al., 2014; Harrington et al., 2008; Rosenthal et al., 2015; Sedehi, 2013). Folate deficiency affects different age groups depending on the country (McLean, 2008). In rural Burkina Faso, a study recorded the food consumption of 36-59 month-old children and their mothers using the quantitative 24 h recall method, and estimated that the probability of folate adequacy in these populations varied with the season. The median probability of adequate folate intake was zero for women in both the lean and post-harvest seasons, and for children during the lean season, but the median probability of

adequate folate intake rose to 0.98 in children in the post-harvest season (Arsenault et al., 2014). Folate intake in men and women in Ireland was assessed through a food frequency questionnaire and showed that 40% of the Irish population is below the recommended dietary allowance for folate (Harrington et al., 2008). In an urban US population, Brunst et al. (2014) estimated that 16% of pregnant women have inadequate folate intake. Analyses of the serum level of folate in women of childbearing age showed that 5.1% of women in Guatemala and around 30% of women in Iran had folate deficiency (Rosenthal et al., 2015; Sedehi, 2013). In Thailand, Assantachai and Lekhakula (2007) evaluated the serum level of folate of subjects aged 60 years and over, and detected folate deficiency in 39% of this population group. All these studies underline the fact that folate deficiency is still a global public health problem that affects different age categories.

Table 1: Estimated average requirements (EARs) and recommended nutrient intakes (RNIs) of folic acid expressed as dietary folate equivalents, according to age group, FAO/WHO (2005)

Group	EAR ( $\mu\text{g}/\text{day}$ )	RNI ( $\mu\text{g}/\text{day}$ )
Infants and children		
0-12 months <sup>a</sup>	65	80
1-3 years	120	150
4-6 years	160	200
7-9 years	250	300
Adolescents, 10-18 years	330	400
Adults		
19-65 + years	320	400
Pregnancy	520	600
Lactation	450	500

<sup>a</sup> Based on a human milk intake of 0.75 l/day

## 2-2- Dietary sources of folate

It is generally considered that the following foods are the best dietary sources of folate: liver (136-963  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ), green leafy vegetables (88-187  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ), other green vegetables such as asparagus (108  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ), Brussels sprouts (101  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ) and broccoli (114  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ), legumes and pulses (140-540  $\mu\text{g}/100\text{ g non-processed FM}$ ), nuts (39-169  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ), cereal-based foods (26-170  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$  for wholegrain products), and some fruits including oranges (27-42  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ), strawberries (36-65  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ) and cherries (52-75  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ) (FAO/WHO, 2005; Souci et al., 2000; USDA, 2015). In the case of cereals, folate is located in the outer layers and in the germ, which explains why refined flours have a much lower concentration (10-17  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ) than wholegrain products (Pomeranz, 1988; Souci et al., 2000). However, food products with low folate content but that are frequently consumed may be better dietary sources of folate than some folate-rich foods that are rarely consumed. Consequently to assess whether a food is a good dietary source of folate, not only its folate content but also its consumption frequency should be taken into account. Table 2 presents theoretical values of folate intake ( $\mu\text{g}/\text{capita}/\text{day}$ ); these were calculated taking into account the folate content of various food products ( $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ ) and their average supply worldwide in the period 2001-2011 ( $\text{g}/\text{capita}/\text{day}$ ).

The food supply data in Table 2 suggest that cereals are the most frequently consumed food group, which can be explained by the high consumption of wheat and rice worldwide. Vegetables are the second most available food category, followed by dairy products, fruits, starchy roots and tubers, and meat. The highest folate content is found in offal, especially in liver, the organ in which folate is stored. With the exception of offal, the folate content of meat products is generally less than 20  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ . Pulses and green leafy vegetables have

a high folate content, generally between 80 and 400  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ . In the other food categories, folate content is generally between 1 and 100  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$ . Table 2 shows that the food categories with the highest folate content are not those that contribute the most to theoretical folate intake. For example, even if offal and pulses have a high folate content, their theoretical folate intake values are similar to those of other foods, such as rice and maize products, whose folate content is lower. This is explained by the more frequent consumption of cereal products than of pulses and offal worldwide.

According to the U.S. Food and Drug Administration, a food can be considered as a good source of folate if it provides at least 10% of the RDA, which is equivalent to the RNI (FAO/WHO, 2005; FDA, 2016b). In this review, we use the value 60  $\mu\text{g}/100\text{ g FM}$  as a reference, which corresponds to 10% of the folate requirements of pregnant women. According to theoretical folate intake values, only some wheat products, vegetables and dairy products supply more than 60  $\mu\text{g}$  of folate/capita/day. However, for wheat products, if we exclude wholegrain products (87  $\mu\text{g}$  of folate/100 g FM), the maximum theoretical folate intake is only 38  $\mu\text{g}$  of folate/capita/day. LeBlanc et al. (2008) already showed that the consumption of some fermented dairy products could cover more than 10% of the folate requirements of pregnant women. Although green leafy vegetables are considered as one of the best sources of folate, the folate intake from this food category cannot be calculated because of the lack of consumption data.

**Table 2: Theoretical contribution of different food products to folate consumption worldwide**

Food category	Food product	Average food supply <sup>a</sup> (g/capita/day)	Folate content <sup>b</sup> (µg/100g FM)	Theoretical folate intake (µg/capita/day)
	<b>Total (excluding beer)</b>	<b>402</b>	ND	NC
Cereals and products	Wheat and products	182	10-87	18-159
	Rice (Milled Equivalent)	146	10-16	15-23
	Maize and products	46	10-26	5-12
	Sorghum and products	10	30-38	3-4
	Millet and products	9	8-50	0.8-5
	<b>Total</b>	<b>17</b>	ND	NC
Pulses	Beans	6	140-360	9-23
	Peas	2	151-340	3-7
	<b>Total (excepted starchy foods and tubers)</b>	<b>343</b>	11-187	38-641
Vegetables	Green leafy vegetables	ND	88-187	NC
	<b>Total (Excluding Wine)</b>	<b>187</b>	ND	NC
Fruits	Oranges, Mandarins	33	7-29	2-10
	Bananas	28	13-17	4-6
	Apples and products	24	3-12	0.8-3
	<b>Total</b>	<b>169</b>	ND	NC
Starchy roots and tubers	Potatoes and products	90	22-40	20-36
	Cassava and products	37	16-56	6-21
	Sweet potatoes	26	7-43	2-11
Nuts and products	<b>Total</b>	<b>5</b>	39-169	2-9
	<b>Total</b>	<b>109</b>	ND	NC
Meat products	Pig meat	41	3-10	1-4
	Poultry Meat	35	4-16	1-6
	Bovine Meat	26	1-10	0.3-3
	Offal*	6	4-592	0.2-36
Fish and Sea products	<b>Total</b>	<b>48</b>	1-37	0.5-18
	<b>Total (Milk, Yoghurt, Cheese and Whey)</b>	<b>219</b>	1-66	2-145
Dairy products	<b>Raw milk</b>	<b>ND</b>	0.8-7	NC
	<b>Cheese</b>	<b>ND</b>	10-65	NC

<sup>a</sup>: The food supply data were obtained from FAOSTAT database for the 2001-2011 period (FAOSTAT, 2015).

<sup>b</sup>: Folate contents of food products were obtained mainly from Souci et al., (2000) and when data were missing, other databases were used (Stadlmayr et al., 2012; USDA, 2015).

ND: Not Determined (no supply data were available in the databases). NC: Not Calculated

\*: offal includes folate-rich products such as liver and kidney, as well as products with a much lower folate content such as heart and brain.



Even if global data help understand the contribution of different food products to folate consumption, they may not reflect reality, because diets differ considerably from one region to another. The nutritional context needs to be taken into account to determine the main dietary sources of folate in any given area. Figure 2 shows the availability of the most consumed food categories in Europe and Africa for the period 2001-2011 (FAOSTAT, 2015). It shows that, in Africa, cereal-based foods (409g/capita/day) are 1 to 9 fold more available than the other food categories, so cereal products may be the main source of folate in Africa. In contrast, in Europe, dairy products (593g/capita/day) are 1 to 3 fold more available than other food categories, and so could greatly contribute to folate intakes, at least in some countries.

