



HAL
open science

Les aliments céréaliers fermentés africains : un autre moyen de participer à la couverture des besoins en folates

Fabrice Bationo

► **To cite this version:**

Fabrice Bationo. Les aliments céréaliers fermentés africains : un autre moyen de participer à la couverture des besoins en folates. Alimentation et Nutrition. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG065 . tel-02045892

HAL Id: tel-02045892

<https://theses.hal.science/tel-02045892>

Submitted on 22 Feb 2019

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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

**En Nutrition et Sciences des aliments
École doctorale GAIA**

Unité de recherche Nutripass-IRD

Les aliments céréaliers fermentés africains: un autre moyen de participer à la couverture des besoins en folates

Présentée par Fabrice BATIONO

Le 12-11-2018

Sous la direction de Mme Christèle HUMBLOT

Devant le jury composé de :

Mme. Françoise NAU, Professeur, AGROCAMPUS OUEST	Rapportrice
Mme. Régine TALON, Directrice de recherche, INRA	Rapportrice
Mme. Isabelle AUDOUIN, Professeur, DRAAF	Examinatrice
Mme. Sabine SCHORR-GALINDO, Professeur, Université de Montpellier	Présidente
M. Nidelet THIBAULT, Chargé de recherche, INRA	Examineur
M. Gérard LOISEAU, Maître de conférences, HDR, Montpellier SupAgro	Membre invité
Mme. Christèle HUMBLOT, Chargée de recherche, HDR, IRD	Directrice de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Dédicaces

Je dédie ce travail à toute ma famille. Merci papa et maman **François** et **Albertine** pour votre soutien multiforme. Merci à ma petite famille (ma chérie **Edith** et mon enfant **Yidain Ange Mattéo**) pour tout l'amour qu'ils me portent et leur patience. A Ange, je souhaite, que ce travail soit pour toi un cap à dépasser. Merci tonton l'abbé **Emmanuel** pour tes conseils et prières constants tout au long de ces longues études. A mon frère **Désiré**, à sa femme **Joséphine** et à leurs enfants pour leur soutien. Merci à toutes mes sœurs et à **André**, le benjamin de la famille pour leur soutien multiforme.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce l'appui financier du projet **FoIEA** qui s'inscrivait dans un vaste projet **ERA-Net «Developing African-European joint collaboration for Science and Technology» (ERAfrica)**, financièrement supporté par le 7^{ème} programme de la commission européenne. J'adresse mes remerciements à la coordonnatrice du projet **Christèle Humblot** et à tous les participants du projet pour la confiance placée en moi en me proposant ce travail. Merci pour toutes les opportunités de formation dont j'ai bénéficiées tout au long de la thèse (formations à l'université de Montpellier, et voyage d'étude à l'université d'Helsinki).

Je remercie l'**IRD** et l'**UMR Nutripass** pour l'accueil et le soutien multiforme durant ces trois années de thèse. Je remercie **Jean-Pierre Guyot** pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son unité de recherche.

Je suis profondément reconnaissant à l'égard des membres de l'école doctorale GAIA (**Marc Bouvy, Valérie Micard, Estelle Monteil, Cendrine Jay-Allemand, Ludivine Cabit...**) pour l'acceptation de mon inscription en thèse au sein de cette école doctorale et pour tous les services rendus au cours de ces trois années d'étude.

Je remercie profondément le **gouvernement français** à travers sa représentation diplomatique à Ouagadougou, au Burkina Faso, pour la bourse du service de coopération et d'action culturelle (SCAC) qui m'a permis à la fois de m'inscrire à l'université de Montpellier et d'y effectuer trois séjours à raison d'un séjour par an.

Je remercie **Christèle Humblot**, directrice de cette thèse. Les mots me manquent pour lui signifier tous mes sentiments de gratitude pour la direction de cette thèse. A tes côtés, ces trois années d'études ont réellement été pour moi trois années d'école de savoir et de vie. Ta rigueur et l'esprit critique scientifiques, tes mots d'encouragement à mon égard quand je

perds souvent le moral ainsi que le sens de l'organisation au travail restent en moi comme ta marque de fabrique. J'essaierai de t'imiter à l'avenir dans ma vie professionnelle et espère y parvenir.

A **Youna M. Hemery**, co-encadrante de ma thèse, je dis un sincère merci. Ta disponibilité et ton rôle ont été très déterminants dans la réussite de mes activités de thèse dont les analyses de laboratoire, l'organisation des données et leurs analyses statistiques, les tenues de mes comités de suivi individuel de thèse, les corrections minutieuses de mes drafts d'articles etc. Ta rigueur scientifique et ton abnégation au travail seront sources d'inspiration pour moi.

J'adresse mes sincères remerciements à **Françoise Nau, Régine Talon, Isabelle Audouin, Sabine Shorr-Galindo, Nidelet Thibault, Gérard Loiseau**, pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et pour l'intérêt porté à ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements à **Alain Michel, Didier Dupont**, et à **Claire Mouquet-Rivier** pour avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi individuel de thèse. Je remercie bien sincèrement **Claire Mouquet-Rivier**, pour sa sympathie et les différentes formes de coup de mains qu'elle m'a apporté au cours de mes séjours à Montpellier.

Je remercie **l'Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologie (IRSAT)** à travers son **département Technologie Alimentaire (DTA)** pour son soutien multiforme.

Je remercie profondément **Bréhima Diawara**, Directeur général de l'Agence Nationale de Valorisation des résultats de la recherche et des innovations (ANVAR), **Hagrétou Sawadogo-Lingani**, directrice de l'IRSAT, **Léguet Ganou**, chef du DTA pour leur appui sur le plan administratif, leur co-encadrement et leurs conseils avisés et soutiens multiformes.

Je remercie **Laurencia Touloundé Songré-Ouattara** pour la confiance placée en moi en me proposant pour mener ces activités de thèse et pour son accompagnement inconditionnel.

Je remercie **Fatoumata Ba-Hama** et **Charles Parkouda** pour leur co-encadrement, pour leurs conseils et soutiens multiformes.

Je remercie tous les collègues du DTA (**Kaboré Donatien, Dawendé Clarisse, Zénabou Douamba, Semdé zénabou, Dabo Rasmata, Compaoré Sérémé Diara, Sawadogo Luc, Combary Michel, Konkobo Charlotte, Samandoulgou Judith, Gorga Korfoum, Congo Maimounata etc.**) qui m'ont apporté leurs amitiés, appuis, et encouragements.

J'adresse mes sincères remerciements à **Catherine Philibert**, secrétaire de l'UMR Nutripass pour son assistance administrative avant, pendant et après mes séjours au sein de l'UMR Nutripass. Je n'oublierai jamais tout ce long temps d'attente que je t'ai fait passer à la Direction de la Recherche et des Études Doctorales (DRED) de l'école doctorale GAIA pour finaliser ma première inscription.

Je remercie **Nicolas Leconte** pour les analyses moléculaires et aussi pour son humanisme. Il m'a réellement sauvé du grand froid de Montpellier lors de mon premier séjour en me cédant une de ces couvertures (couette) alors même que je découvrais ce froid pour la première fois et que je ne m'y étais pas préparé suffisamment.

Je remercie **Christian Picq** pour avoir accepté de m'accueillir dans son bureau et de le partager avec moi chaque fois que j'étais de passage à l'UMR Nutripass. Merci pour l'atmosphère très détendue qui y régnait.

Je remercie **Isabelle Rochette, Christèle Vernière, Caraoline Laurent, et Sylvie Avallone** pour leur sympathie, leur disponibilité et leur soutien moral durant mes séjours

Je ne puis citer tout le personnel de l'UMR Nutripass ici. J'adresse mes sincères remerciements à tous. Ce fut pour moi un réel plaisir d'apprendre à leur côté. Merci à tous pour l'accueil, le partage et pour l'amitié.

I would like to present a big gratitude to **Professor Vieno Piironen, Doctor Susanna Kariluoto, Doctor Edelmänn Minnamari, Doctor Bhawani Chamlagain**, and their all co-workers for the warm welcome and the good conditions of study at the department of food and nutrition of the University of Helsinki (Finland). This moment was special in my live of PhD student in terms of shared knowledges, enriching experience and friendships. Thank you for your king support throughout this stay, valuable time and useful inputs.

Je remercie **Fabien Saubade** pour son amitié et pour son appui dans le démarrage de mes travaux de thèse à l'UMR Nutripass.

Un grand merci à tous les stagiaires, doctorants et CDD de passage à l'IRD Montpellier: **Fanny Olive, Maria del Carmen Ponce De Leon Rodrigue, Morgane Chapron, Celia Mousties, Sarah Haidar, Sandos Njoumi, Charperon, Manon Le Merrer, Gueye Dounia**, etc. ou de passage à l'IRD Ouaga : **Salomon Bouda, Guébré, Daouda, Céline Bintou Sanou, Yasmine Konaté, Zakaria Kaboré, Souleymane Sana** etc. Merci chers amis pour l'ambiance dans les différentes salles de travail ou de pause.

A **Ruba Nasri et à Sarah Haidar** pour les bons moments (promenades) passés ensemble à Montpellier, à **Bahanla Edwige Oboulbiga** pour son appui dans la collecte des échantillons des aliments dans les unités de production à Ouagadougou, et les analyses de matières sèches au laboratoire du DTA, à **Fidèle Tiendrebeogo** et à **Bionimian Ezechiele Tibiri** pour leur appui dans les analyses bio-informatiques sur QIIME2, merci infiniment.

Je remercie sincèrement **toutes les productrices** que j'ai rencontrées à Ouagadougou dans le cadre de la collecte de mes échantillons des aliments céréaliers fermentés.

A tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ma thèse et que je n'ai pas pu citer dans ce document de thèse, merci.

Résumé

Les folates sont des vitamines indispensables à tous les âges, particulièrement pendant la grossesse et l'enfance, étant donné leur fonction dans la division cellulaire. Le régime alimentaire en Afrique est essentiellement basé sur les céréales, consommées toujours après transformation. La fermentation est l'un des moyens de transformation des céréales pouvant augmenter les teneurs en folates dans les aliments. L'objectif de ce travail était d'utiliser la fermentation pour augmenter les ingérés en folates des populations africaines via la consommation d'aliments céréaliers fermentés. Sept aliments céréaliers fermentés couramment consommés en Afrique de l'Ouest ont été investigués. La plupart des aliments avaient des teneurs en folates (1,8–31,3 µg/100g matière fraîche) inférieures à celles des céréales (13,8–73,4 µg/100g matière fraîche). Des pertes en folates ont lieu au cours de certaines étapes de procédés dont le décorticage, le séchage, le trempage, le broyage et la filtration. Toutefois, la fermentation a permis une augmentation de la teneur en folates dans certains aliments. La bioaccessibilité des folates, évaluée à l'aide d'un modèle de digestion statique *in vitro*, variait de 23% à 81%. Elle était influencée par la matrice alimentaire et la stabilité des folates au cours de la digestion. Il a été calculé qu'au maximum 23% des besoins journaliers en folates des jeunes enfants consommant l'un des aliments étudiés pourraient être couverts. Des essais d'inoculation de bouillies fermentées à base de mil avec des souches de bactéries lactiques sélectionnées pour leurs propriétés nutritionnelles (synthèse de folates, hydrolyse de l'amidon) permettaient d'augmenter significativement les teneurs en folates (jusqu'à 8,7 µg/100 g matière fraîche) par rapport à leurs équivalentes préparées de manière traditionnelle (2,5–5,4 µg/100 g matière fraîche). L'inoculation par un pied-de-cuve provenant d'une fermentation spontanée permettait aussi une augmentation significative des teneurs folates (jusqu'à 7,4 µg/100 g matière fraîche). La caractérisation de la diversité bactérienne de 7 aliments céréaliers fermentés du Burkina Faso, d'Éthiopie et de la Finlande montrait que les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* étaient les principaux acteurs de la fermentation de ces aliments. Toutefois, une présence non négligeable d'autres bactéries potentiellement pathogènes des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Escherichia* et *Acinetobacter* a été identifiée. Certaines étapes du procédé de transformation des céréales dont le stockage et le broyage dans les moulins publics pourraient être de possibles sources de contamination. Ces potentiels contaminants étaient réduits par fermentation et éliminés après l'étape de cuisson.

Mots clés: Afrique, Aliments céréaliers fermentés, Bactérie lactique, Diversité bactérienne, Folates, Procédé

African cereal-based fermented foods: Another way to improve folate intakes

Abstract

Folates represent an essential vitamin in the human diet at all ages, particularly during pregnancy and infancy, as it is required for the production of new cells. In many African countries, the main staple foods are based on cereals, which are always consumed after processing. Fermentation is one of the processing, which could increase folate contents in foods. The objective of this work was to increase folates intake of African people through the consumption of cereal-based fermented foods using fermentation. Seven types of cereal-based fermented foods (CBFF), commonly consumed in West Africa, were investigated in this study. Total folate content of cereal-based fermented ranged between 1.8 and 31.3 µg/100g fresh weight, and was almost always lower than in the raw material (13.8–73.4 µg/100g fresh weight). Folate losses occurred during some processing steps like debranning, soaking and drying steps. However, fermentation was able to increase the folate content in some CBFF. Folate bioaccessibility was assessed using a static *in vitro* digestion model, and ranged from 23% to 81%. The bioaccessible folate content was influenced by total folate content, the structure of food matrices that modulated folate release, and folate stability during digestion process. Calculations of the contributions of CBFF to the reference nutrient intake for folate showed that folate intakes from these foods would cover a maximum of 8% of the folate requirements for young children. Porridges prepared with starter cultures of lactic acid bacteria selected for the nutritional properties (folate synthesis, starch hydrolysis) had significantly higher folate contents (up to 8.7 µg/100 g fresh matter) than the porridge prepared using the traditional process (2.5–5.4 µg/100 g fresh matter). Back slopping using an inoculum from a spontaneous fermentation also enabled an interesting increase in folate contents (up to 7.4 µg/100 g fresh matter). The bacterial diversity of seven cereal-based fermented foods from Burkina Faso, Ethiopia and Finland were assessed using 16S rRNA amplicon sequencing. Lactic acid bacteria genus, including *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* were the main bacteria present in cereal-based fermented foods. Several potentially pathogenic bacteria, namely, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella* and *Acinetobacter* were also found in some intermediary products resulting from storage and wet milling. These microorganisms were reduced by fermentation and finally removed after the cooking step.

Key words: Africa, Bacterial diversity, Cereal-based fermented foods, Folates, Lactic acid bacteria, Processing

Table des matières

Résumé	7
Liste des abréviations et acronymes	12
Chapitre 1 : Introduction générale.....	15
Chapitre 2 : Revue bibliographique	20
1. Folates ou vitamine B9	21
1.1. Structure et stabilité des folates.....	21
1.2. Fonctions physiologiques des folates	24
1.3. Absorption et métabolisme des folates.....	25
1.4. Biodisponibilité/Bioaccessibilité des folates.....	26
1.5. Causes des carences en folates	32
1.6. Conséquences des carences en folates.....	37
2. Statut en folates des femmes et des enfants en Afrique et stratégies de lutte.....	39
2.1. Statut en folates des femmes et des enfants en Afrique	39
2.2. Stratégies de lutte contre les carences en folates en Afrique	42
3. Procédés de fabrication permettant d'améliorer les teneurs en folates dans les aliments....	46
3.1. Fermentation.....	48
3.2. Trempage/germination	53
3.3. Fractionnement/fragmentation	54
4. Aliments fermentés à base de céréales en Afrique.....	55
4.1. Principales céréales utilisées pour la production des aliments fermentés.....	55
4.2. Formes de consommation des aliments fermentés à base de céréales en Afrique	59
4.3. Microbiote des aliments fermentés à base de céréales en Afrique.....	60
4.4. Contribution de la fermentation à la nutrition humaine	66
5. Méthodes d'analyse du microbiote d'aliments fermentés	71
5.1. Méthodes dites « cultures-dépendantes ».....	71

5.2. Méthodes dites « cultures-indépendantes ».....	71
6. Méthodes d'analyse des folates	73
6.1. Extraction et traitement tri-enzymatique.....	74
6.2. Dosage microbiologique des folates	75
6.3. Chromatographie liquide haute performance.....	76
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	77
1. Méthodes microbiologiques	78
1.1. Milieux de culture et réactifs.....	78
1.2. Microorganismes utilisés	82
1.3. Production de l'inoculum pour la préparation du <i>ben-saalga</i> bio-enrichi en folates.....	83
1.4. Dénombrement des microorganismes	83
2. Echantillonnage des aliments céréaliers fermentés	84
2.1. Matériel végétal.....	84
2.2. Suivi de la production des aliments céréaliers fermentés et échantillonnage	85
2.3. Etiquetage et conservation des échantillons.....	85
2.4. Procédé de préparation du <i>ben-saalga</i> bio-enrichi en folates	86
3. Dosage des folates totaux et bioaccessibles	86
4. Digestion <i>in vitro</i>	87
5. Techniques moléculaires	89
5.1. Extraction d'ADN	89
5.2. Quantification de bactéries lactiques par PCR en temps réel	91
5.3. Séquençage haut débit des produits de PCR	92
5.4. Analyses bio-informatiques	92
6. Analyses statistiques.....	93
Chapitre 4 : Résultats	95
1. Folates bioaccessibles et influence des procédés traditionnels de transformation sur la teneur en folates des aliments céréaliers fermentés de l'Afrique de l'Ouest.....	96

1.1. Introduction	96
1.2. Publication: Folate in West-African cereal-based fermented foods: bioaccessibility and influence of processing	100
2. Augmentation des teneurs en folates d'une bouillie de mil fermenté par inoculation de souches de bactérie lactiques	130
2.1. Introduction	130
2.2. Publication: Improved processing for the production of cereal-based fermented porridge enriched in folate using selected lactic acid bacteria and a back slopping process.	133
3. Diversité bactérienne d'aliments céréaliers fermentés consommés en Afrique et en Europe	153
3.1. Introduction	153
3.2. Publication: Bacterial diversity and community structure of some African and European traditional cereal-based fermented foods by high-throuput sequencing	156
Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives	177
Chapitre 6: Références bibliographiques	187
Annexe 1 : Folate status of women and children in Africa- current situation and improvement strategies.....	231
Annexe 2 : <i>Lactobacillus plantarum</i> P2R3FA isolated from traditional cereal-based fermented food improves the folate status of deficient rats.....	247
Annexe 3 : Fiche de collecte des données sur le procédé traditionnel de préparation du <i>ben-saalga</i>	265
Annexe 4 : Fiche de collecte des données sur le procédé traditionnel de préparation de 6 autres aliments céréaliers fermentés.....	271
Annexe 5 : Etude du potentiel de contribution des aliments céréaliers fermentés à la couverture des besoins en folates (vitamine B9) au Burkina Faso : impact des procédés sur les teneurs en folates	277
Annexe 6 : Mise au point d'une méthode d'évaluation de la bioaccessibilité des folates (vitamine B9): Application à des aliments céréaliers fermentés.....	279
Annexe 7 : Fortification <i>in situ</i> de la bouillie de mil fermenté de type <i>ben-saalga</i> en vitamine B9 (folates) par des bactéries lactiques	282

Liste des tableaux	285
Liste des figures	287

Liste des abréviations et acronymes

ACF : Aliments Céréaliers Fermentés

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFD : Agence Française pour le Développement

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

AOA : Afrique Orientale et Australe

ASS : Afrique Sub-Saharienne

BFC : Bioaccessible folate contents

BL : Bactéries Lactiques

CBFF : Cereal-based fermented foods

CDC : Centers for Disease Control

Ches : Acide 2- (N-cyclohexylamino) éthanesulfonique

CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour
Développement

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

CV : Coefficient of variation

DFI : Daily folate intake

DFI-OFP : Daily folate intake needed from other food products

DM : Dry matter

DTA : Département Technologie Alimentaire

dTMP : désoxythymidine 5'-monophosphate

EAR : Estimated average requirement

ERA-Net-ERAfrica : European Research Area Network for Africa - Developing African-
European joint collaboration for Science and Technology

FACM : Folic Acid Casei Medium

FANTA : Food And Nutrition Technical Assistance

FAO : Food and Agricultural Organization for the United Nation

FAOSTAT : Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

FBP : Folate binding Protein

FD : Folate Deficiency

FFI : Food Fortification Initiative

FDS : Fluides Digestifs Simulés
FI : Folate intake
FIDA : Fonds International de Développement Agricole
FIS : Fluides Intestinaux Simulés
FSS : Fluides Salivaires Simulés
GCPII : Gama-Glutamyl Carboxypeptidase II
HCY : Homocystéine
Hepes : Acide N- (2-hydroxyethyl) pipérazine-N'-2-ethanesulfonique
IRD : Institut de Recherche pour le Développement
ISO : International Organization for Standardization
LAB : Lactic Acid Bacteria
MF : Matière Fraîche
MNP : Multiple Micronutrient Powders
MRS : de Man Rogosa et Sharpe
MS : Matière Sèche
MTHFR : Méthylenetetrahydrofolate réductase
MTN : Malformations du Tube Neural
MTR : Méthionine synthétase
NGS : Next Generation Sequencing
NTD : Neural Tube Defects
OMS : Organisation mondiale de la santé
PA : Prevalence of Folate adequacy
p-ABA : Para-Amino-Benzoïque Acide
PCA : Plate Count Agar
PCFT : Proton Coupled Folate Transporter
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGA : Pteroylmonoglutamic Acid
PLF : Protéines de liaison aux folates
RCF1 : Reductase Folate Carrier 1
RDC : République Démocratique du Congo
RNI : Recommended Nutrient Intake
SAH : S-Adénosyl Homocystéine
SAM : S-Adénosyl Méthionine

SPRING : Strengthening Partnerships, Results and Innovations in Nutrition Globally

THF : Tetrahydrofolates

TPU : Traditional production units

UFC : Unité Formant Colonie

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

UN : United Nations

US : United States

USDA : United States Department of Agriculture

USAID : United States Agency for International Development

UTPs : Unités Traditionnelles de Production

WAFCT : West African food composition table

WHO : World health organization

H4folate : Tétrahydrofolate

5-CH₃-H4folate : 5-méthyltétrahydrofolate

5-CH₃-H2folate : 5-méthyl-dihydrofolate

5-HCO-H4folate : 5-formyltétrahydrofolate

5-HN=CH-H4folate : 5-formiminotétrahydrofolate

10-HCO-H4folate : 10-formyltétrahydrofolate

10-HCO-H2folate : 10-formyl-dihydrofolate

5,10-CH₂-H4folate : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate

5,10-CH⁺-H4folate : 5,10-méthényl-tétrahydrofolate

10-HCO-PGA : acide 10-formylfolique

PGA : Acide folique

Chapitre 1 : Introduction générale

Les folates sont un groupe de composés mono ou poly-glutamates dérivés de l'acide ptéroïque appelés vitamères (Blakley 1987). Ils appartiennent aux vitamines du groupe B et désignent précisément la vitamine B9. Ce terme générique regroupe aussi bien les vitamères naturellement présents dans les aliments que l'acide folique, forme synthétique de ce groupe utilisée comme supplément ou fortifiant nutritionnel (Gujaska and Kuncewicz 2005). Alors que l'acide folique est un composé mono-glutamate de l'acide ptéroïque et chimiquement stable, les vitamères naturels des folates présentent une chaîne de poly-glutamates de l'acide ptéroïque avec des états d'oxydation et une stabilité chimique variables (Gujaska and Kuncewicz 2005).

Dans l'organisme, les folates sont principalement des donneurs de groupements monocarbonés (McGarel *et al.* 2015). De par cette fonction, ils sont impliqués dans les processus clés de biosynthèse des acides nucléiques, des protéines, des chromosomes, des phospholipides, de la myéline et des neurotransmetteurs (McGarel *et al.* 2015). Ces composés sont indispensables à tous les âges. L'Homme n'étant pas capable de les synthétiser *de novo*, un apport exogène par l'alimentation s'avère indispensable pour ses besoins métaboliques (Zhao, Matherly, and Goldman 2009). Chez l'Homme, les ingérés en folates par le biais de l'alimentation peuvent être insuffisants. Ces apports limités en folates par l'alimentation sont dus à une faible diversité de l'alimentation, à des pertes de ces vitamines au cours des procédés de transformation des aliments ou encore à leur faible biodisponibilité (McNulty 1995; Witthöft *et al.* 1999). Les carences en folates peuvent être dues à des apports alimentaires insuffisants, mais aussi être d'origine biologique (troubles métaboliques, malabsorption) ou médicamenteuse (Allen 2008). Les conséquences sur la santé humaine peuvent être graves comme l'apparition d'anémie mégalo-blastique ou des complications pendant la grossesse telles que les malformations du tube neural (MTN) chez le fœtus (Eitenmiller, Ye, and Landen 2008). Les carences en folates et leurs implications sanitaires sont répandues dans le monde entier (McLean, de Benoist, and Allen 2008; Youngblood *et al.* 2013).

En Afrique, les régimes alimentaires sont souvent peu diversifiés et la majorité des procédés de transformation conduisent à une diminution des teneurs en folates qui peut expliquer les carences observées (Arimond *et al.* 2011; Berger *et al.* 2013; McNulty 1995). En effet, dans beaucoup de pays africains, les céréales dont le sorgho (*sorghum vulgare*), le maïs (*Zea mays*), le mil (*Pennisetum glaucum*, *Eleusine coracana*), et le riz (*Oryza sativa*), constituent la base du régime alimentaire (Galati *et al.* 2014). Ces céréales sont toujours consommées après

transformation comme le décorticage, le séchage, le broyage, le tamisage et la cuisson qui peuvent induire des pertes importantes en folates (Saubade *et al.* 2018; Witthöft *et al.* 1999).

Les moyens de luttés contre les carences en folates en Afrique, à l’instar de ceux des pays développés, incluent la fortification (i.e. enrichissement) et la supplémentation avec de l’acide folique, combinés à la promotion d’une alimentation variée et riche en folates. En 2017, la farine de blé était fortifiée dans 17 pays africains, et celle de maïs l’était dans 9 pays africains (FFI 2017). Quant aux politiques de supplémentation en acide folique, elles restent, dans la plupart des cas, circonscrites aux femmes enceintes avec cependant un taux de couverture limité et faible. En effet moins de deux-tiers des femmes prennent des suppléments au cours de la gestation suivant les recommandations de l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (SPRING/USAID 2016). De plus, le faible niveau de scolarisation des femmes, les grossesses non planifiées, et l’inaccessibilité aux services de soins primaires, aux suppléments d’acide folique et aux aliments fortifiés des populations vulnérables dont les enfants et les femmes en âge de procréer compliquent encore la situation (MacIntyre *et al.* 2002).

Dans ce contexte, l’acide folique, en dépit de son efficacité établie dans la lutte contre les carences en folates à l’échelle mondiale (Blencowe *et al.* 2010) constitue aujourd’hui une solution hors de portée d’une proportion importante des populations vulnérables d’où le besoin d’explorer d’autres moyens plus accessibles dans les pays à ressources limitées. Dans la plupart de ces pays, l’un des principaux procédés de transformation et de conservation des aliments céréaliers est la fermentation (Steinkraus 1994). Outre le développement d’arômes agréables, l’amélioration de la texture, de la conservation et de la digestibilité des aliments, la fermentation améliore aussi la valeur nutritionnelle des produits fermentés par la synthèse de métabolites d’intérêt nutritionnel, dont les folates (Blandino *et al.* 2003; Singh *et al.* 2015; Steinkraus 1994). La production des folates au cours de la fermentation notamment des céréales, est dévolue aux acteurs de la fermentation que sont les bactéries lactiques (BL) et les levures (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Si de nombreux travaux sur l’impact de la fermentation contrôlée ou non des aliments céréaliers, sur les ingérés en folates existent dans la littérature, la plupart de ceux-ci ont été réalisés sur des produits céréaliers communément consommés dans les pays développés (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). En revanche, très peu de travaux portent sur la contribution des aliments céréaliers fermentés aux ingérés en folates en Afrique. Deux aliments céréaliers fermentés ont été investigués à ce jour : le *ben-saalga* et le *togwa*, deux bouillies traditionnelles fermentées à base de mil et de maïs préparées au

Burkina Faso et en Tanzanie, respectivement (Hjortmo, Hellström, and Andlid 2008; Saubade, Humblot, *et al.* 2017; Greppi, Saubade, *et al.* 2017; Saubade *et al.* 2018).

Ce travail a été ainsi initié pour connaître le potentiel de contribution des aliments céréaliers fermentés tels que consommés en Afrique, à la couverture des besoins en folates. Il s'inscrivait dans le projet ERA-Net ERAfrica, intitulé « Contribution des aliments céréaliers fermentés aux ingérés en folates dans les pays européens et africains » (FoIEA ; www.folea.eu). Ce projet était soutenu financièrement par la commission européenne dans le cadre du septième programme cadre (ERAFRICA_IC-027, FP-226154). Il a été réalisé en partenariat entre des laboratoires de cinq pays : l'Afrique du Sud, le Burkina Faso, l'Éthiopie, la Finlande et la France.

Dans ce projet, ma thèse avait pour objectif de répondre à la question de recherche suivante : **comment augmenter les ingérés en folates des populations vulnérables (femmes et enfants) en Afrique à travers la consommation d'aliments céréaliers fermentés ?** Pour répondre à cette question, une collecte d'échantillons de 7 aliments céréaliers fermentés les plus consommés a été effectuée dans des unités traditionnelles de production au Burkina Faso. Ces aliments, bien que collectés au Burkina Faso, sont aussi consommés dans d'autres pays africains, notamment en Afrique de l'Ouest comme le Bénin, le Ghana, le Nigéria, le Niger, le Mali, la Côte d'Ivoire etc. Les teneurs en folates totaux de ces aliments ont été déterminées. Le procédé de préparation de chaque aliment collecté a été décrit. Une étude bilan-matière a permis l'identification des étapes des procédés de transformation susceptibles d'influencer les teneurs en folates de ces aliments. Outre ces analyses, une étude de la diversité microbienne et des mesures de bioaccessibilité des folates de ces aliments ont été réalisées. L'aliment le plus couramment consommé a été utilisé comme modèle de faisabilité d'augmentation de la teneur en folates en utilisant des souches de bactéries lactiques productrices de folates.

Le manuscrit de cette thèse est divisé en cinq chapitres :

Le Chapitre 1 présente l'introduction générale.

Le chapitre 2 est une revue de la littérature qui présente les folates, le statut en folates des populations vulnérables (femmes et enfants) en Afrique et les stratégies de lutte contre les carences mises en place. Un point sur les aliments céréaliers fermentés produits en Afrique et sur les méthodes d'étude de leur microbiote est présenté.

Une partie de cette revue a fait l'objet d'une publication (**Annexe 1**) acceptée dans *Food Reviews International*.

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

Le chapitre 4 présente les résultats obtenus et les discussions sous la forme d'articles soumis ou à soumettre pour publication. Dans une première partie nous présentons les résultats de la détermination des teneurs en folates d'échantillons de 7 aliments céréaliers fermentés les plus consommés, de l'influence des procédés traditionnels sur les teneurs en folates de ces aliments ainsi que la bioaccessibilité des folates présents dans ces aliments.

Dans une deuxième partie nous présentons les résultats obtenus lors de la production de bouillies de mil fermenté produites en utilisant des souches de bactéries lactiques productrices de folates.

Dans une troisième partie nous présentons les résultats de caractérisation de la diversité microbienne de ces aliments.

Le chapitre 5 présente une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, ainsi que les limites de l'étude et les perspectives pour les futures investigations.

Dans le cadre de mon voyage d'étude à l'université d'Helsinki, j'ai participé à une étude d'évaluation du potentiel de production des folates par les bactéries lactiques isolées à partir de la pâte fermentée de l'*injera*. Les résultats de ce travail réalisé en commun avec l'université d'Helsinki (Finlande) et l'université d'Addis Abeba (Ethiopie) ont été valorisés sous forme d'un article (**Annexe 2**) à soumettre dans une revue internationale en 2018. Ma contribution s'est limitée à l'identification de la capacité de production des folates par une centaine de souches de BL.

Chapitre 2 : Revue bibliographique

1. Folates ou vitamine B9

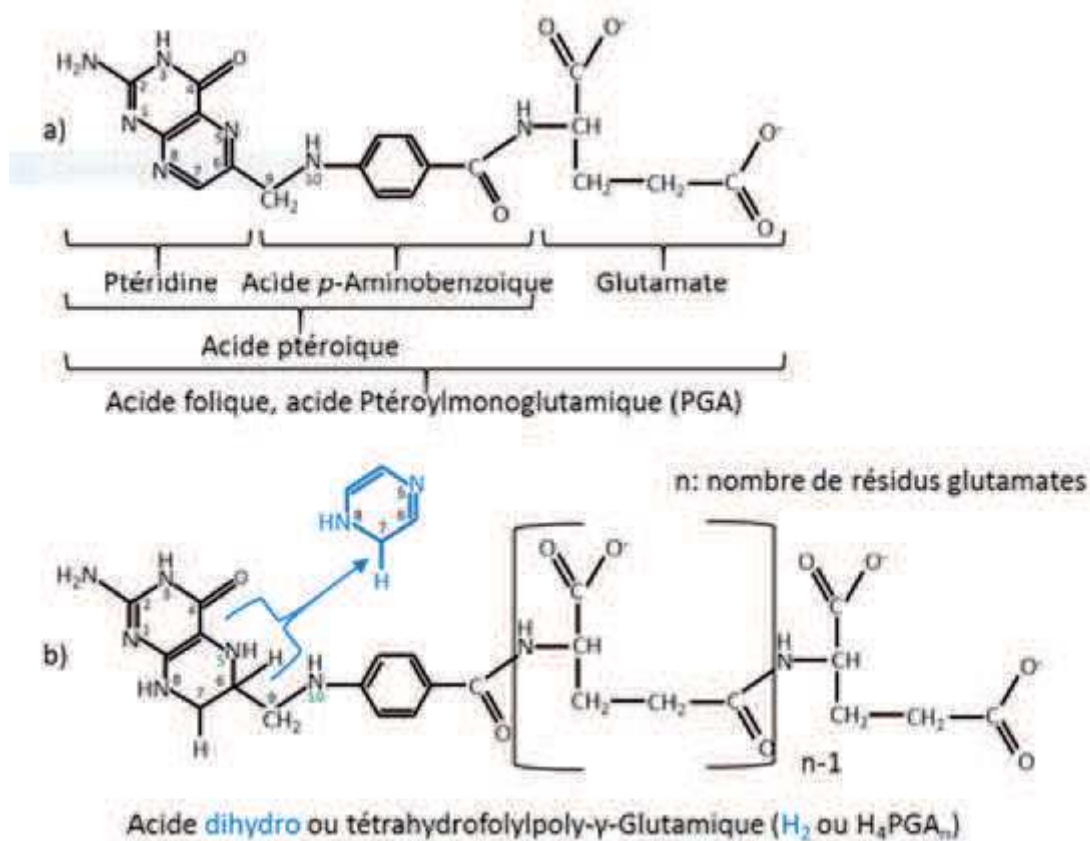
1.1. Structure et stabilité des folates

Le terme folates, ou vitamine B9, est un terme générique qui désigne un groupe de différents composés vitaminiques appelés 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-amino-benzoïque, ce dernier étant lui-même lié à une ou plusieurs molécules d'acide L-glutamique via un lien peptidique (**Figure 1**). Les ptérines sont des molécules appartenant au groupe des ptéridines et qui ont la particularité d'être substituées en position 2 et 4 par une fonction amine et une fonction kéto ou énoïl, 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 peuvent en avoir jusqu'à sept, voire 12 molécules glutamiques (Witthöft *et al.* 1999). Le noyau ptéridine de l'acide folique est complètement oxydé alors que celui des autres vitamères de folates est 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 tetrahydrofolates (Witthöft *et al.* 1999). En outre, les vitamères de folates peuvent 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 aussi y avoir un pont dû à des groupes méthylène ou méthényle entre les positions N₅ et N₁₀.

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

Tous les vitamères de folates sont photosensibles. La susceptibilité à la dégradation oxydative des folates est très variable selon les vitamères : l'acide folique, forme synthétique utilisée comme supplément ou fortifiant alimentaire est plus résistant au stress oxydatif que les formes réduites de folates (Hawkes and Villota 1989). Les substitutions sur les positions N₅ ou N₁₀ augmentent la stabilité des folates. L'ordre de stabilité des vitamères de folates est le suivant : acide folique > 5-HCO-H₄folates > 5-CH₃-H₄folates > 10-HCO-H₄folates > H₄folates. En outre, la stabilité des folates est pH-dépendante (Witthöft *et al.* 1999). Selon le pH, des interconversions entre les vitamères de folates sont possibles. Par exemple, à pH acide modéré, le 5,10-CH₂-H₄folate est facilement dissocié en H₄folate, et à pH acide fort le 5-HCO-H₄folate et le 10-HCO-H₄folate subissent une cyclisation pour former 5,10-CH⁺-H₄folate (Pfeiffer, Rogers, and Gregory 1997). Le taux de dégradation des folates dépend aussi de la température, de la présence de catalyseurs, et des antioxydants (Gregory 1989). Des interconversions entre les vitamères de folates sont possibles. Par exemple, le 10-HCO-H₄folate, sensible à l'oxydation, peut être facilement converti en 10-HCO-PGA à haute température, en 10-HCO-H₂folate à pH neutre ou basique, ou en 5,10-CH⁺-H₄folate à pH acide (Maruyama, Shiota, and Krumdieck 1978; Robinson 1971). Le 5-CH₃-H₄folate peut être oxydé en 5-CH₃-H₂folate (Maruyama, Shiota, and Krumdieck 1978). Bien que plusieurs facteurs affectant la stabilité des folates aient été déjà décrits, les connaissances sur la stabilité des folates dans un environnement complexe comme les aliments restent toujours limitées.



Substituants monocarbonés (Formules)	Position	Etat d'oxydation	Vitamères
Méthyl (-CH ₃)	N-5	Méthanol	5-CH ₃ -H ₄ folate 5-CH ₃ -H ₂ folate
Méthylène (-CH ₂ -)	N-5 ; N-10	Formaldéhyde	5,10-CH ₂ -H ₄ folate
Méthényle (-CH=)	N-5 ; N-10	Formate	5,10-CH ⁺ -H ₄ folate
Formyle (-CHO)	N-5 ou N-10	Formate	5-HCO-H ₄ folate 10-HCO-H ₄ folate 10-HCO-H ₂ folate 10-HCO-PGA
Formimino (HN=CH-)	N-5	Formate	5-HN=CH-H ₄ folate

Source : Saubade *et al.* 2017

Figure 1 : Structure de a) l'acide folique et b) des autres vitamères de folates

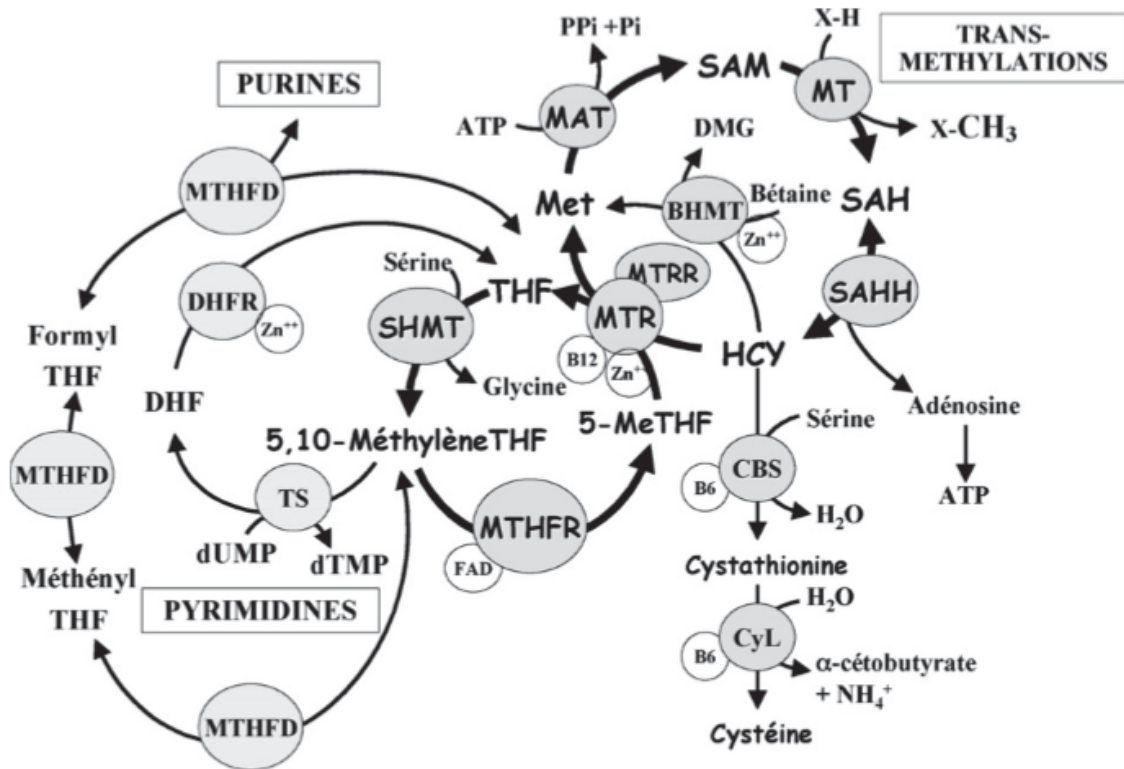
5-CH₃-H₄folate : 5-méthyltétrahydrofolate ; 5-CH₃-H₂folate : 5-méthylidihydrofolate ; 5,10-CH₂-H₄folate : 5,10-méthylènetétrahydrofolate ; 5,10-CH⁺-H₄folate : 5,10-méthényletétrahydrofolate ; 5-HCO-H₄folate : 5-formyltétrahydrofolate ; 10-HCO-H₄folate : 10-formyltétrahydrofolate ; 10-HCO-H₂folate : 10-formylidihydrofolate ; 10-HCO-PGA : acide 10-formylfolique ; 5-HN=CH-H₄folate : 5-formiminotétrahydrofolate

1.2. Fonctions physiologiques des folates

Les folates interviennent dans deux processus biochimiques clés en tant que donneurs de groupements monocarbonés. Il s'agit des synthèses d'acides nucléiques et de la réméthylation de l'homocystéine en méthionine (Forges *et al.* 2008) (**Figure 2**). Seuls les tétrahydrofolates (THF) sont biologiquement actifs, mais chaque vitamère de tétrahydrofolate est impliqué dans une réaction différente selon le groupement carboné qu'il porte.

Par exemple, dans le cas des synthèses d'acides nucléiques, c'est le 5,10-méthylène tétrahydrofolate (THF) qui constitue le donneur de monocarbonés nécessaire à ces synthèses. Il intervient soit directement, comme cofacteur de la thymidylate synthétase qui transforme le désoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) en désoxythymidine 5'-monophosphate (dTMP), soit après transformation en méthényl- puis en formylTHF, sous l'action d'un complexe enzymatique qui participe à la synthèse des purines (Forges *et al.* 2008). Dans les deux cas, le THF est recyclé pour reformer du 5, 10-méthylèneTHF par transfert d'un élément monocarboné provenant de la transformation de la sérine en glycine (Forges *et al.* 2008).