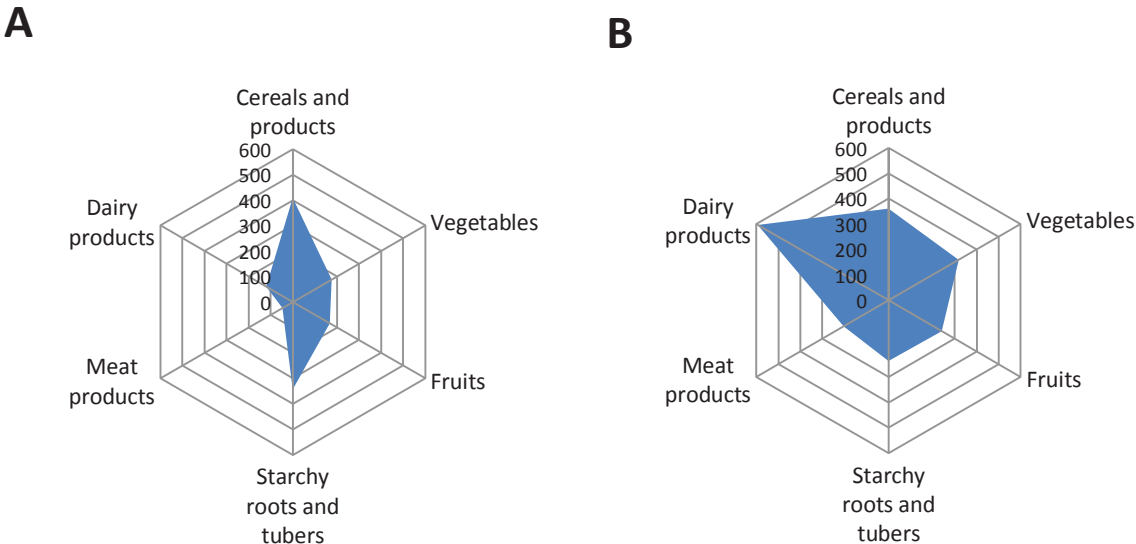


Figure 2: Consumption (in g/capita/day) of different food categories in A) Africa and B) Europe, in 2011 (FAOSTAT, 2015)

A large proportion of dairy products and cereal-based foods are consumed as fermented foods (Blandino et al., 2003; Campbell-Platt, 1994; Guyot, 2012; Nout, 2009; Oyewole, 1997). For example, in some European countries, fermented dairy products (cheese, yoghurt and other fermented milk products) can represent up to 43% of total dairy consumption (160 to 478

g/day) for adults (Hjartaker et al., 2002). Some studies showed that, the consumption of a portion (225 mL) of some dairy products fermented by LAB could contribute to 10-15% of the RDA for adults (Laiño et al., 2013, 2014). However, depending on the LAB involved in the fermentation, some fermented dairy products could have lower folate content and consequently contribute to less than 10% of the RDA for adults (Laiño et al., 2012). Some fermented dairy products could contribute to only 2% of the recommended dietary intake for women of child-bearing age (Crittenden et al., 2003). In Burkina Faso, it has been estimated that 31% of the population consumes pearl-millet based fermented porridge every day (Mouquet-Rivier et al., 2008). According to Kariluoto (2008), cereal products, mostly rye bread contribute more than one third of daily folate intake in Finland. Many studies suggest that fermented foods contain more folate than the original raw material (Ekinci, 2005; Forssén et al., 2000; Murdock and Fields, 1984). For that reason, fermented dairy products could be interesting sources of folate in Europe, and cereal based fermented foods in Africa. However, other processing steps can cause folate losses, due to folate instability, or to the removal of the outer layers of cereal grains.

### 2-3- Folate stability and the influence of food processing

Different factors can cause interconversion and/or degradation of folate, which can lead to irreversible loss of vitamin activity. This is the case of temperature, exposure to oxidizing agents, unfavorable pH, exposure to UV and light, and interaction with other food components such as metal cations. Both oxidized and reduced folate forms are sensitive to degradation by UV (Strandler et al., 2015). Figure 3 summarizes the effects of these factors on folate vitamers. These effects can occur during food processing and food storage. In non-fortified foods, folic acid is a degradation product of H<sub>4</sub>folate, but it is the most stable vitamer

with 10-HCO-folic acid (Ball, 2005; Strandler et al., 2015). Reduced one-carbon-substituted folate vitamers are relatively stable, especially, folate vitamers substituted at the N5 position (Strandler et al., 2015). This could be due to “steric hindrance in restricting the access of oxygen or other oxidants to the pteridine ring” (Strandler et al., 2015). On the contrary, reduced unsubstituted folate, whose pteridine ring is not protected, is more easily oxidized. Many folate vitamers are pH-sensitive. For example, the lowest stability of reduced unsubstituted vitamers is between pH 4 and 6, whereas folic acid is stable under neutral and alkaline conditions but less stable at pH below 5 (Gregory, 1989). At acid pH, 5-CHO-H<sub>4</sub>folate and 10-CHO-H<sub>4</sub>folate are cyclized to form 5,10-CH-H<sub>4</sub>folate (Tabor and Wyngarden, 1959).

As folate vitamers are not all equally stable, folate losses may differ in two food products exposed to the same factors, depending on the composition of the folate vitamers. In fact, the composition of folate vitamers differs from one food category to another (Table 3). In all food categories, the most common vitamer is generally 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate, and to a lesser extent 5-CHO-H<sub>4</sub>folate, 10-CHO-folic acid and H<sub>4</sub>folate. For example, H<sub>4</sub>folate is unstable when exposed to high temperatures (Wilson and Horne, 1983). As H<sub>4</sub>folate is the main vitamer in some pulses and in liver, major losses of folate may occur during cooking.

Table 3: Distribution of folate vitamers in different food categories

Food categories	5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folate	5-CHO-H <sub>4</sub> folate	10-CHO-folic acid	H <sub>4</sub> folate	folic acid	5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folate	10-HCO-H <sub>2</sub> folate	Total folate content (µg/100g FM)	References
<b>Cereal and products</b>	4-47%	5-48%	9-41%	0-15%	0-17%	1-27%	0-70%	17 to 73	(Edelmann et al., 2012, 2013; Gujska et al., 2009; Kariluoto et al., 2004; Konings, 1999; Ringling and Rychlik, 2013)
<b>Pulses</b>	6-85%	0-75%	0-9%	0-67%	0-10%	0-1%	0-1%	50 to 340	(Ringling and Rychlik, 2013; Rychlik et al., 2007; Shohag et al., 2012)
<b>Leafy vegetables</b>	20-74%	6-49%	1-58%	0-24%	0-1%	0-15%	0-34%	54 to 227	(O'Hare et al., 2012; Phillips et al., 2014; Ringling and Rychlik, 2013; Shohag et al., 2011, 2012; Wang et al., 2013)
<b>Other vegetables</b>	17-85%	4-53%	0-14%	7-27%	0-23%	0-2%	1-3%	16 to 103	(Phillips et al., 2006, 2014; Ringling and Rychlik, 2013; Rychlik and Adam, 2008; Rychlik et al., 2007; Shohag et al., 2012; Wang et al., 2013)
<b>Mushrooms</b>	0-90%	10-60%	0-40%	NA	NA	NA	NA	1 to 70	(Phillips et al., 2011)
<b>Liver</b>	18-81%	0-10%	NA	10-81%	0-1%	NA	ND	375 to 1500	(Konings, 1999; Vahteristo et al., 1996)
<b>Dairy products</b>	6-100%	0-93%	16%	0-33%	3%	0.3%	6%	4 to 104	(Forssén et al., 2000; Ringling and Rychlik, 2013)

NA: Not Analyzed; ND: Not Detectable

5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate: 5-methyltetrahydrofolate, 5-HCO-H<sub>4</sub>folate: 5-formyltetrahydrofolate, 10-HCO-folic acid: 10-formylfolic acid, H<sub>4</sub>folate: tetrahydrofolate, 5,10-CH<sup>+</sup>=H<sub>4</sub>folate: 5,10-methenyltetrahydrofolate, and 10-HCO-H<sub>2</sub>folate: 10-formyldihydrofolate.

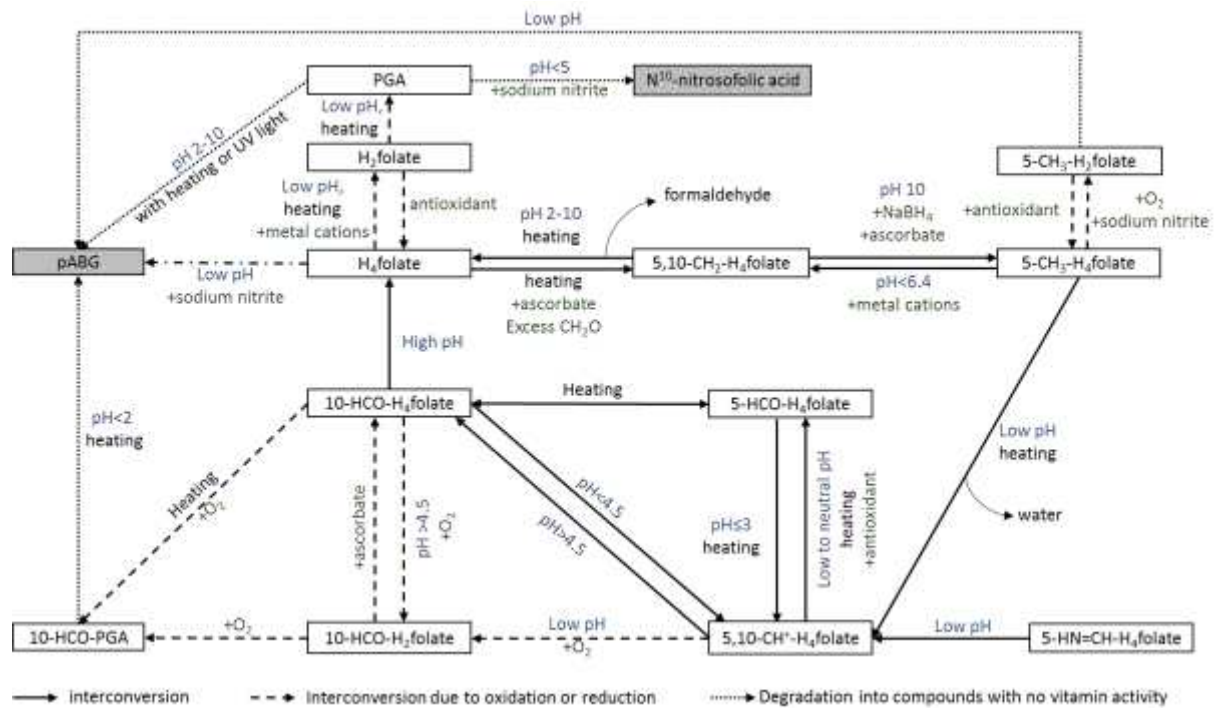


Figure 3: Degradation and interconversion of folate vitamers under different conditions. This figure was adapted from that of Edelmann (2014) and is based on data in different publications (Akhtar et al., 1999, 2003; De Brouwer et al., 2007; Jägerstad and Jastrebova, 2013; Lucock et al., 1994; Mnkeni and Beveridge, 1982; Paine-Wilson and Chen, 1979; Quinlivan et al., 2006; Strandler et al., 2015; Tyagi et al., 2009; Wilson and Horne, 1983).