Dans le cas de la réméthylation de l'homocystéine en méthionine, c'est le 5-méthylTHF qui est sollicité. Ce dernier peut provenir de la réduction du 5, 10-méthylèneTHF par une des enzymes-clés de ce métabolisme, la 5, 10-méthylèneTHF réductase (MTHFR) (Forges *et al.* 2008). Le méthylTHF interagit avec un complexe enzymatique, la méthionine synthétase (MTR) dont le cofacteur, la cobalamine (vitamine B12) prend en charge transitoirement le groupement méthyl avant qu'il ne soit transféré sur l'homocystéine pour former de la méthionine. Une fois produite, elle entre dans les synthèses protéiques ou bien elle couplée à l'adénosine fournie par l'adénosine triphosphate (ATP) pour former la S-adénosinéméthionine (SAM) (Forges *et al.* 2008). Ce composé est le principal donneur de groupements méthyl dans un très grand nombre de réactions de transméthylation concernant aussi bien les protéines et lipides que l'ADN (Forges *et al.* 2008). De ce fait la SAM joue un rôle central dans les phénomènes de régulation épigénétique de l'expression des gènes (Forges *et al.* 2008).



Source : Forges *et al.* (2008)

Figure 2 : Rôle de la vitamine B9 dans le métabolisme cellulaire

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

1.3. Absorption et métabolisme des folates

Près des deux tiers des folates alimentaires sont présents sous formes de poly-glutamates (Melse-Boonstra *et al.* 2002). Ces derniers sont préalablement hydrolysés en mono-glutamates par la γ -glutamyl hydrolase ou carboxypeptidase II (GCP II ; EC : 3.4.17.21) présente dans la membrane de la bordure en brosse des entérocytes avant absorption par les cellules de l'épithélium intestinal au niveau du jéjunum (McNulty and Pentieva 2004). Les mono-glutamates sont transportés à travers l'entérocyte par un mécanisme saturable de co-transport (avec H⁺), pH acide-dépendant via des transporteurs membranaires (proton-coupled folate transporter (PCFT)) (Zhao, Matherly, and Goldman 2009). En plus des transporteurs membranaires PCFT, il est admis aussi la présence d'autres transporteurs membranaires RFC1 (reduced folate carrier 1) et FR α (folate receptor alpha) présents au niveau de la

membrane apicale des entérocytes (Matherly and Goldman 2003; Zhao, Matherly, and Goldman 2009). Ces mécanismes de transport étant saturables, dans le cas d'apports élevés d'acide folique, un transport par diffusion a été décrit (Kelly *et al.* 1997). De plus, d'après une étude de Aufreiter *et al.*, (2009), une absorption des folates a lieu au niveau du côlon et contribue de façon significative à la quantité totale de folates circulants dans le sang (Aufreiter *et al.* 2009). Outre les folates absorbés d'origine alimentaire, les folates peuvent être aussi synthétisés par certaines bactéries coliques, principalement sous forme de monoglutamylfolates qui sont absorbés au niveau du côlon puis métabolisés (Rong *et al.* 1991).

Une fois dans l'entérocyte, les mono-glutamates sont alors réduits en THF et méthylés, la principale forme libérée dans le plasma étant le 5-méthyl-THF (5-CH₃-H₄folate). Les folates absorbés sont ensuite transportés jusqu'au foie, une partie est alors excrétée dans la bile puis réabsorbée (Lin *et al.* 2004). Ce cycle entéro-hépatique représente une forte circulation quotidienne de folates (>80 µg/jour). Une partie des folates est stockée dans le foie, le reste dans les globules rouges. Les réserves s'épuisent en 4 mois en moyenne (Zhao, Matherly, and Goldman 2009).

1.4. Biodisponibilité/Bioaccessibilité des folates

La biodisponibilité d'un nutriment fait référence à la fraction de ce nutriment ingérée qui est effectivement absorbée et utilisée pour assurer les fonctions de l'organisme, tandis que la bioaccessibilité correspond à la fraction du nutriment libérée de la matrice alimentaire au cours de la digestion et potentiellement disponible pour absorption par la barrière intestinale (Gregory III, Quinlivan, and Davis 2005). La biodisponibilité/bioaccessibilité dépend à la fois de facteurs intrinsèques de l'aliment ingéré et de facteurs physiologiques propres à chaque individu (Benito and Miller 1998; Camara and Amaro 2003). Pour ce qui est des folates, les facteurs qui vont limiter cette biodisponibilité sont nombreux et liés: (i) à la variabilité des vitamères de folates et à leur stabilité relative, (ii) à la variabilité entre individus, (iii) à l'effet de la matrice alimentaire, (iv) à la variabilité des méthodes d'évaluation de la bioaccessibilité/biodisponibilité des folates (Gregory 2012; McNulty and Pentieva 2004).

(i) Stabilité relative des vitamères de folates

La stabilité chimique variable des vitamères de folates constitue un facteur limitant de la biodisponibilité des folates (Tamura *et al.* 1976). Elle a été décrite dans la section 1.1. Structure et stabilité des folates. En effet, les formes sensibles aux pH acides ont davantage de

risque d'être dégradées au cours de l'étape gastrique de la digestion des aliments. Ringling et Rychlik (2017) ont ainsi rapporté qu'au cours d'une digestion *in vitro* en présence d'enzymes digestives à concentration physiologique, l'acide folique et le 10-HCO-PGA sont relativement stables, tandis que le H₄folate est quasiment dégradé, le 5-CH₃-H₄folate est dégradé en l'absence d'acide ascorbique pour donner divers produits d'oxydation. Quant au 5-HCO-H₄folate, il subit plusieurs interconversions successives en fonction du pH pour donner d'abord du 5,10-CH⁺-H₄folate au cours de la phase gastrique à pH 2, puis du 10-HCO-H₂folate au cours de la phase intestinale à pH 5,5 puis 6,5 ; 87% du 5-HCO-H₄folate étant converti à la fin de la digestion.

(ii) Variabilité entre individus

Plusieurs variantes génétiques des enzymes contrôlant l'absorption, le transport et le métabolisme des folates peuvent avoir un effet significatif sur le statut en folates et sur la santé humaine (Gregory III, Quinlivan, and Davis 2005). Par exemple, Mitchell et al. (1997) estimaient qu'au moins 46% de la variation des concentrations en folates dans les globules rouges étaient liée à une variation génétique (Mitchell *et al.* 1997). En outre, le style de vie et certains facteurs relatifs à la santé affectent aussi la biodisponibilité des folates. Par exemple, la prise associée de certains médicaments tels que certains anticonvulsivants, certains anticancéreux, et certains antiinflammatoires intestinaux peut influencer négativement le métabolisme et le statut en folates (Bailey 1988). Ces médicaments, ainsi que la fumée des cigarettes et l'éthanol ingéré par les alcooliques auraient des effets inhibiteurs sur l'activité de la GCPII (Halsted 1990). L'absorption des folates peut aussi être perturbée par l'inflammation ou des troubles gastro-intestinaux (Gregory 1997).

(iii) Effet matrice alimentaire

La biodisponibilité de l'acide folique est d'environ 85% (FAO/WHO 2005). Selon les estimations, la biodisponibilité des folates alimentaires est comprise entre 30% à 98% (Brouwer *et al.* 2001; Hannon-Fletcher *et al.* 2004). La plupart des études de biodisponibilité se sont focalisées sur le potentiel des facteurs susceptibles d'inhiber l'enzyme de déconjugaison présente sur la membrane de la bordure en brosse des entérocytes. Il a été montré que les acides organiques ont un effet inhibiteur de la GCPII *in vitro* (Bhandari and Gregory 1990; Wei and Gregory 1998). La consommation d'aliments acides peut induire une diminution du pH du contenu du jéjunum en dessous du pH optimal de l'activité de la GCPII (pH 6,5), ce qui peut entraîner une déconjugaison incomplète des folylpolyglutamates

alimentaires au niveau de la barrière intestinale (Chandler, Wang, and Halsted 1986; Tamura *et al.* 1976). Par ailleurs, en présence de cations métalliques tels que le zinc ou le fer en milieu neutre ou acide (pH 3,5), les folates pourraient former des complexes susceptibles de diminuer leur biodisponibilité (Lucock *et al.* 1994). Dans les produits laitiers, la chélation de la vitamine B9 par la « folate binding protein » protège les folates au cours de la digestion et permet une meilleure biodisponibilité (Forssén *et al.* 2000).

La structure de l'aliment affecte aussi la biodisponibilité des folates (Seyoum and Selhub 1998). Par exemple, la consommation de légumes finement hâchés augmente de façon significative les teneurs en folates du plasma comparativement à des légumes non hâchés (van het Hof *et al.* 1999).

La bioaccessibilité des folates est également influencée par le type de vitamines présents dans l'aliment, leur stabilité, ainsi que par l'efficacité de la déconjugaison. La présence de certaines protéines de transport liées aux folates ou d'antioxydants comme l'acide ascorbique dans les matrices alimentaires protègent et améliorent la stabilité des folates et dans certains cas leur bioaccessibilité (McNulty and Pentieva, 2004; Ringling and Rychlik, 2017). Ainsi, la bioaccessibilité des folates est plus élevée pour des épinards (44%) et du camembert (37%) que pour du germe de blé (21%), mais dans tous les cas la bioaccessibilité est améliorée par l'ajout d'acide ascorbique (Ringling et Rychlik, 2017). Cependant, dans le cas des protéines de transport (« folate binding protein »), des résultats contradictoires ont été aussi obtenus avec l'acide folique en particulier (Verwei *et al.* 2004; Witthöft *et al.* 2006). Les fibres alimentaires, quant à elles, ne semblent pas avoir d'effet adverse sur la biodisponibilité des folates (Gregory 1997).

(iv) Variabilité des méthodes d'évaluation de la bioaccessibilité/biodisponibilité des folates

Il existe un grand nombre d'approches pour estimer la bioaccessibilité/biodisponibilité des folates dans les aliments. Les méthodes peuvent être subdivisées en deux groupes : les méthodes *in vivo* qui sont réalisées soit chez l'Homme, soit chez les animaux, et les méthodes *in vitro* (pour les mesures de bioaccessibilité) qui simulent, de manière plus ou moins sophistiquée, les conditions physiologiques de la digestion. La méthode à adopter pour une étude doit cependant être choisie sur la base des ressources disponibles (financières, matérielles), des considérations éthiques et, surtout, de la nature et de l'objectif de l'étude.

Dans le cas des folates, la plupart des études d'évaluation de la biodisponibilité (méthodes *in vivo*) ont été réalisées sur des animaux de laboratoire, principalement sur des rats (Clifford *et al.* 1991). Les résultats de ces études restent cependant controversés au regard des différences qui subsistent dans la déconjugaison des folates entre l'Homme et les espèces animales étudiées. En outre, les régimes alimentaires de base utilisés dans ces études sont différents de ceux de l'Homme aussi bien du point de vue de la composition que de la matrice alimentaire (Gregory 2001).

Chez l'Homme, les études de biodisponibilité ont utilisé généralement des folates réduits (5-méthyl-THF) ou de l'acide folique, marqués avec des isotopes radioactifs. Ces essais ont été réalisés à court-terme (quelques heures à quelques jours) ou à long-terme (de 4 à 12 semaines) et avec des moyens importants (coût des isotopes, équipement et conditions spéciales). Les estimations de la biodisponibilité des folates alimentaires par rapport à celle de l'acide folique montrent de grandes variations dans les études, allant de 10 à 98% (Baker, Jaslow, and Frank 1978; Brouwer *et al.* 1999; Colman, Green, and Metz 1975; Prinz-Langenohl *et al.* 1999; Tamura and Stokstad 1973).

Pour mesurer la bioaccessibilité des folates dans les matrices alimentaires, il existe principalement quatre méthodes de digestion *in vitro*: la solubilité, la dialyse, les modèles gastro-intestinaux dynamiques et le modèle de cellules Caco-2. Ce dernier est utilisé pour évaluer la biodisponibilité (**Tableau 1**). Dans chacune de ces méthodes, une digestion *in vitro* est réalisée pour simuler le système digestif humain. Elle se fait généralement en deux phases (gastrique et intestinale) ou parfois en trois ou quatre phases avec la prise en compte des phases orale et de la fermentation colique. Pour la phase gastrique, la pepsine (par exemple un extrait d'estomac de porc) est ajoutée avant l'acidification des échantillons à pH 2 (pH gastrique de l'adulte) ou à pH 4 (pH gastrique de l'enfant) (Etcheverry, Grusak, and Fleige 2012). Au début de la phase intestinale, les échantillons sont neutralisés à pH 5,5-6,0 avant l'addition soit de la pancréatine (cocktail d'enzymes pancréatiques contenant l'amylase pancréatique, la lipase, la ribonucléase et les protéases telles que la trypsine) ou des enzymes individuelles purifiées (la trypsine, la chymotrypsine et l'amylase pancréatique) et des sels biliaires, et le pH est finalement ajusté à 6,5-7,0. La troisième phase souvent ajoutée est la phase orale. Elle précède la phase gastrique. Dans cette phase, les échantillons sont soumis à l'action de l'alpha-amylase salivaire. A l'issue des phases de digestion, la bioaccessibilité peut être mesurée par la détermination du pourcentage d'élément dialysable ou soluble après digestion *in vitro*, ou encore par la détermination de la quantité d'élément absorbée ou

transportée par le modèle de cellules Caco-2. Dans le cas des modèles dynamiques gastro-intestinaux, les étapes gastriques et intestinales sont réalisées de manière automatisée au sein du digesteur qui régule automatiquement la température, le pH et l'ajout des enzymes digestives, et permet également de contrôler les temps de transit dans les différents compartiments, et les mouvements péristaltiques.

Tableau 1 : Méthodes de digestion *in vitro* (Etcheverry, Grusak, and Fleige 2012)

Méthodes de digestion <i>in vitro</i>	Objectifs	Avantages	Limites
Solubilité	Mesure de la bioaccessibilité	<ul style="list-style-type: none"> • Simple à faire • Peu coûteux • Facile à conduire 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'indicateur fiable de la biodisponibilité • Impossible d'évaluer le taux d'absorption ou la cinétique de transport • Impossible de mesurer la compétition entre les nutriments et les composants alimentaires sur le site d'absorption
Dialyse	Mesure de la bioaccessibilité	<ul style="list-style-type: none"> • Simple à faire • Peu coûteux • Facile à conduire 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossible d'évaluer le taux d'absorption ou la cinétique de transport • Impossible de mesurer la compétition entre les nutriments et les composants alimentaires sur le site d'absorption
Modèles gastro-intestinaux dynamiques	Mesure de la bioaccessibilité. Cependant, lorsqu'il est couplé aux cellules intestinales, la biodisponibilité peut également être mesurée	<ul style="list-style-type: none"> • Incorpore de nombreux paramètres de digestion (péristaltisme, température corporelle, etc.) • Permet la collecte du digesta à n'importe quelle étape de la digestion 	<ul style="list-style-type: none"> • Cher • Peu d'études de validation
modèle cellulaire Caco-2	Mesure de la biodisponibilité	<ul style="list-style-type: none"> • Permet l'étude de la compétition des éléments nutritifs sur le site d'absorption 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiert du personnel qualifié dans les méthodes de culture cellulaire

1.5. Causes des carences en folates

Les carences en folates peuvent survenir à tous les âges : de la conception à la vieillesse (Clarke *et al.* 2004). Elles peuvent résulter de 3 principales causes à savoir alimentaires, biologiques et médicamenteuses. Ces principales causes sont résumées dans la **figure 3** et décrites ci-dessous.

1.5.1. Causes alimentaires

Les faibles apports alimentaires en folates constituent la principale cause des carences en folates chez l'Homme (WHO 2008). Les causes alimentaires des carences en folates peuvent résulter soit d'un régime alimentaire naturellement pauvre en folates ou des procédés de transformation et de conservation des aliments susceptibles de réduire les teneurs en folates dans les produits alimentaires.

Dans le premier cas, selon les teneurs en folates dans les aliments, certains aliments sont de bonnes sources alimentaires de folates. Parmi ces aliments, figurent le foie (136-963 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de matière fraîche (MF)), les légumes à feuilles vertes (88-187 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF), d'autres légumes verts tels que les asperges (108 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF), les choux de Bruxelles (101 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF) et le brocoli (114 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF), les légumineuses (140-540 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF non transformée), les noix (39-169 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF), les aliments à base de céréales (26-170 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF pour les produits à base de grains entiers), et quelques fruits tels que les oranges (27-42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF), les fraises (36-65 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF) et les cerises (52-75 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF) (FAO/WHO 2005; Souci, Fachmann, and Kraut 2000; USDA 2015).

Cependant, la fréquence de consommation des aliments est aussi très importante puisque même si certains aliments sont très riches en folates mais consommés de manière saisonnière, des carences en folates des populations peuvent être observées (Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

Dans le deuxième type de causes alimentaires des carences en folates, certains procédés de transformation et de conservation des aliments contribuent fortement aux pertes en folates. Le **tableau 2** présente quelques exemples de l'évolution des teneurs en folates lors de différentes étapes des procédés de transformation des aliments. D'après les données de la littérature, le décorticage, le séchage solaire, le trempage, la cuisson peuvent induire des pertes en folates (Witthöft *et al.* 1999).

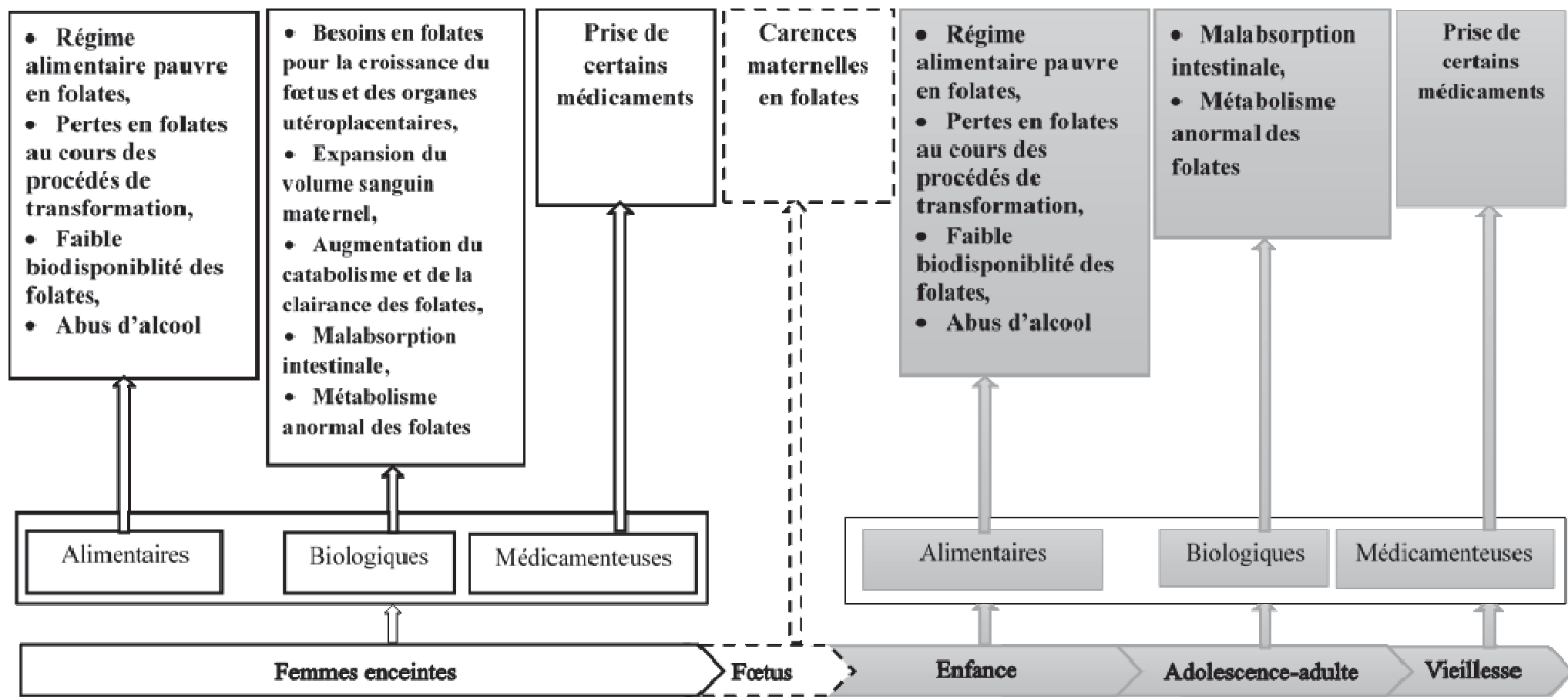


Figure 3: Causes des carences en folates

Dans le cas des céréales, les folates localisés majoritairement dans les couches externes des grains sont perdus suite au décorticage des grains, ce qui explique les faibles teneurs en folates des farines raffinées (10-17 $\mu\text{g}/100\text{g MF}$) par rapport à celles des produits à base de grains entiers (26-170 $\mu\text{g}/100\text{g MF}$) (Promeranz 1988). Lors de la cuisson, et en particulier la cuisson hydrothermale durant laquelle les folates peuvent diffuser dans l'eau, d'importantes pertes en folates ont été enregistrées en particulier lorsque le degré de fragmentation est important quand les aliments sont trempés dans l'eau (Witthöft *et al.* 1999). En effet plus le rapport surface /volume est grand, plus les pertes en folates par diffusion sont importantes (Czarnowska and Gujska 2012).

Lorsque les aliments sont exposés à l'oxygène ou à d'autres agents oxydants (par exemple au cours du stockage qui peut durer plusieurs mois), les folates peuvent s'oxyder (Sotiriadis and Hoskins 1982). Pour prévenir l'oxydation des folates, ils peuvent être protégés par des antioxydants, soit naturellement présents dans les aliments comme l'acide ascorbique soit ajoutés durant la préparation des aliments. Par exemple, Sotiriadis et 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 les pertes en folates durant un stockage de six mois. L'exposition à la lumière peut également induire des pertes en folates par photo-décomposition sous l'action des UV. Par exemple, de l'acide folique ajouté dans des jus de fruits 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 β -lactoglobuline, l'albumine de sérum bovine et l' α -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 les protégeant ainsi des agents oxydants (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Au contraire, le fractionnement, de certains aliments, comme les grains de céréales, pourrait augmenter l'exposition des folates à ces facteurs et donc induire des pertes importantes en folates.

Tableau 2 : Influence des procédés de transformation sur les folates dans les aliments céréaliers

Procédés	Matières premières	Aliments/produits finaux	Conditions	Influence	Références
Cuisson/chauffage	Mil	<i>Ben-saalga</i> (bouillie à base de mil)	80°C, 5 mn	Sans influence	(Saubade <i>et al.</i> 2018)
	Seigle	Pain de seigle	200 °C, 60 mn	-25 %	(Kariluoto <i>et al.</i> 2004)
	Blé	Pain de blé	200 °C, 15 mn	-37 %	(Kariluoto <i>et al.</i> 2004)
	Soja	Soja	Blanchiment (85 °C, 5 mn)	-26 %	(Arcot <i>et al.</i> 2002)
	Brocoli	Brocoli	25-140 °C, 30 mn	-22 à -49 %	(Munyaka <i>et al.</i> 2010)
	Lait	Lait pasteurisé	Pasteurisation (62.5°C, 30 mn micro-ondes) ou chauffage (40°C, 10 mn)	0 à -16 %	(Donnelly-Vanderloo, O'Connor, and Shoukri 1994)
Cuisson hydrothermique	Haricot blanc	Haricot blanc	100 °C, 10-40 mn, dans de l'eau distillée / un mélange d'eau et d'huile (ratio graine / eau : 1 / 80 g / mL)	-11 à -85 %	(Xue <i>et al.</i> 2011)
	Riz	Riz	Conditions non déterminées	-16 à -39 °C	(Wieringa <i>et al.</i> 2014)
Fractionnement	Blé	Fraction de blé	Séparation électrostatique des fractions de son de blé	-37 % à 23 %	(Hemery <i>et al.</i> 2011)
	Riz	Riz polis	Degré de polissage 10 %	-88 %	(Monks <i>et al.</i> 2013)
Trempage	Haricot blanc	Haricot blanc	0-12 h ; ratio graine / eau à 1 / 3 ou 1 / 7	-1 à -45 %	(Xue <i>et al.</i> 2011)
	Soja	Soja	24 h / 30 °C dans l'eau de robinet sans ajout de BL ou 16 h / 20 °C dans l'eau de robinet	-27 à -59 %	(Mo <i>et al.</i> 2013)
Stockage	Niébé et gombo	Niébé et gombo	Stocké en conserve pendant 3 à 24 semaines	-39 % à -76 %	(Sotiriadis and Hoskins 1982)
	Choux de Bruxelles	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 à -18 °C	0 à -99 %	(Czarnowska and Gujska 2012)
	Poudre de lait entier	Poudre de lait entier	60-70 °C, 1 à 8 semaines	-53 à -100 %	(Ford, Hurrell, and Finot 1983)

Source : Saubade *et al.* 2017

1.5.2. Causes biologiques

Les carences en folates peuvent résulter des troubles de l'absorption (maladies cœliaques), du transfert et du métabolisme des folates ou encore de l'état physiologique des individus (Carmel 2008; Tamura and Picciano 2006). Dans ce dernier cas, au cours de la grossesse, les carences en folates sont principalement dues à une augmentation de la demande en folates pour les besoins de croissance du fœtus et des organes utéroplacentaires, ou à une dilution des folates du fait de l'augmentation du volume sanguin maternel (Tamura and Picciano 2006). Les carences en folates peuvent aussi être liées à un catabolisme accru des folates, ou à une augmentation de la clairance et de l'excrétion des folates pendant la grossesse (Tamura and Picciano 2006).

Chez les personnes âgées, les troubles de l'absorption, du transfert et du métabolisme liés au vieillissement, constituent les principales causes de carences en folates (Petridou *et al.* 2016).

1.5.3. Causes médicamenteuses

La prise de certains médicaments associée à la consommation alimentaire peut réduire la biodisponibilité des folates conduisant à des carences. Les médicaments qui sont susceptibles d'influencer négativement le statut en folates appartiennent à plusieurs classes thérapeutiques dont les anticonvulsifs (phénytoïne, phénobarbital, primidone et dilantine), les antiulcéreux antagonistes des récepteurs H-2 (cimétidine), les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les contraceptifs, les anticancéreux (méthotrexate, perimetrexed, pralatrexate), les antipaludiques antifoliniques (pyriméthamine) et la sulfasalazine pour le traitement de la colite ulcéreuse chronique (Allen 2008; Visentin, Zhao, and Goldman 2012).

Dans la plupart des cas, le mécanisme d'action de ces groupes thérapeutiques à l'origine des carences en folates reste encore peu élucidé, mais l'étape de déconjugaison des folylpolyglutamates en mono-glutamates avant absorption constitue la cible de la plupart de ces médicaments. C'est le cas des antipaludiques tels que la pyriméthamine, largement utilisée sous forme de sulfadoxine-pyriméthamine dans de nombreux pays africains pour prévenir le paludisme pendant la grossesse (Hyde 2005) ou encore des contraceptifs (Allen 2008; Visentin, Zhao, and Goldman 2012; Fehr 1974). Pour les antagonistes du récepteur H-2 tels que la cimétidine, l'inhibition de la sécrétion de la pepsine semble être la principale cause de réduction de la biodisponibilité des folates (Binder and Donaldson 1978).

1.6. Conséquences des carences en folates

Les carences en folates peuvent induire des conséquences sanitaires plus ou moins spécifiques à l'âge, à l'état physiologique ou encore à des organes spécifiques chez l'Homme. Les conséquences des carences en folates sont présentées sur la **figure 4** et décrites en dessous.

1.6.1. Au cours de la grossesse et de l'enfance

Les folates jouent un rôle crucial dans les premiers instants de la vie intra-utérine (Tamura and Picciano 2006). Le développement neuropsychique de l'enfant a lieu au cours des 1000 premiers jours de l'enfant, c'est-à-dire de la conception à la date du deuxième anniversaire de l'enfant (Barker 2012) et une carence maternelle en folates au cours de la gestation ou chez l'enfant pendant cette période peut être un facteur limitant (Nabarro 2013; Matoth *et al.* 1979). Au cours de la vie intra-utérine, les carences maternelles en folates sont responsables de malformations du tube neural dont les formes les plus répandues sont le spina bifida et l'anencéphalie (Iyer and Tomar 2009). Elles résultent de l'absence de fermeture normale du tube neural formant la colonne vertébrale, la moelle épinière, le crâne et le cerveau, entre le vingt unième et le vingt huitième jour à compter de la date de conception (March of Dimes Birth Defects Foundation 2006). En outre, étant donné le rôle des folates dans le renouvellement cellulaire de l'organisme, les folates sont très importants pendant les périodes de croissance accélérée, comme l'enfance, la grossesse (Matoth *et al.* 1979; Scott, Rébeillé, and Fletcher 2000). Le faible statut maternel en folates a également été associé à des naissances prématurées et à des faibles poids à la naissance (Iyer and Tomar 2009).

1.6.2. Chez les adolescents, les adultes et les personnes âgées

Les folates agissent comme un transporteur de carbone pour la formation de l'hème, et une déficience peut engendrer des anémies macrocytaires (Iyer and Tomar 2009). Des problèmes de santé liés aux carences en folates comme la diarrhée, les douleurs abdominales, des ulcères buccaux et pharyngés, ont été rapportés chez des adolescents et des adultes (Eitenmiller, Ye, and Landen 2008; Kim 2007). L'apport insuffisant en folates est associé à une forte concentration sanguine d'homocystéine qui a pour conséquence d'augmenter le risque des maladies cardio-vasculaires (Iyer and Tomar 2009).

La dépression est l'une des morbidités caractéristiques des personnes âgées (Petridou *et al.* 2016). Cette dépression favorise la réduction des performances cognitives et l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Hinterberger and Fischer 2013).

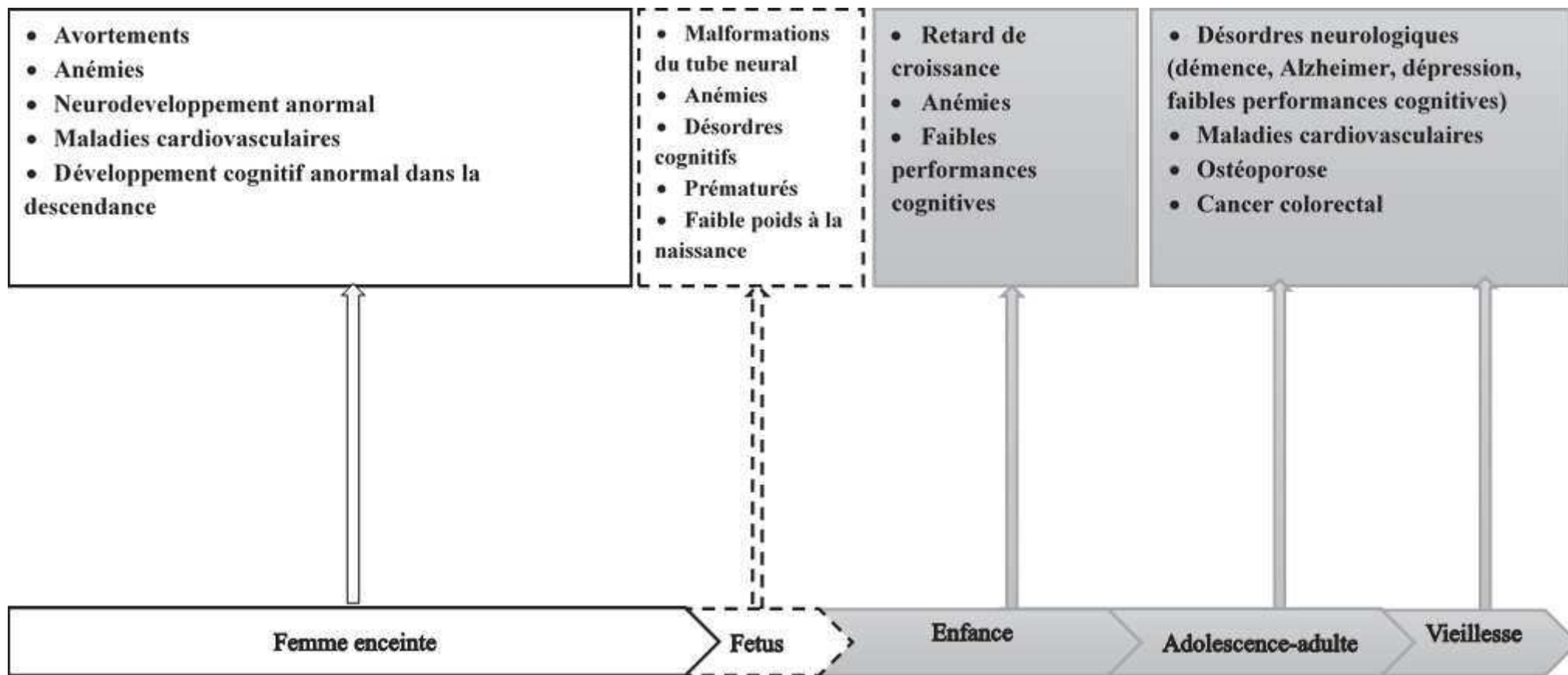


Figure 4 : Conséquences des carences en folates

La S-adénosylméthionine constitue le principal donneur de méthyles dans de nombreuses réactions de méthylation dans le cerveau (Petridou *et al.* 2016). Les carences en folates provoquent une hypo-méthylation dans le cerveau à l'origine de la pathogenèse de la dépression et de la maladie d'Alzheimer (Fuso and Scarpa 2011).

2. Statut en folates des femmes et des enfants en Afrique et stratégies de lutte

2.1. Statut en folates des femmes et des enfants en Afrique

Dans la littérature, il n'existe pas de données sur la prévalence globale des carences en folates aussi bien dans le monde qu'en Afrique. En Afrique la plupart des données sur le statut en folates des groupes vulnérables notamment des femmes et des enfants dérivent des enquêtes nutritionnelles et alimentaires locales non représentatives de la population générale. De plus les indicateurs d'estimation du statut en folates (concentrations sériques ou plasmatiques des folates, apports alimentaires journaliers en folates etc.) des populations varient d'un pays à un autre, rendant la comparaison des données relatives au statut en folates difficile. Bien que ces résultats d'enquêtes utilisent des indicateurs différents et ne concernent pas la population générale, ils montrent cependant que les carences en folates au sein des groupes vulnérables comme les femmes et leurs enfants constituent un problème important de santé dans la plupart des pays africains (**Tableau 3**).

Tableau 3. Prévalence des carences en folates chez les femmes et chez les enfants en Afrique (Données disponibles de 2005 à 2017)

Population	Pays	Groupe d'âge (années)	Taille de l'échantillon	Méthode d'étude	Valeurs Seuils (nmol/L)*	Statut en folate		Références
						PC =Prévalence des carences en folates (%)	AF= Apports journaliers en folates (µg/jr) PA=Prévalence de l'adéquation des apports en folates (%)	
Femmes	Burkina Faso	15-49	178	Rappel de 24 h	ND	AF= 253; PA= 12		(Becquey and Martin-Prevel 2010)
		15-49.	457 ^a ; 455 ^b	Rappel de 24 h	ND	AF= 150 ^a ; 276 ^b ; PA= 5 ^a ; 20 ^b		(Arsenault <i>et al.</i> 2014)
	Cameroun	15-49	900	Folates plasmatiques; Rappel de 24 h	10	PC =17.3; PA=41; AF=285		(Shahab-Ferdows <i>et al.</i> 2015)
	Côte d'Ivoire	15-49	734	Folates plasmatiques	10	PC=86.1		(Rohner <i>et al.</i> 2014)
	Ethiopie	15-49	970	Folates sériques	10	PC= 31.3		(Haidar, Melaku, and Pobocik 2010)
	Mali	15-49	102	Rappel de 24 h	ND	AF= 131; PA= 0		(Kennedy <i>et al.</i> 2010)
	Mozambique	14-19	448	Folates sériques	10	PC= 4.1		(Korkalo <i>et al.</i> 2015)
	République Démocratique de Congo	18-45	641 ^c ; 796 ^d	Folates sériques	6.8	PC= 0.7 ^c -1.0 ^d		(Harvey-Leeson <i>et al.</i> 2016)
	Sierra Leone	15-49	871	Folates plasmatiques	10	PC = 79.2		(Wirth <i>et al.</i> 2016)
Enfants	Afrique du Sud	12-36 mois	55 ^e ; 65 ^f	Questionnaire de fréquence de consommation	ND	AF= 84.2 ^e ; 92.8 ^f ; 97.2 ^g , 98.2 ^h .		(Balogun, Lombard, and McLachlan 2015)
	Burkina Faso	36-59 mois	425 ^a ; 448 ^b	Rappel de 24 h	ND	AF= 91 ^a ; 175 ^b PA= 28 ^a ; 64 ^b		(Arsenault <i>et al.</i> 2014)
	Cameroun	12-59-mois	677	Folates plasmatiques; Rappel de 24 h	10	PC= 8.4; PA=61; AF= 136		(Shahab-Ferdows <i>et al.</i> 2015)
	Ethiopie	4-15	74	Folates sériques	10	PC =13.9		(Herrador <i>et al.</i> 2014)
	Sénégal	5-17	545	Rappel de 24 h	ND	AF= 50; PA : 0		(Fiorentino <i>et al.</i> 2016)

^a Période de soudure (Juillet-Septembre); ^bPériode post-récolte (Décembre-Juin), ^cSud-Kivu, ^dCongo central, ^eFilles de Avian Park, ^fFilles de Zweletemba, ^gGarçons de Avian Park, ^hGarçons de Zweletemba; * Concentrations seuil en folates sériques
ND: Non Disponible

Globalement, les carences en folates chez les femmes et chez les enfants en Afrique varient de 0,7% (République Démocratique du Congo) à 86,1% (Côte d'Ivoire). La prévalence de l'adéquation des apports en folates est très faible dans tous les pays pour lesquels des données de fréquence de consommation d'aliments sont disponibles.

En **Afrique du Sud**, une enquête nutritionnelle réalisée dans deux communes du Cap en 2011 chez les jeunes enfants a montré que plus de 20% des enquêtés avaient des apports journaliers en folates en deçà des valeurs recommandées (Balogun, Lombard, and McLachlan 2015).

Au **Burkina Faso**, le caractère problématique de ce micronutriment dans le régime alimentaire des enfants et de leur mère a été identifié dans 2 études (Becquey and Martin-Prevel 2010 ; Arsenault et al. 2014). En 2010, seulement 12% des femmes âgées de 15 à 49 ans avaient des apports adéquats en folates à Ouagadougou, capitale du Burkina Faso (Becquey and Martin-Prevel 2010). En 2014, la probabilité de couverture des besoins en folates chez les femmes et leurs enfants était extrêmement faible, respectivement de 0,05 et 0,28 pendant la période de soudure, avec cependant une amélioration significative de celle-ci pendant la période post-récolte, c'est-à-dire de Novembre à Janvier (Arsenault *et al.* 2014).

Au **Cameroun**, 17,3% et 8,4% des femmes et des enfants, respectivement, étaient carencés en folates (Shahab-Ferdows *et al.* 2015). Par ailleurs la prévalence de l'inadéquation de la couverture des besoins en folates était de 59% chez les femmes en âge de procréer (Shahab-Ferdows *et al.* 2015). Cependant la prévalence des carences en folates au sein de la population d'étude était dépendante de la zone de résidence avec 13% dans le Sud du Cameroun contre 26% à Yaoundé/Douala (Shahab-Ferdows *et al.* 2015).

En **Côte d'Ivoire**, 86,1% des femmes en âge de procréer présentaient des carences en folates (Rohner *et al.* 2014). Tout comme au Cameroun, la prévalence des carences en folates reste fortement dépendante de la zone de résidence avec 96% de carence en folates à Abidjan, la capitale du pays (Rohner *et al.* 2014).

En **Ethiopie**, dans une enquête nutritionnelle conduite en 2010 auprès de 940 femmes en âge de procréer, près de la moitié de la population (46.1%) était carencée en folates (Haidar, Melaku, and Pobocik 2010). Selon une autre étude de 2014, 13,9% des enfants d'âge scolaire souffraient de carences en folates (Herrador *et al.* 2014).

Au **Mali**, la probabilité d'adéquation des apports alimentaires en folates chez les femmes en âge de procréer dans les zones urbaines maliennes était quasi nulle en 2010 (Kennedy *et al.* 2010).

Au **Mozambique**, la prévalence des carences en folates parmi les adolescentes mozambicaines était de 4,1% (Korkalo *et al.* 2015). De très faibles concentrations sériques en folates ont été rapportées dans les zones urbaines comparativement aux zones rurales (Korkalo *et al.* 2015) soulignant ainsi les carences en folates comme problème de santé dans la population.

La **République Démocratique de Congo** est l'un des pays africains avec le moins de problèmes puisque moins de 1% des mères et leurs enfants présentaient des carences en folates dans les zones du Sud Kivu et du Centre du Congo (Harvey-Leeson *et al.* 2016).

Au **Sénégal**, une enquête nutritionnelle portant sur les apports alimentaires en micronutriments des enfants d'âge scolaire à Dakar a révélé que 100% des enfants enquêtés avaient des apports inadéquats en folates (Fiorentino *et al.* 2016).

En **Sierra Léone**, une étude de 2016 a montré que 79,2% des femmes souffraient des carences en folates (Wirth *et al.* 2016).

2.2. Stratégies de lutte contre les carences en folates en Afrique

La lutte contre les carences en folates des groupes de populations vulnérables est mise en place dans plusieurs pays africains. Elle est basée sur les trois principales stratégies pour prévenir et lutter contre les carences en folates à l'échelle mondiale. Il s'agit de la prise de suppléments d'acide folique seul ou en combinaison avec d'autres micronutriments, la consommation d'aliments fortifiés en acide folique, et de la diversification alimentaire avec prise en compte d'aliments riches en folates dans le régime alimentaire (Bhutta, Salam, and Das 2013). Cependant, l'application effective de chaque stratégie est fonction du contexte alimentaire et nutritionnel de chaque pays africain.

2.2.1. Prise de suppléments d'acide folique

Les données sur l'implémentation des programmes de supplémentation des aliments en acide folique dans les pays africains sont éparses. Les études d'estimation de l'effet des programmes de supplémentation d'acide folique sont quasi-inexistantes. Selon les données présentées sur le **tableau 4**, les informations relatives à la prise de suppléments d'acide folique sont disponibles seulement dans 14 pays africains avec, en plus, de grandes variations

en terme de population cible et de proportions de femmes suivant correctement les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Dans la plupart des pays africains, les suppléments d'acide folique sont destinés aux femmes enceintes. La couverture de ces programmes de supplémentation est faible et limitée. Dans le meilleur des cas, 63% des femmes enceintes suivent correctement les recommandations de l'OMS (SPRING/USAID 2016). Dans les autres pays, cette proportion varie de 1,4% à 50%.