H<sub>4</sub>folate: tetrahydrofolate, 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate: 5-methyltetrahydrofolate, 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate: 5,10-methenyltetrahydrofolate, 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folate: 5,10-methylenetetrahydrofolate, 5-HCO-H<sub>4</sub>folate: 5-formyltetrahydrofolate, 10-HCO-H<sub>2</sub>folate: 10-formyldihydrofolate, 10-HCO-folic acid: 10-formylfolic acid and pABG: para-aminobenzoylglutamate.

Grey boxes: compounds with no vitamin activity

Table 4 lists some examples of changes in folate content during different processing steps. When heating is involved, non-negligible folate losses can occur especially in the case of hydrothermal cooking, where vitamins are leached into the cooking water (Eitenmiller and Laden, 1999). The degree of fragmentation of the food products is also important: the larger the ratio of surface area to volume, the greater the folate loss due to leaching (Czarnowska and Gujska, 2012). Oxidation can also occur when food products are exposed to oxygen and oxidizing agents, for example during storage over a period of several months (Sotiriadis and Hoskins, 1982). To prevent oxidation, folate can be protected by antioxidants that are either naturally present in some food products or added during processing, such as ascorbic acid. For example, Sotiriadis and Hoskins (1982) showed that the addition of ascorbic acid to canned processed foods significantly limited folate loss during a six-month storage period. Exposure to light can also occur during most processing steps. It has been shown that the loss of folic acid in juices stored in the light was significantly higher than in those stored in the dark (Frommherz et al., 2014). However, some compounds naturally present in foods, such as  $\beta$ -lactoglobulin, bovine serum albumin and  $\alpha$ -lactalbumin can delay the photodecomposition of folate (Liang et al., 2013). The food matrix can also play a positive role by entrapping the vitamins and protecting them from exposure to oxidizing agents and light. Conversely, the fractionation of food products, such as cereal grains, may lead to a higher exposition of folate to oxidizing agents and light and to an increase in folate loss in the following processing steps. Moreover, the folate-rich fractions (bran and germ) may be removed during cereal processing, thereby reducing folate content (Monks et al., 2013), whereas other forms of processing make it possible to obtain the folate-rich fractions from wheat bran (Hemery et al., 2011).

Table 4: Influence of food processing on folate content: examples of common processing steps

Processing steps	Food product	Conditions	Influence on B9	References
Cooking or heating	Rye and wheat bread	200 °C/60 min	-25%	Kariluoto et al. (2004)
	Soybeans	Blanched (85 °C/5 min)	-26%	Arcot et al. (2002)
	Broccoli	25-140 °C/30 min	-22 to -49%	Munyaka et al. (2010)
	Milk	Pasteurization (62.5 °C, 30 min), microwaving (720 watts, 30 s), or heating (40 °C, 10 min)	0 to -16%	Donnelly-Vanderloo et al. (1994)
Hydrothermal cooking	Rice	Boiling/duration not given	-16 to -39%	Wieringa et al. (2014)
	Navy beans	100 °C; 10-40 min, in distilled water/water-oil mixture (seed to water ratio 1:80 g/mL)	-11 to -85%	Xue et al. (2011)
Fractionation	Rice	Degree of polishing: 10%	-88%	Monks et al. (2013)
	Wheat	Electrostatic separation of bran fractions	-37% to +23%	Hemery et al. (2011)
Soaking	Navy beans	0-12 h; seed to water ratio at 1:3 or 1:7	-1 to -45%	Xue et al. (2011)
	Soybeans	24 h/30 °C in tap water without added LAB or 16 h/20 °C in tap water	-27 to -59%	Mo et al. (2013)
Storage	Cowpeas and okra	Canned and stored for 3 to 24 weeks	-39 to -76%	Sotiriadis and Hoskins (1982)
	Brussels sprouts	Fresh sprouts stored at -21 °C for 31 to 188 days	-6 to -48%	Malin (1977)
	Various vegetables	3 to 12 months/<-18 °C	0 to -99%	Czarnowska and Gujska (2012)
	Whole milk powder	60-70 °C/1 to 8 weeks	-53 to -100%	Ford et al. (1983)
Germination	Wheat grains	20-35 °C; 48 h	+200 to +336%	Hefni and Witthöft (2011)
	Rye grains	5 to 25 °C; 6 days	+70 to +280%	Kariluoto et al. (2006b)
Fermentation	Fermented skim milk	37 °C/14 to 40 h; single bacteria cultures	-83 to +267%	Crittenden et al. (2003)
	Togwa (maize based porridge)	30 °C/5 to 46 h; single yeast cultures	0 to +700%	Hjortmo et al. (2008b)

Other processing steps can positively influence the folate content of food products. Folate is produced by plant cells during the germination of cereals and pulses (Hefni and Witthöft, 2011; Hefni et al., 2015). A modification in the composition of vitamers may also occur during germination, even though 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate is usually predominant (Koehler et al., 2007; Rychlik and Adam, 2008). During the fermentation of food products (Table 4), the production of vitamins by yeasts and some bacteria can multiply the folate content up to 7 fold, but folate is consumed by other bacteria (LeBlanc et al., 2008; Moslehi-Jenabian et al., 2010). However, fermented foods have an acid pH, and most folate vitamers are less stable at acid pH, especially during heating or in presence of metal cations. As a result, the folate produced by microorganisms - especially reduced unsubstituted folate - might be degraded in a cooking step following fermentation.

#### 2-4- Bioavailability in foods

Folate bioaccessibility is defined as “the fraction that is released from food matrix and is available for intestinal absorption”, and folate bioavailability as “the fraction of the ingested nutrient that is available for utilization in normal physiologic functions and for storage” (Gregory III et al., 2005). Folate is absorbed by intestinal epithelial cells, mainly in the jejunum. Naturally occurring folate forms are generally foylpolylglutamyl folate, which has to be deconjugated into monoglutamyl forms before absorption (Ball, 2005). The deconjugation of foylpolylglutamate is controlled by the intestinal brush-border enzyme glutamate carboxypeptidase II (GCPII; EC 3.4.17.21), which is stable at pH 6.5 (Chandler et al., 1986; KEGG, 2014). Folate is mainly absorbed by transporters, even if in the case of folic acid, diffusion is also possible when the transporters are saturated (Kelly et al., 1997; Zhao et al., 2011). According to Reisenauer and Halsted (1987), human intestinal brush-border conjugase



is generally present in a sufficient amount and is therefore not a limiting factor for folate absorption. Folate could also be synthesized by some bacteria present in the large intestine, mainly in the form of monoglutamyl folate, and then absorbed in the colon and metabolized (Rong et al., 1991).

Eighty-five percent of folic acid is considered to be bioavailable in a food matrix (FAO/WHO, 2005). Previous studies have reported that the bioavailability rates of naturally occurring vitamers are 30% to 98% that of folic acid (used as reference) (Brouwer et al., 1999; Hannon-Fletcher et al., 2004). However, Gregory (2012) and McNulty and Pentieva (2004) emphasized that the bioavailability of folate is a complex topic, and that the variability previously reported for the different vitamers may be due to (i) the use of animal bioassays on rodents, which may not suffice for the prediction of dietary folate bioavailability in humans due to the differences in the intestinal deglutamylation mechanism and in the enzymes involved, and (ii) the properties of the food matrices, as listed below.

The entrapment of folylpolyglutamates in the food matrix can protect folate against degradation, but also limit folate bioaccessibility, as shown in the study of Van het Hof et al. (1999), who demonstrated that the consumption of minced vegetables significantly increased the plasma response to folate, in comparison to non-minced vegetables. The consumption of acid food products could thus reduce absorption of folate, due to incomplete intestinal deconjugation, by lowering the pH of the jejunum content below the optimum pH for the GCPII enzyme. For example, Tamura et al. (1976) observed that the bioavailability of folylpolyglutamates was lower than that of folic acid in orange juice at pH 3.7, or in aqueous solutions with citric acid at the same pH. Conversely, when the orange juice was neutralized to pH 6.4, the bioavailability of folylpolyglutamates did not significantly differ from that of

folic acid. However, some naturally occurring folate vitamers are unstable at low pH (Figure 3), and degradation of these vitamers could also explain the lower bioavailability observed at pH 3.7. Many studies have shown that folate bioavailability can also be reduced or increased by some food components, such as metal cations (Ghishan et al., 1986). For example, at approaching neutral (pH 6.4) and mildly acid (pH 3.5) conditions, which can occur under normal physiological conditions, folate can form a complex with zinc (Lucock et al., 1994). As reviewed by Ball (2005), many food compounds are suspected to exert a negative influence on folate bioavailability by inhibiting conjugase activity. However, the conjugase activity in many raw foods of both plant and animal origin, such as asparagus and chicken offal, can positively influence folate bioavailability by allowing the conversion of folylpolyglutamates into monoglutamates within the food matrix (Leichter et al., 1979; Saini and Rosenberg, 1974).

### **3- Folate production by lactic acid bacteria**

In the previous section, we showed that the dietary supply of folate is not always adequate. Dairy and cereal products appear to be good sources of folate in Europe and Africa, respectively. These food products are often fermented by LAB alone or in combination with other microorganisms before consumption. In the following section, we discuss the potential of LAB to increase folate content of fermented food products. In this review, Bifidobacteria are considered as LAB.

### 3-1- Biosynthetic pathway

The general biosynthetic pathway of folate with the indication of the enzymes present in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 is depicted in Figure 4. This pathway is similar to that of plants and other microorganisms including yeasts. According to other data from the KEGG database (KEGG, 2014), almost all LABs are unable to produce folate because some genes coding for enzymes involved in folate biosynthesis are lacking.

There are 17 enzymatic reactions involved in the common folate *de novo* biosynthesis pathway, or 45 if the synthesis of folate vitamers from dihydrofolate is included (KEGG, 2014). From this pathway, three molecules that can be found in food products are generally considered as precursors: para-aminobenzoic acid (PABA), guanosine triphosphate (GTP) and glutamate. The folate biosynthetic pathway corresponds to three steps: (i) the conversion of the D-erythrose-4-phosphate or the phosphoenolpyruvate into PABA, (ii) the conversion of GTP into 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine-P2 (pteridine moiety) and (iii) the linkage of the pteridine moiety, PABA and glutamate units.

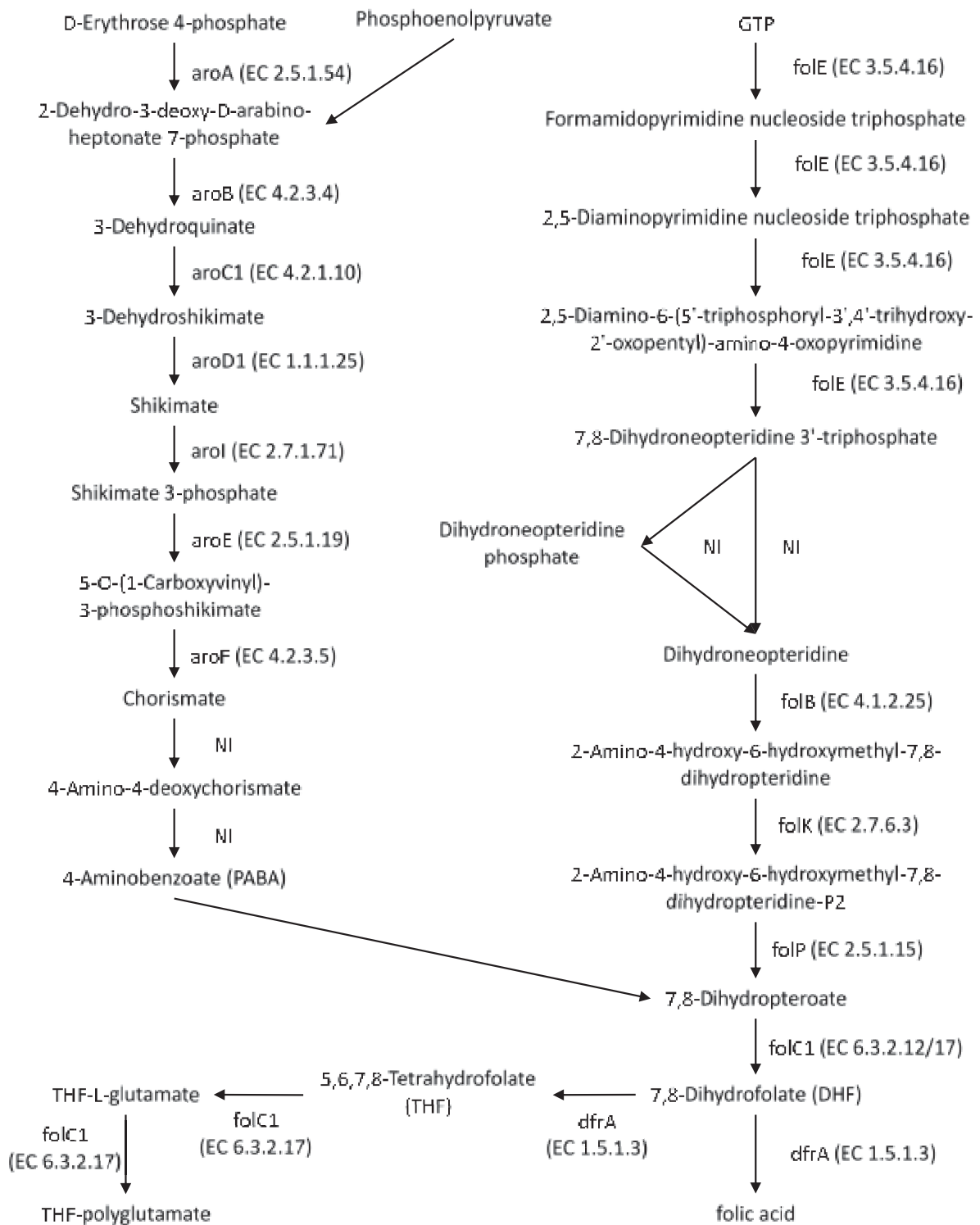


Figure 4: General biosynthetic pathway of folate with indication of the enzyme present in *L. plantarum* WCFS1 according to KEGG database (KEGG, 2014). NI: Not identified (No information on the gene coding for this enzyme in *L. plantarum* WCFS1)

According to Figure 4, *L. plantarum* WCFS1, a well-known folate producing strain, does not have all the genes involved in the folate biosynthesis pathway. In the first step leading to the synthesis of PABA, this strain and other LAB from different species generally have all the genes involved in the synthesis of PABA, except two genes coding for enzymes involved in the synthesis of 4-amino-4-deoxychorismate and PABA from chorismate (KEGG, 2014). These two genes have been described in *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703: *pabA* (EC 2.6.1.85) and *pabC* (EC 4.1.3.38). Two other LAB (*L. fermentum* IFO 3956 and *L. reuteri* JCM 1112) able to produce folate *de novo* possess neither these two genes nor orthologs of them, suggesting that an alternative pathway for PABA biosynthesis exists in these strains (Kuratsu et al., 2010; Satoh et al., 2014). Moreover, in *L. plantarum* WCFS1 and other LAB genera, at least one gene coding for an enzyme involved in the second step is missing (i.e. for the synthesis of dihydroneopterin phosphate and dihydroneopterin from 7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate). These reactions may be catalyzed by non-specific phosphatases that can be synthesized by LAB, and especially by *L. plantarum* (Zamudio et al., 2001). The genes involved in the third step are generally found in all LAB (Kanehisa et al., 2014). In addition, it has been shown that the two proteins FolK (EC 2.7.6.3) and FolP (2.5.1.15) can be used as signature proteins for folate synthesis, since they were detected in 13 LAB able to produce *de novo* folate, but not in 18 LAB dependent on folate salvage (de Crecy-Lagard et al., 2007).

Considering these genetic data, it is likely that if precursors are available in the culture medium or in the food, many LAB could produce folate. These results thus suggest that the potential of LAB to produce folate has probably been underestimated.

### 3-2- Lactic acid bacteria able to produce folate in culture medium

Interest in the potential use of LAB to produce folate in food products significantly increased after 2000 (Holasova et al., 2004; Lin and Young, 2000a, 2000b). In culture media, the strains belonging to the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were the most investigated. The focus on these genus may be due (i) to the occurrence of Lactobacilli in a wide variety of foods (Hugenschmidt et al., 2010), and (ii) to the fact that Bifidobacteria are often considered as probiotics and may be able to produce folate in the colon (Pompei et al., 2007). Table 5 lists all the LAB species whose ability to produce folate in a culture medium has been tested. They were isolated from different sources including dairy products, vegetables and cereals.

It is sometimes impossible to compare data on folate production by LAB in different studies due to the differences in methods used and units of expression of the results. In some studies, folate production was measured in the cell biomass but in others in the supernatant of the culture medium (D'Aimmo et al., 2012, 2014; Kariluoto et al., 2006a). As the quantity of biomass is not given in these studies, it is impossible to estimate the production of folate in the medium, and these results cannot be compared with the data presented in Table 5. However, these studies give interesting results that can be compared to the production of folate by yeasts in culture media. For instance, folate production by 10 *Bifidobacterium* strains in a folate-free medium ranged from 500 to 9,500  $\mu\text{g}/100$  g dry matter (DM) of cell biomass (D'Aimmo et al., 2012). The production of folate by 25 *Saccharomyces cerevisiae* strains ranged from 4,000 to 14,500  $\mu\text{g}/100$  g DM of cell biomass in a synthetic medium (Hjortmo et al., 2005). Therefore, in some cases, the capacity of some LAB to produce folate is similar to that of some yeasts.