Tableau 4. Supplémentation périconceptionnelle en acide folique dans les pays Africains

Régions africaines	Pays	Années d'étude	% de femmes qui reçoivent les suppléments d'acide folique (400 µg/jr) au cours de la grossesse	Population bénéficiaire des programmes nationaux
Afrique Centrale	Cameroun	2011	54,0	Adolescentes Femmes enceintes
	Congo	2011-2012	43,0	Femmes enceintes
	Malawi	2010	32,0	Femmes enceintes
Afrique de l'Est	Rwanda	2010	1,4	Femmes enceintes
	Tanzanie	2010	3,5	Femmes enceintes
	Uganda	2011	3,9	Adolescentes Femmes en âge de procréer Femmes enceintes
	Benin	2011-2012	29,0	Femmes enceintes
	Burkina Faso	2010	50,0	Femmes en âge de procréer Femmes enceintes
	Guinée	2012	41,0	Adolescentes Femmes en âge de procréer Femmes enceintes
Afrique de l'Ouest	Mali	2012-2013	18,0	Femmes enceintes
	Niger	2012	29,0	Femmes enceintes
	Senegal	2010-2011	63,0	Femmes en âge de procréer Femmes enceintes
Afrique du Sud	Madagascar	2008-2009	7,6	Femmes en âge de procréer Femmes enceintes
	Zimbabwe	2010-2011	4,9	Femmes enceintes

Source: National Anemia Profiles. <https://www.spring-nutrition.org/publications/series/national-anemia-profiles> (SPRING/USAID 2016).

2.2.2. Consommation d'aliments fortifiés en acide folique

La fortification ou l'enrichissement des aliments à l'acide folique peut être réalisé à domicile (« home fortification »), à l'échelle industrielle ou semi-industrielle. La technique de fortification à domicile récemment introduite dans la plupart des pays africains repose sur l'utilisation d'une poudre de micronutriments multiples appelés « Multiple micronutrient powders » (MNP) (De-Regil *et al.* 2011). Cette formulation à dose unique renfermant plusieurs vitamines et minéraux dont l'acide folique (150 µg de folates équivalent à 88 µg d'acide folique) peut être ajoutée à tout aliment semi-solide destiné à la consommation des enfants (De-Regil *et al.* 2011).

Quant à la fortification semi-industrielle ou industrielle, des programmes sont en place dans plusieurs pays d'Afrique. Ces programmes incluent la fortification volontaire ou obligatoire (Eichholzer, Tönz, and Zimmermann 2006). La fortification volontaire se définit comme étant l'ajout volontaire de nutriments par des compagnies agro-alimentaires à des aliments non recommandés par l'autorité politique alors que la fortification obligatoire relève d'une obligation étatique sur la base de textes faisant références aux aliments recommandés et aux quantités de nutriments à ajouter (Allen *et al.* 2006). En 2017, la farine de blé a été fortifiée à l'acide folique dans 17 pays Africains, et les farines de blé et de maïs l'ont été dans 9 pays Africains (FFI 2017). Ceci montre que la fortification obligatoire est en place en Afrique et que la farine de blé constitue le principal véhicule utilisé dans ces programmes de fortification. Cependant, le blé n'est pas une céréale communément cultivée en Afrique et les céréales les plus largement utilisées dans le régime alimentaire incluent le sorgho, le mil, le maïs et le riz (Galati *et al.* 2014). En outre, la farine de blé fait l'objet d'importation dans la plupart des pays africains, rendant son accessibilité incertaine à la population (FFI 2017).

2.2.3. Sources alimentaires de folates

De façon générale, les aliments riches en folates incluent le foie, organe par excellence de stockage des folates (136-963 µg/100 g MF), les légumes à feuilles vertes (88-187 µg/100 g MF), les légumineuses (140-540 µg/100 g MF), les amandes (39-169 µg/100 g MF) (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Cependant, en dépit de leur concentration relativement faible en folates (26-170 µg/100 g MF pour les grains entiers de céréales), les céréales peuvent aussi être considérées comme d'importantes sources en folates au regard de leur fréquence de consommation dans le monde, particulièrement en Afrique (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). En effet, pour identifier un aliment comme étant une bonne source en folates, non seulement

ses teneurs en folates mais aussi sa fréquence de consommation devraient être prises en compte (Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

Dans beaucoup de pays africains, la diversification du régime alimentaire constitue un facteur limitant dû en partie aux conditions agro-écologiques contraignantes et aux variations saisonnières (Arsenault *et al.* 2014). Les habitudes alimentaires constituent aussi un frein important à la diversification alimentaire dans cette partie du monde (Semba 2012). De plus, les procédés de transformation des aliments influencent beaucoup les teneurs en folates et il est possible de les utiliser pour améliorer les teneurs en folates dans les plats.

3. Procédés de fabrication permettant d'améliorer les teneurs en folates dans les aliments

Trois principaux procédés de transformation des aliments peuvent permettre une amélioration des teneurs en folates dans les aliments. Il s'agit de la fermentation, de la germination, et du fractionnement des céréales (Jägerstad *et al.* 2005). Ces moyens sont résumés sur le **tableau 5** et décrits ci-dessous.

Tableau 5: Procédés de fabrication permettant d'améliorer les teneurs en folates dans les aliments

Procédés	Matières premières	Aliments	Conditions	% d'augmentation	Références
Fermentation	Mil (<i>Pennisetum glaucum</i>)	bouillie à base de mil	37°C ; 24h ; cultures pures de <i>Lactobacillus fermentum</i> 8.2 ou <i>Lactobacillus fermentum</i> 8.2 et <i>Pichia kudriavzevii</i> M28	+150%	(Greppi, Saubade, <i>et al.</i> 2017)
	Maïs	Bouillie à base de maïs	30°C ; 46h ; Cultures pures de <i>Candida glabrata</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		(Hjortmo, Hellström, and Andlid 2008)
Germination	Mil	Mil trempé	16h, eau de robinet, 30°C	+26% à +31%	(Saubade <i>et al.</i> 2018)
	Blé	Grains germés	20-35°C ; 48h	+200 à 336%	(Crittenden, Martinez, and Playne 2003)
	Seigle	Grains de seigle germés	5-25°C ; 6jours	+70 à 280%	(Kariluoto <i>et al.</i> 2006)
Fractionnement	Seigle, avoine, orge	Enveloppes externes (son)	Incorporation des fractions riches en folates dans les aliments	ND	(Jägerstad <i>et al.</i> 2005)

ND : Non déterminé

3.1. Fermentation

La fermentation est l'un des moyens à la portée des populations pauvres pour augmenter leurs ingérés en folates (**Tableau 6**) (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). L'augmentation des teneurs en folates au cours de la fermentation résulte de la production des folates par les acteurs de la fermentation dont les bactéries lactiques (BL) et les levures (LeBlanc *et al.* 2008; Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Une récente revue a rapporté une production de folates variable de 2 à 16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF dans différentes matrices céréalières, de 1 à 7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF dans les légumineuses, de 1 à 2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF dans les fruits, et plus de 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF dans les produits laitiers (Saubade, Hemery *et al.* 2017).

Les matrices alimentaires étudiées sont majoritairement les produits laitiers, ces derniers étant les plus consommés dans les pays développés. Pour ce qui concerne les céréales, les études de production de folates par les BL ont été réalisées principalement sur du pain de seigle et d'avoine très consommés dans les pays comme la Finlande et la Suède (Kariluoto *et al.* 2004; Kariluoto *et al.* 2006; Kariluoto *et al.* 2014). Les matrices céréalières africaines restent peu étudiées même si des études récentes se sont intéressées à une bouillie fermentée de mil utilisée comme aliment de complément destiné aux jeunes enfants en Afrique subsaharienne (Greppi, Saubade, *et al.* 2017; Saubade, Humblot, *et al.* 2017; Saubade *et al.* 2018). Dans l'ensemble, une production de folates variable de 2 à 16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ MF a été rapportée dans les produits céréaliers fermentés (Kariluoto *et al.* 2004; Kariluoto *et al.* 2006; Kariluoto *et al.* 2014; Greppi, Saubade, *et al.* 2017) Cependant la capacité de production des folates au cours de la fermentation lactique n'est pas systématique puisqu'elle est dépendante des espèces et des souches bactériennes (LeBlanc *et al.* 2008; LeBlanc *et al.* 2011). En effet, les BL peuvent produire ou consommer les folates dans les aliments fermentés (LeBlanc *et al.* 2008; LeBlanc *et al.* 2011; Moslehi-Jenabian, Lindegaard, and Jespersen 2010). De plus, les conditions de culture peuvent aussi influencer la capacité à produire des folates (Lin and Young 2000; Sybesma *et al.* 2003; Greppi, Hemery, *et al.* 2017). Par exemple, les souches *L. bulgaricus* ABM 5096 et *S. thermophilus* ABM 5097 produisent des folates au cours de la fermentation du pain de seigle au levain, alors qu'au cours de la fermentation du lait, la capacité de production des folates de *L. bulgaricus* ABM 5096 n'a pas été établie (Rao *et al.* 1984).

Tableau 6. Production de folates par les BL dans différentes matrices alimentaires fermentées

Matières première	Teneurs en folates avant fermentation (µg/100g MS)	Aliments fermentés	Teneurs en folates après fermentation (µg/100g MS)	Identification des vitamines	BL productrices de folates	Références
Lait	ND	Lait fermenté	1-7 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	(Lin and Young 2000)
	1.15 µg/100 g	Lait fermenté	4-5 µg/100 g	ND	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Crittenden, Martinez, and Playne 2003)
	1.15 µg/100 g	Lait fermenté	4 µg/100 g	ND	<i>Bifidobacterium breve</i>	(Crittenden, Martinez, and Playne 2003)
	1.15 µg/100 g	Lait fermenté	2-3 µg/100 g	ND	<i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	(Crittenden, Martinez, and Playne 2003)
	0.5 µg/100 g	Lait fermenté	1.5-4.5 µg/100g	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Holasoava <i>et al.</i> 2004)
	0.66 µg/100 g	Lait fermenté	0.8-1.14 µg/100	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Bifidobacterium longum</i> ,	(Holasoava <i>et al.</i> 2004)
	2-3 µg/100 mL	Lait fermenté	5-10 µg/100 mL	ND	<i>Bifidobacterium longum</i>	(Lin and Young 2000)
	3-5 µg/100 mL	Lait fermenté	25-28 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus amylovorus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(Laiño <i>et al.</i> 2014)
	4-6 µg/100 mL	Lait fermenté	8-18 µg/100 mL	ND	<i>L. delbrueckii</i> and <i>S. thermophilus</i>	(Laiño <i>et al.</i> 2013)
	ND	Lait fermenté	1.18-2.52 µg/100 g	H ₄ folates	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	0.04-3.07 µg/100 g	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	1.48-2.15 µg/100 g	5-CHO-H ₄ folates	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	1.65-2.16 µg/100 g	H ₄ folates	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	0.56-0.76 µg/100 g	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	0.35-0.053 µg/100 g	5-CHO-H ₄ folates	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	2.82 <i>Lb. lactis</i>	H ₄ folates	<i>Lactobacillus. lactis</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	2.43 <i>Lb. lactis</i>	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Lactobacillus lactis</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	1.05 <i>Lb. lactis</i>	5-CHO-H ₄ folates	<i>Lactobacillus lactis</i>	(Sanna <i>et al.</i> 2005)
	ND	Lait fermenté	0.2-7 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus sp.</i>	(Dana <i>et al.</i> 2010)
	2.3-2.9 µg/100 g	Lait fermenté	5-11.1 µg/100 g	ND	<i>Lactobacillus. lactis</i>	(Ayad 2009)
	0.2-0.4µg/100 mL	Lait fermenté	1.25 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus cremoris</i>	(Gangadharan <i>et al.</i> 2010)
	0.2-0.4µg/100 mL	Lait fermenté	1.42 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus. lactis</i>	(Gangadharan <i>et al.</i> 2010)
	0.2-0.4 µg/100 mL	Lait fermenté	0.2-2 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri 2011)
	ND	Lait fermenté	2-5 µg/100 mL	ND	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Iyer <i>et al.</i> 2011)
	1-2 µg/100 g	Lait fermenté	10-11 µg/100 g	ND	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Wouters <i>et al.</i> 2002)
	4-5 µg/100 g	Lait fermenté	5-20 µg/100 g	ND	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Padalino <i>et al.</i> 2012)

	2-3 µg/100 mL	Lait fermenté	7-8 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	(Laiño, LeBlanc, and Savoy de Giori 2012)
Céréales	ND	Levain d'avoine	15-17 µg/100 g	ND	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	(Kariluoto <i>et al.</i> 2014)
	4-6 µg/100 g	Levain de seigle	8-13 µg/100 g	ND	<i>Streptococcus thermophilus</i>	(Kariluoto <i>et al.</i> 2006)
	4-6 µg/100 g	Levain de seigle	8.1	ND	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(Kariluoto <i>et al.</i> 2006)
	0-3,3 µg/100 g	Bouillie fermentée de mil	7 µg/100 g	ND	<i>Lactobacillus. fermentum 8.2</i>	(Saubade, Humblot, et al. 2017; Greppi, Saubade, <i>et al.</i> 2017)
Légumes	10-11µg/100 g	Melange chou blanc fermenté	10-16 µg/100g	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis/cremoris Leuconostoc sp.</i>	(Jägerstad, Jastrebova, and Svensson 2004)
	29µg/100g	Mélange betterave fermentée	11-17 µg/100g	5-CH ₃ -H ₄ folates	<i>Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis/cremoris Leuconostoc sp.</i>	(Jägerstad, Jastrebova, and Svensson 2004)
	1µg/100 mL	Concombre fermenté	5-7 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri 2011)
Fruit	1-2 µg/100 mL	Jus de pastèque fermenté	2-3 µg/100 mL	ND	<i>Lactobacillus. lactis</i>	(Gangadharan and Nampoothiri 2011)

ND: non déterminé

Les levures sont capables de produire des folates (Patring *et al.* 2005). La production de folates par les levures dans différentes matrices alimentaires fermentées est présentée dans le **tableau 7**. Il a été rapporté que la levure de bière, *Saccharomyces cerevisiae* produit entre 24,5-35,2 µg/100 g MS de folates (Seyoum and Selhub 1998; Patring *et al.* 2005). Ce qui explique que les produits fermentés tels que le pain au levain à base de seigle ou d'avoine, ou des boissons fermentés (vin et bière) soient riches en folates (Seyoum and Selhub 1998; Forssén *et al.* 2000; Ndaw *et al.* 2001; Gujska and Kuncewicz 2005; Kariluoto *et al.* 2006; Kariluoto *et al.* 2014).

Tout comme les BL, la production des folates par les levures est aussi espèce et souche dépendantes (Hjortmo *et al.* 2005). Aussi la sélection des souches de levures les plus efficaces ainsi que l'utilisation de co-cultures de souches de levures peuvent permettre d'optimiser les teneurs en folates dans les aliments céréaliers fermentés.

Tableau 7. Production de folates par les levures dans différentes matrices alimentaires fermentées

Teneurs en folates (µg/100g MS)	Aliments fermentés	Teneurs en folates (µg/100g MS)	Folates totaux /Vitamines de folates augmentés	Levures productrices de folates	Références
4-6	Levain de seigle	5.3-23	Folates totaux	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Candida Milleri</i> ; <i>Torulaspora delbrueckii</i>	(Kariluoto <i>et al.</i> 2006; Katina <i>et al.</i> 2007)
21-27	Levain de blé	21-50	10-HCO-H2folates, 5-CH3H4folates,	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Kariluoto <i>et al.</i> 2004; Hjortmo <i>et al.</i> 2008)
2.9	<i>Togwa</i> (Bouillie fermentée de maïs)	1.6-6.9	Folates totaux; H4folates et 5-CH ₃ -H4folates	<i>Candida glabrata</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Hjortmo, Hellström, and Andlid 2008)
2-3.5	Levain de son et de farine d'avoine	4-15	Folates totaux	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ALKO743, ABM5103 and ABM5131 ; <i>Candida milleri</i> ABM4949 ; <i>Kluyveromyces marxianus</i> ABM5130	(Kariluoto <i>et al.</i> 2014; Korhola <i>et al.</i> 2014)
1-4	Levain de son et de farine d'orge	7-15	Folates totaux	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ALKO743 ; <i>Candida Milleri</i> ABM4949 ; <i>Kluyveromyces marxianus</i> ABM5130	(Kariluoto <i>et al.</i> 2014)

L'utilisation combinée de levures et de BL peut aussi être plus efficace dans l'optimisation des teneurs en folates dans les produits fermentés que l'utilisation des monocultures, du fait d'une synergie d'action possible entre les souches de levures et de BL (Greppi, Saubade, *et al.* 2017). Par exemple dans une récente étude, des cofermentations de bouillies de mil utilisant des co-cultures *P. kudriavzevii* M28+ *L. fermentum* 8.2; ou *P. kudriavzevii* M28+ *L. fermentum* 6.9, ont conduit à une augmentation des teneurs en folates après 4 heures de fermentation plus importante que l'utilisation des BL lactiques seules (Greppi, Saubade, *et al.* 2017). De la même manière, la fermentation de farine de seigle, combinant levures et BL (*S. cerevisiae*+ *L. plantarum* + *L. brevis*), permet une augmentation deux fois supérieure au produit fermenté utilisant des monocultures (Katina *et al.* 2007). Cependant, beaucoup d'études montrent que les levures seules peuvent être plus efficaces que leur combinaison avec les BL (Kariluoto *et al.* 2006; Korhola *et al.* 2014). L'une des explications serait que les BL retardent la croissance des levures en abaissant le pH du milieu. Elles peuvent aussi entrer en compétition avec les levures pour l'utilisation de nutriments du milieu (Jägerstad *et al.* 2005). Par exemple, *S. cerevisiae* ABM5131, seule, produit 6 fois plus de folates qu'en co-culture avec *L. rhamnosus* LC-705 dans une solution de son d'avoine à 3.5% et 2% de glucose (Korhola *et al.* 2014).

Dans tous les cas de figures, la quantité de folates produits est dépendante de la cinétique de croissance des microorganismes en présence. Ceci est particulièrement important dans le cas des souches de BL du fait que ces dernières peuvent être à la fois productrices et consommatrices de folates dans un produit fermenté. De nombreuses études rapportent que les folates sont majoritairement synthétisés au cours de la phase de croissance exponentielle ou au début de la phase stationnaire (Hjortmo, Hellström, and Andlid 2008; Iyer, Tomar, and Singh 2010; Padalino *et al.* 2012). Ce fait est aussi un levier qui permettrait d'augmenter les teneurs en folates céréaliers fermentés.

3.2. Trempage/germination

Le trempage d'une céréale dans de l'eau pendant plusieurs heures (24 h à 48 h) permet le déclenchement de la germination ce qui induit la production de folates (Jägerstad *et al.* 2005). La germination peut permettre une augmentation d'un facteur 1 à 5 dans les grains germés comparativement aux grains non germés (Jägerstad *et al.* 2005). Cette production de folates est due à une augmentation de la demande en groupes méthyles, impliquant une synthèse *de novo* des folates pour satisfaire cette demande indispensable à la croissance de la plantule

(Hefni and Witthöft 2011). La quantité de folates produits au cours de la germination est dépendante de la température de germination. Hefni *et al.* (2011) ont montré que la production de folates était plus importante lorsque les grains sont entreposés à 30°C plutôt qu'à 20°C ou à 35°C. De plus, la quantité de folates produits au cours de la germination est dépendante du temps puisque Koehler *et al.* (2007) ont montré que la quantité de folates n'est pas la même dans les grains germés en 48 h ou 72 h (Koehler *et al.* 2007). Ils ont également montré que le temps de germination a une influence sur la quantité des différents vitamines produits. Le vitamine le plus présent dans les grains non germés est le 5-formyl-THF tandis que les grains germés possèdent majoritairement le 5-méthyl-THF (Koehler *et al.* 2007).

Les grains germés avec de meilleures teneurs en folates peuvent être d'excellents substrats pour la production des aliments fermentés. La combinaison des deux procédés peut aboutir à une synergie d'action sur la quantité de folates dans le produit final (Katina *et al.* 2007).

3.3. Fractionnement/fragmentation

Dans les procédés traditionnels de transformation des céréales en Afrique, le décortilage partiel ou total est souvent une étape préliminaire à l'obtention des farines de céréales. Les grains entiers peuvent aussi être directement concassés ou broyés pour donner des brisures, des semoules ou des farines. La **figure 5** résume les différentes options utilisées traditionnellement pour obtenir des farines de céréales.

Ce traitement de fractionnement ou de fragmentation sépare les enveloppes (son) peu digestibles de l'albumen amylicé (Lestienne 2004). Les folates sont majoritairement localisés dans le son constitué essentiellement du péricarpe, de la testa, de la couche d'aleurone (Jägerstad *et al.* 2005). Toutes les couches constitutives du son n'ont pas le même intérêt, la couche d'aleurone étant la plus riche en folates (Hemery *et al.* 2011).

En Afrique, le son est généralement utilisé pour l'alimentation des animaux domestiques, tandis que la fraction de grains décortiqués, qui contient l'essentiel de l'endosperme et une grande partie du germe est conservée pour la consommation humaine (Lestienne 2004). L'incorporation du son ou des sous parties du son riches en folates dans d'autres produits alimentaires comme les farines de céréales décortiquées qui en contiennent moins peut être un moyen de les enrichir.

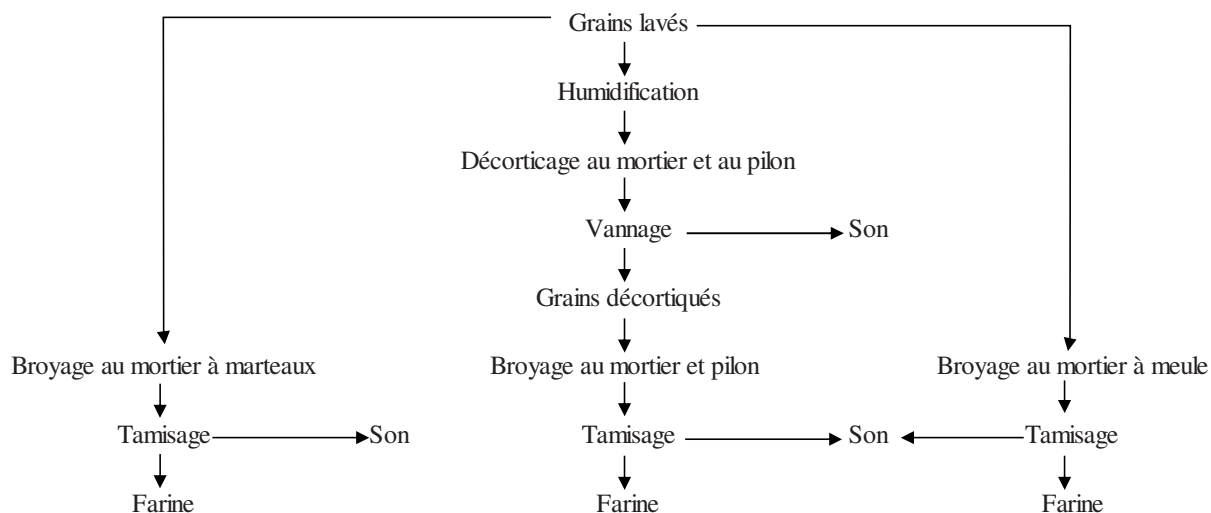


Figure 5: Diagramme des procédés traditionnels utilisables pour la fabrication de farine de céréales (Murty and Kumar 1995)

4. Aliments fermentés à base de céréales en Afrique

4.1. Principales céréales utilisées pour la production des aliments fermentés

En Afrique, les céréales telles que le maïs, le sorgho, le mil, le riz et le blé sont des matières premières majeures pour l'alimentation de la population. Ces céréales sont cultivées sur une surface de près de 98,6 millions d'hectare, avec un rendement de 162 millions de tonnes par an (FAOSTAT 2015) (Tableau 8).

Tableau 8. Production de cultures céréalières en Afrique

Cultures	Surfaces (ha/an)	Production (t/an)
Maïs	34 075 972	70 076 591
Sorgho	23 142 595	23 350 064
Mil	19 998 008	16 008 838
Riz	11 206 813	28 798 202
Blé	10 224 952	24 704 201
Total	98 226 080	162 422 507

Source : FASOTAT/Division des statistiques de la FAO 2015

4.1.1. Le Maïs (*Zea mays*)

Le maïs est la culture alimentaire de base la plus largement pratiquée en Afrique. Des 22 pays au monde où le maïs compose le pourcentage le plus élevé d'apport calorique dans le régime alimentaire national, 16 sont en Afrique, plus particulièrement en Afrique Sub-Saharienne

(ASS) (Nuss and Tanumihardjo 2011). Cette culture couvre presque 17 % des quelques 200 millions ha de terres cultivées en ASS (FAOSTAT 2015). Les pays suivants : l'Afrique du Sud, l'Angola, le Bénin, le Burkina Faso, le Cameroun, la Côte d'Ivoire, l'Éthiopie, le Ghana, le Kenya, le Malawi, le Mali, le Mozambique, le Nigéria, l'Ouganda, la Tanzanie, le Togo, la République Démocratique du Congo (RDC), la Zambie, et le Zimbabwe représentent 96 % de la production totale de maïs en ASS (FAOSTAT 2015). On estime que plus de 300 millions de personnes en ASS dépendent du maïs comme source d'alimentation et de subsistance (FAOSTAT 2015). La culture du maïs est pratiquée dans divers environnements de production et le maïs est consommé par la population avec des préférences alimentaires et des contextes socio-économiques divers.

Si l'ASS a les taux de production de maïs les plus élevés, les taux de consommation sont cependant les plus élevés en Afrique orientale et australe (AOA) où le maïs compose presque la moitié des apports en calories et en protéines tandis qu'il est de un cinquième en Afrique de l'ouest (FAOSTAT 2015).

4.1.2. Le sorgho rouge (*Sorghum bicolor* L. Moench) et le sorgho blanc (*Sorghum vulgare*)

Le sorgho serait originaire d'Afrique, précisément d'Éthiopie où il serait cultivé depuis 5000 à 7000 ans (Tawaba *et al.* 2013). Il s'agit de la deuxième céréale la plus importante après le maïs, et représente 22 % des zones céréalières totales (FAOSTAT 2015). De son centre d'origine, le sorgho aurait suivi les migrations humaines vers l'Ouest et le Sud de l'Afrique et aurait été temporairement isolé dans trois centres de diversifications secondaires dans lesquels il a évolué vers quatre races principales restées inter-fertiles: *caudatum* est-africain, *durra* dans la zone éthiopienne et sahélienne, *guinea* ouest-africain et *kafir* sud-africain. Des migrations plus récentes ont ensuite étendu l'aire de culture du sorgho vers l'Asie, depuis 3000 ans en Inde, puis en Chine, et enfin vers l'Amérique et l'Australie.

En ASS, on distingue trois grands bassins de production de sorgho: le Nord-Ouest du Nigeria, qui s'étend jusqu'au Nord du Cameroun et au Sud du Niger; la zone Sénégal-Gambienne et un bassin moins marqué qui couvre le Burkina Faso et le Nord-Est du Mali (Uher *et al.* 2011).

Le sorgho rouge est principalement cultivé pour ses grains qui sont consommés en l'état ou après transformation. Il est généralement récolté avant les principales cultures vivrières et constitue de ce fait un aliment de soudure en zone rurale (Nebié *et al.* 2012). De plus, les

feuilles et les tiges sont exploitées comme fourrage ou comme combustible. Comparativement au sorgho blanc, le sorgho rouge est une plante mineure dans le système agraire à l'échelle continentale. Sa culture est de plus en plus abandonnée menaçant ainsi la préservation de cette culture céréalière (Sawadogo *et al.* 2014).

4.1.3. Le mil

Le mil regroupe un ensemble de graminées alimentaires annuelles, appartenant à plusieurs genres et espèces et qui ont pour caractéristiques communes le nombre élevé et la petitesse de leurs grains. Parmi les espèces les plus importantes, on peut citer: *Pennisetum glaucum*, *Panicum milaceum*, *Setaria italica*, *Eleusine coracana*, *Paspalum scrobiculatum*, *Digitaria exilis*, *Digitaria iburua* et *Echinochloa crusgalli* (**Tableau 9**).

Le mil et le sorgho, contrairement à la plupart des céréales, sont cultivés dans des régions sèches et sur des terres marginales (sols secs et infertiles) des zones tempérées, subtropicales et tropicales dont la pluviométrie généralement très faible varie entre 300 et 500 mm/an.

Le mil pénicillaire (*Pennisetum glaucum*, *P. typhoides*, *P. typhideum*, *P. americanum* ou *P. spicatum*) également connu sous plusieurs noms vernaculaires tels que mil chandelle ou encore mil perlé, est quantitativement le plus important de toutes les espèces cultivées (environ 76% du total de la production) en raison de son fort potentiel de rendement (Belton and Taylor 2004). C'est l'espèce principalement cultivée en Asie et en Afrique, notamment en Afrique occidentale tropicale où on note la plus grande diversité des variétés cultivées (USDA 2014). Les deux continents se partagent la production mondiale de mil estimée à 29 millions de tonnes par an (USDA 2014). En 2014, le Burkina Faso occupait le septième rang mondial et la cinquième place des producteurs Africains après le Nigéria, le Niger, le Mali et le Soudan (USDA 2014).

Tableau 9. Origines, noms scientifiques et communs des principaux types de mils (McDonough and Rooney 2000)

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

4.1.4. Le riz

Le riz est devenu un produit prioritaire pour la sécurité alimentaire en Afrique. La consommation augmente plus rapidement que pour tout autre produit de base majeur sur le continent du fait de la croissance démographique importante, de l'urbanisation rapide et de l'évolution des habitudes alimentaires (Seck *et al.* 2013). Il s'agit de la plus importante source d'apports caloriques en Afrique occidentale et la troisième pour l'ensemble du continent africain. Bien que la production locale de riz ait augmenté rapidement après la crise alimentaire de 2007-2008, un problème essentiel auquel le secteur du riz est confronté en Afrique en général est que la production locale n'a jamais égalé la demande. Le continent continue dès lors à dépendre des importations afin de répondre à la demande croissante de riz (Seck *et al.* 2013).

4.1.5. Le blé

Le blé est cultivé sur environ 10 millions d'ha en Afrique. Il s'agit d'une culture de base majeure pour plusieurs pays et d'un produit importé dans toute l'Afrique. Dans l'ensemble des pays africains, la consommation de blé n'a cessé d'augmenter ces 20 dernières années en réaction à la croissance démographique, à l'évolution des préférences alimentaires et à l'évolution socioéconomique associée à l'urbanisation. Les pays africains sont les plus grands importateurs mondiaux de blé, avec plus de 45 millions de tonnes en 2013, ce qui représente environ 15 milliards de dollars USD (Harold and Tabo 2016). Les importations de blé représentent 60 % de la consommation africaine de blé et 80 % dans les pays en ASS. Les pays Nord-africains ont la consommation de blé par tête la plus élevée et le blé fournit jusqu'à 50 % de l'apport journalier en calories et en protéines (Harold and Tabo 2016).

4.2. Formes de consommation des aliments fermentés à base de céréales en Afrique

Les aliments fermentés traditionnels à base de céréales sont très divers à l'échelle mondiale. Recentrée sur le continent Africain, cette grande diversité des produits céréaliers fermentés trouve en partie son origine dans la diversité des céréales utilisées, mais aussi d'autres matières premières utilisées en association avec les céréales comme les racines et tubercules (manioc, taro), les légumes secs (haricot, pois, graines de soja), et également les graines de cacao ou de café. En outre, les technologies employées pour leur fabrication sont très variées (trempage, lavage, décorticage, mouture, cuisson (à la vapeur ou à l'eau), torréfaction, germination, fermentation) (Tankoano *et al.* 2017). De ces technologies multiples, résultent de nombreux et complexes changements biochimiques, sensoriels et nutritionnels. Il peut y avoir une ou plusieurs étapes de fermentation allant de quelques heures à plusieurs mois selon l'aliment et selon le transformateur (Tankoano *et al.* 2017). Contrairement aux aliments fermentés des pays industrialisés où les fermentations sont en majorité contrôlées, les fermentations traditionnelles d'Afrique sont pour la plupart spontanées. Elles donnent lieu à des produits fermentés consommés sous des formes très variées sur le continent africain (pâtes cuites ou non cuites, boissons, bouillies, soupes etc.) présentés dans le **tableau 10**.

Au Burkina Faso, à l'instar de nombreux pays africains, différentes formes de consommation alimentaire des céréales ont été identifiées dans les ménages en 2010 (Greffeuille *et al.* 2010; Hama *et al.* 2009; Konkobo *et al.* 2002). Ces formes de consommation ont été classées en différentes catégories. Dans cette classification, on distingue les pâtes (*tô*), les bouillies (*ben-*

kida, *ben-saalga*, autres bouillies infantiles), les produits torréfiés (*mougoudougou*), les produits cuits à la vapeur (couscous, *bassi*, *déguè*), les produits cuits dans l'eau (*fura*), les produits frits (beignets), et les boissons fermentées.

Au nombre des boissons fermentées à base de céréales consommées en Afrique, il y a : le *gowè* au Bénin et au Togo, le *Kunun-zaki* au Nigéria, l'*ogi* au Bénin et au Ghana, le *pito* au Ghana et au Nigéria, le *burukutu* et l'*otika* au Nigéria, le *tchoukoutou* au Bénin, le *tchapalo* en Côte d'Ivoire, le *bouza* en Egypte, le *dolo* et le *zoom-koom* au Burkina Faso.

Parmi ces formes de consommation, les bouillies céréalières (*benkida*, *bensaalga* etc.) ont, de tout temps, constitué en Afrique la source d'alimentation de complément permettant aux nourrissons de franchir la période de passage d'une alimentation lactée exclusive, liquide à une alimentation diversifiée solide (Dillon 1989).

Toutes ces formes de consommation très variées sur le continent africain peuvent avoir un impact sur la qualité nutritionnelle des aliments.

4.3. Microbiote des aliments fermentés à base de céréales en Afrique

La diversité des matières premières et des procédés de préparation des aliments fermentés à base de céréales se traduit par une grande variété des acteurs de la fermentation. Les acteurs de la fermentation des aliments céréaliers africains sont pour la plupart des BL ou une association de BL et de levures (**Tableau 10**) (Galati *et al.* 2014). Les BL sont responsables de l'acidification lactique et contribuent, avec les levures, au développement des arômes conduisant à une variété de produits, à l'amélioration de la qualité nutritionnelle, et à l'hydrolyse de l'amidon (Odunfa *et al.* 2001; Galati *et al.* 2014).

Les levures communes aux fermentations des produits céréaliers fermentés africains appartiennent au genre *Saccharomyces* et *Saccharomyces cerevisiae* est l'espèce la plus fréquemment identifiée (Tankoano *et al.* 2017). Les bactéries associées aux fermentations des céréales sont les espèces des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* et *Bacillus* (Tankoano *et al.* 2017). Les mycètes du genre *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichothecium* sont plus fréquemment identifiés dans certains produits dont le *fura* (Jespersen 2003; Karovičová 2007; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012; Aka *et al.* 2014).

En dépit des avantages liés à la fermentation ci-dessus mentionnés, certains risques microbiologiques existent du fait que la fermentation soit spontanée et par conséquent non

contrôlée dans la plupart des procédés traditionnels. Les bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp. et *Brucella* sp. ont été identifiées dans les aliments céréaliers fermentés africains (Tankoano *et al.* 2017). Par exemple, l'évaluation de la qualité microbiologique du *gappal* indique la présence de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et d'entérobactéries à des taux proches ou supérieurs aux limites microbiologiques acceptables (Tankoano *et al.* 2016).

Les connaissances sur la composition du microbiote des aliments céréaliers fermentés traditionnels africains sont toujours limitées même si le nombre de publications consacrées à son étude croît de plus en plus. En effet, la très large majorité des travaux disponibles, à ce jour a été réalisée par des méthodes culture-dépendantes (Humblot and Guyot 2009) qui sélectionnent une partie des populations microbiennes existantes. Or, il est désormais connu que l'écologie microbienne a connu un nouvel essor depuis l'arrivée des nouvelles méthodes de séquençage à haut débit qui permettent des approches globales sans les biais liés aux méthodes de culture (Ercolini 2004, Humblot and Guyot, 2009). 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, Humblot, and Guyot 2011). Par ailleurs, les travaux disponibles décrivent souvent le microbiote de quelques aliments céréaliers fermentés traditionnels, ne prenant pas en compte la variabilité éventuelle entre les différentes unités de productions et les lieux de prélèvement.

Tableau 10. Produits fermentés traditionnels à base de céréales et leur microbiote

Matières premières	Nom local	Microorganismes impliqués	Nature/utilisation	Pays/origines	Références
Blé	<i>Bouza</i>	BL, levures	Boisson alcoolisée acidulée	Egypte, Turquie	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Blé, riz	<i>Talla</i>	BL, levures	Boisson trouble alcoolisée	Ethiopie	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Ilambaziokubilisa</i>	BL, levures et moisissures	Bouillie de complément	Zimbabwe	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Busaa</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Candida</i>	Boisson alcoolisée	Afrique de l'Est	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Gowé</i>	<i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. confusus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Ln. Mesenteroides</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bouillie	Bénin	(Greppi <i>et al.</i> 2013; Vieira-Dalode <i>et al.</i> 2007)
Maïs	<i>Malawa</i>	Bactéries, levures	Boisson alcoolisée (bière traditionnelle)	Ouganda, Zambie	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Hussuwa</i>	<i>L. fermentum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , levures	Pâte semi-solide fermentée	Soudan	(Yousif <i>et al.</i> 2010)
Maïs	<i>Kenkey</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>C. mycoderma</i>	Pâte cuite à la vapeur, aliment de base	Ghana	(Amoa Awua <i>et al.</i> 2007; Oguntoyinbo <i>et al.</i> 2011)
Maïs	<i>Mawè</i>	<i>L. fermentum</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>W. confusa</i> , <i>Pediococci</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. confusus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Ln. Mesenteroides</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i>	Aliment de base utilisé pour la préparation de plusieurs mets	Bénin, Togo	(Hounhouigan <i>et al.</i> 1993; Greppi <i>et al.</i> 2013)
Maïs	<i>Togwa</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>C. glabrata</i>	Bouillie	Tanzanie	(Mugula <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Koko</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>C. mycoderma</i>	Bouillie, aliment de base	Ghana	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Mutwiwa</i>	BL, moisissures	Bouillie	Zimbabwe	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs	<i>Poto poto</i>	<i>L. gasseri</i> , <i>L. plantarum/paraplantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterococcus</i>	Bouillie	Congo	(Abriouel <i>et al.</i> 2006)

Maïs	<i>Tobwa</i>	<i>spp.</i> , levures BL	Boisson non alcoolisée	Zimbabwe	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs, sorgho	<i>Pito</i>	<i>Aspergillus, Penicillium, Rhizopus oryzae, Gibberella, Geotrichum, Lactobacillus, Candida, S. cerevisiae, L. fermentum, L. delbrueckii, Pediococcus spp.</i>	Boisson alcoolisée	Nigéria, Ghana, Afrique de l'Ouest	(Odunfa and Oyewole 1997)
Maïs et manioc	<i>Banku</i>	BL, moisissures	Pâte cuite	Ghana	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs, mil, sorgho	<i>Mahewu</i>	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Lactococcus</i>	Aliment de base	Afrique du Sud	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Maïs, mil, sorgho	<i>Ogi</i>	<i>Lactobacillus, L. plantarum, S. cerevisiae, Corynebacterium; Aerobacter Rhodotorula, Cephalosporium, Fusarium, Aspergillus, Penicillium</i>	Bouillie à base de pâte fermentée	Nigéria, Afrique de l'Ouest	(Greppi <i>et al.</i> 2013)
Maïs, mil, sorgho	<i>Busa</i>	<i>S. cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, L. plantarum, L. helveticus, L. salivarius, L. casei, L. brevis, L. buchneri</i>	Boisson liquide	Afrique de l'Est, Kenya	(Odunfa and Oyewole 1997)
Maïs, mil, sorgho	<i>Kunu-zaki</i>	<i>Lactobacillus spp., Bacillus, Enterobacter, S. cerevisiae, L. plantarum, L. pantheris, L. vaccinostercus, Corynebacterium spp., Aerobacter spp., C. mycoderma, Rhodotorula spp., Cephalosporium spp., Fusarium spp., Aspergillus spp., Penicillium spp.</i>	Boisson non alcoolisée, petit déjeuner	Nigéria	(Obadina, Oyewole, and Awojobi 2008; Adeleke and Abiodun 2010; Agarry, Nkama, and Akoma 2010; Olasupo, Odunfa, and Obayori 2010; Oguntoyinbo <i>et al.</i> 2011)
Maïs, mil, sorgho	<i>Mbege</i>	<i>S. cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, L. plantarum, Ln. mesenteroides</i>	Boisson alcoolisée	Tanzanie	(Odunfa and Oyewole 1997)
Maïs, sorgho, blé, tef	<i>Injera</i>	<i>L. pontis, L. plantarum, Ln. mesenteroides, P. cerevisiae, S. cerevisiae, C. glabrata</i>	Aliment de base ressemblant à une gelette	Ethiopie	(Fischer <i>et al.</i> 2014; Nigatu and Gashe 1998; Olasupo, Odunfa, and Obayori 2010)
Mil	<i>Ben-saalga/Benkida</i>	<i>Lactobacillus spp., L. plantarum, L. fermentum, L. paraplantarum, P. acidilactici, P. pentosaceus</i>	Bouillie	Burkina Faso	(Turpin, Humblot, and Guyot 2011; Humblot and Guyot 2009; Tou <i>et al.</i> 2007)

Mil	Déguè	<i>Enterococcus spp.</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i>	Pâte	Burkina Faso, Bénin	(Abriouel <i>et al.</i> 2006; Hama <i>et al.</i> 2009)
Mil	Doro	BL, levures	Boisson colloïdale alcoolisée	Zimbabwe	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Mil	Fura ou Tchobal	<i>W. confusa</i> , <i>L. reutei</i> , <i>P. acidilacici</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrukii spp.</i> , <i>Lactobacillus Spp.</i> , <i>Pediococcus Spp.</i> , <i>Streptococcus Spp.</i> , <i>Leuconostoc Spp.</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Galactomyces geotricum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	Pâte	Burkina Faso, Benin, Ghana, Togo, Nigeria	(Owusu-Kwarteng <i>et al.</i> 2012; Adebisin, Amusa, and Fagade 2001)
Mil	Gappal	BL, levures	Mélange de lait et de farine de mil	Burkina Faso	(Tankoano <i>et al.</i> 2016)
Mil	Massa	<i>Lactobacillus Spp.</i> , <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Aerococcus/Tetragenococcus</i> , <i>Streptococcus/Lactococcus</i>	Galettes, petit déjeuner	Burkina Faso	(Tankoano <i>et al.</i> 2017)
Mil	Mangisi	BL	Boisson non alcoolisée, sucrée et aigre	Zimbabwe	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Mil, sorgho	Kirsa	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. confusus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Erwinia ananas</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizopus spp.</i>	Aliment de base ressemblant au pain	Soudan	(Hamad <i>et al.</i> 1997)
Mil, sorgho	Merissa	BL, bactéries acétiques, <i>Saccharomyces</i>	Boisson alcoolisée	Soudan	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Mil, Sorgho	Zoom-koom	BL, Levures	Boisson non alcoolisée, sucrée et acidulée	Burkina Faso	(Tankoano <i>et al.</i> 2017)
Riz	Seketeh	<i>Saccharomyces</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i>	Boisson alcoolisée	Nigéria	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Sorgho	Nasha	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Candida</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Bouillie	Soudan	(Blandino <i>et al.</i> 2003)
Sorgho	Burukutu	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Ln. Mesenteroides</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Mucor pusilus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>C.</i>	Boisson alcoolisée à flaveur vinaigrée	Nigéria, Bénin, Ghana	(Blandino <i>et al.</i> 2003; Yabaya 2008)

Sorgho	Bière de <i>Kaffir</i>	<i>pelliculosa</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Kloeckera</i>	Boisson alcoolisée	Afrique du Sud	(Van Der Walt 1956; Blandino <i>et al.</i> 2003)
Riz, maïs, sorgho, mil, manioc	<i>Uji</i>	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i>	Bouillie, aliment de base	Kenya, Ouganda, Tanganyika	(Mbugua and Njenga 1992; Onyango <i>et al.</i> 2004)
Sorgho (kafir), mil, maïs et racines de plante munkoyo	<i>Munkoyo</i>	BL, levures	Boisson faiblement alcoolisée	Congo, Zambie	(Zulu, Dillon, and Owens 1997)

4.4. Contribution de la fermentation à la nutrition humaine

4.4.1. Valeur nutritionnelle des aliments céréaliers fermentés

La complexité du microbiote au cours de la fermentation naturelle entraîne une grande variabilité au niveau de la qualité nutritionnelle, sanitaire et sensorielle des aliments fermentés traditionnels (Tankoano *et al.* 2017). Si la valeur nutritionnelle de la plupart des aliments céréaliers fermentés consommés dans les pays développés est connue (Souci, Fachmann, and Kraut 2000), très peu d'aliments céréaliers fermentés consommés en Afrique ont fait l'objet d'études de caractérisation de leur valeur nutritionnelle. La valeur nutritionnelle de la plupart des céréales de base pour la production des produits fermentés en Afrique est en revanche connue et présentée sur le **tableau 11**.

Tableau 11. Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments dans les grains de céréales les plus consommés en Afrique selon FAOSTAT (2015).

Les valeurs sont exprimées pour 100g MF

	Maïs Jaune (<i>Blanc</i>)	Sorgho Blanc (<i>rouge</i>)	Mil	Riz	Blé
Energie et macronutriments					
Energie (Kcal)	353,0 (351,0)	354,0 (348,0)	348-364	352,0-354,0	282,0- 326,0
Protéines (g) (NX6.25)	9,3 (9,7)	9,3 (10,5)	8,8-10	6,1-7,8	9,3-10,5
Lipides (g)	4,4 (4,0)	3,9 (3,5)	4,1-5,8	0,3-2,2	1,5-4,8
Carbohydrates (g)	64,3 (64,5)	65,5 (63,6)	62,6-64,8	73,8-81,4	58,7-72,5
Micronutriments					
Fer (mg)	3,0 (3,8)	3,9 (3,4)	7,6-10	1,0-1,9	2,0-4,7
Zinc (mg)	340,0 (315,0)	2,08 (1,97)	1,47-2,83	1-2,02	1,7-1,8
Calcium (mg)	18,0 (18,0)	24,0 (24,0)	14-35	2,2-3,0	19,0-30,0
Folates (µg)	10,0 (25,0)	30,0 (30,0)	29-30	20,0-40,0	40,0-60,0

Source : Données tirées de la table de composition des aliments d'Afrique de l'Ouest (Stadlmayr *et al.* 2012). Entre parenthèses les teneurs des variétés du maïs blanc et du sorgho rouge.

Les matières premières présentées dans le **tableau 11** 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 dues 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. Le blé a la teneur en folates la plus élevée par rapport à celle des autres céréales.

Les aliments céréaliers fermentés peuvent avoir des caractéristiques nutritionnelles très différentes des grains 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 grains a un impact sur les teneurs en nutriments des farines obtenues (Slavin, Jacobs, and Marquart 2000). 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 micronutriments, ainsi que des densités énergétiques plus faibles dans les boissons et bouillies par effet dilution. Par exemple, l'effet dilution est l'une des principales causes de la faible valeur nutritionnelle du *ben-saalga*, une bouillie céréalière traditionnelle fermentée Ouest-africaine dont les caractéristiques nutritionnelles ont été décrites lors d'études précédentes (Tou *et al.* 2006; Mouquet-Rivier *et al.* 2008; Hama *et al.* 2011; Mouquet-Rivier *et al.* 2016). Les caractéristiques nutritionnelles du *ben-saalga* sont présentées sur le **tableau 12**.

Tableau 12. Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments du *ben-saalga*. Les valeurs sont exprimées pour 100g MF

Composition nutritionnelle	Concentrations	Références
Micronutriments		
Fer (mg)	0,2-1,2	(Mouquet-Rivier <i>et al.</i> 2008).
Zinc (mg)	0.1-0.3	(Mouquet-Rivier <i>et al.</i> 2008).
Calcium (mg)	ND	(Mouquet-Rivier <i>et al.</i> 2008).
Folates (µg)	0-3,3	(Saubade, Humblot, <i>et al.</i> 2017).
Energie et macronutriments		
Energie (Kcal)	32	(Mouquet-Rivier <i>et al.</i> 2008).
Protéines (g) (N x 6.25)	0,3-0,8	(Mouquet-Rivier <i>et al.</i> 2008).
Lipides (g)	0,1-0,5	(Mouquet-Rivier <i>et al.</i> 2008).

ND : non déterminé

D'après le **Tableau 12**, le *ben-saalga* a une densité énergétique très faible (32 Kcal/100g) par rapport à la densité énergétique requise pour les aliments de compléments du jeune enfant (84Kcal/100g) (Dewey and Brown 2003). D'après les données de Mouquet-Rivier *et al.* (2016), le *ben-saalga* procure 62 ± 34 Kcal/jour et 124 ± 58 Kcal/jour pour des enfants de 6 à 9 mois et de 15 à 20 mois, respectivement. Sur la base des travaux de Dewey et Brown (2003), les aliments de compléments doivent apporter aux enfants de moins de deux ans une valeur énergétique au moins 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, l'épaississement étant dû à la gélatinisation de l'amidon. Les bouillies obtenues ont donc des teneurs en matière sèche variables de 5 à 10 g/100g de bouillie (Mouquet-Rivier *et al.* 2008). Cet effet dilution est aussi à l'origine des faibles teneurs en macronutriments (protéines et lipides) dans le *ben-saalga* par rapport à celles du mil.

Les teneurs en fer du *ben-saalga* sont inférieures à celles des grains de départ. Mouquet-Rivier *et al.* (2008) ont dosé le fer dans des échantillons de mil et du *ben-saalga*. Malgré une

teneur en fer élevée dans les gains de mil (21 mg/100g MF), la teneur en fer dans le *ben-saalga* est significativement plus faible (inférieure à 1,2 mg/100g MF). D'après ces auteurs, la perte importante de fer est principalement due à une diffusion du fer dans l'eau pendant le trempage.

Au regard de la faible valeur nutritionnelle du *ben-saalga* et de sa large utilisation comme aliment de complément en Afrique sub-saharienne, des études ont été menées dans le but d'améliorer sa qualité nutritionnelle par la fermentation (Tou *et al.* 2007; Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010; Greppi, Saubade, *et al.* 2017).

4.4.2. Les avantages nutritionnels de la fermentation

La fermentation est un procédé ancestral de transformation des aliments qui présente globalement trois avantages majeurs à savoir (i) l'amélioration de la qualité sanitaire des aliments, (ii) l'amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments; (iii) l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments (Steinkraus 1994).

(i) Amélioration de la qualité sanitaire des aliments

La fermentation permet aussi d'améliorer la qualité sanitaire des aliments. Pratiquée très souvent dans des conditions peu hygiéniques au sein des unités traditionnelles de production en Afrique, l'acidification liée à la production d'acide lactique par les BL au cours de la fermentation, permet d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes, contribuant ainsi à la qualité sanitaire de ces aliments fermentés (Beuchat, 1997). Les BL peuvent aussi produire des composés comme le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines qui ont l'avantage d'empêcher ou de limiter la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables dans les aliments (Blandino *et al.* 2003; Kingamkono *et al.* 1994; Nout, Rombouts, and Hautvast 1989). La durée de conservation des produits fermentés augmente grâce à l'acidification et à la production de bactériocines (Raimbault 1995; Sawadogo *et al.* 2004; Sawadogo-Lingani *et al.* 2008).

(ii) Amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments

La fermentation est un bon moyen d'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments. Par exemple, Odunfa *et al.* (1985) ont utilisé des souches de BL productrices de lysine et de méthionine pour enrichir l'*ogi* (Odunfa 1985). Oguntoyinbo et Narbad (2012), Songré *et al.* (2009, 2010) ont démontré le potentiel amylolytique des BL sur des matrices amylacées dont respectivement l'*ogi* et le *ben-saalga* (Oguntoyinbo and Narbad 2012; Songré-Ouattara *et al.*

2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010). Par exemple, pour le *ben-saalga*, le procédé de fermentation combinant une étape de précuisson et d'inoculation de BL amylolytique a abouti à du *ben-saalga* de meilleure teneur en MS variable de 15,3 à 17,4 g MS / 100g, avec une densité énergétique de 75,8 à 84,7 kcal / 100 g (Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010). Dans une étude récente, Greppi *et al.* (2017) ont démontré la production de la vitamine B9 par des BL combinées à des levures dans une bouillie de mil fermenté (Greppi, Saubade, *et al.* 2017). Dans cette étude, la fermentation contrôlée par inoculation de deux souches de *Lactobacillus fermentum* sélectionnées pour leur capacité à produire des folates en milieux de culture a permis d'obtenir du *ben-saalga* avec une teneur en folates de 7 µg / 100g en quatre heures de fermentation (Greppi, Saubade, *et al.* 2017). La fermentation d'un aliment à base de farine de mil par les BL entraîne une augmentation de la teneur en thiamine et en niacine d'environ 12 à 13 % (Tankoano *et al.* 2017). La fermentation favorise l'obtention d'un pH optimal pour la dégradation enzymatique (phytase et polyphénoloxidase microbiennes) des phytates et des polyphénols qui sont présents dans les céréales sous formes complexées avec les protéines et certains minéraux tels que le fer, le zinc, le magnésium (Harland and Morris 1995). Une dégradation des phytates par *Pichia kudriavzevii* TY13 et *Hanseniaspora guilliermondii* TY14 dans le *togwa* tanzanien a été rapportée (Hellström *et al.* 2012). Une réduction des phytates et des autres composés polyphénoliques peut augmenter la quantité de fer soluble, de zinc et de calcium. La fermentation lactique entraîne un effet très hautement positif sur la disponibilité du fer et du phosphore, avec une diminution de la teneur en phytates dans ces produits fermentés (Raimbault 1995).

(iii) Amélioration de la qualité organoleptique des aliments

La fermentation conduit à une amélioration générale de la texture, du goût et de l'arôme des aliments. Au cours de la fermentation des produits céréaliers, des composés volatiles tels que le diacétyl, l'acide acétique et l'acide butyrique sont produits conduisant à un mélange complexe de saveurs et d'arômes (Blandino *et al.* 2003; Chavan, Kadam, and Beuchat 1989; Karovičová 2007). La présence d'arômes résultants de ces métabolites rend les produits céréaliers fermentés plus appétissants (Blandino *et al.* 2003). La production des métabolites tels que l'acide lactique par les BL par exemple au cours de la fermentation induit une diminution du pH qui donne aux aliments céréaliers fermentés une saveur aigre (Tankoano *et al.* 2017).

5. Méthodes d'analyse du microbiote d'aliments fermentés

Au regard de l'importance des microorganismes dans l'amélioration de la qualité organoleptique, nutritionnelle et sanitaire des aliments fermentés (Section 4.4.2. Les avantages nutritionnels de la fermentation), des études approfondies sur la composition des populations microbiennes des aliments fermentés ont été effectuées. L'analyse du microbiote des aliments céréaliers fermentés peut se faire à l'aide de deux types de méthodes : les méthodes dites « cultures-dépendantes » et celles dites « cultures-indépendantes » qui présentent chacune des avantages et des inconvénients.

5.1. Méthodes dites « cultures-dépendantes »

Ces méthodes se rapportent aux méthodes classiques de culture microbiologique (caractéristiques physiologiques, morphologiques et biochimiques). Elles ont l'avantage de permettre le dénombrement de différents types de microorganismes cultivables. Elles permettent également d'isoler des souches pures de microorganismes dans le but, soit, d'étudier leur comportement et leur physiologie, soit, de les sélectionner sur la base des fonctions spécifiques d'intérêt, pour les utiliser comme cultures starters. En revanche, l'utilisation de ces méthodes pour l'estimation de la diversité microbienne dans les aliments fermentés présente de nombreux inconvénients. Il s'agit principalement du temps de mise en œuvre et du recours à des milieux de culture sélectifs qui sont différents des milieux d'origine des microorganismes ce qui entraîne ainsi un biais dû à une sous-estimation de la population microbienne. En outre les bactéries cultivables isolées du microbiote d'un aliment fermenté, ou d'un autre environnement, ne représente qu'une fraction de ce microbiote (Robert, Gabriel, and Fontagné-Faucher 2009). Ainsi, la diversité microbienne et l'abondance relative des espèces ont souvent été sous-estimées par les méthodes de cultures microbiologiques (Wintzingerode, Göbel, and Stackebrandt 1997).

5.2. Méthodes dites « cultures-indépendantes »

Ces méthodes se rapportent aux techniques de biologie moléculaire pour l'estimation de la diversité microbienne dans les aliments fermentés ou dans d'autres environnements. Elles permettent d'évaluer la diversité des écosystèmes microbiens, de détecter et de caractériser les microorganismes non cultivables et aussi d'étudier la relation entre la diversité microbienne et les propriétés fonctionnelles. Ces méthodes moléculaires reposent sur les propriétés des acides nucléiques. Elles sont très nombreuses et mettent en jeu plusieurs techniques différentes couplées à la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction,

PCR). Dans la majorité des cas, ces techniques moléculaires utilisent le gène codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) comme marqueur parce qu'il est présent chez tous les procaryotes et assez polymorphe pour permettre de distinguer les espèces. Aussi, il est de taille idéale (1500 paires de base) plus facile à analyser que le gène codant l'ARN 23S (2900 paires de base) et plus riche en information que le gène codant l'ARN 5S (120 paires de base).

Dans ce document, j'ai choisi de présenter plus en détails les 2 méthodes utilisées dans cette thèse : La PCR en temps réel et le séquençage à haut débit.

5.2.1. PCR en temps réel

La PCR est une technique *in vitro* de biologie moléculaire de réplication ciblée qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) spécifique et de longueur définie.

La PCR en temps réel permet la quantification des genres ou espèces pour lesquels des oligonucléotides spécifiques ont été identifiés. 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 microorganismes de départ et le Ct. Il est ainsi possible de déterminer la concentration du genre ou de l'espèce de BL recherchée dans l'aliment de départ.

5.2.2. Les techniques de séquençage à haut débit

L'une des plus grandes avancées en Biologie moléculaire au cours de la dernière décennie est l'avènement des techniques de séquençage de l'ADN à haut débit (ou NGS – Next Generation Sequencing). Le terme NGS regroupe un ensemble de techniques et de technologies, développées dans le but d'obtenir un haut débit de séquençage d'ADN comparativement aux méthodes préexistantes telles que le séquençage Sanger ou Maxam- Gilbert (Arfi 2012). En effet, ces anciennes techniques, bien que fiables et éprouvées, ne permettent qu'une acquisition lente des données. Par exemple, un séquenceur Sanger ABI Prism 310 permet de générer 19 kb par heure, soit 96 séquences de 600 pb en 3 heures (Arfi 2012). A ce rythme, le séquençage des 3,2 Gb d'un génome humain à l'aide d'une unique machine prendrait plus de

19 ans (Arfi 2012). De ce fait, la disponibilité des données génétiques était limitée aux génomes d'un faible nombre d'organismes modèles et aux séquences codant des fonctions d'intérêt de chaque étude scientifique. Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit sont basées sur le séquençage parallèle, indépendant et simultané de centaines de milliers, voire de centaines de millions de brins d'ADN, pouvant ainsi générer plus de 50 Mb par heure par machine (plus de 2600 fois plus que le séquençage « classique ») (Arfi 2012). A l'heure actuelle, la majorité des technologies NGS sont commercialisées par des grands groupes industriels, le coût de développement et de fabrication des séquenceurs n'étant pas à la portée des laboratoires. Parmi les technologies disponibles à l'heure actuelle, on citera notamment : « 454 sequencing » de Roche Applied Science, « Solexa » d'Illumina, « SOLiD » de Applied Biosystems, « Heliscope » de Helicos, « Ion Torrent » de Life Technologies et « PacBio » de Pacific Bioscience. Le séquençage 454 a été la première technologie NGS commercialement disponible, suivi peu de temps après par le Solexa (Arfi 2012).

6. Méthodes d'analyse des folates

L'analyse des folates dans les aliments constitue un grand défi pour diverses raisons devant être prises en compte dans le choix de la méthode d'analyse la plus appropriée. Les concentrations des folates dans les aliments sont relativement faibles et elles existent sous forme de plusieurs vitamères avec une stabilité chimique très variable. Ces formes sont sensibles à l'oxygène, à la lumière et à la chaleur, ce qui peut les rendre inactive biologiquement. En outre, l'effet matrice alimentaire est très important. En effet, les folates sont des molécules physiquement piégées dans la matrice alimentaire qui peut être un facteur limitant au cours de l'étape d'extraction. Par ailleurs, plusieurs matériels biologiques contiennent des conjuguases endogènes et d'autres enzymes susceptibles d'induire des interconversions entre les vitamères et des changements dans la distribution des vitamères.

Les méthodes d'analyse des folates alimentaires les plus usuelles sont la méthode microbiologique de référence et la chromatographe liquide haute performance (CLHP)(Eitenmiller, Ye, and Landen 2008). La méthode microbiologique de référence est utilisée pour doser les folates totaux dans les aliments alors que la méthode CLHP est utilisée pour quantifier les différents vitamères pouvant être présents dans les aliments. Dans cette étude, seule la méthode microbiologique de référence a été utilisée pour le dosage des folates dans les aliments céréaliers fermentés.

Quelle que soit la méthode d'analyse, il faut au préalable s'assurer de la stabilité des folates dans les aliments pendant leur stockage, de la bonne extraction des folates de la matrice alimentaire et des cellules (végétales et/ou microorganismes), et aussi de la bonne purification avant toute analyse par CLHP.

6.1. Extraction et traitement tri-enzymatique

Le principe de l'extraction repose principalement sur l'action de 3 enzymes (α -amylase, protéase et la conjugase) qui en dégradant la matrice alimentaire et en déconjuguant les chaînes de polyglutamates permettent de libérer les folates sous forme de mono- ou diglutamates dans le tampon d'extraction (Edelmann et al., 2012; Puwastien et al., 2005). Pour favoriser l'action des enzymes, une étape de chauffage (dans un tampon d'extraction contenant des antioxydants stabilisant les folates) est nécessaire afin de gélatiniser l'amidon pour le rendre hydrolysable. Le chauffage présente aussi l'avantage de détruire les éventuelles enzymes qui pourraient intervenir dans la dégradation ou l'interconversion des vitamères de folates. L' α -amylase permet de dégrader la matrice amylacée et la protéase dégrade les protéines de la matrice alimentaire. La conjugase permet d'hydrolyser les folylpolyglutamates, libérés par l'action de l' α -amylase et de la protéase, en mono- et diglutamates. Les folylpolyglutamates n'étant pas assimilables par la souche bactérienne utilisée lors du dosage microbiologique, l'action de la conjugase est importante puisqu'elle permet l'obtention d'une forme assimilable par la bactérie.

Dans le cas de la CLHP, les folates doivent être aussi sous la forme de mono-glutamates. 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 (β -mercaptoéthanol et l'acide ascorbique) est ajouté aux échantillons avant chauffage. Le tampon HEPES/CHES permet aussi de maintenir un pH constant lors du chauffage. Le pH des échantillons est ensuite ajusté au pH optimal des enzymes ajoutés à l'étape suivante. Afin d'éviter une oxydation des folates (facilitée par une exposition à la lumière ou à l'oxygène pendant l'extraction), les extraits sont « flushés » avec de l'azote à chaque étape, et protégés de la lumière par du papier aluminium. Dans le cas du dosage microbiologique, à la fin de l'extraction, le pH des tubes est ajusté à 6,1 puisque c'est le pH optimal de la souche bactérienne utilisée pour le dosage microbiologique.

6.2. Dosage microbiologique des folates

Le dosage microbiologique est basé sur les besoins en folates d'un certain nombre de micro-organismes dont la croissance dépend de la teneur en folates de l'échantillon. Cette croissance peut être mesurée par turbidimétrie. Le micro-organisme le plus commun dans l'analyse des folates est le *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Cependant d'autres microorganismes comme *Tetrahymena pyriformis*, *Enterococcus hirae* ATCC N° 8043 et *Pediococcus acidilactici*, ATCC N° 8081 peuvent aussi être utilisés avec des spécificités limitées par rapport à certains vitamères de folates (**Tableau 13**). Une corrélation peut être établie entre la quantité de folates dans le milieu et la croissance de la souche utilisée, qui peut être mesurée par turbidimétrie. Toutefois cette corrélation n'est observée que si les folates possèdent moins de trois unités de glutamate, car *L. rhamnosus* ATCC7469 ne peut pas utiliser les autres formes. Une gamme étalon de folates (généralement en acide folique) doit donc être réalisée lors de chaque série d'analyse. Cette méthode, bien qu'elle permette de quantifier de très faibles teneurs en folates, présente l'inconvénient d'être longue (une analyse complète s'exécute en deux jours).

Tableau 13. Réponses induites par les dérivés du folate par rapport à l'acide folique

Folates	<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>T. pyriformis</i>
Acide folique	+	+	-	+
H ₂ folate	+	+	-	*
H ₄ folate	+	+	+	+
5-HCO-H ₄ folate	+	+	+	+
10-HCO-H ₂ folate	+	+	-	*
10-HCO-H ₄ folate	+	+	+	*
5-CH ₃ -H ₄ folate	+	-	-	-
5,10-CH ₄ =H ₄ folate	+	+	-	*
5-CHNH-H ₄ folate	+	+	+	*
PteGlu2	+ 100%	+	-	+
PteGlu3	+ <100%	-	-	+
PteGlu4	+ 65%	-	-	*
PteGlu5	+ 20%	-	-	*
PteGlu6	+ 3.6%	-	-	*
PteGlu7	+ (2.4%	-	-	*
Pterioic acid	-	+	-	-

*Données non disponibles

source: Voigt and Eitenmiller (1978)

6.3. Chromatographie liquide haute performance

Les méthodes chromatographiques liquides permettent de déterminer les vitamines de folates. Plusieurs méthodes CLHP ont été développées pour la détermination des vitamines de folates dans les aliments (Wigertz, and Jägerstad 1995; Vahteristo, Ollilainen, and Varo 1996; Pfeiffer et al. 1997; Konings 1999; Kariluoto, Vahteristo, and Piironen 2001). Quelque soit la méthode CLHP, une extraction enzymatique constitue aussi un préalable et les extraits de chaque échantillon doivent être purifiés pour éviter l'apparition de pics parasites sur les chromatogrammes (Konings 1999; Kariluoto, Vahteristo, and Piironen 2001). Pour ce faire, 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 CLHP, ou à l'ultra haute performance chromatographie liquide (UPLC) en utilisant des solutions pures de chaque vitamine comme standards. Cette méthode reste cependant très peu utilisée en routine en raison de son coût.

En conclusion de cette première partie de la thèse, les folates sont des vitamines indispensables à tous les âges. Les données sur le statut en folates des populations vulnérables (femmes et enfants), bien que non représentatives de la situation globale du continent africain, puisque dérivant d'études locales, attestent du faible niveau du statut en folates des populations. Les stratégies de lutte contre les carences en micronutriments prenant en compte les folates sont en place dans la plupart des pays africains. Cependant, ces stratégies de lutte connaissent toutes des limites (faible couverture, disponibilité et accessibilité à l'acide folique et aux aliments fortifiés faibles etc.). Ces limites nécessitent de rechercher des moyens de lutte contre les carences en folates à l'échelle populationnelle, et plus spécifiquement à la portée des couches pauvres en Afrique. Les céréales constituent l'essentiel du régime alimentaire au Burkina Faso et plus généralement en Afrique. La majorité des procédés de transformation des céréales diminue les teneurs en folates dans les aliments céréaliers. En revanche, la fermentation est un levier qui permet d'augmenter les teneurs en folates dans les aliments. L'objectif de ce travail de thèse est d'utiliser la fermentation pour augmenter les teneurs en folates des populations africaines via la consommation d'aliments céréaliers fermentés.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Méthodes microbiologiques

1.1. Milieux de culture et réactifs

1.1.1. Milieux liquides

1.1.1.1. L'Eau peptonée

Le diluant est une solution physiologique qui permet de revivifier les souches bactériennes. La composition de ce milieu est présentée dans le **tableau 14**. Il a été préparé à partir de 9,5 g du milieu commercial en poudre (BD Difco, Sparks, MD, USA) dissout dans 1 L d'eau distillée. La solution est homogénéisée et le pH ajusté à $7 \pm 0,2$, puis répartie dans des tubes à vis (9 mL) et dans des flacons (90 mL). Les tubes et les flacons sont stérilisés à 121°C pendant 15 mn à l'autoclave. Les tubes et les flacons sont retirés et refroidis à la température ambiante avant utilisation.

Tableau 14. Composition du diluant

Ingrédients	g/L
Peptone pancréatique de viande	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate disodique	9,0
Phosphate mono potassique	1,5

1.1.1.2. Bouillon MRS

Le bouillon MRS a servi à la culture des bactéries lactiques (BL) et à la préparation des inocula. La composition du bouillon MRS est donnée dans le **tableau 15**. Le bouillon MRS a été préparé en solubilisant 54.3 g de poudre commerciale (BD Difco, Sparks, MD, USA) avec ajout de 1 mL de tween 80 dans 1 L d'eau distillée. Après homogénéisation, le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 15 min.

Tableau 15. Composition du bouillon MRS

Ingrédients	g/L
Peptone de protéase	10,00
Extrait de bœuf	10,00
Extrait de levure	5,00
glucose	20,00
Citrate de tri-ammonium	2,00
Acétate de sodium	5,00
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	0,20
Sulfate de Manganèse (MnSO ₄)	0,05
Phosphate di-potassique (K ₂ HPO ₄)	2,00

1.1.1.3. Milieu dépourvu de folates (*folic acid casei medium*-(FACM))

Le FACM a été utilisé pour le dosage des folates totaux par la méthode microbiologique de référence (Kariluoto and Piironen 2009). La composition de ce milieu est présentée dans le **tableau 16**. Pour préparer 100 mL de milieu liquide, il faut dissoudre 7,05 g de milieu commercial en poudre de FACM (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 (0,22µm).

Tableau 16. Composition du *folic acid casei medium*

Ingrédients	Quantité dans un litre
Hydrolysats de caséine dépourvu de vitamines	10,0 g
Dextrose (glucose)	40,0 g
Acétate de sodium	40,0 g
Phosphate di-potassique	1,0 g
Phosphate mono-potassique	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
Glutathion 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-amino-benzoïque	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

1.1.2. Milieux gélosés

1.1.2.1. Milieu Plate Count Agar(PCA)

Le milieu de culture PCA (gélose glucosé à l'extrait de levure) a été utilisé pour le dénombrement des bactéries mésophiles aérobies. La composition de ce milieu est présentée

dans le **tableau 17**. Ce milieu a été préparé selon la norme ISO 4833-1 (2013) (NI ISO 4833-1 2013): 23,5 g de PCA (PCA, Difco, Sparks, MD, USA) ont été mis en suspension dans 1L d'eau distillée puis la suspension a été chauffée pour dissoudre la gélose. Le pH a été ajusté à $7 \pm 0,2$, et la solution a été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn. Après autoclavage la solution a été maintenue en surfusion dans un bain marie à $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tableau 17. Composition du milieu PCA

Ingrédients	g/L
Tryptone	5,0
Extrait auto-lytique de levure	2,5
Glucose	1,0
Agar agar bactériologique	12,0

1.1.2.2. Milieu Sabouraud

Le milieu Sabouraud (extrait de levure, glucose, chloramphénicol) a été utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures. La composition de ce milieu est présentée dans le **tableau 18**. Il a été préparé en suivant la norme ISO 7954, (2003) (NF ISO 7954 2003): 65,5 g de Sabouraud (BD Difco, Sparks, MD, USA) ont été introduits dans un flacon contenant 1L d'eau distillée puis chauffés au bain marie bouillant jusqu'à dissolution complète. Dès lors, le pH a été ajusté à $5,6 \pm 0,2$ et le milieu homogénéisé est ensuite stérilisé à 121°C pendant 15 minutes.

Tableau 18. Composition du milieu Sabouraud

Ingrédients	g/L
Peptomycol	10,0
Glucose	40,0
Chloramphénicol	0,5
Agar agar bactériologique	15,0

1.1.2.3. Milieu MRS

Le milieu De Man, Rogosa et Sharp (MRS), a servi à la culture et au dénombrement des BL. La composition du MRS gélosé est donnée dans le **tableau 19**. Le milieu MRS gélosé a été préparé en solubilisant 67,3 g de poudre commerciale (BD Difco, Sparks, MD, USA)

additionnée de 1 mL de tween 80 dans un litre d'eau. Après homogénéisation, le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 15 min.

Tableau 19. Composition du MRS gélosé

Ingrédients	g/L
Peptone de protéase	10,00
Extrait de bœuf	10,00
Extrait de levure	4,00
Glucose	20,0
Citrate d'ammonium	2,00
Acétate de sodium	5,00
Sulfate de magnésium	0,20
Sulfate de Manganèse	0,05
Phosphate di-potassique	2,00
Agar	15

1.2. Microorganismes utilisés

Le **tableau 20** présente les différents microorganismes utilisés dans les travaux de cette thèse et l'objet de leur utilisation. Pour les essais de production de folates dans les bouillies de mil fermenté, les souches *L. fermentum* 8.2 et *L. plantarum* 6.2 ont été utilisées. Ces deux souches ont été sélectionnées pour leur bonne capacité à produire des folates en milieux de culture (Greppi, Hemery, *et al.* 2017). Elles font partie de la collection de 155 BL précédemment isolées du *ben-saalga* dans 12 Unités traditionnelles de production (UTPs) à Ouagadougou (Burkina Faso) (Tou *et al.* 2006; Turpin, Humblot, and Guyot 2011). En outre, deux souches amylolytiques de BL à savoir *L. plantarum* A6 et *L. fermentum* MW2 préalablement isolées des racines fermentées de manioc (*Manihot esculenta* var. Ngansa) et de la pâte fermentée de maïs (*mawè*), respectivement, ont été co-inoculées avec les BL productrices de folates (Agati *et al.* 1998; Giraud *et al.* 1991).

Le *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 a été utilisé comme indicateur de croissance dans le dosage des folates totaux des aliments céréaliers fermentés.

Les souches de référence *L. plantarum* ATCC14917T, *L. fermentum* ATCC14931, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC10880, *Pediococcus pentosaceus* ATCC43200 et *Weissella confusa* ATCC10881T ont été utilisées pour la PCR en temps réel.

Tableau 20. Diffrents microorganismes utilisés

Microorganismes	Types	Utilisations
<i>L. fermentum</i> 8.2	Souche de BL	Production du <i>ben-</i>
<i>L. plantarum</i> 6.2	productrices de folates	<i>saalga</i>
<i>L. plantarum</i> A6	Souches de BL	Production du <i>ben-</i>
<i>L. fermentum</i> MW2	amylolytiques	<i>saalga</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	Indicateur de croissance	Dosage des folates
<i>L. plantarum</i> ATCC14917T		
<i>L. fermentum</i> ATCC14931		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC10880	Souches de référence	PCR en temps réel
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC43200		
<i>Weissella confusa</i> ATCC10881T		

1.3. Production de l'inoculum pour la préparation du *ben-saalga* bio-enrichi en folates

Chaque souche de BL (*L. plantarum* A6, *L. fermentum* MW2, *L. fermentum* 8.2 et *L. plantarum* 6.2) a été réactivée par stries sur boîtes de Petrie de MRS gélosé à partir d'un Cryotube. Après une incubation de 48 h à 37°C, du bouillon MRS stérile (4,5 mL) a été inoculé à partir d'une colonie isolée. Après une seconde incubation d'une nuit à 37°C, les cultures ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 10 mn à 4 ° C, et les culots rincés 2 fois avec du NaCl 0,9% afin d'éliminer les folates provenant du bouillon MRS puis suspendu de nouveau dans du NaCl 0,9%. Cette suspension a été utilisée comme l'inoculum.

1.4. Dénombrement des microorganismes

1.4.1. Préparation de la suspension mère, des dilutions et ensemencements

La préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales a été effectuée selon la norme internationale ISO 6887-1 (1999). Les échantillons ont été analysés immédiatement après prélèvement. Dix grammes (10 g) d'échantillon ont été pesés dans un sachet stomacher stérile dans lequel ont été ajoutés 90 mL d'eau peptonée stérile (diluant). L'ensemble est passé au stomacher pendant 2 minutes. A partir de cette suspension mère une

série de dilutions décimales successives a été réalisée: Un mL de solution a été prélevé à l'aide d'une pipette et introduit dans un tube contenant 9 mL d'eau peptonée stérile à la température ambiante. Un mL a été de nouveau prélevé de cette dernière solution et introduit dans le tube suivant contenant la même quantité d'eau peptonée. La dilution a été ainsi faite jusqu'à la plus forte dilution désirée.

La méthode de l'inoculation dans la masse a été utilisée pour l'ensemencement. Pour ce faire, 1 mL de chaque dilution a été introduit dans une boîte de Pétri stérile dans laquelle a été ajouté le milieu de culture en surfusion à une température comprise entre 44 et 47°C. Ensuite le contenu de la boîte a été homogénéisé. Les boîtes ont été laissées à solidifier sur une surface fraîche à température ambiante avant d'être incubées à l'étuve. Toute la manipulation a été effectuée autour d'une flamme et sur une paillasse préalablement bien nettoyée à l'alcool 70° afin d'éviter toute contamination.

1.4.2. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale a été effectué selon la norme internationale ISO 4833-1 (2013) (NI ISO 4833-1 2013) par ensemencement dans la masse (milieu PCA). Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 30°C pendant 72 h ± 3 h.

1.4.3. Dénombrement des levures et moisissures

La norme internationale ISO 7954 (1988) a été utilisée pour le dénombrement des levures et moisissures. L'ensemencement a été effectué dans la masse (milieu Sabouraud au chloramphénicol). Les boîtes ont été incubées à 25°C à l'étuve pendant 3 jours.

1.4.4. Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement des BL a été effectué suivant la norme ISO 15 214 (1998) en milieu-MRS. L'incubation des boîtes a été faite à 37°C dans des jarres (Biolab) anaérobies contenant des générateurs de CO₂ (anaérocults) pendant 72 heures.

2. Echantillonnage des aliments céréaliers fermentés

2.1. Matériel végétal

Les matières premières des aliments céréaliers fermentés (ACF) étudiés sont le maïs, le sorgho et le mil.

2.2. Suivi de la production des aliments céréaliers fermentés et échantillonnage

Sept aliments céréaliers fermentés (ACF), à savoir le *ben-saalga*, le *ben-kida*, le *fura*, le *massa*, le *Kafa*, l'*akassa*, et le *doncounou* ont été collectés à Ouagadougou (Burkina Faso). L'échantillonnage des sept ACF a été précédé d'une étape de suivi de production de chaque aliment. Au cours de l'étape de suivi de production, différentes observations et mesures ont été réalisées dans chacune des unités traditionnelles de production (UTPs) des ACF (cf. la fiche de collecte des données du *ben-saalga* en **annexe 3** et la fiche de collecte des données de six autres ACF en **annexe 4**). Ces observations et mesures ont été réalisées dans le but de faire une description précise et approfondie des procédés traditionnels de fabrication des ACF.

Dans le cas du *ben-saalga*, l'échantillonnage a été effectué à toutes les étapes de production dans 4 UTPs et sur 3 séries de productions indépendantes (**figure 7**). Au cours de l'échantillonnage du *ben-saalga*, les différents récipients et ustensiles (marmites, tamis, filtres...) utilisés ainsi que les échantillons (grains de mil, eau, filtrat, résidu, etc.) prélevés à chaque étape ont été pesés dans le but de faire une étude bilan-matière.

Quant aux six autres ACF, l'échantillonnage a été réalisé à la fois sur la matière première et sur leur produit fini au sein de 3 UTPs et sur 3 séries de productions indépendantes, à l'exception du *kafa* collecté uniquement dans une seule UTP du fait qu'il n'était pas communément vendu comme les 5 autres ACF.

2.3. Etiquetage et conservation des échantillons

Le numéro d'identification de chaque échantillon comportait une lettre **B** (Burkina Faso), **O** (Ouagadougou), une lettre **A** à **D** (pour désigner l'UTP dans le cas du *ben-saalga*) ou **P1** à **P3** (pour désigner l'UTP dans le cas des autres ACF) suivie de deux initiales du nom de l'échantillon dont la 1^{ère} est en majuscule, **J1** à **J3** (pour désigner le jour du prélèvement) et enfin la date du prélèvement. Par exemple, **BO-A-Mi-J1-9/8/15** : échantillon de mil collecté dans l'UTP A à Ouagadougou (Burkina Faso) le premier jour à la date du 9/8/2015.

Tous les échantillons prélevés, à l'exception des matières premières, ont été mis immédiatement dans une glacière contenant des pains de glace puis conservés à -20°C au laboratoire du Département Technologie Alimentaire (DTA). Ceux des matières premières ont été gardés à la température ambiante du laboratoire (variable de 25 à 30°C). La matière sèche (pour tous les échantillons) ainsi que le pH (uniquement pour les échantillons du *ben-saalga*)

ont été déterminés immédiatement. Des aliquotes d'échantillons ont été transmis au laboratoire de l'UMR Nutripass de Montpellier pour les analyses des folates totaux, de bioaccessibilité et l'évaluation de la diversité microbienne.

2.4. Procédé de préparation du *ben-saalga* bio-enrichi en folates

Toutes les bouillies ont été préparées à partir de mil (*Pennisetum glaucum*, var. Gampela), acheté chez un producteur à Ouagadougou. Un stock de mil a été au préalable constitué pour tous les essais de production. Deux types de bouillies ont été réalisés sur la base du procédé de préparation présenté sur la **figure 9**.

Le premier type a été préparé selon le procédé traditionnel de préparation du *ben-saalga* selon Tou *et al.* (2006). Le second type de bouillie a été préparé selon le procédé modifié avec une étape de précuisson du filtrat suivi de l'inoculation des souches de BL comme décrit par Songré-Ouattara *et al.* (2010). Dans le but de se conformer au type de broyage réalisé habituellement dans les UTPs, un broyage humide a été effectué et consistait en un ajout d'eau au mil au cours du broyage et il en résultait une pâte à la place de la farine sèche obtenue par Songré-Ouattara *et al.* (2010).

Le procédé modifié comportait les étapes suivantes: trempage du mil dans l'eau de robinet (1:1.5 m/v) pendant 16 h, lavage (1:2 m/v), égouttage du mil pendant 30 mn, broyage humide, addition d'eau et tamisage (1:3.5 m/v). Le filtrat a subi une précuisson (85°C, 10 mn) suivi d'une étape de refroidissement rapide sur glace (30°C). Le filtrat refroidi a été inoculé avec une souche productrice de folates (10% m/v) et une amylolytique (1% m/v). Les combinaisons de souches étaient les suivantes : *L. plantarum* 6.2 + *L. fermentation* MW2 ou *L. fermentum* 8.2 + *L. plantarum* A6 et les échantillons ont été respectivement annotés 6.2 + MW2 et 8.2 + A6. En plus du procédé traditionnel, une inoculation par pied-de-cuve (10 % m/v), a été aussi réalisée sur les pâtes précuites et fermentées pendant 24 h. Dans tous les cas, les pâtes fermentées ont été cuites pendant 5 mn à partir du point d'ébullition. Tous les essais ont été répétés trois fois pour chaque condition expérimentale.

3. Dosage des folates totaux et bioaccessibles

Le dosage des folates totaux a été réalisé par la méthode microbiologique de référence décrite par Kariluoto et Piironen (2009) avec de légères modifications récemment introduites par Saubade *et al.* (2018). Les échantillons, préalablement décongelés ont été dilués dans un tampon d'extraction (50 mM Ches/50 mM HEPES, 10 mM 2-mercaptoéthanol, 2% (w/v)

sodium ascorbate, pH 7.85) et chauffés à ébullition pendant 10 min (en vortexant 2 fois les tubes au cours du chauffage afin d'éviter la formation d'un culot gélatinisé), puis refroidis dans la glace. Après ajustement du pH à 7, 2 ; 1 ml de solution d'amylase (Sigma-Aldrich A9857, 20 mg/ml dans du sodium ascorbate 1%), et 100 µl de solution de γ -glutamylhydrolase de pancréas de poulet (R-Biopharm P2002, 100 mg/ml dans l'eau milli-Q) ont été ajoutés et les tubes ont été flushés à l'azote, avant incubation de 3h à 37°C dans l'obscurité, dans un bain avec agitation latérale. Deux millilitres de solution de protéase (Sigma-Aldrich P5147, 3 mg / ml dans l'ascorbate de sodium à 1%) ont ensuite été ajoutés, les tubes flushés et replacés 1h dans les mêmes conditions d'incubation. Après incubation, les tubes ont été chauffés 5 min à 100°C pour inactiver les enzymes, refroidis dans la glace, puis le pH a été ajusté à 6,1 avant ajustement du volume à exactement 40 ml avec de l'ascorbate de sodium 0,5% w/v, et centrifugation 30 minutes à 20 000 g à 4°C. Après des dilutions appropriées des extraits centrifugés, la concentration en folates a été déterminée dans des microplaques de 96 puits en utilisant *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 comme indicateur de croissance, l'acide folique (Sigma-Aldrich F7876) comme étalon et le milieu *folic acide casei medium* (Difco, Sparks, MD, USA) comme milieu de croissance de la souche de référence. La performance de la méthode a été confirmée par l'analyse d'une farine de référence certifiée (BCR 121 Farine complète, IRMM, Geel, Belgique). Un blanc et un échantillon de référence ont été analysés pour chaque série d'échantillons.

Les folates bioaccessibles ont été déterminés sur 4 mL de digestat (c'est-à-dire le surnageant) après digestion *in vitro*. L'extraction a été effectuée comme décrit ci-dessus, avec quelques modifications. En effet, l'utilisation de l'alpha-amylase et de protéase n'étant pas nécessaire sur les échantillons déjà digérés, seule la conjugase (γ -glutamylhydrolase) a été ajoutée pour convertir les polyglutamyl-folates bioaccessibles en mono et diglutamyl-folates qui ont été ensuite quantifiés en utilisant le dosage microbiologique. Toutes les analyses ont été faites en triplicata.