Table 5: Lactic acid bacteria species able to produce folate in a culture medium or in food.

LAB species	Medium (number of strains studied)	Folate production (ng/mL)	References
<i>B. adolescentis</i>	MRS (n=1)	-50 to 150	(Padalino et al., 2012)
	SM7 (n=10)	1 to 65	(Pompei et al., 2007)
<i>B. animalis</i>	SM7 (n=7)	26	(Pompei et al., 2007)
<i>B. bifidum</i>	SM7 (n=6)	1	(Pompei et al., 2007)
<i>B. breve</i>	SM7 (n=15)	1 to 3	(Pompei et al., 2007)
<i>B. catenulatum</i>	MRS (n=1)	0 to 25	(Padalino et al., 2012)
	SM7 (n=1)	3	(Pompei et al., 2007)
<i>B. dentium</i>	SM7 (n=1)	29	(Pompei et al., 2007)
<i>B. longum</i>	MRS (n=2)	10 to 30	(Lin and Young, 2000a)
	SM7 (n=17)	2	(Pompei et al., 2007)
<i>B. pseudocatenatum</i>	SM7 (n=3)	12 to 82	(Pompei et al., 2007)
<i>L. acidophilus</i>	FFM (n=8)	0 to 38	(Laiño et al., 2014)
	MRS (n=3)	1 to 20	(Lin and Young, 2000a; Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=5)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. amylovorus</i>	FFM (n=1)	75 to 87	(Laino et al. 2014)
<i>L. brevis</i>	SWP (n=9)	0 to 150*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. buchneri</i>	SWP (n=1)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. casei</i>	FFM (n=4)	0 to 2	(Laino et al. 2014)
	MRS (n=2)	-63 to -13	(Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=19)	0 to 20*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. coryniformis</i>	FFM (n=2)	80 to 100	(Masuda et al., 2012)
<i>L. curvatus</i>	SWP (n=6)	0 to 20*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. delbrueckii</i>	MRS (n=4)	-50 to 200	(Lin and Young, 2000a; Padalino et al., 2012; Sybesma et al., 2003a)
<i>L. fermentum</i>	FFM (n=15)	0 to 148	(Cárdenas et al., 2015; Laiño et al., 2014; Masuda et al., 2012)
	SWP (n=24)	-10 to 116*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. fructivorans</i>	SWP (n=1)	0 to 20*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. helveticus</i>	MRS (n=2)	2 to 89	(Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=3)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. johnsonii</i>	MRS (n=1)	28	(Nor et al., 2010)
<i>L. paracasei</i>	FFM (n=12)	0 to 40	(Laino et al., 2014)
	SWP (n=18)	0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. pentosus</i>	FFM (n=2)	0 to 4	(Masuda et al., 2012)

Table 5 continued

LAB species	Medium (number of strains studied)	Folate production (ng/mL)	References
<i>L. plantarum</i>	CDM (n=1)	36 to 60	(Nor et al., 2010)
	FFM (n=30)	0 to 108	(Laiño et al., 2014; Masuda et al., 2012)
	MRS (n=2)	-10 to 9030	(Hugenschmidt et al., 2011; Padalino et al., 2012; Park et al., 2014)
	SWP (n=28)	0 to 4413	(Hugenschmidt et al., 2010, 2011)
<i>L. reuteri</i>	CDM (n=1)	59	(Santos et al., 2008)
	SWP (n=3)	0 to 125*	(Hugenschmidt et al., 2010)
<i>L. rhamnosus</i>	SWP (n=1)	-10 to 0*	(Hugenschmidt et al., 2010)
	YPD (n=3)	<0*	(Herranen et al., 2010)
<i>L. sakei</i>	FFM (n=2)	101 to 107	(Masuda et al., 2012)
<i>Lc. lactis</i>	M17 (n=16)	57 to 291	(Sybesma et al., 2003a)
	YPD (n=2)	<0*	(Herranen et al., 2010)
<i>Leuconostoc lactis</i>	MRS (n=1)	45	(Sybesma et al., 2003a)
<i>Ln. paramesenteroides</i>	MRS (n=1)	44	(Sybesma et al., 2003a)
<i>Pediococcus. parvulus</i>	FFM (n=10)	40 to 60	(Masuda et al., 2012)
<i>P. pentosaceus</i>	FFM (n=3)	0 to 40	(Masuda et al., 2012)
<i>S. thermophilus</i>	FFM (n=51)	0 to 170	(Laiño et al., 2012)
	MRS (n=1)	0 to 200	(Padalino et al., 2012)
	M17 (n=2)	4 to 202	(Lin and Young, 2000a; Sybesma et al., 2003a)
	SWP (n=33)	0 to 50*	(Hugenschmidt et al., 2010)
	YPD (n=1)	100 to 190	(Herranen et al., 2010)
<i>Weissella confusa</i>	FFM (n=1)	0 to 20	(Masuda et al., 2012)

MRS: de Man Rogosa and Sharp; YPD: Yeast extract, peptone, dextrose; SWP: supplemented Whey permeate, CDM: Chemically defined medium; TPY: tripticase, phytone, yeast extract; FFM: folate free medium. \*: extracellular production only.



Table 5 shows that folate may also be consumed or produced in different culture media, and that this is highly variable and strain dependent. *L. plantarum* JA71 produced the highest concentration of folate in MRS medium (9,030 ng/mL) (Park et al., 2014) and *L. plantarum* SM39 produced 4,413 ng/mL in a supplemented whey permeate medium (Hugenschmidt et al., 2011). Folate production also depends on growth kinetics and on the culture conditions. According to numerous studies, folate is synthesized during the exponential growth phase or at the beginning of the stationary phase, and is then consumed (D'Aimmo et al., 2012; Iyer et al., 2010; Laiño et al., 2012, 2014; Padalino et al., 2012). In addition, it has been proved that folate production depends on the composition of the medium (Nor et al., 2010). A high rate of production of folate by *L. plantarum* SM39 was obtained in a medium supplemented with 10 mg/L of PABA (Hugenschmidt et al., 2011) which is generally recognized as the limiting precursor (Sybesma et al., 2003a). Moreover, LAB can produce large amounts of folate even when folate is already available in the medium (Lin and Young, 2000a; Padalino et al., 2012; Sybesma et al., 2003a). Therefore, to select folate-producing strains, it is important to take all these elements into account.

Studying the synthesis of folate by LAB in culture media is useful to understand the influence of different parameters, but may not be suitable to select LAB strains with the aim of increasing the folate content of a food product. Many studies have shown that the composition of the medium has an impact on folate synthesis by LAB. Therefore, for the selection of strains, it would be better to investigate folate production by LAB in the food matrices concerned.

### 3-3- Folate production in fermented food

Table 6 summarizes the studies on inoculation of different food matrices with LAB previously selected for their ability to synthesize folate in culture medium. In most cases, an increase in folate was reported. Cereal, vegetable and milk-based food products were investigated, although most of the studies focused on dairy products. Dairy foods are not representative of the wide variety of fermented food products in the world, especially as fermented dairy products are mostly consumed in developed countries, whereas cereal-based fermented foods are far more widely consumed in African countries. The production of folate in dairy products by pure culture of LAB strains has already been reviewed (LeBlanc et al., 2008).

Only a few studies have been conducted on the production of folate in cereal based fermented foods. Most studied the effect of yeasts on the folate content of this food category (Hjortmo et al., 2008a, 2008b), but two studies showed that the folate content of fermented rye and oat sourdoughs was increased by LAB (Kariluoto et al., 2006a, 2014). LAB can produce from 2 to 16  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FM in food matrices (Table 6). In comparison, yeasts alone can produce from 9 to 17  $\mu\text{g}/100\text{g}$  FM in various cereal-based matrices (Kariluoto et al., 2006a; Korhola et al., 2014). LAB can thus produce similar amounts of folate as some yeasts in food products. However, given the small number of studies dedicated to this topic, it is difficult to generalize and further studies are needed on the production of folate by LAB alone or in co-culture with yeasts.

Table 6: Folate measurement after fermentation of different food inoculated with LAB only  
 ND: not determined. \* Folate content values are expressed in fresh weight basis

Raw Material		Fermented food		Portion needed to cover 10% of RNI of a pregnant woman	Producing microorganisms	Reference
Type	Folate content*	Name	Folate content*			
Cereal	ND	Fermented oat sourdough	15-17 µg/100 g	353-400 g	<i>L. rhamnosus</i>	(Kariluoto et al., 2014)
Cereal	4-6 µg/100 g	Fermented rye sourdough	8-13 µg/100 g	462-750 g	<i>S. thermophilus</i>	(Kariluoto et al., 2006a)
Vegetable	15-16 µg/100 g	Fermented Beetroot mix	10-17 µg/100 g	353-600 g	<i>L. plantarum, Lc. lactis, Ln sp.</i>	(Jägerstad et al., 2004)
Vegetable	1±0.0 µg/100 mL	Fermented cucumber	5-7 µg/100 mL	857-1200 mL	<i>Lc. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri, 2011)
Fruit	1-2 µg/100 mL	Fermented watermelon juice	2-3 µg/100 mL	2000-3000 mL	<i>Lc. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri, 2011)
Milk	1-2 µg/100 g	Fermented milk	6-9 µg/100 g	667-1000 g	<i>B. animalis</i> and <i>S. thermophilus</i>	(Crittenden et al., 2003)
Milk	2-3 µg/100 g	Fermented milk	3-6 µg/100 g	1000-2000 g	<i>B. longum, S. thermophilus</i>	(Holasoava et al., 2005)
Milk	2-3 µg/100 mL	Fermented milk	5-10 µg/100 mL	600-1200 mL	<i>B. longum</i>	(Lin and Young, 2000a)
Milk	3-5 µg/100 mL	Fermented milk	25-28 µg/100 mL	214-240 mL	<i>L. amylovorus, S. thermophilus</i> and <i>L. bulgaricus</i>	(Laiño et al., 2014)
Milk	ND	Fermented milk	1-7 µg/100 mL	857-6000 mL	<i>L. delbrueckii</i>	(Lin and Young, 2000b)
Milk	4-6 µg/100 mL	Fermented milk	8-18 µg/100 mL	333-750 mL	<i>L. delbrueckii</i> and <i>S. thermophilus</i>	(Laiño et al., 2013)
Milk	Not detectable	Fermented milk	6-7 µg/100 g	857-1000 g	<i>L. lactis</i>	(Sanna et al., 2005)
Milk	ND	Fermented milk	0.2-7 µg/100 mL	857-30000 mL	<i>L. sp.</i>	(Dana et al., 2010)
Milk	11-12 µg/100 g	Fermented milk	12-13 µg/100 g	462-500 g	<i>Lc. lactis</i>	(Ayad, 2009)
Milk	0.2-0.4 µg/100 mL	Fermented milk	0.2-2 µg/100 mL	3000-30000 mL	<i>Lc. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri, 2011)
Milk	0.5-1 µg/100 g	Fermented milk	0.5-5 µg/100 g	1200-12000 g	<i>S. thermophilus</i>	(Holasoava et al., 2004)
Milk	ND	Fermented milk	2-5 µg/100 mL	1200-3000 mL	<i>S. thermophilus</i>	(Iyer et al., 2011)
Milk	1-2 µg/100 g	Fermented milk	10-11 µg/100 g	545-600 g	<i>S. thermophilus</i>	(Wouters et al., 2002)
Milk	4-5 µg/100 g	Fermented milk	5-20 µg/100 g	300-1200 g	<i>S. thermophilus</i>	(Padalino et al., 2012)
Milk	2-3 µg/100 mL	Fermented milk	7-8 µg/100 mL	750-857 mL	<i>S. thermophilus</i>	(Laiño et al., 2012)

To assess if the enriched food products listed in Table 6 can be considered as good dietary sources of folate, and to determine if the increase in folate content in these food products by LAB is high enough to satisfy nutritional requirements, the portion of each food needed to cover 10% of the needs of a pregnant woman (based on the RNI: 600 µg/day) was calculated. Most of the values obtained are not realistic, for example, more than 1 kg of some fermented milk would need to be consumed per day. Therefore, even if LAB can significantly increase the folate content in food products, this would still not be enough to cover people's folate needs. Other solutions should be investigated to further increase the folate content of food products fermented by LAB.

#### **4- Ways to preserve and improve folate content in fermented food**

The previous parts of this review showed that folate synthesis by LAB depends on the strain, the incubation time and the composition of the culture medium. In this section, we discuss these parameters in detail and suggest ways to optimize folate synthesis by LAB in food matrices.

##### **4-1- Folate production and selection of strains**

In addition to the selection of high folate producing strains, the use of a combination of different LAB may be more efficient than the use of single cultures (Table 5 and 6). For example, in a reconstituted skim milk, a co-culture of two *B. animalis* and *L. acidophilus* strains produced at least 30% more folate than the single cultures (Crittenden et al., 2003). Similarly, in a supplemented wheat permeate medium, two co-cultivated strains of *L. plantarum* and *P. freudenreichii* produced at least 35% more extracellular folate than *L.*

*plantarum* and *P. freudenreichii* alone (Hugenschmidt et al., 2011). In another study, among different combinations, the best was the mix of one *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* strain with two *S. thermophilus* strains in milk (Laiño et al., 2013). Similarly, among various combinations, the combination of strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* gave the best results in Domiati cheese (Ayad, 2009).

Combinations of LAB with other folate producing microorganisms such as yeasts could also be used to increase the folate content of fermented food products. A few studies have evaluated the impact of LAB and yeast co-cultures on the folate content of fermented food products. However, in almost all cases, yeasts alone or the natural endogenous microbiota were more efficient than the selected strains. Indeed, a combination of *L. rhamnosus* LC-705 and *Saccharomyces cerevisiae* ABM5131 (in 3.5% oat bran solution with 2% added glucose) produced 6 fold more folate than the LAB alone and a similar amount of folate to yeast alone (Korhola et al., 2014). In another study, the highest folate concentrations in sourdoughs made from rye flour was reached with the non-sterile control containing naturally occurring bacteria and yeasts or with some of the monocultures of yeasts, whereas folate concentrations were significantly lower with LAB monocultures (Kariluoto et al., 2006a). Considering the limited number of attempts reported until now, it would be interesting to further investigate this hypothesis.

As reviewed previously, metabolic engineering can be used to obtain overproducing strains of LAB and, as a consequence, food products with higher amounts of folate (Capozzi et al., 2012; LeBlanc et al., 2011). Consumption of food fermented with the overproducing LAB strains was even able to improve the folate status of deficient rats (LeBlanc et al., 2010).

However, the use of genetically modified microorganisms may be limited by ethical and regulatory considerations.

LAB have co-evolved with their habitat and are the result of a combination of extensive gene loss and key gene acquisition via horizontal gene transfer (Makarova et al., 2006). Therefore, isolating strains from a different niche could be a way to find naturally overproducing bacteria. For example, the two genes *folK* (EC 2.7.6.3) and *folP* (EC 2.5.1.15) were detected in 96 LAB strains isolated from African starchy foods (Turpin et al., 2011). This work suggests that many different bacteria would be able to produce folate. Exerting selection pressure by isolating LAB on culture medium without folate would also be a way to find naturally producing bacteria. For example, among eight *L. acidophilus* strains, only two were able to grow and to produce folate after seven passages in a folate free medium at 37 °C for 16 h (Laiño et al., 2014).

Another promising way to increase the folate content of foods, would be to promote the production of folate by LAB strains mainly able to produce the most stable vitamers. Indeed, it was shown in section 2.3 that many processing steps can reduce the folate content, due to oxidation and other reactions, especially when the food product is fragmented before fermentation, and cooked and/or stored after fermentation. According to the few data available, the production of vitamers appears to be a strain dependent trait (D'Aimmo et al., 2012). 5-methyl-THF appears to be the main vitamer produced by LAB, but THF can also be produced at higher levels by some LAB (D'Aimmo et al., 2014; Lin and Young, 2000a). However, Figure 3 shows that THF, among other vitamers, is oxidized into other folate forms at low pH, which may explain its low detection rate. Therefore, the lowering of the pH in the food matrix due to fermentation is likely to induce degradation and/or interconversion of

folate vitamers. As 5-methyl-THF is more stable than THF, in some cases it would be advisable to use strains that mainly produce this vitamer than other strains able to produce more folate but mainly THF.

#### 4-2- Kinetics of folate production

The choice of the strain is very important to produce large amounts of folate, but as mentioned above, folate production by LAB also depends on the period of incubation. For example, with a *L. plantarum* strain, the highest folate content was reached at the beginning of the stationary phase in a folate free medium and similar results were obtained with a mixed culture of a *L. plantarum* strain with a *Propionibacterium* strain in supplemented whey permeate medium (Hugenschmidt et al., 2011; Masuda et al., 2012). However, with *Bifidobacterium* strains in single culture in a folate free medium or co-cultivated with *S. thermophilus* in reconstituted non-fat dry milk, the highest folate contents were obtained during the exponential growth phase (D'Aimmo et al., 2012; Lin and Young, 2000a). Moreover, the distribution of folate vitamers produced by yeasts depends on the length of the fermentation period (Kariluoto et al., 2014). These results indicate that the duration of the fermentation should be optimized for each fermented food.

#### 4-3- Precursors of folate biosynthesis

Three main precursors are required for folate synthesis: para-aminobenzoic acid (PABA), guanosine triphosphate (GTP) and glutamate (Kanehisa et al., 2014). According to the KEGG database (KEGG, 2014), many LAB are unable to synthesize at least PABA. For now, only the effect of PABA and glutamate on the production of folate by LABs has been evaluated

(Gangadharan and Nampoothiri, 2011; Hugenschmidt et al., 2011; Nor et al., 2010; Pompei et al., 2007; Santos et al., 2008; Sybesma et al., 2003a). GTP is an essential molecule synthesized by all the LAB and should not be a limiting factor.