4. Digestion *in vitro*

4.1.1. Enzymes et produits chimiques

L'activité des enzymes utilisées pour la digestion *in vitro* a été préalablement vérifiée, afin de garantir une bonne performance de la méthode de Minekus *et al.* (2014). L'alpha-amylase de pancréas de porc (E-PANAA, #150402, 110.8 U/mg) (Megazyme, Bray, Irlande) a été utilisée pour les phases orale et intestinale. La pepsine de muqueuse gastrique de porc (P7000,

#BCBF9832V, 536 U/mg) (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) a été utilisée pour la phase gastrique. La trypsine de pancréas bovin (T0303, # SLBR6593V, 160,6 U / mg) et la chymotrypsine de pancréas bovin (C4129, # SLBG2821V, 40 U / mg) (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) ont été utilisées pour la phase intestinale. Plusieurs extraits de sels biliaires ont été testés pour déterminer leurs teneurs en folates, et l'extrait de sels biliaires qui avait la plus faible teneur en folates a été choisi afin d'éviter une contamination trop importante par ce réactif, qui aurait pu masquer les teneurs en folates bioaccessibles. Ainsi, l'extrait de bile de bovin et d'ovin (B8381, # SLBH1720V, 881,3 g / mol) (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) avait la plus faible teneur en folates et a été retenu pour les essais de digestion *in vitro*. Toutes les enzymes ci-dessus citées ont été stockées à -20 ° C.

4.1.2. Méthode de digestion *in vitro*

La bioaccessibilité des folates a été déterminée en utilisant le modèle statique de digestion *in vitro* de Minekus *et al.* (2014), avec des modifications mineures. Cette méthode comprend trois phases (orale, gastrique et intestinale) avec des fluides digestifs simulés (un fluide salivaire simulé (FSS, pH 7), un fluide gastrique simulé (FGS, pH 3) et un fluide intestinal simulé (FIS, pH 7). Les fluides digestifs simulés ont été préparés au préalable et congelés à -20 °C. Leur composition est indiquée dans le **tableau 21**.

Tableau 21. Composition des fluides digestifs simulés

Constituants	Concentration (stock)		FSS	FGS	FIS
			pH 7	pH 3	pH 7
	g/L	mol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	84	1	13,6	25	85
NaCl	117	2	-	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,15	0,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,5	-
NaOH	-	1	-	-	-
HCl	-	6	1,1	15,6	8,4
CaCl ₂ , 6H ₂ O	-	-	4,1	-	-

Au regard des teneurs en folates non négligeables de la pancréatine par rapport aux teneurs en folates des échantillons à analyser, nous avons choisi d'utiliser les enzymes individuelles purifiées (trypsine, chymotrypsine et l'alpha-amylase pancréatique) lors de la phase intestinale.

Dans un tube Falcon de 50 mL, 5 g d'échantillon (les aliments semi-solides comme le *massa* et le *fura* ont été au préalable légèrement broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon en porcelaine) ont été mélangés avec 4 mL de FSS contenant l'alpha-amylase, et 25 µL de solution de CaCl₂ et 975 µL d'eau milli-Q ont été ensuite ajoutés pour atteindre un rapport final aliment / réactifs de 50/50 (m / v). Ce mélange a été incubé pendant 2 minutes à 37 °C dans un bain-marie sous agitation dans l'obscurité. Lors de la phase gastrique, 8 mL de FGS contenant la pepsine et 5 µL de solution de CaCl₂ ont été ajoutés, et le pH a été ajusté à 3 avec de l'HCl 6 M, puis de l'eau Milli-Q a été ajoutée pour compléter le volume à 20 mL. Le mélange a été incubé dans un bain-marie sous agitation dans l'obscurité pendant 2 heures à 37 °C. Pour stimuler la digestion intestinale, 10 mL de FIS contenant l'extrait de sels biliaires, 6 mL de FIS contenant l'alpha-amylase pancréatique, 1 mL de solution de trypsine, 1 mL de solution de chymotrypsine, et 40 µL de solution de CaCl₂ ont été ajoutés, le pH a été ajusté à 7 avec du NaOH 2M et les échantillons ont été incubés dans un bain-marie sous agitation dans l'obscurité à 37 °C pendant 2 heures. A l'issue de la phase intestinale, les échantillons ont été centrifugés à 13.000 rpm pendant 30 mn à 4 °C, et le surnageant (i-e le digestat) a été prélevé, flushé à l'azote et stocké à -20 °C jusqu'à l'analyse des folates bioaccessibles. Toutes les digestions ont été réalisées en double. Les folates bioaccessibles (exprimés en µg/100g MF) correspondent à la fraction de folates libérés de la matrice alimentaire et potentiellement disponible pour absorption ultérieure à travers la barrière intestinale. La bioaccessibilité des folates (%) a été calculée à l'aide de la formule suivante:

Bioaccessibilité des folates (%) = Folates bioaccessibles / folates totaux X 100.

5. Techniques moléculaires

5.1. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées sur des matrices alimentaires complexes (bouillies inoculées ou non à base de mil, mil trempé, broyat de mil trempé, pâte fermentée et surnageant). Quelle que soit la matrice alimentaire, l'extraction a été faite en deux étapes : la première étape a consisté à concentrer les cellules bactériennes par des centrifugations

différentielles résumées dans la **figure 6**. Quant à la seconde étape, elle a consisté à extraire l'ADN des cellules bactériennes.

Dans cette seconde étape, à partir du culot bactérien, l'ADN total a été extrait à l'aide d'un kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, Charbonnières, France). Le culot bactérien a été 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) ont été ajoutées pour réaliser un broyage des cellules (3 minutes à 30 Hz) à l'aide d'un Tissue Lyser (Quiagen). Une lyse enzymatique a été ensuite réalisée grâce à l'addition de 120 µL de lysozyme à 20 mg/mL et de 10 µL de mutanolysine à 1 U/µL, suivies d'une incubation d'une heure à 37°C. L'échantillon a été ensuite chauffé à 80°C pendant 5 minutes, après avoir ajouté 600 µL de « nuclei lysis solution ». Les ARN ont été ensuite détruits grâce à l'ajout de 3 µL de RNase suivi d'une incubation d'une heure à 37°C. Une centrifugation à 10 000g pendant 5 minutes a permis de récupérer un surnageant dépourvu d'ARN. Les protéines ont été ensuite précipitées à l'aide de 200 µL de « protein precipitation solution » et éliminées par une centrifugation de 3 minutes à 10 000g. L'ADN a été ensuite précipité par ajout de 600 µL d'isopropanol, puis récupéré dans le culot bactérien après une centrifugation de 2 minutes à 10 000g. Le culot d'ADN a été ensuite rincé à l'éthanol 70% v/v, puis séché au speed Vac® pendant au moins 20 minutes. Enfin, l'ADN a été resuspendu dans 100 µL de « rehydratation solution » pendant une nuit à 4 °C.

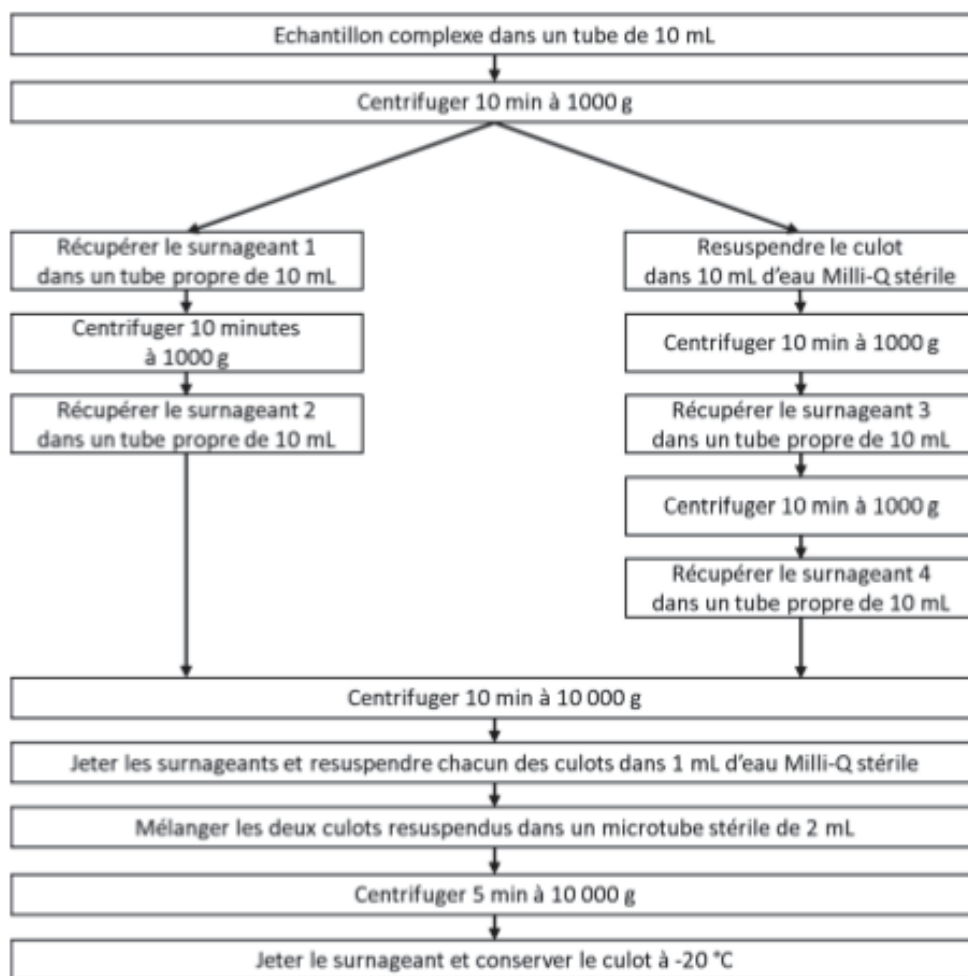


Figure 6: Centrifugations différentielles d'échantillons complexes pour éliminer la matrice alimentaire et obtenir un culot bactérien

5.2. Quantification de bactéries lactiques par PCR en temps réel

La fermentation du *ben-saalga* est due principalement à des BL appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella* (Humblot and Guyot 2009; Turpin, Humblot, and Guyot 2011). 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* (Tableau 26).

L'ADN des souches suivantes a été utilisé pour générer les matrices de quantification et aussi pour vérifier les amorces : *L. plantarum* ATCC149, *L. fermentum* ATCC14931, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC10880, *Weissella confusa* ATCC 10881t. L'ADN de chacune des 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 26**. Certaines amorces, indiquées dans le **tableau 26**, ont dû être converties en leur complément inverse pour réaliser les PCR en temps réels. Pour vérifier que les amorces utilisées ne peuvent pas s'hybrider avec l'ADN chloroplastique, des suspensions non fermentées de mil/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 de 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 non fermentées.

Pour réaliser les réactions de PCR en temps réel, l'ADN (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 étaient les suivantes: 10 minutes 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 phase 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.

5.3. Séquençage haut débit des produits de PCR

L'ADN extrait de 160 échantillons de 6 matrices alimentaires dont 4 collectés à différentes étapes de préparation du *ben-saalga* (le mil trempé, le broyat du mil trempé, la pâte fermentée et le surnageant), le *fura* (pâte fermentée à base de mil), la pâte fermentée de l'*injera*, et de celle du pain de seigle au levain a été séquençé sur la plateforme Illumina MiSeq en « paired-end » (séquences reliées par paires) par Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Germany). Les amorces spécifiques des bactéries 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') / 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), qui amplifient les régions V3-V4 de l'ADN codant pour l'ARNr16S ont été utilisées (Muyzer, Dewaal, and Uitterlinden 1993). Les séquences ont été démultiplexées par la compagnie de séquençage (Eurofins).

5.4. Analyses bio-informatiques

Les séquences démultiplexées ont été analysées par le logiciel QIIME2 (QIIME2, ver. 2018-2, <https://qiime2.org/>). Elles ont d'abord été nettoyées en utilisant le programme « Divisive

Amplicon Denoising Algorithm 2 » (DADA2) de QIIME2. Les séquences chimériques ont été éliminées par la méthode de consensus. Les séquences mitochondriales et chloroplastiques résultant de la contamination de l'ADN contenu dans les cellules végétales ont été éliminées par le programme « feature table filtering ». Les séquences résultantes du processus de nettoyage ont été alignées avec le programme MAFFT. L'alpha et la bêta diversité des ACF ont été évaluées à partir des indices Shannon et le nombre d'OTUs observés (pour l'alpha diversité) et des distances métriques « Jaccard » et « unweighted UniFrac » (pour la bêta diversité). L'assignation taxonomique a été faite en utilisant le classificateur Greengenes 99% OTUs.

6. Analyses statistiques

Dans la première publication, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, USA) et Statgraphics Centurion 18 (FranceStat, Neuilly, France). Des tests de corrélation de Spearman ont été utilisés pour déterminer les relations entre variables. Des analyses de variance (ANOVA) à un facteur, suivies de tests de Newman-Keuls ont permis d'identifier des différences significatives entre groupes homogènes (différences jugées significatives pour $p < 0,05$). Les facteurs étudiés n'étant pas indépendants (les jours d'observation étant différents d'une UTP à l'autre, et les UTP ne produisant qu'un produit), des analyses de variance à 3 facteurs imbriqués ont également été réalisées pour déterminer la variabilité entre UTP et la variabilité journalière, le facteur « jour » étant imbriqué dans le facteur « UTP », lui-même imbriqué dans le facteur « produit », selon le modèle linéaire ci-dessous :

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_{k(ij)} + e_{ijkl}$$

Avec:

y_{ijkl} = la $l^{\text{ème}}$ observation au sein du $k^{\text{ème}}$ niveau du facteur « jour », au sein du $j^{\text{ème}}$ niveau du facteur « UTP », au sein du $i^{\text{ème}}$ niveau du facteur « produit »,

μ = la moyenne globale,

α_i = l'effet fixe attribuable au $i^{\text{ème}}$ niveau du facteur « produit » (i.e. soit le type de céréale utilisée comme matière première, soit le type d'aliment fermenté produit), avec $i = 1$ à 3 (pour les matières premières) ou $i = 1$ à 7 (pour les aliments fermentés),

$\beta_{j(i)}$ = l'effet aléatoire attribuable au $j^{\text{ème}}$ niveau du facteur « UTP », imbriqué au sein du $i^{\text{ème}}$ niveau du facteur « produit », avec $j = 1$ à 20,

$\gamma_{k(ij)}$ = l'effet aléatoire attribuable au $k^{\text{ème}}$ niveau du facteur « jour », imbriqué au sein du $j^{\text{ème}}$ niveau du facteur « UTP », imbriqué au sein du $i^{\text{ème}}$ niveau du facteur « produit », avec $k = 1$ à 60,

e_{ijkl} = l'erreur résiduelle de l'observation y_{ijkl} .

Les composantes de la variance ont été calculées et exprimées en pourcentages.

Dans la deuxième publication, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, USA) et XLSTAT software (Vers. 2014.5.03). Dans cette dernière publication, une ANOVA à un facteur, suivie par un test de Newman-Keuls a été réalisée pour identifier les différences significatives entre groupes homogènes d'échantillons (différences jugées significatives pour $p < 0,05$).

Dans la troisième publication, les analyses statistiques ont été réalisées sur R (<http://www.Rproject.prg/>).

Dans toutes les analyses statistiques, les différences étaient considérées comme statistiquement significatives pour des valeurs p inférieures à 0,05.

Chapitre 4 : Résultats

1. Folates bioaccessibles et influence des procédés traditionnels de transformation sur la teneur en folates des aliments céréaliers fermentés de l'Afrique de l'Ouest

1.1. Introduction

D'après les résultats sur le statut en folates des populations vulnérables (femmes et enfants) en Afrique (**Annexe 1**), les carences en folates sont très répandues dans cette région du monde et varient de 0,7% (République Démocratique du Congo) à 86,1% des femmes en âge de procréer (Côte d'Ivoire) (Papathakis *et al.* 2007; Kennedy *et al.* 2009; Becquey and Martin-Prevel 2010; Haidar, Melaku, and Pobocik 2010; Arsenault *et al.* 2014; Balogun, Lombard, and McLachlan 2015; Shahab-Ferdows *et al.* 2015; Harvey-Leeson *et al.* 2016). Dans ce contexte, il est donc important d'améliorer les apports alimentaires en folates des populations. Cela passe par une connaissance préalable de la consommation des populations africaines ainsi que de la teneur en folates dans les aliments transformés.

La fermentation, qu'elle soit contrôlée ou spontanée, est présentée dans la littérature comme un moyen d'augmentation des ingérés en folates pour les populations (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Son potentiel d'augmentation de la teneur en folates est lié à la capacité de certains acteurs de la fermentation, dont les BL et les levures, à produire des folates. Les BL peuvent produire de 2 à 16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ dans différentes matrices alimentaires dont les céréales, tandis que les levures peuvent en produire de 9 à 17 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). La plupart de ces études ont été réalisées sur des produits largement consommés dans les pays développés comme les produits laitiers et le pain (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Par contre, les aliments céréaliers fermentés qui constituent une part importante de l'alimentation de base en Afrique (Nout 2009; Galati *et al.* 2014), ne sont presque pas investigués.

Dans le contexte ouest-africain, un seul aliment, à ce jour, a fait l'objet d'études sur son potentiel nutritionnel en folates. Il s'agit du *ben-saalga* (une bouillie de mil fermenté très consommée en Afrique de l'Ouest) (Turpin, Humblot, and Guyot 2011; Saubade, Humblot, *et al.* 2017; Greppi, Saubade, *et al.* 2017; Saubade *et al.* 2018). Par ailleurs, aucune donnée à ce jour n'est disponible sur la bioaccessibilité des folates des ACF traditionnels consommés en Afrique.

Dans ce contexte, la première étape de ma thèse a consisté à échantillonner les aliments céréaliers fermentés les plus consommés au Burkina Faso, au nombre de sept (7). Ces aliments, bien que tous échantillonnés dans un seul pays, le Burkina Faso, sont également consommés partout ailleurs dans la sous-région comme le Nigeria, le Niger, le Benin, le Togo, le Ghana, le Mali, la Côte d'Ivoire, le Sénégal etc. (Ayo, Agu, and Famoriyo 2008; Inyang and Zakari 2008; Greffeuille *et al.* 2010; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012; Soro-Yao *et al.* 2013). L'échantillonnage a été effectué directement dans les unités traditionnelles de productions. Pour évaluer l'influence des procédés de transformation sur la teneur finale en folates dans les ACF, les céréales ayant été utilisées ont été aussi collectées. Les teneurs en folates totaux des ACF et celles des matières premières ont été déterminées. Les folates bioaccessibles ont été aussi déterminés et le procédé de préparation de chaque aliment collecté a été décrit.

Parmi les sept ACF échantillonnés, le *ben-saalga* est l'un des ACF le plus étudié au sein de l'UMR Nutripass. 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 (Tou *et al.* 2006; Tou *et al.* 2007; Mouquet-Rivier *et al.* 2008). Des études ont été menées dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle de cet aliment (Tou *et al.* 2007; Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010; Greppi, Saubade, *et al.* 2017). De récentes études, conduites au sein de l'UMR Nutripass, ont mis en évidence un contraste entre l'énorme potentiel génétique de synthèse des folates de son microbiote et sa faible teneur en folates. En effet, Turpin Humblot, and Guyot (2011), ont mis en évidence un fort potentiel génétique de synthèse des folates du microbiote du *ben-saalga*, puisque les deux gènes *folK* et *folP*, marqueurs de la capacité de synthèse de cette vitamine, ont été détectés dans 96% de 155 souches de BL isolées du *ben-saalga* (Turpin, Humblot, and Guyot 2011). Ce potentiel génétique a par la suite été confirmé par Saubade, Humblot, *et al.* (2017) dans les métagénomés de bouilles de *ben-saalga* directement rapportées des UTPs. Dans cette étude, les gènes *folK* et *folP* ont été détectés dans 80% des métagénomés extraits de bouillie de *ben-saalga* (Saubade, Humblot, *et al.* 2017). Ce potentiel de synthèse des folates a par la suite été vérifié par Greppi, Hemery *et al.* (2017) à l'aide des tests phénotypiques. La capacité de production des folates en milieux de culture des BL isolées du *ben-saalga* était non seulement espèce et souche dépendante, mais aussi milieu de culture dépendante (Greppi, Hemery, *et al.* 2017). Malgré ce potentiel de synthèse des folates des acteurs de la fermentation du *ben-saalga*, la teneur en folates de cet aliment est très faible, variant de 0 à 3.3 µg/100g MF

(Saubade, Humblot, *et al.* 2017). Pour comprendre les raisons d'une telle différence, une récente thèse s'est intéressée à l'influence des étapes du procédé traditionnel de production de cette bouillie en milieu contrôlé (Saubade *et al.* 2018). Cette approche a consisté à reproduire en laboratoire toutes les étapes du procédé traditionnel de préparation de cet aliment et à réaliser une étude bilan-matière pour suivre précisément les pertes et les gains en folates à toutes les étapes du procédé, en tenant compte des pertes de matières, mesurées par des pesées (diffusion dans l'eau, séparation des enveloppes, etc.). Toutefois, les conditions de production du *ben-saalga* en laboratoire ne reflètent pas exactement les conditions réelles de production du *ben-saalga* dans les ateliers traditionnels (ustensiles, broyeurs, air, eau, les quantités de matières premières, durées, cuisson etc.). En outre, certaines étapes réalisées au laboratoire dans le cadre de cette thèse sont différentes de celles observées sur le terrain. C'est par exemple l'étape du broyage qui, dans les UTPs, se fait en ajoutant de l'eau au moment du broyage, tandis qu'en laboratoire les graines trempées sont broyées telles quelles.

Dans l'optique de mieux évaluer l'impact des étapes du procédé traditionnel sur la teneur en folates des ACF dans leur contexte réel de production et aussi de comparer les résultats de cette étude à ceux de Saubade *et al.* (2018), la seconde étape de cette étude a consisté à faire à nouveau une étude bilan-matière pour identifier les étapes du procédé de transformation susceptibles d'influencer les teneurs en folates de ces aliments dans les UTPs.

Les principaux résultats de cette partie ont été valorisés sous forme d'un article soumis dans *Journal of Food Composition and Analysis*. Une partie de ces résultats a également été valorisée sous la forme d'une communication orale et d'un poster présentés au Symposium International sur la Science et la Technologie tenu du 4 au 8 décembre 2017 à Ouagadougou (Burkina Faso).

Projet d'article

Fabrice Bationo, Christèle Humblot, Laurencia T. Songré-Ouattara, Fatoumata Hama-Ba, Manon Le Merrer, Morgane Chapron, Susanna Kariluoto and Youna M. Hemery (2018). Folate in West-African cereal-based fermented foods: bioaccessibility and influence of processing.

Soumis dans Journal of Food Composition and Analysis

Communication orale (Annexe 5)

F. Bationo, C. Humblot, LT. Songré-Ouattara, F. Ba-Hama, C. Parkouda, M. Chapron, M. Le Merrer, H. Lingani-Sawadogo, B. Diawara, Y. Hemery (2017). Etude du potentiel de contribution des aliments céréaliers fermentés à la couverture des besoins en folates (vitamine B9) au Burkina Faso : impact des procédés sur les teneurs en folates. Symposium International sur la Science et la Technologie 2017, 2^{ème} édition (Ouagadougou, 04 au 08 Décembre 2017)

Poster (Annexe 6)

F. Bationo, C. Humblot, LT. Songré-Ouattara, F. Ba-Hama, C. Parkouda, S. Kariluoto, M. Chapron, M. Le Merrer, H. Lingani-Sawadogo, B. Diawara, Y. Hemery (2017). Mise au point d'une méthode d'évaluation de la bioaccessibilité des folates (vitamine B9) : Application à des aliments céréaliers fermentés. Symposium International sur la Science et la Technologie 2017, 2^{ème} édition (Ouagadougou, 04 au 08 Décembre 2017)

1.2. Publication: Folate in West-African cereal-based fermented foods: bioaccessibility and influence of processing

Folate in West-African cereal-based fermented foods: bioaccessibility and influence of processing

Fabrice Bationo^{1,2}, Christèle Humblot², Laurencia T. Songré-Ouattara¹, Fatoumata Hama-Ba¹, Manon Le Merrer², Morgane Chapron², Susanna Kariluoto³ and Youna M. Hemery^{2*}

¹ Département Technologie Alimentaire, IRSAT, CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso

² Institut de Recherche pour le Développement (IRD); UMR 204 Food and nutrition research in the global south (NUTRIPASS), IRD / University of Montpellier / SupAgro, Montpellier, France

³ Department of Food and Nutrition, University of Helsinki, Helsinki, Finland

* Corresponding author:

Youna Hemery: +33 4 67 41 62 48; youna.hemery@ird.fr

ORCID ID: 0000-0003-0408-2552

ResearcherID: C-7886-2011

Abstract:

Folate deficiency is a public health issue in West Africa, where dietary folate intake is often inadequate. Cereal-based fermented foods (CBFF) are frequently consumed by young children in West-Africa. To improve the folate intake from CBFF, it is important to better understand the influence of traditional processing steps on folate content and bioaccessibility in CBFF. Seven CBFF types (gelatinized doughs, porridges, dumplings, and fritters, made from corn, sorghum or pearl millet) were produced according to the commonly used methods in traditional production units in Burkina-Faso. Their analysis showed that the total folate content was rather low, between 1.8 and 31.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ fresh weight. Folate degradation occurred at several steps during the cereal grain processing into CBFF, for instance during debranning, soaking and drying. Conversely, fermentation increased the folate content of some CBFF. Folate bioaccessibility, assessed using a static *in vitro* digestion model, ranged from 23% to 81%. The bioaccessible folate content was influenced by the total folate content, the food matrix structure, and folate stability during digestion. Analysis of the CBFF contribution to the reference folate intake showed that these foods cover at most 23% of the folate requirements in young children.

Key-words:

Vitamin B9, processing, cereal, digestion, fermentation, bioaccessibility, Africa, infant food, complementary feeding

Highlights:

The total folate content of West African cereal-based fermented foods is rather low

- Traditional process steps (debranning, soaking, drying) influence folate content
- Fermentation can increase folate content in some cereal-based fermented foods
- Folate bioaccessibility is strongly influenced by the food matrix structure
- Folate intake from such foods does not cover young children's folate requirements

1. Introduction

Folate (vitamin B9) is essential for human metabolism, because it is involved in cell division, DNA replication, methylation, biosynthesis of nucleotides, and amino acid metabolism (McNulty and Scott 2008; Preedy 2013). Folate deficiency is a global health issue, in both developed and low-income countries (McLean *et al.* 2008; Youngblood *et al.* 2013), and leads to many pathologies, such as neural tube defects, megaloblastic anemia, and colorectal cancer (Bailey *et al.* 2015; FAO/WHO 2004). Recent studies carried out in West African countries (Burkina Faso, Ivory Coast, Mali and Senegal) showed that folate deficiency is a severe public health problem among women of reproductive age and children (Arsenault *et al.* 2014; Fiorentino *et al.* 2016; Kennedy *et al.* 2010; Rohner *et al.* 2014). For instance, in 2010, the folate dietary intake was adequate only in 12% of women of reproductive age in Burkina Faso (Becquey and Martin-Prevel 2010).

Cereals are the main crops in Africa (45% of arable land), and make an important contribution to the human diet in this continent (Galati *et al.* 2014). They cannot be eaten raw, and are processed before consumption. Fermentation is widely used in many West African countries to transform cereals (sorghum, maize and millet) into edible products (Guyot 2012). Traditional cereal-based fermented food (CBFF), such as porridges or gelatinized doughs, are frequently consumed by young children in West Africa (Greffeuille *et al.* 2010; Hama 2012). Fermentation is an ancestral way to preserve food products, and to enhance their health and nutritional quality (Nout 2009). Fermentation is also considered as a good way to increase the folate content of food products, because yeast and many lactic acid bacteria (LAB) can synthesize folate during fermentation (Moslehi-Jenabian *et al.* 2010; Saubade, Hemery *et al.* 2017). Studies in industrialized countries on the ability of fermentation to improve the folate content of food (Jägerstad *et al.* 2005; Laiño *et al.* 2013) reported promising results for some CBFF, such as rye and oat sourdoughs (Kariluoto *et al.* 2004; Kariluoto *et al.* 2006).

Other processing steps used in cereal processing, such as milling, debranning, soaking, and cooking also can influence the folate content of cereal-based foods (Arcot, Wootton *et al.* 2002; Kariluoto *et al.* 2006; Witthöft *et al.* 1999). However, data on the influence of cereal processing on folate content in African cereal-based foods are very scarce. One recent study (Saubade *et al.* 2018) assessed the influence of traditional processing steps (soaking, wet-milling, sieving, and fermentation) on the final folate content of a porridge commonly eaten in Burkina Faso. Three other studies focused on the production of folate in African CBFF, such

as fermented maize-based porridge (Hjortmo, Hellström, and Andlid 2008) and fermented pearl millet-based porridges (Greppi, Saubade *et al.* 2017; Saubade, Humblot, *et al.* 2017). They found that fermentation has a positive effect on folate content when microorganisms that promote folate production are used.

Moreover, the absorption of dietary folate mainly depends on its bioaccessibility (i.e., the fraction of a nutrient that is released from the food matrix and is available for intestinal absorption) (Parada and Aguilera 2007). Folate bioaccessibility can be affected by many factors, including the action of gastrointestinal enzymes and pH during digestion, the presence of inhibitors, and the matrix effects (Arkbåge *et al.* 2003; Parada and Aguilera 2007; Ringling and Rychlik 2017). Very few studies have evaluated folate bioaccessibility from foods, and to our knowledge, none focused on folate bioaccessibility in traditional African cereal-based foods.

However, to improve folate intake from African CBFF, more accurate information on traditional cereal processing methods and their influence on folate content is required, as well as on the folate bioaccessibility of these commonly eaten food products.

Therefore, the objectives of the present work were: i) to describe traditional methods of production of CBFF (porridges, fritters, gelatinized doughs, dumplings) frequently consumed in Burkina Faso and other West African countries; ii) to provide information on the folate content and bioaccessibility in these CBFF, and iii) to study the influence of some traditional processing steps on the folate content in these CBFF. Seven CBFF (*akassa*, *doncounou*, *kaffa*, *massa*, *fura*, *ben-kida*, and *ben-saalga*), made from corn, sorghum, or pearl millet, were produced in 20 traditional production units (TPUs) in Ouagadougou, Burkina Faso. Moreover, the processing steps of *ben-saalga* were monitored in detail, to carry out a mass balance assessment and to precisely quantify the folate gains and losses. Folate bioaccessibility was assessed using a static *in vitro* digestion model, and the obtained data allowed calculating the potential contribution of the seven CBFF types to the recommended folate intake of young children.

2. Material and methods

2.1. Sampling and observation of processing

Seven CBFF types were investigated in this study: *akassa* and *doncounou* (made from corn, *Zea mays*), *kaffa* (made from sorghum, *Sorghum bicolor*), and *massa*, *fura*, *ben-kida*, and *ben-saalga* (made from pearl millet, *Pennisetum glaucum*). The food products studied here were sampled in Ouagadougou, Burkina Faso.

The processing of *ben-saalga*, the most commonly eaten CBFF, was monitored in detail in four different TPUs (three different days for each TPU). The parameters implemented at each steps were precisely recorded (e.g., material used, time, temperature, pH, and weight of the different fractions and by-products). Samples of pearl millet grains (raw material), intermediate/final products and by-products were collected.

For five other CBFF (*akassa*, *doncounou*, *massa*, *fura*, and *ben-kida*), samples of raw materials (*i.e.*, grains of pearl millet, or corn) and final products (fermented foods, as eaten by consumers) were collected in three different TPUs for each food type, on three different days for each TPU. The process steps were not followed in details, but were listed by recording the producers' declarations, including estimations of the fermentation and cooking times. For *kaffa*, the least commonly eaten CBFF, samples of raw material (sorghum) and final product were collected on three different days from only one TPU.

For all seven CBFF, samples were taken in triplicate, and immediately stored at -20°C.

2.2. *Ben-saalga* mass balance assessment

The traditional processing of pearl millet into *ben-saalga* has been described before (Tou *et al.* 2006). To follow the folate losses and gains during *ben-saalga* processing, and to monitor folate distribution in pearl millet fractions, a mass balance assessment was carried out at each TPU, as described by Saubade *et al.* (2018). Briefly, the weight of sampled products (samples taken for folate analysis, raw materials, intermediate products, by-products, and final products) was recorded at each step of the process. The dry matter (DM) content of all samples was measured, then each sample weight and DM content were combined with the folate content, to calculate the amount of folate (in µg) in the original pearl millet grains, and in the

intermediate and final products. The folate content distribution in the intermediate and final products was expressed as a percentage of the initial folate quantity in pearl millet grains.

2.3. Dry matter content and total lipid content

The DM content of all samples was measured by drying the samples at 105°C in open dishes until constant weight, and was expressed as g DM/100 g sample.

In *massa* samples, the lipid content also was measured because the frying step led to lipid absorption that might influence the DM content. Fritters were first lyophilized and ground, and then lipids were extracted with diethyl ether using a semi-automatic 2055 Soxtec system (Foss, Nanterre, France) according to the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) Official Methods 2003.05 and 2003.06 (AOAC 2006). The defatted DM was calculated by subtracting the lipid content from the DM content.

2.4. Determination of total and bioaccessible folate contents

Total folate content was determined in triplicate using the microbiological assay described by Kariluoto and Piironen (2009) and adapted by Saubade *et al.* (2018). Briefly, thawed samples were diluted in extraction buffer and heated at 100°C for 10 min. After adjusting the pH to 7.2, a three-step enzymatic extraction with α -amylase (Sigma-Aldrich A9857, 20 mg/ml in 1% sodium ascorbate), chicken pancreas γ -glutamylhydrolase (R-Biopharm P2002, 100 mg/ml in Milli-Q water) and protease (Sigma-Aldrich P5147, 3 mg/ml in 1% sodium ascorbate) was used to release folate from the food matrix. After appropriate dilutions of the centrifuged extracts, folate concentration was determined in microtiter plates with *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 as the growth indicator organism, folic acid (Sigma-Aldrich F7876) as the calibration standard, and Folic Acid Casei Medium (Difco, Sparks, MD, USA) as the assay medium. The method performance 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 series of samples.

The bioaccessible folate content was determined in 4 ml of digesta (i.e., supernatants of the samples used for *in vitro* digestion). The extraction was carried out as described above, with some modifications. Specifically, α -amylase and protease were not needed for already digested samples, and only the conjugase (γ -glutamylhydrolase) was added to convert bioaccessible

polyglutamyl folate into mono and diglutamyl folate forms that were quantified using the microbiological assay.

2.5. Chemicals and enzymes used for *in vitro* digestion

Prior to *in vitro* digestion, the enzyme activity was checked to guarantee the efficiency of the method described by Minekus *et al.* (2014). Porcine pancreatic α -amylase (E-PANAA, #150402, 110.8 U/mg) was purchased from Megazyme (Bray, Ireland). *Aspergillus oryzae* alpha-amylase (A9857, #SLBM0836V, 50.4 U/mg), pepsin from porcine gastric mucosa (P7000, #BCBF9832V, 536 U/mg), and bovine pancreatic trypsin (T0303, #SLBR6593V, 160.6 U/mg) and chymotrypsin (C4129, #SLBG2821V, 40 U/mg) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MI, USA). Bovine and ovine bile extracts (B8381, #SLBH1720V, 881.3 g/mol) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MI, USA). After quantifying the folate content of several bile extracts, the one with the lowest folate content was chosen, in order not to interfere with the folate bioaccessibility assay. All the enzymes were stored at -20°C . All other used chemicals were of analytical grade.

2.6. *In vitro* digestion (folate bioaccessibility)

Folate bioaccessibility was assessed using the static *in vitro* digestion model described by Minekus *et al.* (2014), with minor modifications. This method includes the oral (simulated salivary fluid, SSF, pH 7), gastric (simulated gastric fluid, SGF, pH 3), and small intestinal (simulated intestinal fluid, SIF, pH 7) phases. As the folate content of pancreatin was high, purified enzymes (i.e., trypsin, chymotrypsin, and pancreatic α -amylase) were used.

In a 50 ml Falcon tube, 5 g of roughly ground sample was mixed with 4 ml of SSF containing α -amylase, 25 μl of CaCl_2 solution and 975 μl of Milli-Q water to reach a final ratio of food/reagents of 50: 50 (W/ V). The mixture was incubated at 37°C in a shaking water bath for 2 min. Then, 8 ml of SGF with pepsin and 5 μl of CaCl_2 solution were added, and the pH was adjusted to 3 with 6 M HCl. After adjusting the volume to 20 ml with Milli-Q water, the mixture was incubated in a shaking water bath at 37°C for 2 hours. To stimulate intestinal digestion, 10 ml of SIF containing bile extract, 6 ml of SIF containing pancreatic α -amylase, 1 ml trypsin solution, 1 ml chymotrypsin solution, and 40 μl of CaCl_2 solution were added. After adjusting the pH to 7 with 2 M NaOH, samples were incubated in a shaking water bath at 37°C for 2 hours. Finally, samples were centrifuged at 13000 rpm at 4°C for 30 min, and

supernatants (i.e., the digesta) were stored at -20°C for bioaccessible folate analysis. All samples were digested in duplicates.

Bioaccessible folate (in µg/100g fresh weight, FW) corresponds to the fraction of folate that is released from the food matrix, and potentially available for absorption through the intestinal barrier. Folate bioaccessibility (in %) was calculated using the following formula:

Folate bioaccessibility (%) = Bioaccessible folate/Total folate * 100.

2.7. Estimation of CBFF contribution to the folate intake of infants

To estimate the daily folate intake (DFI, in µg/day) from the seven CBFF, known data on the daily frequency (DF) of consumption and portion sizes (PS, in g) of each CBFF for young children aged 6 to 35 months (Hama 2012) were used. Based on these data and on the total folate content (TFC in µg DFE/100g FM) of the seven CBFF, their DFI was calculated as follows:

DFI = TFC/100 * PS * DF
For breastfed children, the folate intake from breast milk was also taken into account, based on a folate content of 85 µg/l in breast milk (Allen 2012), as well as the average daily amount of breast milk consumed by children in developing countries, as described by the World Health Organization (WHO) (1998).

Then, the respective contribution of CBFF and breastmilk to the recommended folate intake (RNI) were calculated, taking into account the specific RNI for each age group (FAO/WHO 2004). The DFI needed from other food products (DFI-OFP) than breast milk to reach 100% of the RNI was also calculated. Finally, based on the DFI-OFP, the daily CBFF intake needed to reach 100% of the RNI, if only breast milk and CBFF were consumed, was calculated.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion 18 (FranceStat, Neuilly, France). The Spearman's rank correlation was used to determine the strength of the relationships between variables. One-way analysis of variance (ANOVA) and Newman-Keuls post-hoc tests were used to identify significant differences between samples. Differences were considered statistically significant with p-values <0.05.

Three-level nested ANOVA was also carried out to test the between-producer and the between-day (within producers) variabilities. These variables are nested, meaning that each value of these nominal variables (i.e., the subgroups 'producer' and 'day') are found in combination with only one value of the higher-level nominal variable (i.e., the groups 'product' or 'producer'). The linear model for three-way unbalanced nested arrangement is given by:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_{k(ij)} + e_{ijkl}$$

where:

y_{ijkl} is the l^{th} observation within the k^{th} level of factor 'day' within the j^{th} level of factor 'producer' within the i^{th} level of factor 'product'; μ represents the overall mean, α_i is the fixed effect due to the i^{th} level of factor 'product' (i.e., either the type of raw material used, or the type of CBFF produced), with $i = 1$ to 3 (for raw materials) or $i = 1$ to 7 (for CBFF); $\beta_{j(i)}$ is the random effect due to the j^{th} level of factor 'producer' nested within the i^{th} level of factor 'product', with $j = 1$ to 20; $\gamma_{k(ij)}$ is the random effect due to the k^{th} level of factor 'day' nested within the j^{th} level of factor 'producer' nested within the i^{th} level of factor 'product', with $k = 1$ to 60; and e_{ijkl} is the residual error of the observation y_{ijkl} .

Variance components were calculated and expressed as percentages.

3. Results

3.1. Description of food products and processes

The processes used to produce the seven CBFF from different raw materials, corn (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and pearl millet (*Pennisetum glaucum*), are summarized in **Figure 7**. *Akassa* and *doncounou* are thick fermented and cooked gelatinized doughs made of corn, using similar processes. The main difference is that *doncounou* is made from non-hulled corn

(wholegrain), whereas *akassa* is made from debranned and degermed corn. Both processes included grain sorting, washing and draining. Then, grains were soaked for 24-48 h (*akassa*), or for 3 days (*doncounou*), with daily renewal of the soaking water. After draining, wet milling was carried out. For *akassa* production, the paste of milled corn was sieved with addition of water to remove the remaining bran particles, and the obtained batter was left to rest at ambient temperature for 2-24 h, depending on the producer (if they wanted to get a sour taste or not). For *doncounou* production, after wet milling, the wholegrain paste was left to rest at ambient temperature for 7-24 h, depending on the producer (decantation). After decantation, for *akassa*, the supernatant was removed, and the fermented paste was cooked in boiling water mixed or not with part of the supernatant (depending on the producer) for 30 min, before being shaped into balls and wrapped in plastic bags. For *doncounou*, the fermented paste was quickly pre-cooked in boiling water to yield a thick dough that was then shaped into balls, wrapped in plastic bags, and steam-cooked and sold as a ready-to-eat food. *Kaffa* also is a thick, fermented and cooked gelatinized dough, but made of sorghum. After grain winnowing and sorting, *kaffa* processing was similar to *akassa* processing: soaking for 10 h, washing, draining, wet-milling, filtration with addition of water to remove bran particles, decantation for 11h, and cooking of the fermented paste in boiling water.

Massa are fritters made from pearl millet batter, directly consumed, or crumbled in a porridge. Processing included grain winnowing, sorting, washing and sun drying, before dry milling in a community mill. Part of the obtained wholegrain flour was then cooked in water to get a porridge that was left to cool, while most of the flour was sieved to remove bran particles. The sieved flour was mixed with water and kneaded to obtain a homogenous dough, that was mixed with the previously prepared porridge, other ingredients (sugar, ginger, mint), and water. The obtained batter was left to rest for 3-7 h (fermentation could occur). The fermented batter was then fried in oil for 1-3 min to make fritters. Frying led to oil adsorption in the fritters, with average lipid contents of 15.5 ± 4.6 , 6.7 ± 2.8 , and 17.1 ± 2.4 g/100g FW for *massa* produced in TPU 1, 2 and 3, respectively.

Fura is a semi-solid dumpling meal made from pearl millet that can be consumed in different ways. *Fura* processing comprised the following steps: grain winnowing, dehulling, sorting, washing, and draining followed by sun drying (for 30 min for two producers, and up to 10 h for the other), before dry milling. The wholegrain flour was sieved or not, depending on the producer. The flour was then blended with spices and lukewarm water, and the resulting

dough was kneaded and molded into dough balls that could be left to ferment or not (depending on the TPU) for up to 24 h at ambient temperature. These fermented dough balls were then boiled for 10-30 min and, while still hot, they were pounded into a sticky cohesive mass. This *fura* dough was molded again into smaller balls that were dusted with flour and left to ferment again for 8 to 24 h before being sold. *Fura* balls can be made into porridge by crumbling and mixing them with *ben-saalga*, *ben-kida*, fermented milk, or water with sugar. It can be used as food, refreshing drink, or weaning food for infants.