Conversely, PABA can be a limiting precursor for folate biosynthesis. Even if many LABs are able to produce PABA without the genes *pabA* (EC 2.6.1.85), and *pabC* (EC 4.1.3.38), many LAB need PABA in the medium to produce folate or larger amounts of folate. For example, in their study, Sybesma et al. (2003) showed that most folate was produced by a *Lc. lactis* strain in a chemically defined medium containing 14 mg/L of PABA. In another study, the optimal PABA concentration in a modified MRS medium was around 1 mg/L for a *L. plantarum* strain (Nor et al., 2010). These two studies reported very different optimum concentrations with different explanations: all strains do not have the same PABA requirements. For example, PABA concentrations required for folate production varied between 0.04 mg/L and 1.37 mg/L for different strains of *Bifidobacterium* in a folate-free semisynthetic medium (Pompei et al., 2007). In addition, rich media such as MRS or food matrices may already contain PABA, thus limiting the quantity of precursor that needs to be added to increase folate production.

In food matrices for example, 10 mg/L was the best concentration of added PABA for a *Lc. lactis* strain in skim milk (Gangadharan and Nampoothiri, 2011). Similarly, with a wild strain and a mutant strain of *L. reuteri*, the addition of 10 mg/L of PABA in a cucumber juice led to a two-fold and a fifteen-fold increase, respectively, in folate content in comparison with the same matrix without PABA (Santos et al., 2008). However, it should be kept in mind that a high concentration of PABA can inhibit folate biosynthesis (Pompei et al., 2007). It would



thus be worth measuring the PABA content of a food product before trying to increase its folate content using LAB.

Finally, the addition of glutamate could also increase folate production by LAB. For example, 10 mg/L of glutamate in skim milk led to an increase in folate production by a *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Gangadharan and Nampoothiri, 2011). However the ratio of PABA to glutamate appears to be critical. A tenfold increase in folate production by a combination of *L. plantarum* and *P. freudenreichii* was obtained in whey permeate supplemented with 10 mg/L of PABA, but production was a little lower when 10 mg/L of glutamate was added (Hugenschmidt et al., 2011). The PABA:glutamate ratio thus deserves more attention in future studies.

Understanding the physiology of the strains with respect to the need for a precursor is of importance in basic research, but the question remains whether it is desirable to add these precursors to food products: changing the composition of food may lead to undesirable effects. For example, as reviewed by Ende (2015), the consumption of high doses of glutamate could increase impulsivity and anxiety.

#### 4-4- Modulating folate production by other food components

A few studies attempted to better understand folate production in culture medium by investigating other parameters. For example, it has been shown that the growth rate is inversely correlated with folate production, so the use of growth inhibitory compounds such as NaCl could improve folate production by LAB (Sybesma et al., 2003a). However, the use of prebiotics such as sorbitol and mannitol could also improve folate production by LAB

(Gangadharan and Nampoothiri, 2011). Carbon and nitrogen sources could also play a role in folate production. Nor et al. (2010) showed that lactose was a better carbon source for folate production for a *L. plantarum* strain in a modified MRS medium than glucose and maltose. However, the best lactose concentration for folate production appears to depend on the strain (Iyer et al., 2010; Tomar et al., 2009). Similarly, meat extract was a better nitrogen source than yeast extract for a *L. plantarum* strain (Nor et al., 2010). The impact of growth inhibitory molecules and nutrient sources on folate production also deserves more attention.

## **5- Conclusion**

In many countries, dietary folate consumption is not sufficient to prevent folate deficiencies, leading to the implementation of fortification programs using synthetic folic acid. Another alternative to fortification worth considering is *in situ* folate biofortification of fermented foods by LAB. Fermentation is an ancestral, sustainable and low cost way of preserving food products, and most fermented foods have higher concentrations of folate than non-fermented foods. Moreover, fermented foods are frequently consumed in many countries worldwide. For all these reasons, numerous studies have been conducted to assess the potential of LAB to produce folate during fermentation of various food products.

This review highlighted the fact that folate can be degraded during food processing due to physical-chemical factors. The activation of biological pathways during germination and fermentation can lead to a significant increase in folate content. Food products are complex media, in which oxidizing and reducing agents are naturally present and can induce and/or influence reactions. This review also evidenced that even if numerous LAB strains have been shown to consume folate, others are able to increase the folate content of cereal, vegetable, fruit or milk-based fermented foods. In addition, some LABs are able to produce similar

amounts of folate as yeasts in both culture media and food matrices. However, the folate content of fermented foods enriched by LAB is generally still too low to significantly contribute to the satisfaction of folate requirements.

Future research should thus focus on the following points: (i) selecting strains able to produce high amounts of folate and if possible, mainly folate vitamers that are resistant to oxidation, acid pH, and heat treatments, (ii) testing co-cultures of folate-producing microorganisms, (iii) estimating the effect of different parameters *in situ* (kinetics, precursors, growth inhibitors, etc), (iv) limiting folate losses during the different processing steps. The use of LAB to naturally fortify food can be an advantage if bacteria are consumed alive, since folate could be produced in the gut. This aspect also deserves further investigation. The combination of LAB with different ability to improve the nutritional quality of food could also be considered to cumulate beneficial properties.

### **Acknowledgments**

This work was carried out in the framework of the FOLEA project, which is part of the ERA-Net « Developing African-European joint collaboration for Science and Technology » (ERAFrica), financially supported by the European Commission under the 7th Framework Programme.

**Annexe 2 : Influence of spontaneous  
fermentations on the folate content  
of a pearl-millet based gruel**



# Influence of spontaneous fermentations on the folate content of a pearl-millet based gruel

Fabien Saubade\*, Youna Hemery, Jean-Pierre Guyot & Christèle Humblot

## Introduction

Folate (vitamin B9) deficiencies can lead to health disorders such as megaloblastic anemia and neural tube defects. Ben-saalga is a traditional african cereal based gruel, mainly fermented by lactic acid bacteria. This gruel is often used as complementary food for young children in Burkina Faso, but its folate content was unknown.

**Aim of the study:** This study was planned to measure the folate content of ben-saalga and to assess the relationship between the folate content and the natural microbiota of this gruel.

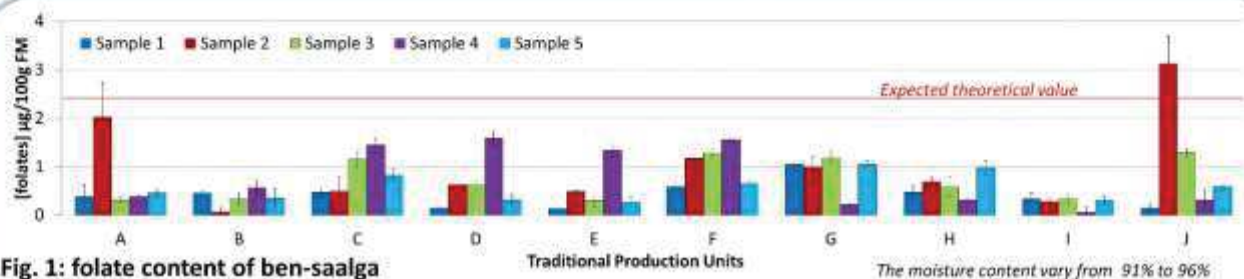
## Material and Methods

Ben-saalga samples (n=50) were collected in 10 traditional production units (TPU, coded with letters from A to J) in Ouagadougou (Burkina Faso).



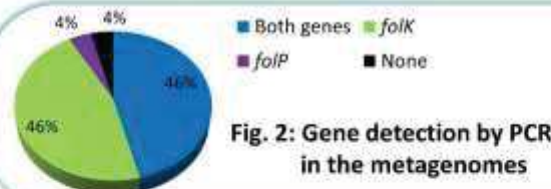
1. Total folate assay (Kariluoto, 2009)
2. Screening of two signature genes for folate biosynthesis by PCR (Turpin et al., 2011)
3. Quantification of lactic acid bacteria (LAB) by real time PCR

### 1. Folate content of ben-saalga



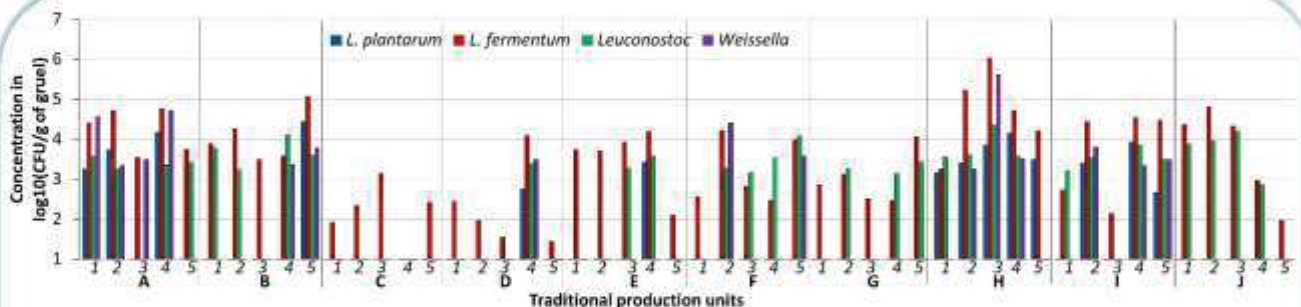
The folate content of ben-saalga is low, given that young children should eat 160 µg of folate/day. The expected theoretical value (2.6 µg/100g FM) was calculated from the folate content of the whole grain, making the hypothesis that no folate was lost during the process. So, we observe that folate is generally lost during the process, but a folate production can sometimes be observed. Folate might be synthesized by microorganisms during the fermentation step.

### 2. Genetic potential



Both signature genes *folP* and *folK* were detected in 46% of the metagenomes. This suggests that the microbiota of ben-saalga has a good potential to synthesize folate. However, there are no significant correlations between the detection of the two genes and the folate content of the samples.