Ben-saalga and *ben-kida* are fermented porridges made from pearl millet, often used as complementary food for young children. Their processing was similar: grains were soaked for 10–24 h depending on the producer, sorted, washed, and drained before wet-milling. The obtained paste was filtered through a piece of muslin, with addition of water, to remove the draff (bran particles). The pH of the filtered batter used for *ben-saalga* production ranged between 5.4 and 6.4. This batter was left to rest for 10-24 h at ambient temperature (26.8-31.0°C) to allow decantation and fermentation. After decantation, the pH of the fermented product was 3.4-3.9. The liquid supernatant was separated from the thicker fermented paste, and boiled. Depending on the producer, part of the supernatant could be discarded and replaced by water, to reduce the sour taste. The fermented paste was added to the boiling supernatant and cooked for 5-20 min. Water could be added to adjust the porridge texture. The cooked porridge had a pH of 3.4–4.0, and a temperature of 75–78°C. For the preparation of *ben-kida*, lumps were added to the boiling mixture, to make porridge with a granulated texture. Those lumps were made from pearl millet flour that was moistened with water and stirred by hand. The moist bulk was forced through a sieve to form granules of similar caliber. Granules were then hand-rubbed and sieved again to obtain small spherical granules.

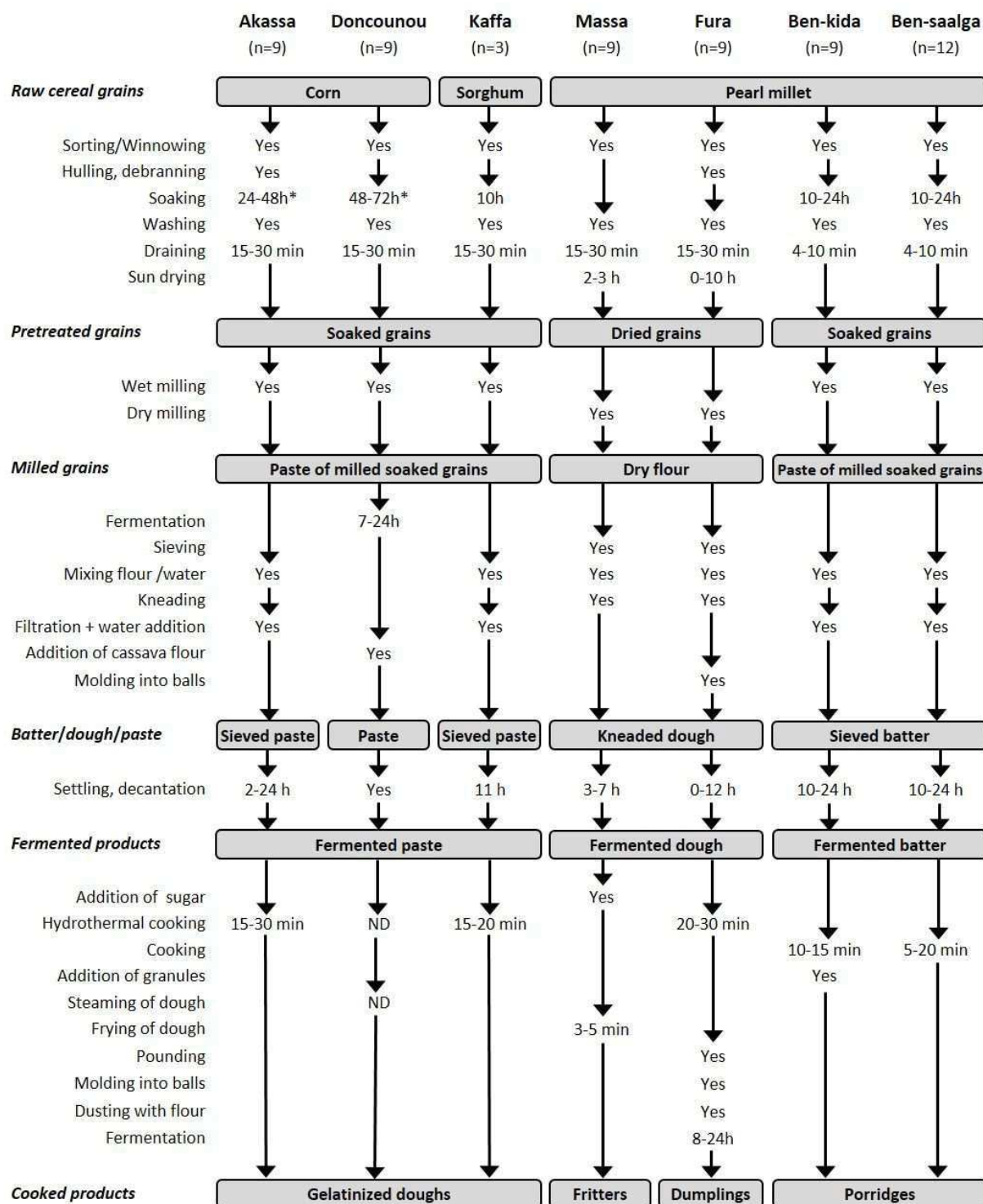


Figure 7: Processing of cereal-based fermented foods in traditional processing units.

“Yes” indicates that the corresponding step was carried out in the process. When available, the step duration was indicated. ND: duration not determined. *: Soaking water was daily renewed

3.2. Dry matter content of raw materials and fermented foods

Measurement of the raw material DM content (**Table 22**) did not highlight any significant difference among cereal grains, whatever the producer or the day of production. Conversely, the DM content of the different CBFF types (**Table 22**) varied significantly. DM content was very low in porridges (*ben-kida* and *ben-saalga*) (5.7 to 8.3 g/100g). The DM contents of the three gelatinized doughs (*akassa*, *doncounou*, *kaffa*) varied greatly (from 11.1 to 30.2 g/100g). The highest DM content (56.7-63.6 g/100g) was observed in fritters (*massa*). The DM content of *doncounou* and *massa* were significantly different among TPUs. A nested analysis of variance showed that for *doncounou*, this was due to between-producer variability (88.6% of the variance) rather than between-day variability (11.0% of the variance). Conversely, for *massa*, 89.4% of variance was explained by between-day variability, and only 10.5% by between-producer variability.

The *massa* DM content (**Table 22**) included the lipid content brought by oil absorption during frying. The defatted DM content was also calculated, and was of 48.1 ± 3.8 , 50.0 ± 4.4 and 45.1 ± 5.7 g/100g for *massa* produced in TPU 1, 2 and 3, respectively.

Tableau 22. Dry matter content and total folate content in raw materials and fermented foods

Food products (and respective raw materials)	Producer	Dry matter content (g/100g FW)		Total folate content (µg/100g FW)	
		Raw materials	Fermented foods	Raw materials	Fermented foods
<i>Akassa</i> (corn)	P1	89.7 ± 0.5	11.4 ± 1.1 ^b	13.8 ± 1.3 ^j	3.1 ± 0.8 ^{op}
	P2	89.9 ± 0.1	11.1 ± 0.2 ^b	16.8 ± 1.3 ^{jk}	1.8 ± 0.3 ^o
	P3	89.6 ± 0.4	13.0 ± 1.1 ^b	21.2 ± 1.4 ^k	2.7 ± 0.4 ^o
<i>Doncounou</i> (corn)	P1	88.4 ± 0.7	24.1 ± 0.9 ^d	15.7 ± 2.4 ^j	4.7 ± 0.8 ^p
	P2	88.8 ± 0.6	26.6 ± 1.6 ^e	14.8 ± 2.0 ^j	4.8 ± 0.6 ^p
	P3	90.4 ± 2.4	30.2 ± 0.1 ^f	13.8 ± 1.7 ^j	3.6 ± 0.6 ^p
<i>Kaffa</i> (sorghum)	P1	88.9 ± 0.4	17.4 ± 3.1 ^c	16.3 ± 2.6 ^{jk}	5.2 ± 1.3 ^{pq}
<i>Massa</i> (pearl-millet)	P1	89.4 ± 0.7	63.6 ± 8.1 ⁱ	57.2 ± 3.7 ^l	7.2 ± 1.3 ^q
	P2	89.8 ± 0.8	56.7 ± 3.8 ^h	72.6 ± 4.0 ⁿ	10.2 ± 1.0 ^{qr}
	P3	89.9 ± 0.4	62.2 ± 6.2 ⁱ	63.3 ± 3.9 ^{lm}	12.6 ± 3.2 ^{rs}
<i>Fura</i> (pearl-millet)	P1	89.6 ± 0.3	42.5 ± 1.9 ^g	73.2 ± 3.9 ⁿ	16.2 ± 1.2 ^s
	P2	89.7 ± 0.8	42.2 ± 3.1 ^g	65.4 ± 3.7 ^{mn}	31.3 ± 2.5 ^t
	P3	89.1 ± 1.0	42.6 ± 1.2 ^g	64.0 ± 9.7 ^{mn}	29.6 ± 4.1 ^t
Ben-kida (pearl-millet)	P1	90.0 ± 0.6	8.3 ± 0.9 ^a	54.4 ± 4.2 ^l	2.5 ± 0.4 ^o
	P2	90.5 ± 0.7	6.1 ± 0.7 ^a	65.3 ± 7.0 ^{mn}	2.5 ± 0.3 ^o
	P3	90.4 ± 0.5	7.9 ± 0.7 ^a	59.3 ± 6.9 ^l	2.5 ± 0.8 ^o
<i>Ben-saalga</i> (pearl-millet)	P1	89.0 ± 0.7	5.8 ± 0.4 ^a	62.6 ± 6.3 ^{lm}	1.9 ± 0.3 ^o
	P2	90.0 ± 0.3	6.6 ± 1.9 ^a	70.3 ± 6.9 ^{mn}	2.9 ± 1.3 ^{op}
	P3	89.3 ± 0.9	5.7 ± 0.6 ^a	68.6 ± 7.4 ^{mn}	1.8 ± 0.2 ^o
	P4	89.2 ± 0.1	6.6 ± 0.1 ^a	73.4 ± 8.2 ⁿ	2.4 ± 1.0 ^o

Results are the mean ± standard deviations (for each producer, samples were collected on three different days, and analyzed in triplicate). ANOVA: In each column, values with no common letter are considered significantly different (p<0.05). No significant differences were observed for the dry matter content of raw materials.

3.3. Folate content of raw materials and fermented foods

Analysis of the folate content of raw materials and fermented foods (**Table 22**) showed significant differences among cereal types. A three-level nested analysis showed that 95.6% of variance was due to between-cereal type variability, 1.9% to between-producer variability, and 1.1% to between-day variability. The folate content of raw corn and sorghum ranged from 13.8 to 21.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW, whereas it was much higher in pearl millet (54.4 to 73.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW). The corn grain color did not influence the folate content, because no significant difference was observed between white and yellow corn (15.7 ± 3.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW and 17.5 ± 2.9 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW, respectively). The folate content variability in pearl millet grains was mainly due to between-producer variability (32.5% of variance) and between-day variability (26.1% of variance), whereas the CBFF type did not influence much the folate content of the cereal used as raw material (only 8.8% of variance).

Significant differences in total folate content were observed in the seven CBFF. A three-level nested analysis of variance showed that 84.0% of variance was due to between-food variability, 13.0% to between-producer variability, and 1.9% to between-day variability. Folate content was very low in porridges (*ben-kida* and *ben-saalga*: 1.8 to 2.9 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW), and also in gelatinized doughs (*akassa*, *doncounou*, and *kaffa*: 1.8 to 5.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW). The highest folate content was observed in dumplings (*fura*): 16.2 to 31.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW. Significant variations in folate content from one producer to another were observed in *massa* and *fura*. A nested ANOVA showed that for *massa* this variability was due to both between-producer and between-day variability (52.5% and 37.7% of the variance, respectively), whereas for *fura* it was mostly explained by between-producer variability (87.8% of the variance compared with 6.4% due to between-day variability). Indeed, the folate content of *fura* produced in TPU 1 (the one that used sun drying instead of draining) was significantly lower compared with that of the other TPUs.

3.4. Influence of processing on CBFF folate content

The first step of *akassa* processing (i.e., corn grain debranning and degerming) resulted in major folate losses because debranned corn contained only 49.6 ± 14.0 % of the folate detected in the initial grains (data not shown). The folate content in wholegrain corn ranged from 13.8 to 21.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW, whereas that of debranned corn ranged from 7.0 to 10.8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW. Folate loss ranged from 23% to 66%, but no significant difference among TPUs was observed.

Table 23 summarizes the folate loss or gain in the final food products compared with the raw materials. To avoid the influence of the various water amounts added during processing, the folate content of the different CBFF was expressed in ng/g DM, and compared with that of cereal grains. The highest folate loss was observed in fritters (*massa*; reduction between 59% and 76%), followed by porridges (reduction between 44% and 59% for all *ben-kida* and *ben-saalga* samples, whatever the producer). Conversely, folate content increased by 66% in *kaffa*, suggesting that folate was produced during processing. Folate content was greatly reduced (by 53%) in the dumplings made by the first *fura* producer (sun drying instead of draining), whereas no folate loss was observed in the *fura* made by the other producers. This suggests that folate was not degraded during *fura* processing and that the added water only ‘diluted’ the vitamins initially present in the grains, or that some loss occurred but that folate was produced at one stage or another to counterbalance this loss. Likewise, no significant difference in folate content between raw material and CBFF was observed in most *akassa* and *doncounou* samples, except for one *doncounou* producer (folate loss of 22%) and one *akassa* producer (folate gain of 78%).

Tableau 23. Folate loss or gain during the processing of cereal grains into fermented foods

Food products (and raw materials)	Producer	Folate content (ng/g DM)		Folate loss or gain (%)
		Raw material	Processed food	
<i>Akassa</i> (corn)	P1	154.3 ± 14.6	275.3 ± 61.7	+78% *
	P2	186.7 ± 14.2	166.3 ± 29.9	-11%
	P3	236.5 ± 15.3	206.0 ± 40.8	-13%
<i>Doncounou</i> (corn)	P1	178.0 ± 27.8	195.6 ± 35.4	10%
	P2	166.9 ± 21.8	179.3 ± 18.0	7%
	P3	152.5 ± 18.8	118.3 ± 19.4	-22% *
<i>Kaffa</i> (sorghum)	P1	183.1 ± 28.9	303.6 ± 73.1	+66% *
<i>Massa</i> (pearl-millet) ^a	P1	639.5 ± 39.3	150.7 ± 32.7	-76% *
	P2	808.5 ± 45.3	204.7 ± 17.7	-75% *
	P3	704.1 ± 43.7	288.7 ± 96.1	-59% *
<i>Fura</i> (pearl-millet)	P1	817.2 ± 43.1	380.6 ± 35.0	-53% *
	P2	729.1 ± 41.1	745.0 ± 68.7	2%
	P3	719.0 ± 112.1	696.8 ± 103.8	-3%
<i>Ben-kida</i> (pearl-millet)	P1	604.6 ± 43.9	307.6 ± 58.4	-49% *
	P2	721.2 ± 76.5	404.4 ± 41.5	-44% *
	P3	656.9 ± 78.3	320.1 ± 120.1	-51% *
<i>Ben-saalga</i> (pearl-millet)	P1	703.4 ± 73.9	322.7 ± 72.3	-54% *
	P2	781.0 ± 78.5	415.4 ± 95.2	-47% *
	P3	768.7 ± 81.0	318.2 ± 52.5	-59% *
	P4	822.6 ± 92.6	361.7 ± 150.2	-56% *

Results are the mean ± standard deviations (samples collected on three different days for each producer, and analyzed in triplicate). *: Significant difference of folate content between raw material and processed fermented food product (ANOVA, $p < 0.05$). ^a: For *massa* (fritters made from pearl millet batter), the defatted dry matter was used for the calculation, to take into account the absorption of oil during frying.

3.5. Impact of the different *ben-saalga* processing steps on folate content

To understand the reason(s) of the significant folate loss during processing observed in most samples, folate content distribution during processing of *ben-saalga*, one of the most frequently consumed West African fermented food, was monitored.

The changes in folate content distribution in the samples from the four different TPUs (expressed as percentages of the pearl millet folate content) (**Figure 8A**) indicated that with the exception of producer P2, the soaking step resulted in a significant decrease in folate content (20% to 49% loss, compared with raw pearl millet), partly due to folate diffusion in the soaking water (5% to 15%). The longer soaking time (24-48 h) used by producer P2, compared with the other producers (10-24 h soaking) might explain the higher folate content in the P2 soaking water sample. After the soaking step, grains were washed only by two producers, and this did not significantly affect folate content. Conversely, wet-milling resulted in a significant loss of folate, compared with soaked grains, except for producer P4. Indeed, the paste of milled soaked grains contained only 41% to 61% of the folate initially present in pearl millet grains (**Figure 8A**). The sieving step also led to folate loss due to fractionation (draff removal), and all sieved batter samples contained significantly less folate than the pastes of milled grains (20% to 37% of the initial pearl millet folate content). However, the sum of the folate fraction present in the sieved batter and in draff samples was still significantly lower than the folate in milled grains (except for producer P3), suggesting that folate losses also occurred due to other causes, such as oxidation.

The sieved batter was then left to rest at ambient temperature (decantation and fermentation). The folate content in the decanted paste (21% to 28% of the initial pearl millet folate) and in supernatant (6% to 18% of the initial pearl millet folate) samples was comparable among producers (**Figure 8B**). The sum of the folate present in the decanted paste and total supernatant (Decanted paste + TS) samples was significantly higher than the folate fraction in the sieved batter samples for producers P1 and P2, suggesting that folate was produced during the fermentation step. To prepare the final products, producers used only part of the supernatant (used supernatant, US) to dilute the decanted paste and cook the dish (Decanted paste + US) to obtain *ben-saalga*. The cooking step did not significantly affect folate distribution. Nevertheless, for all producers, the cooked *ben-saalga* contained only 21% to 35% of the folate initially present in raw pearl millet grains.

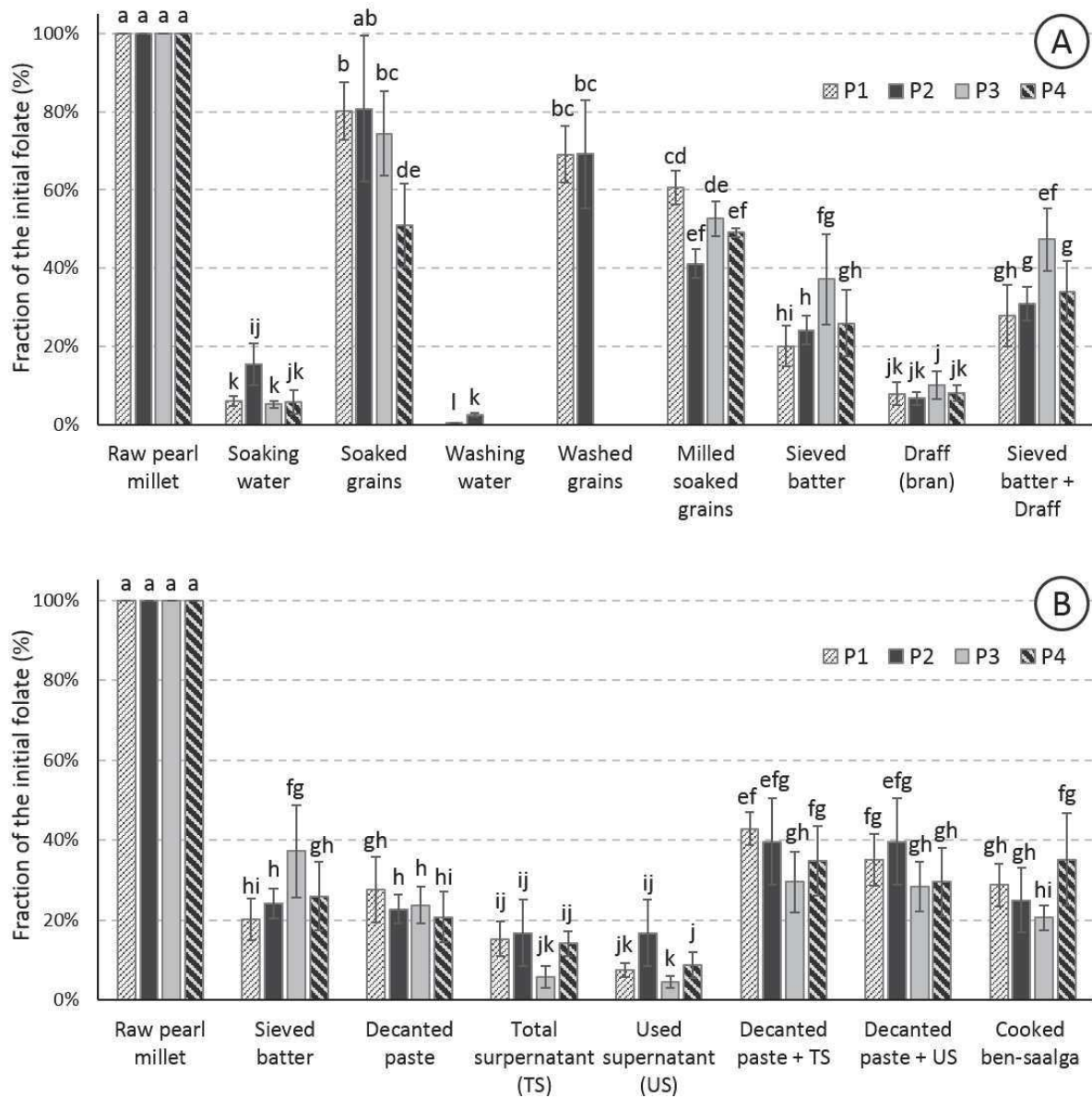


Figure 8. Changes in folate content distribution among the indicated products

(Mass balance, as a percentage of the folate content of the original raw pearl-millet) during the different steps of the traditional processing of pearl-millet into *ben-saalga*, in four different production units (P1 to P4). **A**: from the raw materials to the fractions after sieving; **B**: from the sieved batter to the final fermented and cooked product. Values are the mean of three samplings collected in three different days, bars indicate standard deviations, and different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in folate distribution among samples.

3.6. Bioaccessible folate and folate bioaccessibility

Significant differences in bioaccessible folate content (expressed as $\mu\text{g}/100\text{g}$ fresh weight) were observed among CBFF types (**Table 24**). A three-level nested analysis showed that 80.5% of total variance was due to between-food variability, whereas between-producer variability and between-day variability accounted for 7.1% and 10.2% of variance, respectively. Bioaccessible folate was very low (0.4 to 3.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW) in porridges (*ben-kida*, *ben-saalga*) and most of the gelatinized doughs (*akassa*, *doncounou*, and *kaffa*). The highest bioaccessible folate content (4.5 to 8.6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW) was observed in fritters (*massa*) and dumplings (*fura*); however, the bioaccessible folate content significantly varied among producers. Nested analyses of variance showed that for *fura*, 62.5% of the variance was due to between-producer variability and 18.2% of the variance to between-day variability. Conversely, for *massa*, 79.6% of the variance was due to between-producer variability and only 16.4% to between-day variability.

Folate bioaccessibility values also varied among the seven studied CBFF. The between-food variability was the main contributor (73.8%) to the total variance, whereas the between-producer and between-day variability only accounted for 7.9% and 9.9% of variance, respectively. Folate bioaccessibility values were low (between 23% and 30%) for *akassa*, *kaffa* and *fura*, and average (between 30% and 57%) for the two porridges (*ben-kida*, *ben-saalga*). The highest values (up to 81%) were observed in *massa*. Folate bioaccessibility was much higher for *doncounou* (57-67%) than for *akassa* (24-29%), two gelatinized doughs made of corn.

The bioaccessible folate content was significantly correlated only with the DM content and the total folate content of the fermented foods ($r = 0.80$ and $r = 0.87$, respectively).

Tableau 24. Bioaccessible folate and folate bioaccessibility in fermented food products

Food product	Producer	Bioaccessible folate ($\mu\text{g}/100\text{g FW}$)	Folate bioaccessibility (%)
<i>Akassa</i> (gelatinized dough)	P1	0.9 \pm 0.4 ^a	29.1 \pm 6.8 ⁱ
	P2	0.4 \pm 0.1 ^a	23.6 \pm 5.4 ⁱ
	P3	0.7 \pm 0.2 ^a	26.4 \pm 6.2 ⁱ
<i>Doncounou</i> (gelatinized dough)	P1	3.2 \pm 0.8 ^c	66.9 \pm 10.9 ⁿ
	P2	2.8 \pm 0.5 ^c	57.4 \pm 7.6 ^{lm}
	P3	2.2 \pm 0.5 ^{bc}	62.4 \pm 11.1 ^{mn}
<i>Kaffa</i> (gelatinized dough)	P1	1.6 \pm 0.4 ^{ab}	29.8 \pm 4.5 ⁱ
<i>Massa</i> (batter fritters)	P1	5.6 \pm 0.5 ^e	77.6 \pm 5.8 ^o
	P2	8.3 \pm 1.3 ^{fg}	80.9 \pm 7.7 ^o
	P3	8.6 \pm 3.2 ^g	66.8 \pm 13.3 ⁿ
<i>Fura</i> (dumplings)	P1	4.5 \pm 0.8 ^d	27.7 \pm 4.9 ⁱ
	P2	7.4 \pm 1.5 ^f	23.5 \pm 4.9 ⁱ
	P3	8.2 \pm 1.6 ^{fg}	27.8 \pm 3.9 ⁱ
<i>Ben-kida</i> (porridge)	P1	1.1 \pm 0.2 ^{ab}	45.5 \pm 10.7 ^{jk}
	P2	1.1 \pm 0.2 ^{ab}	43.5 \pm 9.0 ^j
	P3	1.4 \pm 0.6 ^{ab}	55.7 \pm 10.8 ^{lm}
<i>Ben-saalga</i> (porridge)	P1	1.1 \pm 0.3 ^{ab}	57.3 \pm 7.5 ^{lm}
	P2	1.2 \pm 0.4 ^{ab}	45.7 \pm 8.1 ^{jk}
	P3	1.0 \pm 0.2 ^a	52.9 \pm 10.9 ^{kl}
	P4	0.6 \pm 0.1 ^a	30.1 \pm 8.8 ⁱ

Results are the mean \pm standard deviations (samples collected on three different days for each producer, and analyzed in quadruplicate). ANOVA: in each column, values without common letters are considered significantly different ($p < 0.05$).

3.7. Contribution of CBFF to the recommended folate intake of infants

The total folate contents were used to calculate the potential contribution of the seven CBFF to the recommended folate intake of children aged 6-35 months, (**Table 25**).

The estimated daily folate intakes from CBFF were 0.8 to 6.4 $\mu\text{g/day}$, 2.7 to 15.2 $\mu\text{g/day}$, and 7.9 to 34.6 $\mu\text{g/day}$, for children aged 6-11 months, 12-23 months, and 24-35 months, respectively. The average contribution of breast milk to the recommended folate intake of young children was 70%, 31% and 0% for children aged 6-11 months, 12-23 months, and 24-35 months, respectively. Thus, for these three age categories, 30%, 69% and 100% of the folate intake should come from other food sources than milk. However, the potential contribution of the seven studied CBFF to the recommended DFI was low, varying from 1% to 8%, 2% to 10%, and 5% to 23% for children aged 6-11 months, 12-23 months, and 24-35 months, respectively.

If the bioaccessible folate contents were used to calculate the potential contribution of the seven CBFF to the recommended folate intake of young children, the potential contribution of the CBFF to the recommended DFI was even lower (from 0 to 8%), whatever the age category, and the estimated daily bioaccessible folate intake from CBFF were 0.4 to 2.9 $\mu\text{g/day}$, 1.1 to 5.1 $\mu\text{g/day}$, and 3.6 to 11.5 $\mu\text{g/day}$, for children aged 6-11 months, 12-23 months, and 24-35 months, respectively (**Table 25** in supplementary material).

Taking into account the folate intake from breast milk, the daily folate intake that should come from other food sources (DFI-OFP) was 23.9, 103.3 and 150.0 $\mu\text{g/day}$ for children aged 6-11 months, 12-23 months, and 24-35 months, respectively. If the DFI-OFP were to come only from cereal-based fermented foods, the amount of the various CBFF that should be consumed to reach 100% of the recommended folate intakes would range from 93-1073 g/day for children aged 6-11 months, to 584-6735 g/day for children aged 24-35 months (**Table 25**).

Tableau 25. Potential contribution of West-African cereal-based fermented foods to the recommended folate intakes for children aged 6-35 months

	Daily CBFF folate intake from CBFF (µg/day)	Contribution of CBFF to RNI ^a (% of RNI)	Recommended folate intake (RNI) ^b (µg/day)	Daily intake of breastmilk ^c (ml/day)	Daily folate intake from breast milk ^d (µg/day)	Contribution of breast milk to RNI (% of RNI)	Folate intake from foods to reach 100% RNI ^e (µg/day)	CBFF intake needed to reach 100% RNI ^f (kg/day)
6-11 months (breastfed)								
<i>Akassa</i>	3,2	4%						940
<i>Doncounou</i>	2,5	3%						549
<i>Kaffa</i>	4,6	6%						456
<i>Massa</i>	0,8	1%	80	660	56.1	70%	23.9	239
<i>Fura</i>	1,4	2%						93
<i>Ben-kida</i>	6,2	8%						961
<i>Ben-saalga</i>	6,4	8%						1073
12-23 months (breastfed)								
<i>Akassa</i>	10,8	7%						4066
<i>Doncounou</i>	8,2	5%						2372
<i>Kaffa</i>	15,2	10%						1973
<i>Massa</i>	2,7	2%	150	550	46.7	31%	103.3	1032
<i>Fura</i>	4,3	3%						402
<i>Benk-ida</i>	4,8	3%						4154
<i>Ben-saalga</i>	5,0	3%						4640
24-35 months (non-breastfed)								
<i>Akassa</i>	24,6	16%						5902
<i>Doncounou</i>	18,7	12%						3443
<i>Kaffa</i>	34,6	23%						2864
<i>Massa</i>	8,2	5%	150	0	0	0%	150.0	1499
<i>Fura</i>	14,0	9%						584
<i>Ben-kida</i>	7,9	5%						6029
<i>Ben-saalga</i>	8,2	5%						6735

^a Contribution of CBFF to RNI calculated using the daily intakes and daily intake frequencies reported by Hama (2012) for various CBFF, and for the indicated age groups. ^b RNI values, as reported by FAO/WHO (2004). ^c Daily intake of breast milk as reported by (WHO, 1998). ^d Folate intake from breast milk based on a folate content of 85 µg/L in breast milk (Allen, 2012). ^e Folate intake needed from other food products than breast milk to reach the RNI. ^f Daily CBBF intake that would be needed if only breast milk and CBFF were consumed.

Tableau 26. (In supplementary material), Potential contribution of West-African cereal-based fermented foods to the recommended folate intakes for children aged 6-35 months

	Daily bioaccessible folate intake from CBFF (µg/day)	Contribution of CBFF to RNI ^a (% of RNI)	Recommended folate intake (RNI) ^b (µg/day)	Daily intake of breastmilk ^c (ml/day)	Daily folate intake from breast milk ^d (µg/day)	Contribution of breast milk to RNI (% of RNI)	Folate intake from foods to reach 100% RNI ^e (µg/day)	CBFF intake needed to reach 100% RNI ^f (kg/day)
6-11 months (breastfed)								
<i>Ben-saalga</i>	2.8	4%						2.4
<i>Ben-kida</i>	2.9	4%						2.0
<i>Fura</i>	0.4	0%						0.4
<i>Massa</i>	0.5	1%	80.0	660.0	56.1	70.0%	23.9	0.3
<i>Kaffa</i>	1.4	2%						1.5
<i>Akassa</i>	0.9	1%						3.5
<i>Doncounou</i>	1.5	2%						0.9
12-23 months (breastfed)								
<i>Ben-saalga</i>	2.2	1%						10.6
<i>Ben-kida</i>	2.3	2%						8.6
<i>Fura</i>	1.1	1%						1.5
<i>Massa</i>	1.5	1%	150.0	550.0	46.7	31.0%	103.3	1.4
<i>Kaffa</i>	4.5	3%						6.6
<i>Akassa</i>	2.9	2%						15.0
<i>Doncounou</i>	5.1	3%						3.8
24-35 months (non-breastfed)								
<i>Ben-saalga</i>	3.6	2%						15.3
<i>Ben-kida</i>	3.7	2%						12.4
<i>Fura</i>	3.6	2%						2.2
<i>Massa</i>	4.7	3%	150.0	0.0	0.0	0.0%	150.0	2.0
<i>Kaffa</i>	10.3	7%						9.5
<i>Akassa</i>	6.6	4%						21.8
<i>Doncounou</i>	11.5	8%						5.5

^a Contribution of CBFF to RNI calculated using the daily intakes and daily intake frequencies reported by Hama (2012) for various CBFF, and for the indicated age groups. ^b RNI values, as reported by FAO/WHO (2004). ^c Daily intake of breast milk as reported by (WHO, 1998). ^d Folate intake from breast milk based on a folate content of 85 µg/L in breast milk (Allen, 2012). ^e Folate intake needed from other food products than breast milk to reach the RNI. ^f Daily CBBF intake that would be needed if only breast milk and CBFF were consumed.

4. Discussion

CBFF are staple foods in many African countries (Nout 2009). To the best of our knowledge, the influence of traditional processing on the folate content of CBFF commonly eaten in Africa had not been studied yet, except for *ben-saalga* (Saubade *et al.* 2018). Moreover, folate bioaccessibility in traditional African CBFF had never been investigated. The present study provides new information on CBFF frequently consumed in Burkina Faso, but our findings are also relevant for many other West African countries, because the analyzed food products are also frequently produced and consumed in Benin and Togo (*akassa*, *doncounou*, *massa*, *kaffa*, *ben-saalga* commonly called *koko* in Benin), Ghana (*fura*, *doncounou*, *kaffa*), Ivory Coast (*akassa*, *massa*, *ben-saalga* and *ben-kida* commonly called *baca* or *coco baca*), Niger (*kaffa*, *doncounou*), and Nigeria (*fura*, *massa* commonly called *wômi*) (Ayo, Agu, and Famoriyo 2008; Greffeuille *et al.* 2010; Inyang, and Zakari 2008; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012; Soro-Yao *et al.* 2013).

Considerable variations were observed in the folate content of the raw materials. Pearl millet grains displayed the highest folate content (54 to 73 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW), and corn and sorghum the lowest folate content (14 to 21 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW). The folate content of corn and sorghum was close to those of the West African Food Composition Table (WAFCT), whereas that of pearl millet was much higher than the one reported in the WAFCT (29-31 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW) and also in a recent study (Saubade *et al.* 2018; Stadlmayr *et al.* 2012). This large variation in folate contents may be due to differences in grain cultivars, growing conditions, and storage conditions, as previously reported (Arcot, Wootton, *et al.* 2002; Kariluoto *et al.* 2010). Moreover, folate content was low in all studied CBFF, whatever the food type, producer and starting raw material. *Fura* exhibited the highest folate content (16 to 31 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW), and *ben-saalga*, *ben-kida* and *akassa* the lowest (1.8 to 3.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW). The difference in folate content between raw material and final food products indicates that part of the initial folate content was lost during food processing to obtain fritters (*massa*) and porridges (*ben-saalga* and *ben-kida*). Conversely, for dumplings (*fura*), the folate loss during food processing depended on the producer (folate loss observed only for one producer).

Analysis of the CBFF process steps suggests that some procedures may particularly affect the folate content. For instance, debranning performed during *akassa* processing is likely to have affected folate content, explaining the significantly lower folate content in this dish compared with *doncounou*, another gelatinized dough produced from non-debranned corn grains.

Indeed, vitamin B9 is mainly located in the outer layers and germ of cereal grains, and is largely lost during debranning/degerming (Liukkonen *et al.* 2003; Pomeranz 1988). During grain soaking, folate could have been lost through leaching in soaking water (Witthöft *et al.* 1999). Foliates are sensitive to heat, light, and oxidation. Sun drying, which is performed in the TPU yards, also could have affected folate content through the combined action of atmospheric oxygen and light (Preedy 2013; Strandler *et al.* 2015). This could explain the significantly lower folate content of the *fura* dumplings produced in the TPU with a very long sun drying step. Moreover, the CBFF under study were cooked (porridges), fried (fritters), or boiled in water (dumplings, gelatinized doughs). Cooking can lead to thermal and oxidative degradation of folates (Delchier *et al.* 2016; Witthöft *et al.* 1999). Specifically, frying can generate significant folate losses in various food products (Aramouni *et al.* 1986; Arcot, Wong, *et al.* 2002; Hefni and Witthöft 2014), and boiling in water (i.e., hydrothermal cooking) results in significant losses due to folate leaching from the food matrix into the cooking water (Delchier *et al.* 2016; Hefni and Witthöft 2014).

The present work also shows that the folate content of the gelatinized doughs produced in two TPUs (*kaffa*, and *akassa* P1) was significantly higher than that of their respective raw materials (sorghum and corn), suggesting a folate production during the fermentation step. Indeed, it was previously reported that fermentation positively influences folate content (Nout 2009), due to the ability of yeast and some LAB to produce folate in fermenting foods (Moslehi-Jenabian *et al.* 2010; Saubade, Hemery, *et al.* 2017). However, despite this folate content increase, the final folate content in these ready-to-eat foods was still very low, due to the low DM content of those products.

Saubade *et al.* (2018) carried out a mass balance assessment during the processing of pearl millet grains into *ben-saalga*, but in controlled laboratory conditions. In the present study, although the final *ben-saalga* folate content was comparable to the 1.5 to 2.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW reported by Saubade *et al.* (2018), the influence of the different processing steps was not similar, highlighting the difference between analyses in controlled time/temperature conditions and in the yard of TPUs. Specifically, Saubade *et al.* (2018) reported folate production (+26% to +31%) during pearl millet soaking, whereas in the TPUs folate was lost during the soaking step (-19% to -49%). In the TPU yard, grains are left in water at ambient temperature, exposed to sunlight and atmospheric oxygen, until the end of soaking step (Tou *et al.* 2006), and this can lead to folate oxidization or photo-degradation (Delchier *et al.* 2016; Preedy 2013). Moreover,

the soaking time was variable (10 to 24h) among TPUs, and might not have been sufficient to promote germination, which leads to folate synthesis (Kariluoto *et al.* 2006). Saubade *et al.* (2018) found that the fermentation step did not have any significant effect on folate content. Conversely, a significant gain of folate was observed during the fermentation step in two TPUs, suggesting folate production by microorganisms present in the batter. Spontaneous fermentation can lead to variable microbial composition (Saubade, Hemery *et al.* 2017), and this could explain the folate content variability in *ben-saalga* from the different TPUs. In *ben-saalga*, LAB are the predominant microorganisms during fermentation (Saubade, Humblot *et al.* 2017; Tou *et al.* 2006). LAB isolated from *ben-saalga* have been shown to display a good genetic potential for folate synthesis, and some specific strains can produce folate during fermentation (Greppi, Hemery, *et al.* 2017; Greppi, Saubade, *et al.* 2017; Turpin *et al.* 2011).

The bioaccessibility of folate in CBFF was very variable (from 23% to 81%) depending on the food product. The bioaccessible folate content could have been influenced by i) the total folate content in non-digested foods; ii) the food product structure that governs the digestion patterns of the carbohydrate fractions in cereal foods (Lovegrove *et al.* 2017; Mishra, Hardacre, and Monro 2012) and might influence the release of folate from food matrices; and iii) the stability of folate vitamers during the digestion process. Ringling and Rychlik (2017) also observed a noticeable variability of folate bioaccessibility for various food matrices (wheat germ: 23%, camembert cheese: 44-48%, spinach: 52-56%), and reported that this variability was due to differences in the food product composition and in folate vitamer distribution within the food products. Specifically, they observed differences in vitamer stability during *in vitro* digestion that affected their relative bioaccessibility. For example, tetrahydrofolate was completely lost during the digestion simulations. In the current study, the seven CBFF could be classified in groups that behaved differently during digestion and presented distinct folate bioaccessibility profiles:

- Porridges were characterized by very low bioaccessible folate contents (< 1.5 µg/100g FW), due to the low total folate content and moderate bioaccessibility ratios (30% to 57%). In these semi-liquid foods, most folate was already in a solubilized form and should have been bioaccessible. However, porridges had little structural resilience in digestion conditions, and folate was not protected by the food matrix during the gastric phase. As many folate vitamers are sensitive to low pH, the observed moderate bioaccessibility ratios could be due to the loss of labile folate in the acidic gastric conditions (Ringling and Rychlik 2017; Seyoum and Selhub 1998; Strandler *et al.* 2015).

- Gelatinized doughs made from debranned grains (*akassa*, *kaffa*) displayed low bioaccessible folate contents (0.4-1.6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW) and low bioaccessibility (23-30%). Folate bioaccessibility was similarly low in dumplings (*fura*), but bioaccessible folate content was much higher (4-9 $\mu\text{g}/100\text{g}$ FW) due to a higher initial total folate content. In these three structurally weak foods, the hydrolysis of the starchy matrix started during the oral phase of digestion, possibly leading to the degradation of non-protected folate during the gastric phase.
- The two CBFF with the highest folate bioaccessibility ratio were both made from wholegrain cereals, and had either a dense semi-solid structure (*doncounou*, 57-67% bioaccessibility) or a solid structure (*massa*, 67-81% bioaccessibility). These dense matrices provided secondary structure and generated particles that were resistant to digestion (Mishra, Hardacre, and Monro 2012), and persisted long enough to protect folate from the acidic gastric conditions. Moreover, the micronutrient encapsulation in the plant cell walls is known to modulate the rate and extent of nutrient release during digestion (Parada and Aguilera 2007). Therefore, the presence of bran particles in *massa* and *doncounou* may have protected folate during the gastric phase, and allowed a higher proportion of folate to reach the intestinal phase (neutral pH) in a non-degraded form.

In many West African countries, traditional millet-, sorghum- and maize-based fermented dishes are frequently consumed by young children (Greffeuille *et al.* 2010). Porridges are mainly consumed as foods to complement breast milk. Then, when children can eat family dishes, porridges are progressively replaced by thicker starchy staple foods (such as gelatinized doughs) that are eaten with various sauces. Snacks, such as fritters or dumplings, are given more regularly (Hama 2012). Our study shows that, whatever the age group, the contribution of the studied CBFF to the recommended folate intake was far from sufficient to cover the folate requirement of young children. Taking into account the food intake reported by Hama (2012), children aged 6-11 months, 12-23 months and 24-35 months would get respectively 1-8%, 2-10% and 5-23% of the recommended folate intake through CBFF consumption. Besides, the potential contribution of the seven studied CBFF to the recommended DFI was limited: up to 23% when considering the total folate contents, and only up to 8% when considering the bioaccessible folate contents. This suggests that many children might be at risk of folate deficiency, especially non-breastfed children, if their diet were mainly based on CBFF. However, these data do not reflect the real diet of young children, as most of these CBFF are consumed with other food products with higher folate

contents, such as sauces made from green leafy vegetables and legumes (e.g., groundnut or soybean) (Greffeuille *et al.* 2010).

5. Conclusions

This work generated new information on the influence of traditional processing on the folate content and the first data on folate bioaccessibility in seven CBFF commonly consumed in West Africa that can be useful to complete the existing food composition tables. The total folate and bioaccessible folate contents of the seven studied products (gelatinized doughs, porridges, dumplings, fritters) were rather low, suggesting that populations whose diet is mainly based on these CBFF may be at risk of folate deficiency. The folate content of most of the food products was strongly and negatively affected by the laborious processing. Some processing steps could be adapted to limit such losses (controlled volumes, controlled soaking and fermentation times, and limitation of direct exposure to sunlight). Another way to increase the folate content in CBFF could be to promote folate production during the fermentation step, by using folate-producing bacterial strains. Finally, the observed differences in folate bioaccessibility ratios among the studied food products suggest a strong effect of the food matrix that should be investigated more precisely.

Acknowledgements

This work was carried out in the framework of the FoIEA project that 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.

The authors would like to thank Christian Picq for the analysis of crude lipids, Sonia Fortin for advices on statistical methods, Edwige Oboulbiga Bahanla for her help with the collection of food samples in Ouagadougou, and Dounia Gueye and Nelly Fioroni for their help with the folate analyses and *in vitro* digestions.

2. Augmentation des teneurs en folates d'une bouillie de mil fermenté par inoculation de souches de bactérie lactiques

2.1. Introduction

D'après les résultats de la partie précédente, les teneurs en folates de l'ensemble des aliments céréaliers issus de la fermentation spontanée sont faibles. Ces données montrent que, les ACF consommés tels quels, ne peuvent pas couvrir les besoins journaliers des folates des populations en Afrique. Le but de cette seconde partie de la thèse est d'étudier la possibilité d'augmenter les ingérés en folates des populations en améliorant les teneurs en folates des ACF via la fermentation par l'utilisation de souches de BL productrices de folates.

Des sept ACF investigués dans cette thèse, le *ben-saalga* est le plus étudié. Le microbiote du *ben-saalga*, le potentiel génétique de synthèse des folates de son microbiote, la capacité de certaines BL isolées du *ben-saalga* à produire des folates aussi bien en milieux de culture que dans des bouillies de mil fermenté, son procédé de fabrication, sa consommation au Burkina Faso, sa teneur en folates et ainsi que d'autres caractéristiques nutritionnelles ont été décrites lors d'études précédentes (Tou *et al.* 2006; Tou *et al.* 2007; Mouquet-Rivier *et al.* 2008; Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010; Turpin, Humblot, and Guyot 2011; Saubade, Humblot, *et al.* 2017; Greppi, Hemery, *et al.* 2017; Greppi, Saubade, *et al.* 2017; Mouquet-Rivier *et al.* 2016; Saubade *et al.* 2018). De ces travaux antérieurs, il a été montré que la densité énergétique du *ben-saalga* est en moyenne de 41 kcal/100g de bouillie ce qui est très faible par rapport aux recommandations pour des aliments de complément du jeune enfant (84kcal/100g) (Dewey and Brown 2003). Sa teneur en folates est extrêmement faible et varie entre 0 et 3,3 µg/100 g de matière fraîche (Saubade, Humblot *et al.* 2017). Songré *et al.* (2009, 2010) ont réalisé des études sur l'amélioration de la densité énergétique de cette bouillie avec des souches de BL amylolytiques inoculées dans des pâtes résultant d'un mélange « mil-arachide » ou « mil soja ». Ces essais d'inoculation ont abouti à des bouillies de teneurs en matières sèches variables de 15.3 à 17.4 g matière sèche/100g de bouillie, et de densités énergétiques variables de 75.8 à 84.7 kcal/100 g (Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010). Dans de récentes études, la capacité des isolats bactériens provenant d'échantillons du *ben-saalga* à produire des folates dans des milieux de cultures puis dans des bouillies à base de mil a été testée avec succès (Greppi, Hemery, *et al.* 2017; Greppi, Saubade, *et al.* 2017). L'inoculation de deux souches de *Lactobacillus fermentum*

(isolées du *ben-saalga*) préalablement sélectionnées pour leur capacité à produire des niveaux élevés de folates en milieux de culture, a permis d'obtenir des bouillies de *ben-saalga* avec une teneur en folates de l'ordre de 7 µg/100g de matière fraîche après 4 heures de fermentation (Greppi, Saubade, *et al.* 2017).

A partir des résultats des études ci-dessus évoquées, deux approches ont été combinées dans cette étude pour augmenter les ingérés en folates du *ben-saalga*: (i) augmenter la teneur en folates de la bouillie de *ben-saalga* en utilisant des souches de BL les plus productrices de folates, et dans le même temps, (ii) co-inoculer des souches de BL amylolytiques pour obtenir une bouillie de meilleure densité énergétique. Nous avons utilisé *L. fermentum* 8.2 and *L. plantarum* 6.2 comme souches de BL productrices de folates. Ces deux souches de BL font partie de la collection de 155 isolats de BL du *ben-saalga* et sont les deux meilleures souches productrices de folates en milieux de culture (Greppi, Hemery, *et al.* 2017). Les souches *L. plantarum* A6 et *L. fermentum* MW2 ont été utilisées comme souches amylolytiques. Toutes les bouillies tests (bouillies inoculées avec les cultures starters ou avec un pied-de-cuve provenant d'une fermentation spontanée) ont été préparées selon le procédé amélioré décrit par Songré *et al.* (2010). Quant aux bouillies témoin, elles ont été obtenues selon le procédé traditionnel décrit par Tou *et al.* (2006).

Les principaux résultats de cette partie ont été valorisés sous forme d'un article soumis dans *LWT-Food Science and Technology*. Une partie de ces résultats a également été valorisée sous la forme d'un poster présenté au Symposium International sur la Science et la Technologie tenu du 4 au 8 décembre 2017 à Ouagadougou.

Projet d'article

Fabrice Bationo, Laurencia Touloumé Songré-Ouattara, Youna M. Hemery, Fatoumata Hama-Ba, Charles Parkouda, Morgane Chapron, Manon Le Merrer, Nicolas Leconte, Hagrétou Sawadogo-Lingani, Bréhima Diawara and Christèle Humblot (2018). Improved processing for the production of cereal-based fermented porridge enriched in folate using selected lactic acid bacteria and back slopping process.

Soumis à LWT-Food Science and Technology

Poster (Annexe 6)

F. Bationo, LT. Songré-Ouattara, Y. Hemery, F. Ba-Hama, C. Parkouda, M. Chapron, M. Le Merrer, H. Lingani-Sawadogo, B. Diawara, C. Humblot (2018). Fortification *in situ* de la

bouillie de mil fermenté de type *ben-saalga* en vitamine B9 (folates) par des bactéries lactiques. Symposium International sur la Science et la Technologie 2017, 2^{ème} édition (Ouagadougou, 04 au 08 Décembre 2017).

2.2. Publication: Improved processing for the production of cereal-based fermented porridge enriched in folate using selected lactic acid bacteria and a back slopping process.

Improved processing for the production of cereal-based fermented porridge enriched in folate using selected lactic acid bacteria and a back slopping process

Fabrice Bationo^{ab}, Laurencia Touloumdé Songré-Ouattara^a, Youna M. Hemery^b, Fatoumata Hama-Ba^a, Charles Parkouda^a, Morgane Chapron^b, Manon Le Merrer^b, Nicolas Leconte^b, Hagrétou Sawadogo-Lingani^a, Bréhima Diawara^a and Christèle Humblot^{b*}

^a Département Technologie Alimentaire, IRSAT, CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso

^b UMR 204 Food and nutrition research in the global south (NUTRIPASS), IRD / University of Montpellier / Montpellier SupAgro, Montpellier, France

***Corresponding author:**

E-mail address: christele.humblot@ird.fr

Phone: +33 467416248

Abstract

The objective of this work was to study the effect of two selected lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* 6.2 and *Lactobacillus fermentum* 8.2, on folate production in a cereal-based fermented porridge called *ben-saalga*. We profited from previous improvements in processing to produce porridges with higher energy content, by including a combination of precooking and inoculation with amylolytic strains (*Lactobacillus plantarum* A6 or *Lactobacillus fermentum* MW2), which we combined with the folate producing strains. For comparison with the action of natural microbiota, fermentation was also performed by traditional and back slopping process. Folate contents were determined microbiologically. Porridges prepared with starter cultures *L. plantarum* 6.2 + *L. fermentum* MW2 or *L. fermentum* 8.2 + *L. plantarum* A6 had significantly higher folate contents (7.1 and 7.3 µg/100 g fresh matter respectively) than the porridge prepared using the traditional process (4.2 µg/100 g fresh matter). Back slopping also enabled an interesting increase in folate contents (6.1 µg/100 g fresh matter). Five minutes of cooking had no significant impact on folate contents of the porridges. These results underline the feasibility of new ways to produce folate rich foods available to the poorest populations using local materials with slight modification of the processes.

Keywords: Cereal, Fermentation, Folate, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*

1. Introduction

Folate, or vitamin B9, is a crucial component in maintaining the individual's health over the course of life (Iyer and Tomar 2009). Folate is necessary for basic cellular functions involved in providing one-carbon groups for several essential reactions related to amino acid metabolism, nucleotide biosynthesis, and methylation cycle (Iyer and Tomar 2009). Unlike plants and micro-organisms, humans do not have a metabolic system able to synthesize *de novo* folate, which must be acquired entirely from dietary sources (Zhao, Matherly, and Goldman 2009). Insufficient dietary intake of folate is associated with folate deficiency, which can cause megaloblastic anaemia and foetal neural tube defects (Iyer and Tomar 2009). Folate deficiency is very frequent in many countries worldwide (McLean, de Benoist, and Allen 2008; Youngblood *et al.* 2013). In Africa, folate deficiency is related to the low dietary diversity and the poor energy and nutrient density of complementary foods for infants (Dewey and Brown 2003; McNulty 1995). Indeed, in many African countries, the most common foods used as complements to breast feeding are traditional cereal-based porridges (Dop and Benbouzid 1999) which rarely fulfil the infant's nutritional needs as they have very low energy and nutrient densities (Mouquet-Rivier *et al.* 2008). The porridges can also be consumed after fermentation, which can improve their overall nutritional quality (Singh *et al.* 2015). Most fermentations are accomplished by lactic acid bacteria (LAB), which have a positive effect on food quality, for example thanks to the synthesis of compounds of interest including vitamin B9 (Blandino *et al.* 2003).

Ben-saalga is a traditional fermented cereal-based porridge produced from pearl-millet (*Pennisetum glaucum*) at a small scale in informal micro-enterprises in West African countries particularly in Burkina Faso (Tou *et al.* 2006). Forty-five percent of the 6-23 month-old children in Ouagadougou eat this porridge daily (Mouquet-Rivier *et al.* 2008). Its energy content is on average 41 kcal/100 g dry matter (DM), which is very low (Mouquet-Rivier *et al.* 2008). Its folate content is also extremely low: between 0 and 3.3 µg/100 g fresh matter (FM) (Saubade, Humblot, *et al.* 2017). Given how frequently it is consumed by young children, different attempts have been made to improve its nutritional quality using LAB selected for their functional properties. A modification of the recipe by including a pre-cooking step, and the addition of amylolytic bacteria, has already been successfully explored. The resulting porridge had increased DM content: 15.3 to 17.4 g DM/100g, and consequently

higher energy density: 75.8 to 84.7 kcal/100 g DM (Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010). Using folate producing LAB to increase the folate content of fermented cereal foods has been reported to be a potentially useful tool (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Most investigations to date have focused on fermented rye and oat sourdoughs consumed in developed countries (Kariluoto *et al.* 2004; Kariluoto *et al.* 2006; Korhola *et al.* 2014), and few studies of the increase in the folate content of fermented complementary foods for young children in developing countries have been conducted using folate producing LAB. *In situ* fortification of pearl-millet porridges fermented by two strains of *Lactobacillus fermentum* selected for their ability to produce high levels of folate in culture media, resulted in a successful folate production in fermented gruel, which peaked around 7 µg/100g FM (Greppi, Saubade *et al.* 2017).

In the present study, taking into account that the DM content and the energy density of the traditional *ben-saalga* have already been optimized using a modified processing method including the use of amylolytic LAB (Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010), we made use of this modified processing and aimed to increase the folate content of the porridge using selected productive strains. To this end, porridges were prepared using a traditional process (spontaneous fermentation of uncooked paste) as control, and by including a precooking step followed by inoculation by back slopping from the spontaneous fermentation, or inoculation by two combinations of folate-producing LAB and amylolytic LAB.

2. Material and methods

2.1. Starter cultures and preparation of the inoculum

Based on the study performed by Greppi, Hemery, *et al.* (2017) to identify folate-producing and folate-consuming LAB among 151 LAB strains previously isolated from *ben-saalga*, two LAB strains namely *L. fermentum* 8.2 and *L. plantarum* 6.2 were selected for their efficiency. Those strains belong to the LAB species (*L. fermentum* and *L. plantarum*), the most frequently involved in pearl-millet fermentation (Turpin, Humblot, and Guyot 2011). *L. plantarum* A6 and *L. fermentum* MW2 were used as amylolytic LAB because of their proven efficiency in hydrolysing starch in various food matrices (Agati, *et al.* 1998; Giraud, *et al.* 1991). In order to follow the two species growth in the food matrix, we chose a combination

of one *L. plantarum* and one *L. fermentum* to easily allow their detection in the food matrix using real time PCR.

Each starter culture was grown overnight in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth medium (BD Difco, Sparks, MD, USA) at 30 °C. To inoculate the gelatinized pearl-millet slurry, the cultures were centrifuged at 8000 × g for 10 min at 4 °C, and the pellets obtained were washed in sterile 0.9% NaCl centrifuged in the same conditions and suspended in sterile 0.9% NaCl to form a cell suspension, which constituted the inoculum. It contained on average $7.2 \pm 0.6 \log_{10}$ CFU/ml for *L. fermentum* 8.2; $6.8 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/ml for *L. plantarum* 6.2; $6.9 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/ml for *L. plantarum* A6 and $5.4 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/ml for *L. fermentum* MW2.

2.2. Ben-saalga processing and inoculation conditions

All the porridges used in this study were prepared from raw pearl-millet grains purchased in a local market in Ouagadougou. Two types of porridge were prepared at laboratory scale (**Figure 9**). The first type was prepared according to the traditional process described by Tou *et al.* (2006) with 700 g of pearl-millet grains. The second was prepared according to a process based on the traditional process described by Songré-Ouattara *et al.* (2010) with one modification: to be consistent with what is done in traditional production units (TPUs) in Ouagadougou, the milling step was wet, i.e. water was added to the soaked grains during milling and the resulting product was a paste of milled soaked grains.

Briefly, the modified process consisted of the following steps: the grains (700 g) were soaked in tap water (1:1.5 w/v) for 16 h, washed (1:2 w/v), drained for 30 min, wet milled, water was added and the grains were sieved (1:3.5 w/v) through muslin. The resulting dough was boiled for 10 min to gelatinize the starch (3000 g), and then cooled to around 30 °C. The inoculation was carried out with one folate producing strain (10%, v/w) and one amylolytic strain (1%, v/w). After inoculation, the resulting samples were named *L. plantarum* 6.2 + *L. fermentum* MW2 (6.2 + MW2) and *L. fermentum* 8.2 + *L. plantarum* A6 (8.2 + A6). Fermentation by back slopping (10 % v/w) was used as control by adding fermented dough sampled during the traditional process.

In addition, as a control of spontaneous fermentation after precooking, the back slopping was used. It consisted in the addition of a small amount (10 % v/w) of fermented paste from a previous successful prepared using traditional process fermentation (**Figure 9**). This fermented paste of semi liquid form was collected during the fermentation step of traditional

processing. It contained on average $7.6 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/ml (total count). It can be considered as a natural selection of the microorganisms the most adapted to the pearl-millet substrate. In addition, it promotes better hygienic conditions by favouring an immediate dominance of LAB, and this technique is particularly suitable for household and TPUs with only rudimentary facilities, taking place in, e.g., developing countries (Nout, Rombouts, and Havelaar, 1989).

All fermentation took place at ambient temperature (around 30 °C) for 24 h. After fermentation, the porridges were prepared by cooking the fermented paste for 5 min after reaching boiling point. Experiments were performed in triplicate for each fermentation condition.

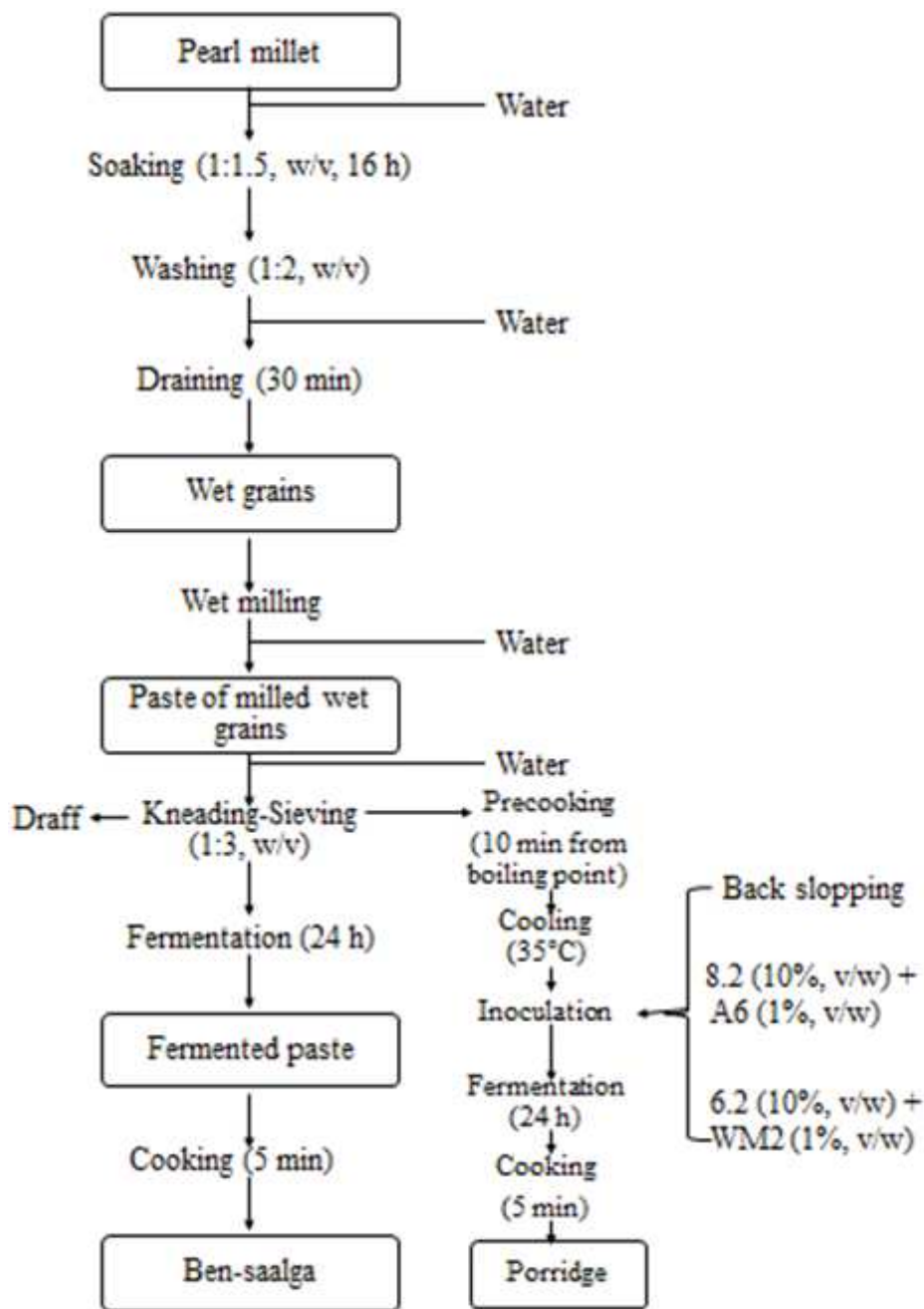


Figure 9: Processing of pearl-millet into fermented porridges using a process based on the traditional process, or including precooking of the paste followed by inoculation with three different starters: back slopping using dough taken from the traditional fermentation process, a combination of *L. fermentum* 8.2 and *L. plantarum* A6, and a combination of *L. plantarum* 6.2 and *L. fermentum* MW2.

2.3. Sampling

Samples for folate analysis and quantification of LAB were collected immediately after inoculation (0 h), at the end of fermentation (24 h) and after 5 min of cooking corresponding to the ready-to-eat porridge. The viable counts of microorganisms and the DM content were determined immediately in all samples. DM content was determined by drying the samples at 105 °C in open dishes to constant weight. Aliquots were stored at -20 °C until real-time PCR counts of specific LAB, and folate analysis.

2.4. Counts of viable microorganisms

For all experiments, 10 g of sample, taken at 0 h and 24 h during processing and after 5 min of cooking, were homogenized with 90 ml of sterile peptone water solution 0.1% peptone 0.85% NaCl (Difco), using a stomacher 400 (Type BA 7021, Seward England) for 2 min. Presumptive aerobic mesophilic bacteria (total count), LAB, and yeasts were enumerated on the following media: Plate Count Agar (PCA), MRS, and Sabouraud Chloramphenicol Agar (all from BD Difco, Sparks, MD, USA), respectively. MRS plates were incubated at 30 °C for 48 h, PCA plates at 37 °C for 48 h and Sabouraud plates at 30 °C for 3 days. Enumerations were done in triplicate for each sample. Results are expressed in log₁₀ CFU/g of sample.

2.5. DNA extraction and real-time PCR for the quantification of LAB

Total DNA extraction from samples and real-time PCR were performed as previously described in detail (Saubade, Humblot, *et al.* 2017). Briefly, samples (20 g) collected at 0 h and 24 h of fermentation were extracted after serial centrifugation to eliminate starch 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). The concentration and purity of the DNA 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 real time PCR analysis.

Selected primers corresponding to the species (*L. fermentum*, *L. plantarum*) used to inoculate the dough were used for the quantification of LAB by real-time PCR. We included the primers corresponding to the genera *Leuconostoc* and *Weissella*, as they are also involved in the spontaneous fermentation of *ben-saalga* (Humblot and Guyot 2009; Saubade, Humblot, *et al.* 2017). The selected primers are listed in **Table 26**. The specificity of each previously

selected primer was checked by real-time PCR using the DNA extracted from the reference strains (*L. fermentum* ATCC14931, *L. plantarum* ATCC14917T, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC10880 and *Weissella confusa* ATCC10881T) and sterile water as a negative control. The same strains were used to generate quantification matrixes, by extracting DNA from pure culture with different known bacterial concentration. The real-time PCR conditions were the same as those described in Saubade, Humblot, *et al.* (2017).

Tableau 27. Primers used to quantify the genus or species of bacteria from *ben-saalga* samples using real-time PCR. The primers were designed to match the gene coding 16S rRNA

Name	Sequences 5'-3'	Targets	References
Lferm72f*	CCTGATTGATTTTGGTCGC	<i>L. fermentum</i>	(Omar and Ampe 2000)
Lpla72f	ATCATGATTTACATTTGAGTG	<i>L. plantarum</i>	(Chagnaud et al. 2001)
338r*	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacteria	(Muyzer, Dewaal, and Uitterlinden 1993)
Leu200f*	CGGCGTCACCTAGAGATGGATC	<i>Leuconostoc</i>	(Omar and Ampe 2000)
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal	(Muyzer, Dewaal, and Uitterlinden 1993)
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

2.6. Folate analysis

Total folate content was determined in triplicate using the microbiological assay described by Kariluoto and Piironen (2009), and adapted as described by Saubade *et al.* (2018). Briefly, the thawed samples were diluted in the extraction buffer and heated at 100 °C for 10 min, after which, the pH was adjusted to 7.2 and a tri-enzymatic extraction with amylase (Sigma-Aldrich A9857, 20 mg/ml in 1% sodium ascorbate), chicken pancreatin (γ -glutamylhydrolase) (R-Biopharm P2002, 100 mg/ml in Milli-Q water) and protease (Sigma-Aldrich P5147, 3 mg/ml in 1% sodium ascorbate), was used to release folate from the food matrix and to hydrolyse the polyglutamate forms of folate to mono- or diglutamate. After appropriate dilutions of the centrifuged extracts, the concentration of folate was determined on microtiter plates with *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 as the growth indicator, folic acid (Sigma-Aldrich F7876) as the calibrant, and Folic Acid Casei Medium (Difco, Sparks, MD, USA) as the assay medium. The performance 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 analysed in each series of samples.

2.7. Statistical analysis

Data were analysed using SPSS version 20.0 (International Business Machines Corporation, Armonk, New York, USA) and XLSTAT software (v. 2014.5.03). Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc tests, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Changes in the microbial population during fermentation

At the beginning of fermentation, the number of LAB and mesophilic aerobic bacteria were quite similar under all experimental conditions (**Figure 10**). With traditional and back slopping fermentation, respective yeast counts of 4 log₁₀ CFU/g and 3 log₁₀ CFU/g were found. No yeasts were found in samples inoculated with starter cultures. After 24 h of fermentation, LAB counts increased at a rate of 9 log₁₀ CFU/g in all conditions. In samples resulting from spontaneous fermentation, LAB became the dominant microbiota. After five

minutes of cooking, all LAB were still present at detectable levels in the samples in all experimental conditions, while yeasts counts decreased or were undetectable.

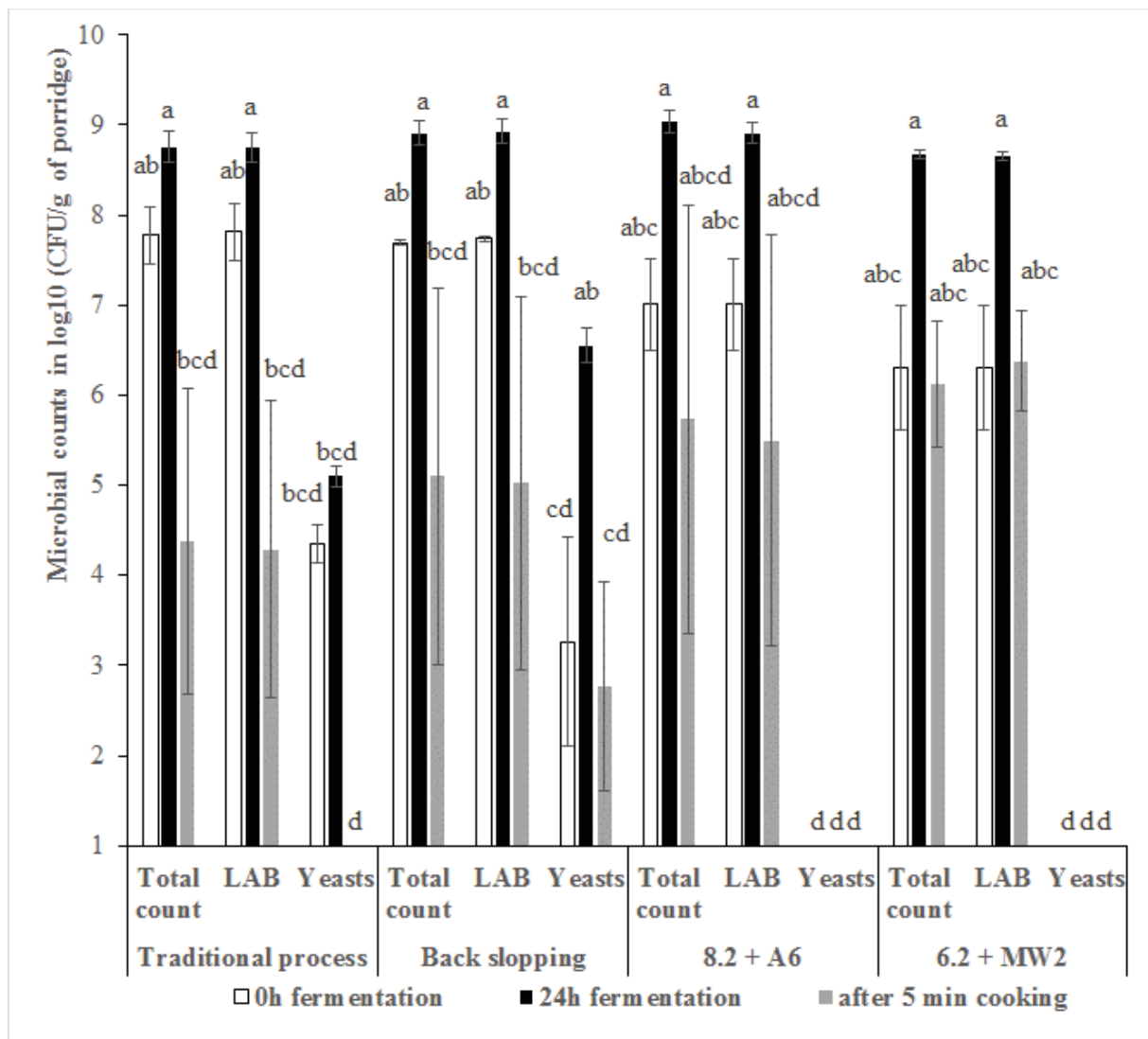


Figure 10. Microbial counts of fermented porridges obtained following a process based on the traditional process, or including precooking of the paste followed by inoculation with three different starters: back slopping using dough taken from the traditional fermentation, a combination of *L. fermentum* 8.2 and *L. plantarum* A6 and a combination of *L. plantarum* 6.2 and *L. fermentum* MW2. Samples were taken at the beginning of the fermentation (0 h : white bars), at the end of the fermentation (24h : black bars) and after cooking (for 5 min : grey bars).

Values are expressed as means \pm standard error of the mean. For yeasts, means with different letters differ significantly between samples prepared according the different processes ($p < 0.05$).

3.2. Quantification of targeted LAB by real-time PCR

At the beginning and after fermentation, *L. fermentum* and *L. plantarum*, i.e. the species used for inoculation, were detected in samples 8.2 + A6 and 6.2 + MW2. In the 8.2 + A6 samples, *L. fermentum* and *L. plantarum* increased significantly ($p < 0.05$) from 6 log₁₀ CFU / g to 7 log₁₀ CFU / g of porridge, and from 4 log₁₀ CFU / g to 6 log₁₀ CFU / g of porridge, respectively (**Figure 11**). In the 6.2 + MW2 samples, *L. fermentum* and *L. plantarum* increased significantly ($p < 0.05$) from 5 log₁₀ CFU / g to 7 log₁₀ CFU / g of porridge, and from 5 log₁₀ CFU / g to 6 log₁₀ CFU / g of porridge, respectively. Both *L. plantarum* and *L. fermentum* were detected in samples from traditional or back slopping processes, but *L. fermentum* was the dominant microorganism. The genus *Weissella* and *Leuconostoc* were detected in all porridges and underwent a significant increase ($p < 0.05$) after fermentation in samples from traditional and back slopping process. In samples 6.2 + MW2, *Leuconostoc* showed a significant increase ($p < 0.05$) after fermentation.

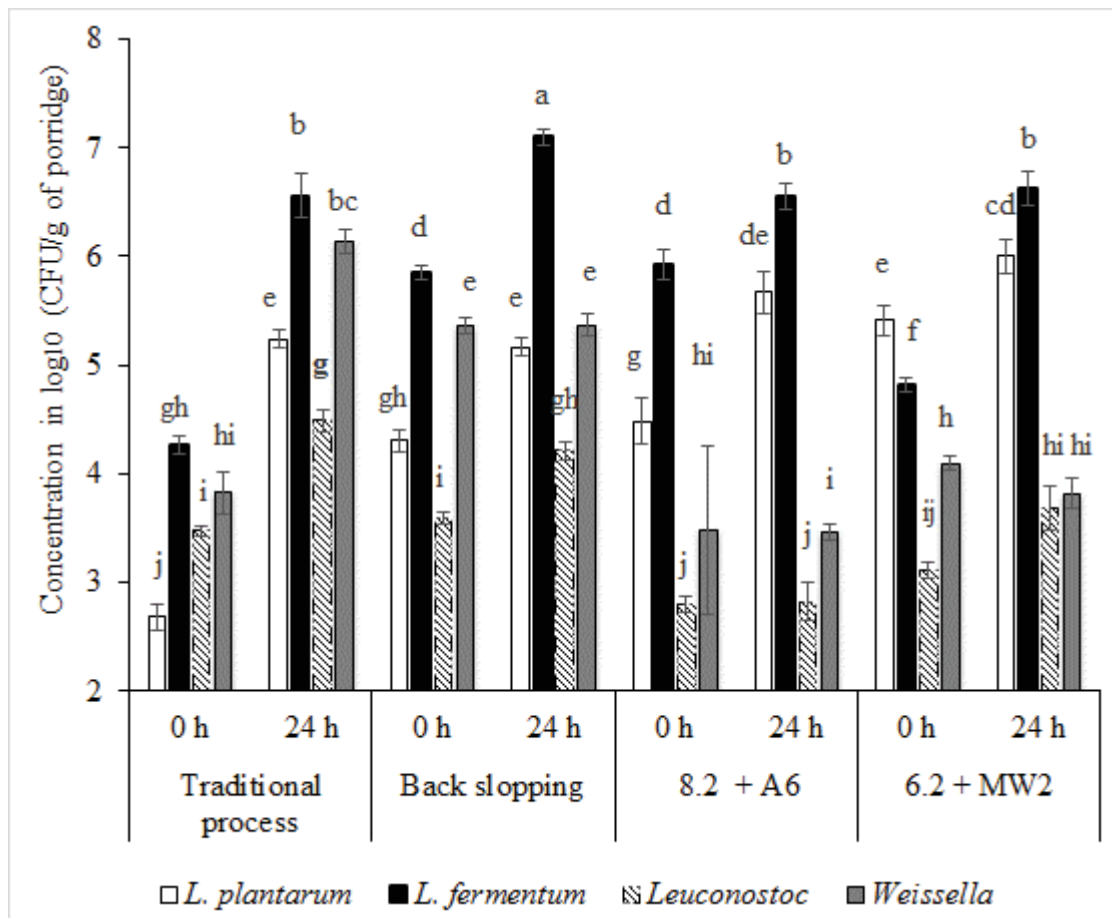


Figure 11. Real-time PCR quantification of *L. plantarum* (white bars), *L. fermentum* (black bars), *Leuconostoc* (striped bars) and *Weissella* (grey bars) during the preparation of the porridges using the different processes at the beginning of fermentation (0 h), at the end of the fermentation (24 h) and after cooking (for 5 min).

Values are expressed as means \pm standard error of the mean.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

3.3. Dry matter contents

Table 27 lists the DM contents of porridges under all fermentation conditions. At the beginning of fermentation (0 h), pearl-millet doughs made using traditional and back slopping processes had significantly higher DM ($p < 0.05$) than those inoculated with the two combinations of strains 8.2 + A6 or 6.2 + MW2. After fermentation and cooking, DM contents were not modified whatever the fermentation conditions.

Tableau 28. Dry matter content of samples taken during the preparation of the porridges using the different processes at the beginning of the fermentation (0 h), at the end of the fermentation (24 h) and after cooking (for 5 min.).

Fermentation conditions	Dry matter content (g DM/100 g of sample)		
	0 h	24 h	5 min
Traditional process	13.1 ± 0.3	13.3 ± 0.4	13.3 ± 0.2
Back slopping process	14.1 ± 0.2	13.8 ± 0.3	13.7 ± 0.3
<i>L. fermentum</i> 8.2 + <i>L. plantarum</i> A6	11.6 ± 0.7	11.6 ± 0.6	12.2 ± 0.8
<i>L. plantarum</i> 6.2 + <i>L. fermentum</i> MW2	11.9 ± 0.8	11.7 ± 0.4	11.8 ± 0.4

Values are expressed as means ± standard error of the mean.

3.4. Folate contents in porridges prepared following the four processes

Table 28 shows the folate contents of fermented pearl-millet porridges. At the beginning of fermentation, folate contents were similar in all the pearl-millet doughs (ranging from $2.6 \pm 0.5 \mu\text{g}/100 \text{ g FM}$ to $3.4 \pm 0.4 \mu\text{g}/100 \text{ g FM}$) with the exception of the sample prepared using the back slopping process, which had lower folate content ($1.8 \pm 0.4 \mu\text{g}/100\text{g FM}$). After 24 h of fermentation, folate contents remained stable ($3.6 \pm 0.5 \mu\text{g}/100\text{g FM}$) in doughs prepared using the traditional processing method. In contrast, folate contents increased when the precooked batter was inoculated by back slopping or by both the LAB combinations. Whatever the fermentation conditions, five minutes of cooking had no significant effect on the folate contents of the porridges.

The overall gains in folate content in the cooked foods compared to the initial folate contents were 134% for fermentation performed with the combined inoculation with 8.2 + A6, 184% for fermentation performed with co-inoculation with 6.2 + A6, and more than 200% with back slopping.

Tableau 29. Folate contents of samples taken during the preparation of the porridges according to the different processes at the beginning of the fermentation (0 h), at the end of the fermentation (24 h) and after cooking (for 5 min).

Fermentation conditions	Changes in folate contents ($\mu\text{g}/100 \text{ g FM}$)			Folate gain (% of 0 h)
	0 h	24 h	5 min of cooking	
Traditional process	3.4 ± 0.4^b	3.6 ± 0.5^b	4.2 ± 0.9^b	22
Back slopping process	1.8 ± 0.4^c	7.1 ± 1.7^a	6.1 ± 0.8^a	237
<i>L. fermentum</i> 8.2 + <i>L. plantarum</i> A6	3.0 ± 0.6^b	6.5 ± 0.8^a	7.1 ± 1.0^a	134
<i>L. plantarum</i> 6.2 + <i>L. fermentum</i> MW2	2.6 ± 0.5^b	7.7 ± 1.4^a	7.3 ± 0.6^a	184

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Means with different letters in the same row differed significantly when compared at different stages of the same process ($p < 0.05$).

4. Discussion

The nutritional quality of traditional *ben-saalga* is very poor since its energy density and its folate content are very low (Mouquet-Rivier *et al.* 2008; Saubade, Humblot, *et al.* 2017). In this work, we used a combination of precooking and inoculation with selected strains, and back slopping, to improve the nutritional quality of the porridge.

The agents of fermentation in the samples obtained using traditional and back slopping fermentation processes were similar to those prepared with the spontaneous fermentation pattern of pearl-millet dough previously described, as mesophilic aerobic bacteria, yeasts, and lactic acid bacteria were found to be present (Tou *et al.* 2006; Humblot and Guyot 2009). High microbial count variability was observed, mainly after cooking (for 5 min). This variability may be due to the difficulty to control the temperature in such amount of porridge and the microbial composition of the back-slopping inoculum, which can differ from one fermentation to another. The fermented dough prepared using a combination of strains inoculated after precooking contained a high concentration of LAB. Real-time PCR targeting specific species or genera showed that the species corresponding to the starter cultures used were present at the beginning and at the end of the fermentations. But using this methodology it was not possible to state that the cultures present at the beginning and end of the fermentation were the same strains. They belong to the same species and further studies would be needed to confirm their identities. What is more, they were not out-competed by other species although little growth of *Leuconostoc* and *Weissella* genus was observed in the samples inoculated with the selected strains after 24 h of fermentation. As the experiments were conducted in a non-sterile environment, this is probably explained by the reintroduction of this genus after precooking (air, dust etc.).

In the present study, all fermentations with selected LAB strains led to a significant increase in folate contents of the dough compared with both the unfermented (0 h) and the traditional *ben-saalga*. This clearly revealed folate production by the *L. plantarum* 6.2 and *L. fermentum* 8.2 used as folate producers. Folate contents of precooked paste inoculated with the two combinations of strains were similar to that reported by Greppi, Saubade, *et al.* (2017) using *L. fermentum* 8.2 alone.

Back slopping fermentation led to a similar increase in the folate contents of the porridges as in fermentation using starter cultures. This increase in folate content may be due to the production of folate by naturally occurring yeasts and LAB present in the traditional

spontaneous fermentation and used as inoculum. Counts of microorganisms in the fermented dough prepared using the back slopping process indeed showed the presence of yeasts and LAB. Numerous studies have shown that yeasts can also significantly increase (up to 700%) the folate content of cereal fermented products (Hjortmo, Hellström, and Andlid 2008; Kariluoto *et al.* 2014). In addition, a symbiotic relationship between yeasts and LAB concerning folate production was recently reported by Greppi, Saubade, *et al.* (2017) in fermented pearl-millet porridge, since the use of the combination of selected microorganisms is more efficient than folate producing LAB alone. The only difference between the two processes is including a precooking step in the case of back slopping. Such a positive effect of precooking alone was unexpected and further studies are necessary to explain it. Yet, spontaneous fermentations have been shown several times to lead to highly variable products in terms on nutritional quality and microbial composition, the choice of inoculation with selected microorganisms would be preferred (Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

We deliberately used the conditions developed by Songré-Ouattara *et al.* (2009; 2010) which target 15-17 g DM/100g using amylolytic LAB to ferment pearl-millet. However, we obtained porridges with slightly less DM content than expected, due to the addition of starter cultures in liquid form, which induced a slightly lower dry matter content, due to a dilution effect. But during the inoculation by back slopping, the addition of a small amount of fermented paste from a previous successful natural fermentation induced an increase of dry matter content of the precooked paste.

Based on joint recommendations by the World Health Organization (WHO) and the Food and Agricultural Organization (FAO) of the United Nations (UN), folate requirements, expressed as recommended nutrient intakes (RNIs) of most of the population including adolescents, adults and the elderly are 400 µg of folate per day (FAO/WHO 2005). However, a dose of 65-300 µg of folate per day would satisfy the folate requirements of infants and young children (FAO/WHO 2005). A food is considered to be a good source of folate when it contributes at least 15% of daily recommended intake (EC Regulation 1924 2006). Based on this definition, traditional *ben-saalga* is far from being a good source of folate. In this study, one 200 g portion of the porridges prepared using precooking and inoculation by back slopping or with both combinations of LAB strains would represent 15% RNIs for infants aged 6-12 months or children aged 1-3 years. This portion can be consumed by infants and young children owing to the functional gastric capacity of 30 g / kg of body weight (BW) / meal (WHO 1998).

However, Mouquet-Rivier *et al.* (2016) recently reported that mean intakes of *ben-saalga* consumed by the 6-9-month-old and the 15-20-month-old children ranged from 7.6 to 19.7 g/kg of BW / meal in Burkina Faso. This was below the functional gastric capacity of 30 g/kg of BW/meal, suggesting that portions of fermented porridges prepared with inoculation would cover far less than the 15% of daily recommended intake of folate. The development of a cereal-based fermented porridges enriched in folate, even though promising, needs to be further refined. For example, based on previous findings, the use of co-cultures of folate producing LAB and amylolytic LAB to ferment pearl-millet, combined with the use of legume seeds such as groundnuts or soybean, which contain folate and other useful nutrients (protein, lipids, etc.) could be further explored (Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010). The optimisation of the duration of fermentation should also be taken into account.