### 3. Quantification of some lactic acid bacteria



The microorganisms concentrations of gruels produced by different TPU are significantly different, even if there is a high variability between samples from the same TPU. However, no significant correlation was observed between the microorganisms concentrations and the folate content of the samples.

## Conclusion

In spite of a good genetic potential of the lactic acid bacteria naturally present, the folate content of ben-saalga is very low for a complementary food. The influence of the different process steps (and especially the fermentation duration) on folate content of this pearl-millet gruel will be investigated in an other study. It will allow us to better understand the relationship between the folate content and the microbiota.



**Annexe 3 : Influence of fermentation and other process steps  
on the folate content of a traditional African pearl-millet  
based fermented food**





# Influence of fermentation and other process steps on the folate content of a traditional African pearl millet based fermented food

Fabien Saubade\*, Youna Hemery, Jean-Pierre Guyot & Christèle Humblot

## Introduction

Folate (vitamin B9) deficiency leads to different pathologies such as megaloblastic anemia and neural tube defects. Folate is sensitive to various factors such as light, pH and temperature, and therefore can be lost during processing. Folate can be produced or consumed by microorganisms during fermentation, depending on the microbiota and the fermentation duration.

This study was planned to assess the evolution of the folate content during the different process steps of a cereal-based fermented food: a traditional pearl millet based porridge from Burkina-Faso.

## Material and Methods

*Ben-saalga* was produced in triplicate, by reproducing an African traditional process, under controlled conditions in the laboratory (cf. Fig. 1).



The total folate content was measured (using the method of Kariluoto and Piironen, 2009) during:

- 1<sup>st</sup> experiment: the various process steps during the production of ben saalga,
- 2<sup>nd</sup> experiment: during a 20h fermentation.

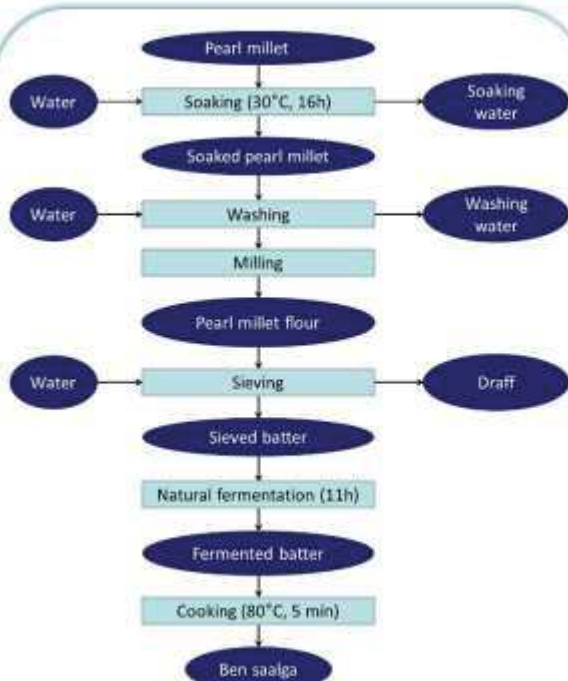


Fig. 1: Processing of pearl millet into ben saalga by reproducing the traditional process described by Tou et al. (2007), under controlled conditions in the laboratory



Fig. 2: Evolution of the folate content during the preparation of *ben-saalga*, compared to the folate content of the initial raw pearl millet (in %)

A folate production occurred during the soaking of pearl millet grains (31% increase). The folate content decreased by 32% after sieving, due to the removal of the outer layers of the grains (draff). The fermentation (11h) did not significantly influence the folate content of the liquid dough (batter).



Fig. 3: Evolution of the folate content during the natural fermentation, compared to the initial folate content of the initial raw pearl millet (in %)

The fermentation time had no significant effect on the folate content.



Fig. 4: Folate content of pearl millet porridges

The folate content of pearl millet grains used to prepare the ben saalga in the lab was of **26 µg/100g** fresh weight basis.

The folate content of laboratory made porridges was significantly higher than that of porridges produced in the field.

This could be explained by:

- a higher dry matter content,
- a higher folate content of the initial pearl millet grains,
- differences in the processes (e.g. the milling processes used in the lab and in the field are different, and may not give the same fractions)

1: Porridges produced in laboratory (n=3). Dry matter content: 9,4±0,4%.  
2: Porridges produced in the field (n=50). Dry matter content: 5,6±1,2%  
(Saubade et al., Food Micro-2014)

## Conclusion

The fermentation step had no significant effect on the folate content of the pearl millet porridge. The folate content of ben saalga is low (mainly due to the low dry matter content). Ben saalga consumption do not allow to meet the folate requirement of children, given that this population should consume 150 µg of folate/day.

Future research should focus on the following points to increase the folate content of pearl millet porridges:

- Promote the germination of pearl millet grains, in order to increase the folate production during the soaking step,
- Inoculate with B9-producing bacteria strains (limitation of consuming strains) before the fermentation,
- Increase the dry matter content ...

## Résumé

Les céréales sont des aliments de base dans la plupart des pays africains. De nombreux aliments céréaliers africains sont fermentés naturellement. Comme la qualité nutritionnelle des aliments céréaliers pourrait être améliorée grâce aux fermentations spontanées, ces aliments pourraient être de bonnes sources de micronutriments. Cependant, différentes carences en micronutriments, comme les carences en folates par exemple, sont toujours fréquentes dans de nombreux pays africains où ces aliments sont consommés. Les carences en folates peuvent mener à différentes pathologies, comme des anémies mégaloblastiques et des malformations du tube neural par exemple. L'objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel nutritionnel du microbiote du *ben-saalga*, un aliment fermenté traditionnel à base de mil consommé au Burkina Faso. Des gènes codant des enzymes impliquées dans différentes activités nutritionnelles ont été recherchés dans 50 métagénomés extraits d'échantillons collectés à Ouagadougou. Certains gènes n'ont jamais été détectés dans les métagénomés (e.g. les gènes impliqués dans la synthèse de caroténoïdes), alors que d'autres ont été fréquemment détectés (e.g. les gènes impliqués dans la synthèse de folates). En dépit du haut niveau de détection (80%) des deux gènes *folP* et *folK*, codant des enzymes impliquées dans la synthèse de folates, la teneur en folates du *ben-saalga* était plutôt faible (médiane : 0,5 µg/100g de base humide). Pour mieux comprendre l'impact de la fermentation sur la teneur en folates du *ben-saalga*, l'évolution de la teneur en folates a été mesurée durant la fermentation de bouillies produites en laboratoire. La fermentation n'a pas eu d'impact significatif sur la teneur en folates, ce qui pourrait être dû à une balance entre les micro-organismes auxotrophes et les micro-organismes prototrophes pour les folates. Dans le but de produire des bouillies fermentées à base de mil avec des teneurs en folates plus élevées, des cultures starters de micro-organismes producteurs de folates ont été utilisés pour inoculer des bouillies au laboratoire. Nous avons obtenu une bouillie avec une teneur en folates de 10 µg/100g de base humide, ce qui est significativement plus élevé que la teneur en folates du *ben-saalga* produit au Burkina Faso, mais qui reste trop faible sachant que le *ben-saalga* est fréquemment utilisé comme un aliment de complément à l'allaitement maternel pour les enfants de moins de cinq ans.

**Mots clés :** vitamine B9, bactérie lactique, levure, métagenomique, *Pennisetum glaucum*, procédé

## Nutritional potential of the microbiota of cereal based fermented foods: the case of folate

### Abstract

Cereals are staple foods in most African countries. Numerous African cereal-based foods are spontaneously fermented. As the nutritional quality of cereal products could be enhanced through spontaneous fermentation, these food products might be good sources of micronutrients. However, various micronutrients deficiencies, such as folate deficiency, are still common in many African countries where these food products are consumed. Folate deficiency leads to different pathologies, such as megaloblastic anemia and neural tube defects. The objective of this work was to evaluate the nutritional potential of the microbiota of *ben-saalga*, a traditional pearl-millet-based fermented food from Burkina Faso. Genes encoding enzymes involved in different nutritional activities were screened in 50 metagenomes extracted from samples collected in Ouagadougou. Certain genes were never detected in the metagenomes (e.g. genes involved in carotenoid synthesis) while other were frequently detected (e.g. genes involved in folate synthesis). In spite of the high rate of detection (80%) of both genes *folP* and *folK*, encoding enzymes involved in folate synthesis, the folate content in *ben-saalga* was rather low (median: 0.5 µg/100g fresh weight basis). To better understand the impact of the fermentation on the folate content of *ben-saalga*, the evolution of the folate content was measured during the fermentation of porridges produced in laboratory. The fermentation had no significant impact on the folate content, which may be due to a balance between folate auxotrophy and prototrophy. In order to produce pearl-millet based fermented porridges with higher folate content, starter cultures of folate-producing microorganisms were used to inoculate porridges in laboratory. We obtained a porridge with 10 µg of folate/100 g of fresh weight basis, which is significantly higher than the folate content of *ben-saalga* produced in Burkina Faso, but still too low knowing that *ben-saalga* is frequently used as a complementary food for children under five in Burkina Faso.

**Key words:** vitamin B9, lactic acid bacteria, yeast, metagenomics, *Pennisetum glaucum*, process