5. Conclusion

This study showed that the use of two starter cultures previously isolated from pearl-millet fermented slurry, and combined with amylolytic LAB strains, may increase the folate content of cereal-based fermented porridges. Back slopping is a potentially advantageous alternative way to improve the folate content of cereal based fermented foods.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest

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.

The authors would like to thank Dounia Gueye, Nelly Fioroni and Oboulbiga Bahanla Edwige for their help with the experiments.

3. Diversité bactérienne d'aliments céréaliers fermentés consommés en Afrique et en Europe

3.1. Introduction

D'après les résultats de la partie précédente, la fermentation contrôlée du *ben-saalga* par l'utilisation des souches *L. fermentum* 8.2 et *L. plantarum* 6.2 a permis une augmentation des teneurs en folates de 130-180%. Ces résultats suggèrent que ces BL, préalablement isolées du *ben-saalga*, sont capables de synthétiser des folates au cours de la fermentation des aliments. A l'instar des souches productrices de folates utilisées dans la partie précédente, de nombreuses fonctions d'intérêt nutritionnel sont aujourd'hui reconnues à plusieurs acteurs de la fermentation des produits céréaliers produits dans les contrées africaines ou européennes (Alexandraki *et al.* 2013). Par exemple, dans une récente publication, en plus du potentiel de synthèse des folates par le microbiote du *ben-saalga*, mis en évidence dans les métagénomes de cet aliment, d'autres fonctions d'intérêt nutritionnel dont le potentiel génétique de synthèse de la riboflavine, de l'hydrolyse de l'amidon, et de la dégradation des polyphénols ont été aussi reconnues aux acteurs de la fermentation de cet ACF (Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

Aujourd'hui, sur la base des fonctions d'intérêt nutritionnel des microorganismes, certains acteurs de la fermentation dont les BL sont utilisés pour la production d'aliments bio-fortifiés en acides aminés essentiels, en vitamines, en exopolysaccharides, en acides gras essentiels, en enzymes et en probiotiques ou pour la production de bactériocines ou de composés aromatiques (Alexandraki *et al.* 2013; Leroy and De Vuyst 2004; Liu, Han, and Zhou 2011). Il est aussi connu que le microbiote des ACF peut jouer différents rôles bénéfiques pour l'Homme. En effet, les ACF peuvent être une source de microorganismes probiotiques. Les effets probiotiques démontrés dans la littérature sont principalement la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction de l'intensité et de la durée des épisodes diarrhéiques et la réduction de l'intolérance au lactose (Rijkers *et al.* 2010).

L'évaluation du potentiel nutritionnel du microbiote des ACF et la compréhension de leur effet santé a été révolutionnée par l'avènement des nouvelles techniques de séquençage de l'ADN permettant de caractériser rapidement ce microbiote. Les acteurs de la fermentation des ACF sont dominés par les BL bien que la présence des levures ne soit pas négligeable (Tamang, Watanabe, and Holzapfel 2016). Les BL des ACF appartiennent principalement aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, et *Weissella* (De Vuyst *et al.* 2009; Guyot 2010; Moroni, Arendt, and Bello 2011). Bien que

les acteurs de la fermentation des ACF soient bien connus en général, l'essentiel des travaux d'étude de la diversité bactérienne concerne les ACF largement consommés dans les pays occidentaux comme le pain à base de seigle, de blé, d'orge et d'avoine (Tamang, Watanabe, and Holzapfel 2016), laissant de côté les nombreux ACF comme les bouillies ou les pâtes solides ou semi-solides faites à base de sorgho, de maïs, ou de mil qui sont des aliments de base ou bien des ressources économiques importantes pour beaucoup de consommateurs en Afrique.

Dans cette partie de ma thèse, la diversité bactérienne de sept ACF dont six produits en Afrique (Burkina Faso et Ethiopie) et un produit en Finlande a été explorée. Parmi les six ACF, l'évolution de la communauté bactérienne a été déterminée dans quatre sous-produits du *ben-saalga* incluant les produits de trempage, de broyage et de fermentation. Dans tous les cas, les indices de diversités intra et interspécifiques ont été calculés et les communautés bactériennes ont été comparées selon la provenance géographique, le procédé de fermentation et la matière première.

Les principaux résultats de cette partie ont été valorisés sous forme d'une ébauche d'article qui sera soumis dans *LWT-Food Science and Technology*.

Projet d'article

Fabrice Bationo, Aynadis Tamene, Susanna Kariluoto, Kaleab Baye, Minnamari Edelmann, Nicolas Leconte, Christèle Humblot. Bacterial diversity and community structure of some African and European traditional cereal-based fermented foods by Illumina Miseq sequencing

A soumettre à LWT-Food Science and Technology

3.2. Publication: Bacterial diversity and community structure of some African and European traditional cereal-based fermented foods by high-throughput sequencing

Bacterial diversity and community structure of some African and European traditional cereal-based fermented foods by high-throughput sequencing

Fabrice Bationo^a, Aynadis Tamene^b, Susanna Kariluoto^c, Kaleab Baye^b, Minnamari Edelmann^c, Nicolas Leconte^d, Christèle Humblot^{d*}

^a Département Technologie Alimentaire, IRSAT, CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso

^b Center for food science and nutrition, Addis Ababa University, Addis Ababa, Ethiopia

^c Department of Food and Nutrition, University of Helsinki, Helsinki, Finland

^d UMR Nutripass, IRD, University of Montpellier / Montpellier SupAgro, Montpellier, France.

*correspondence should be addressed to:

Abstract

A total of seven traditional cereal-based fermented foods were sampled at production units located in Burkina Faso, Ethiopia and Finland. We used metagenomic-based 16S rRNA gene amplicon sequencing to analyze the microbial communities present in these fermented foods. The microbial communities of the studied fermented foods exhibited high relative abundance of lactic acid bacteria which were the main actors of these food, whatever the raw materials, the producers, the geographic origin and the fermentation process. The genera of lactic acid bacteria including *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Enterococcus* were shared by all studied foods. However, within (alpha) and between (beta) fermented foods microbial diversity were different depending on the food type. Fermented foods from Burkina Faso displayed both high alpha and beta diversity as compared to other foods from Ethiopia and Finland. This divergence resulted in the presence of some potentially pathogenic bacteria, namely, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Klesiella*, and *Acinetobacter* in some cereal-based fermented foods from Burkina Faso. The presence of these pathogenic bacteria in some foods from Burkina Faso could be linked to the handling during food processing and the use of wet milling using community mill. The pathogenic bacteria were reduced by fermentation.

Key words: Burkina Faso, Cereal-based fermented foods, Ethiopia, Finland, Microbiota.

1. Introduction

Cereals are used worldwide as staple foods (Nout 2009). A large proportion of the world cereals production is processed by fermentation prior to consumption (Nout 2009). Traditionally, maize (*Zea mays*) / sorghum (*Sorghum vulgare*) / rice (*Oryzae sativa*) / millet (*Pennisetum glaucum*, *Eleusine coracana*) (semi)-cooked doughs and porridges are the main sources of many fermented foods in Africa, while wheat / barley-based breads are a staple diet in Europe (Nout 2009; Tamang and Samuel 2010). These cereals-based fermented foods (CBFF) are developed using different processes which are typical to different geographical areas (Blandino *et al.* 2003). For example, in many African countries, the production of CBFF is still largely a traditional art and generally depends on a spontaneous or fermented by naturally occurring microorganisms while in European countries this is done using different manufacturing processes which can include the use of starter cultures (Omar *et al.* 2006; Blandino *et al.* 2003; Galati *et al.* 2014). In many developing countries located in Africa, the processing of cereal into fermented foods is the main low cost way to improve food safety and these foods represent a local solution to nourishment, and health maintenance for local populations (Oyewole 1997).

CBFF like other fermented products are the hub of consortia of microorganisms (Tamang, Watanabe, and Holzapfel 2016). Microorganisms are present in CBFF either as natural indigenous microbiota or starter cultures used for their functional properties (Franz *et al.* 2014; Stevens and Nabors 2009). Due to the potential of microorganisms for nutritional enhancement of fermented foods and the fact that their consumption may improve health, extensive studies on the properties of functional microorganisms spontaneously occurring in fermentation have been reported (Liu and Tong 2017). Many genera/species of microorganisms have been reported in relation to various CBFF from different countries of Africa and Europe (Tamang, Watanabe, and Holzapfel 2016). The types of microorganisms occurring during the fermentation process appears to depend on the processing, producer, season, and geographical area and with respect to the raw materials used (Nguyen *et al.* 2013). For example, even though *L. plantarum* has been reported as the dominating lactic acid bacteria (LAB) at the final stages of several cereal-based fermented foods (Nout 1980; Kunene *et al.* 2000; Humblot and Guyot 2009), no isolates of *L. plantarum* were found in *fura*, a millet-based spontaneously fermented dumpling (Owusu-Kwarteng *et al.* 2012).

On the microorganisms present in CBFF around the world, LAB are frequently identified as the predominant bacterial genera throughout the fermentation process, including *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, and *Weissella* (Tamang, Watanabe, and Holzapfel 2016). Some of the LAB have one or more enzymatic activities of functional interest in nutrition such as α -amylases, phytases, or α -galactosidases (Songré-Ouattara *et al.* 2008). Based on their function of interest during fermentation, some LAB have been engineered for the production of L-alanine, vitamins, exopolysaccharides, bacteriocins and aromatic compounds (Alexandraki *et al.* 2013) metabolizing the chemical components of raw materials (Nguyen *et al.* 2013).

Since the publication of the first paper on 16S rRNA gene profiling of food bacterial communities by high throughput sequencing (Humblot and Guyot 2009), more than 120 studies have been published in the literature (De Filippis, Parente, and Ercolini 2017). Despite a growing understanding of the ecology of microorganisms of many fermented foods, detailed investigations of bacterial community variation in African CBFF remain scarce. The data available on the microbial diversity of African fermented foods are mainly done by culture-dependent methods (Humblot and Guyot 2009), with strong biases in the identification of microorganisms that can play major or minor functional roles in production of fermented foods. It is therefore necessary to acquire a better and more accurate understanding of the microorganism community in traditional cereal-based fermented from various regions.

The objective of the present study was to estimate the diversity and variation of the native bacterial communities among 7 traditional CBFF originating from two African countries including Burkina Faso and Ethiopia and one European country which is Finland using high throughput 16S rRNA sequencing. In Burkina Faso and in Ethiopia, the different CBFF samples were collected from traditional production units while in Finland this was done from manufacturing level.

2. Material and methods

2.1. Cereal-based fermented food preparation and sampling

The different characteristics and operational conditions of the seven cereal-based fermented foods samples covered in this study can be seen in **Table 29**.

Ben-saalga is a traditional fermented porridge made from pearl-millet (*Pennisetum glaucum*), and often used as complementary food for young children in Burkina Faso and in many West African countries (Mouquet-Rivier *et al.* 2008). This porridge was prepared according to a traditional processing (Tou *et al.* 2006). Briefly, pearl-millet grains were soaked, then sorted, washed and drained before wet-milling. The paste of milled grains was filtrated through a piece of muslin, with addition of water, to remove the draff. The filtrated batter was left to rest for 10 to 24h at ambient temperature (26.8-31.0°C), to allow decantation and fermentation to occur. After decantation, the liquid supernatant was separated from the thicker fermented paste. The paste was boiled and depending on the producer, part of the supernatant could be discarded and replaced by water, to reduce the sour taste. The fermented paste was added to the boiling supernatant and cooked. Water could be added to adjust the texture of the porridge. Three replicates were collected in four traditional production units (TPUs) of Ouagadougou, capital city of Burkina Faso. Sampling was performed at different steps of *ben-saalga* preparation including soaked pearl-millet (Bs-Sm), paste of milled soaked pearl-millet grains (Bs-Pm), fermented paste (Bs-Fp) and supernatant (Bs-Sp).

Fura (Fu) is a semi-solid dumpling fermented food made from pearl-millet commonly consumed in many West African countries particularly in Nigeria, Ghana and Burkina Faso (Jideani *et al.* 2001). Fu dough was prepared according to a traditional processing (Jideani *et al.* 2001). Briefly, its processing comprised the following steps: winnowing, dehulling, sorting, washing, draining of the grains followed by drying, before dry milling. The flour was then blended with spices and lukewarm water, and this dough was kneaded and molded into dough balls that was left to ferment (fermentation time depending on the TPU, varying from 1h to 12 h). These fermented dough balls were then boiled for around 30 min and – while still hot – the cooked dough was pounded into a sticky cohesive mass. This Fu dough was molded again into smaller balls that were dusted with flour before selling in ready-to-eat form which can be consumed in different ways: as it is or as a porridge by crumbling Fu dough and mixing it with *ben-saalga*, fermented milk, or water with sugar. Fu sampling was done on the ready-to-eat form from three TPUs of Ouagadougou at also three separate occasions.

Injera is a fermented pancake widely consumed by the Ethiopian population as a staple food (Baye *et al.* 2013). It is often prepared from tef (*Eragrostis tef*) according to a traditional processing (Yetneberk *et al.* 2004). The procedure involved milling whole tef grain into a flour, preparation of a dough, and fermentation of the dough using back slopping (a batter from a previous batch) and fermenting at room temperature for 48 h. In this study a total of 60

tef dough (Td) samples were collected from ten subcities of Addis Ababa, capital city of Ethiopia. From each sub city, two households were randomly selected and a total of twenty households were included. From each household, Td samples were collected on three separate occasions.

The majority of rye in Finnish diet is consumed as sourdough fermented bread baked from whole meal rye flour. Sourdough is classically made by mixing rye flour and water and allowing it to ferment (Kariluoto *et al.* 2004). A total of 13 rye sourdough (Rs) samples were collected from small bakeries.

All Samples were stored at -20 °C until DNA extraction.

Tableau 30. Information of CBFF samples used in this study.

Country/collection Site	CBFF	Description of samples	Sample codes	Fermentation	Number	
					Producers	Samples
Burkina Faso/Ouagadougou	<i>Ben-saalga</i>	Soaked pearl millet grains	Bs-Sm	Spontaneous (soaking)	4*	12
		Paste of milled soaked millet grains	Bs-Pm	Spontaneous (Soaked milled flour)	4*	12
		Fermented paste	Bs-Fp	Spontaneous	4*	12
	Supernatant	Bs-Sp	Spontaneous	4*	12	
	<i>Fura</i>	<i>Fura</i> dough	Fu	Spontaneous	3*	9
Ethiopia/Addis Ababa	<i>Injera</i>	tef dough	Td	Back slopping	10*	60
Finland/Helsinki	Rye bread	Rye sourdough	Rs	Back slopping	13	13

* From each producer, CBFF samples were collected on three separate occasions

2.2. DNA extraction

A total of 20 g of each CBFF sample were processed using serial centrifugation to eliminate starch and to pellet the bacteria. The final pellet was then washed one more time in 0.9 % (w/v) NaCl. DNA was extracted from the pellets 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 described previously (Turpin, Humblot, and Guyot 2011). Briefly, the cells were firstly lysed with 0.1-mm-diameter zirconium beads for 30 s, followed by 1 h of incubation at 37 °C with lysozyme (40 kU; Eurobio) and mutanolysin (10 U; Promega). According to the manufacturer's instructions, cell lysis was completed with the Nuclei lysis solution (Promega). RNA was removed with the RNase solution (Promega) and proteins with the Protein Precipitation solution (Promega). DNA was precipitated with isopropanol and washed with 70 % ethanol. DNA quality was checked by separation on an agarose gel, followed by ethidium bromide staining.

2.3. PCR amplification for 16S rDNA

PCR conditions were the same as those described in Turpin, Humblot, and Guyot (2011). The V3-V4 hypervariable region was amplified using the primers 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Muyzer, Dewaal, and Uitterlinden 1993).

The amplicons from each sample were used for Illumina paired-end sequencing. Paired-end sequencing (2×300 bp) was performed on an Illumina MiSeq platform by Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Germany). The sequencing company provided the raw reads as fastq which were demultiplexed according to the 2x8 bp index code with 1 mismatch allowed. Each output directory produced by sequencing company using a software bc12fastq provided read 1 and read 2 fastq files for each sampleID.

2.4. Rarefaction and Sequence analysis

The paired-end fastq demultiplexed sequences were imported into the Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 program (QIIME2, ver. 2018-2, <https://qiime2.org/>) with the casava 1.8 paired-end demultiplexed fastq. The quality filter, trim, denoise, and merge the data were performed using the Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2). Based on the interactive quality plots tab (prior to quality filtering), the following criteria were used in

quality filtering: i) any base from the beginning of the each sequence was trimmed off as they seemed to display a high quality; ii) each sequence was truncated at 200 bp reads as the quality began to drop off around this position for forward and reverse reads. Chimeric sequences were removed using the consensus method. Total-frequency-based filtering in QIIME2 was used to filter samples whose total frequency was an outlier in the distribution of samples frequencies. Fives discarded samples with a total frequency less than 20000 were distributed, on each, across three different cereal-based foods including two intermediary products of *ben-saalga* (unfermented and fermented paste) and rye sourdough. The Greengenes 99% operational taxonomic unit (OTU) was used to assign taxonomy to all ribosomal sequence variants. Contaminating mitochondrial and chloroplast sequences were filtered out of the resulting feature table. The remaining sequences were aligned with MAFFT and used for phylogenetic reconstruction in Fast Tree. The diversity metrics were calculated using the QIIME2 diversity plugin. The sampling depth used for these calculations was 34079 as this was chosen based on the number of sequences in the DADA2 feature table summary. This value allowed to retain all samples in the diversity metrics calculation. Alpha diversity as a function of sampling depth (alpha rarefaction) was done using the QIIME2 diversity alpha-rarefaction visualizer with 84 000 as a maximum sampling depth. This value was around the median frequency given in the DADA2 feature table summary.

2.5. Statistical analysis

Principal component analysis and hierarchical clustering analysis were conducted within the R statistical environment (<http://www.Rproject.prg/>).

3. Results

3.1. Characteristics of samples sequences tags

A total of 13 977 792 reads were generated by Illumina MiSeq platform from the 120 CBFF foods samples with an average sequence length of 107 521 (minimum: 902; maximum: 154 654). Following quality control including trimming, denoising, chimera and contaminating mitochondrial and chloroplast sequences removal, 10 461 143 sequences with an average sequence length of 82 371 were obtained (minimum: 34 079; maximum: 125 202), which were then subjected to further down-stream analysis. These sequences were further assigned to a total of 250 OTUs (as defined by 97% sequence similarity).

3.2. Communities richness

Alpha diversity values of the CBFF were measured by both the observed OTUs (a qualitative measure of community richness) and Shannon's diversity index (a quantitative measure of community richness) (**Figure 12**). The number of OTUs and Shannon index were the highest in the Bs-Pm samples and the lowest in sample Rs. The differences between the Bs-Pm and the six other CBFF, on the one hand, and between the Rs and the rest of CBFF, apart from Fu were statistically significant ($P < 0.05$) for Shannon's diversity index. However, no significant differences were found among the seven CBFF for observed OTUs index. Rarefaction analysis based on Shannon's diversity index were shown in **Figure 13**, which indicated that the recovered sequences commendably represented the diversity of the bacterial communities in the samples because the rarefaction showed approximation to a plateau.

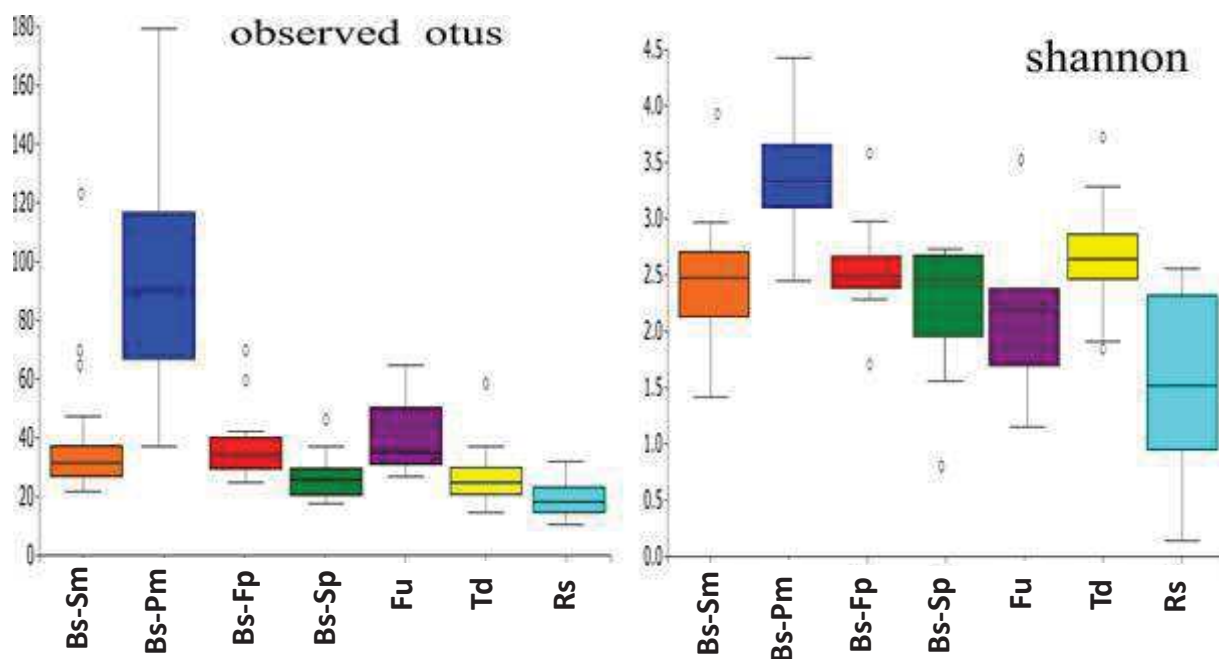


Figure 12: Alpha diversity of the microbiomes of cereal-based fermented foods based on Shannon's diversity index and observed OTUs

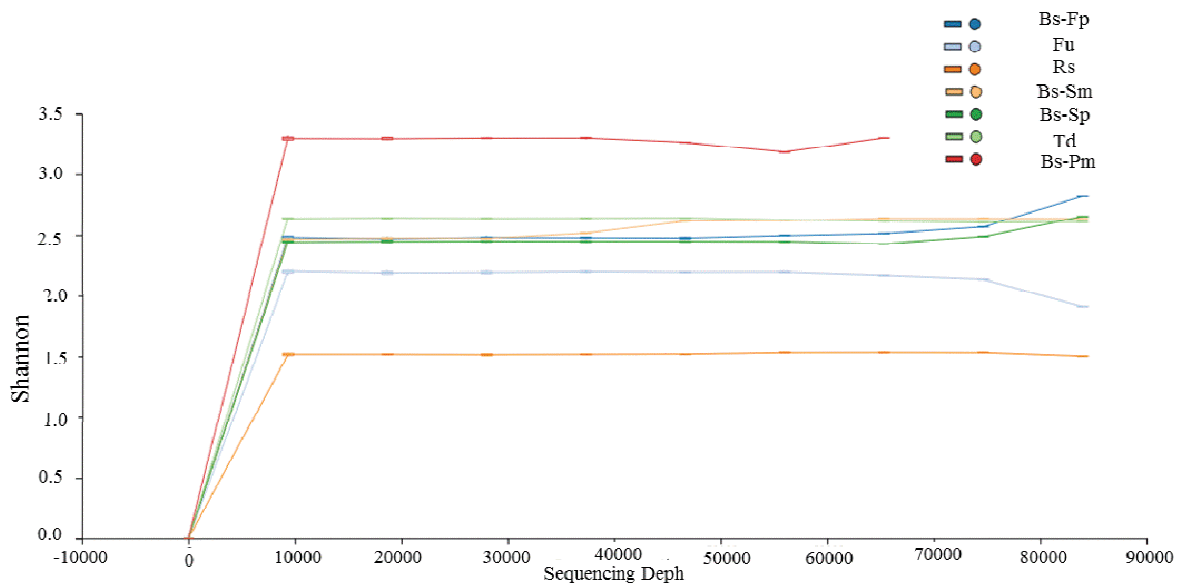


Figure 13: Alpha rarefaction curve based on Shannon's diversity index

3.3. Between samples comparisons

The differences in community structures between CBFF samples were visualized using two phylogeny-based beta-diversity measures: Jaccard distances (**Figure 14A**) and unweighted UniFrac distances (**Figure 14B**). The principal coordinate analyses (PCoA) of bacteria structure clearly differentiated clustering by food sample type, indicating that the bacterial communities from each type of food have a great variation from one to another. Td samples were clustered together at the middle left corner of the plot (A) and slightly scattered alongside the right corner of the plot, indicating a similarity among all Td samples. However, the latter collected in Ethiopia showed a high dissimilarity with other food samples collected in Burkina Faso and Finland. The CBFF samples collected in Burkina Faso and Finland appear scattered and mainly located in the right part of the plot in figure 3A and in the left part of the plot in figure 3B, indicating a slight dissimilarity among them.

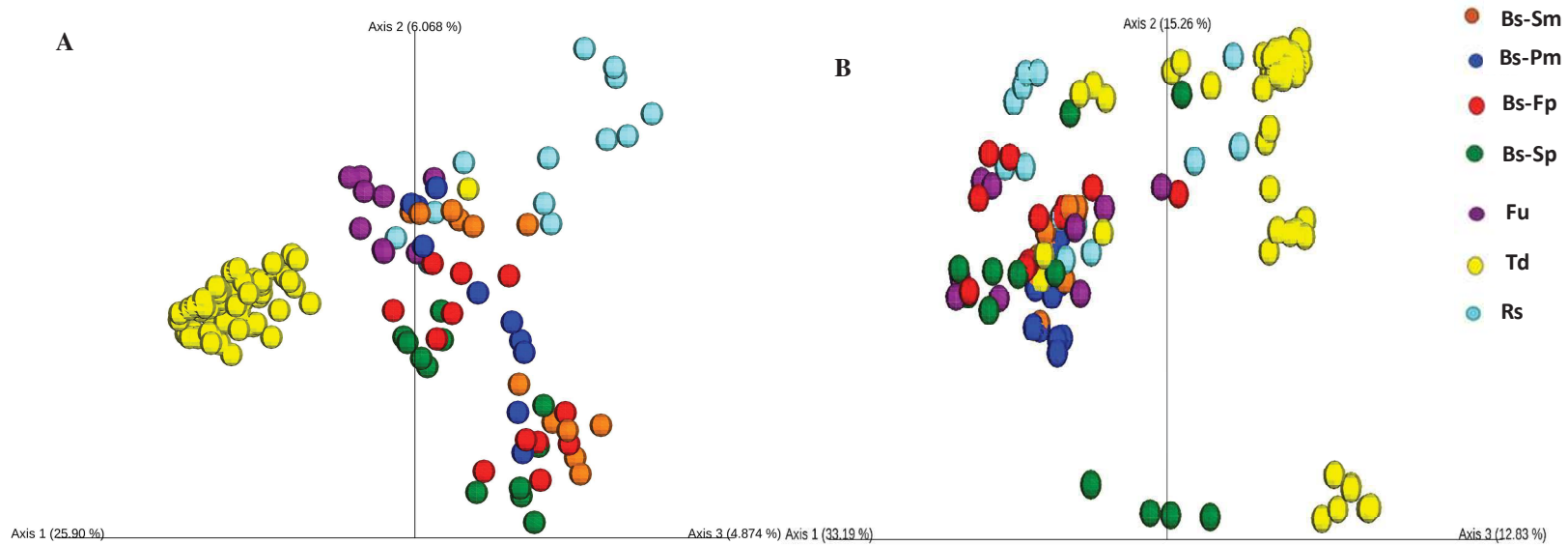


Figure 14: PCoA score plot representation of the microbiota of CBFF based on Jaccard distance (A) and unweighted UniFrac distance (B).

Each point represents the composition of the microbiota of one cereal-based fermented food sample from each country.

3.4. Characterization of the bacterial community structure of the studied foods samples

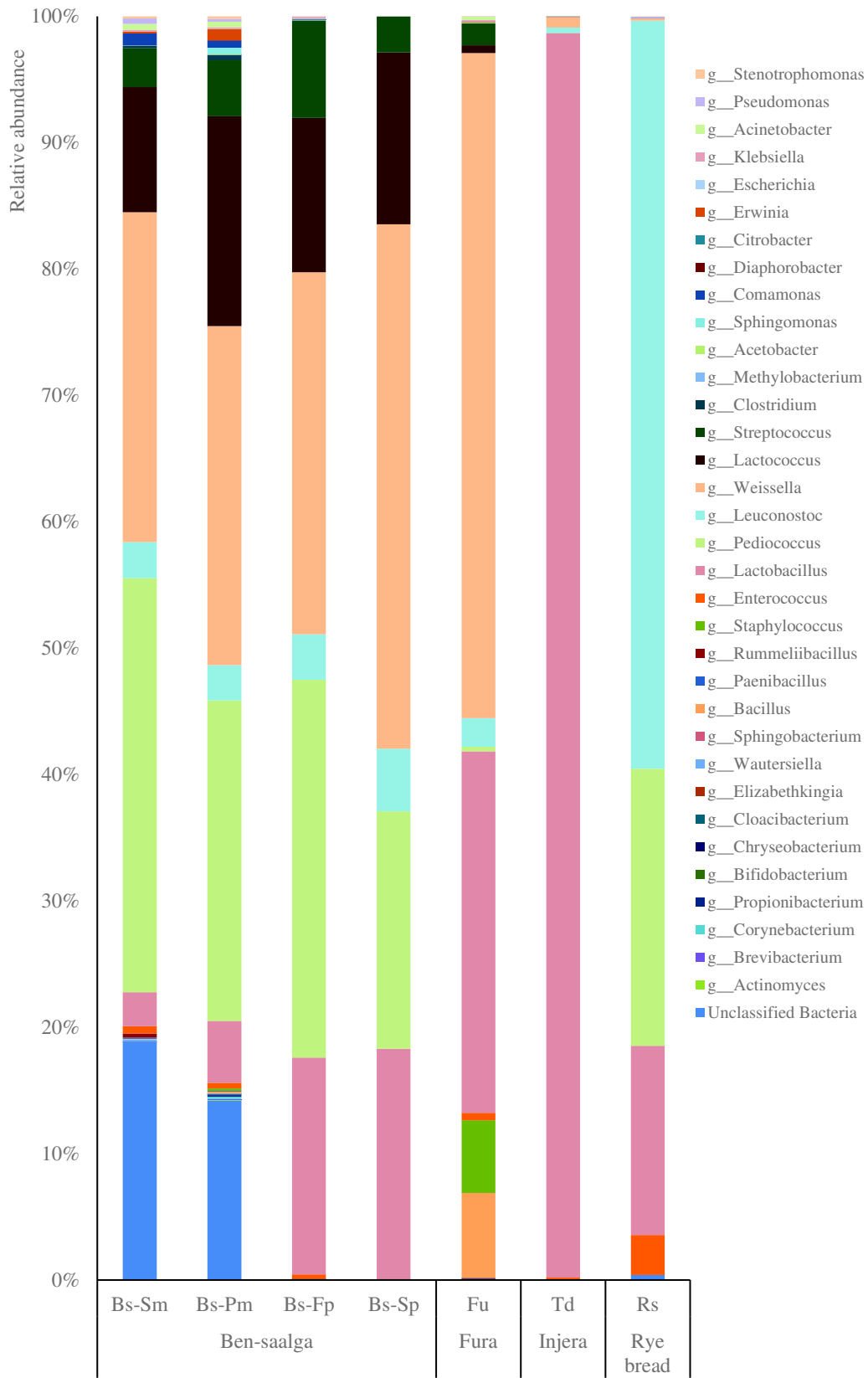
At genus level (**Figure 15A**), thirty four genera were clearly identified among all CBFF samples. Among these, the dominance belong to seven genera including *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus*, and *Streptococcus*. These major genera were all LAB and constituted almost exclusively the bacterial community of CBFF from Ethiopia and Finland. On the other hand, other genera with a non-negligible relative abundance coexisted with the LAB in the CBFF from Burkina Faso. This included *Bacillus*, *Klebsiella* and, *Staphylococcus* in Fu, *Clostridium*, *Sphingomonas*, *Klebsiella* and *Acinetobacter* in Bs-Sm and Bs-Pm, *Comamonas* and *Erwinia* in Bs-Pm, and *Klebsiella* in Bs-Fp.

There are considerable differences in the relative abundance of genera between CBFF samples. Even if five genera including *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Enterococcus* were shared by all CBFF samples whatever the country source, their relative abundance varied in relation to both CBFF and country. In Td from Ethiopia, 98% of identified genus belong to *Lactobacillus*, while the main genus found in Rs from Finland was *Leuconostoc* (38 %), followed by *Pediococcus* (14 %), *Lactobacillus* (10%) and *Enterococcus* (2%). In Fu from Burkina Faso, *Weissella* was the most represented genus (53%). Bs-Fp and Bs-Sp, resulting from the settling step of *ben-saalga* preparation, displayed almost the same profile of major genera. In these products, *Weissella* was the main genus (Sp (42 %), Bs-Fp (29 %)) followed by *Pediococcus* (Bs-Sp (19 %), Bs-Fp (30%)), *Lactobacillus* (18% in both product) and *Lactococcus* (Bs-Sp (14 %), Bs-Fp (12 %)). In Bs-Sm and Bs-Pm, *Pediococcus* (23% and 25% respectively) and *Weissella* (26% and 27% respectively) were found to have a relatively high importance.

At species level (**Figure 15B**), a total of twenty seven species were clearly identified. From these identified species, fourteen were LAB species which belong mainly to the *Lactobacillus* in 8/14 identified species. Among the *Lactobacillus*, the most comonly identified sepcies were *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueki*, *Lactobacillus salivarius* (in all the intermediate products of *ben-saalg* and Fu), *Lactobacillus helveticus* (specy shared by all CBFF samples apart from Bs-Sm), and *Lactobacillus paralimentarius* (in Td). *Streptococcus luteciae* was also found in all the intermediate products of *ben-saalga* and in Fu.

The other identified species were exclusively in CBFF from Burkina Faso including Bs-Sm, Bs-Pm, and Fu. *Bacillus flexus*, *Staphylococcus sciuri*, *Erwinia dispersa*, *Klebsiella* sp., *Acinetobacter guillouiae*, *Acinetobacter rhizosphaerae* were identified in Bs-Sm, Bs-Pm and Fu. *Escherichia coli* and *Pseudomonas mexicana* were present in Bs-Pm. In the Bs-Fp, *Klebsiella* sp. was also found.

A



B

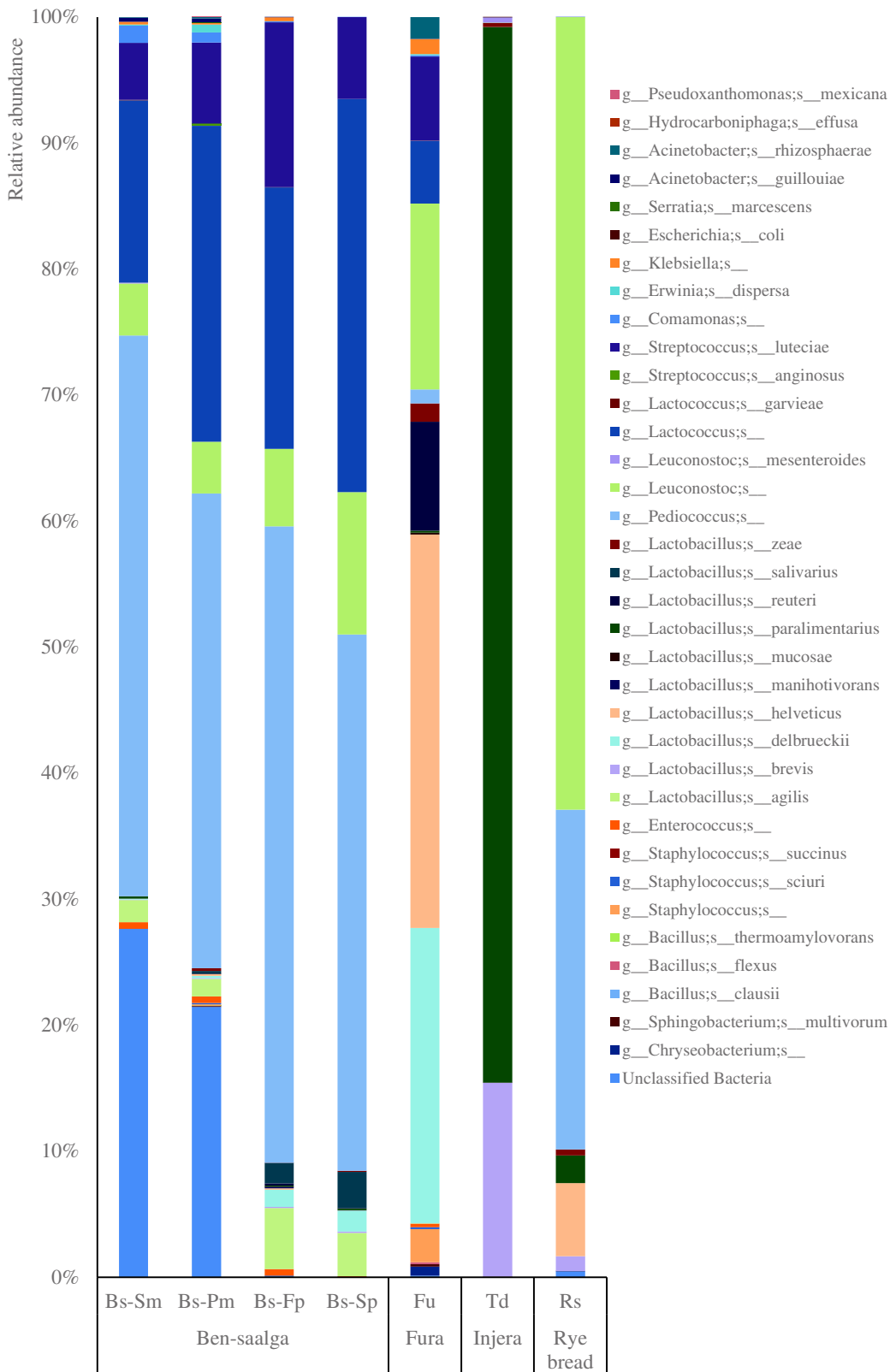


Figure 15. Relative abundance of bacterial taxa in the cereal-based fermented foods samples at the genus (A) and species (B) levels.

4. Discussion

Overall, the microbial communities of the different CBFF showed that the main actors of fermentation are LAB whatever the raw material, regions of foods processing, the fermentation conditions used to produce CBFF and the producers. This is consistent with already-known patterns in the microbial ecology of cereal-based fermented foods (De Vuyst *et al.* 2009; Guyot 2010; Moroni, Arendt, and Bello 2011). However, differences were found in the composition of LAB communities and their relative abundance in relation to the raw material, producers, geographic and fermentation conditions.

The microbial communities of studied CBFF were previously elucidated using culture- and sequencing-based methods. A 16S rRNA sequencing method has shown the predominance of LAB, mainly represented by members of the *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* genera in the fermentation process of *ben-saalga* (Humblot and Guyot 2009). However, the microbial diversity of the intermediate products of *ben-saalga* has never been investigated before. Overall, our results showed that, whatever the intermediate products of *ben-saalga*, the main actors of fermentation are LAB. Indeed, LAB genera including *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* (*L. agilis*, *L. brevis*, *L. delbruecki*, *L. paralimentarius*, *L. Salivarius*) were shared by all the intermediate products of *ben-saalga*. This is in line with the microbial communities of cereal-based fermented foods (De Vuyst *et al.* 2009; Guyot 2010; Moroni, Arendt, and Bello 2011). These findings are also not a surprise as, fermentation of *ben-saalga* is lactic acid fermentation (Tou *et al.* 2007; Mouquet-Rivier *et al.* 2008). For the Bs-Sm and Bs-Pm, a variety of other bacteria, including *Staphylococcus* (*S. sciuri*) *Enterobacteriaceae* such as *Klebsiella* sp., *Erwinia* (*E. dispersa*), *Escherichia* (*E. coli*), *Pseudomonas* (*P. Mexicana*), *Acinetobacter* (*A. guillouiae*, *A. rhizosphaerae*) were found. These bacteria are well known to be potentially pathogenic bacteria in the literature. For example, *S. sciuri* may cause skin infections, food poisoning, toxic shock syndrome and septic shock (Darby 2005; Laskin and Lechevalier 1977). *E. dispersa* and *E. coli* are present in the human gut and are opportunistic pathogens (Darby 2005; Laskin and Lechevalier 1977). *P. Mexicana*, *A. guillouiae* and *A. rhizosphaerae* are widely distributed in nature and may be pathogens (Darby 2005; Laskin and Lechevalier 1977). The presence of these potentially pathogenic bacteria may result from the storage and the wet milling conditions in small community milling units i.e., wet milling in the open air without any safety precautions (Tou *et al.* 2006). Nevertheless, at the end of the fermentation step most were no longer detected, which is

consistent with the reported effect of lactic acid fermentation, which inhibits the growth and survival of food-borne pathogens (Nout and Motarjemi 1997).

Culture-based methods have shown the predominance of LAB in the fermentation process of *Fura* (Owusu-Kwarteng *et al.* 2010; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012). Owusu-Kwarteng *et al.* (2010) detected seventy (70) LAB isolates grouped into five genera belonging to *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, and *Enterococcus* with *Lactobacillus* as the dominant genera. In 2012, 862 LAB isolated from MRS by Owusu-Kwarteng *et al.* (2012) were characterized by rep-PCR fingerprinting and showed also the presence of *Weissella* genera, in addition to those previously detected (Owusu-Kwarteng *et al.* 2010; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012). LAB species commonly involved in the *Fura* fermentation are *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* (Owusu-Kwarteng *et al.* 2010; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012). We found the same bacterial communities and in addition, identified in relative high abundance another variety of bacteria in *fura* such as *Bacillus* (*Bacillus flexus*) not previously detected. As previously reported by Owusu-Kwarteng *et al.* (2010), *fura* can be contaminated by potentially pathogenic bacteria such as *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter sakazakii*, *Serratia liquefaciens* and *Escherichia coli*. In this study, the microbial community of *fura* revealed a contamination by potentially pathogenic bacteria such as *Staphylococcus* (*S. sciuri*), *Pseudomonas* (*P. Mexicana*), and *Enterobacteriaceae* including *E. dispersa* and *Klebsiella* sp. The presence of these potential contaminants in the *fura* is not a surprise since this product is exposed to excessive human handling during preparation and sale (Jideani *et al.* 2001). Umoh *et al.* (1990) have previously isolated *Staphylococcus aureus* from *fura* bought at different markets in Nigeria in numbers ranging between 4.5×10^3 and 4.3×10^4 CFU/mL (Umoh, Adesiyun, and Gomwalk 1990). This highlight the need to improve the standard of hygiene during manufacture and sale of *fura*.

Culture investigation of Td showed the predominance of LAB in the fermentation process, mainly *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Streptococcus*, even if low numbers of *Enterococci* was also reported (Fischer *et al.* 2014; Nigatu and Gashe 1998). Our results confirmed the presence of *Lactobacillus*, and *Leuconostoc*. No *Pediococcus* and *Streptococcus* were not found. However, we identified *Lactococcus*, and *Weissella* at high relative abundance and low number of *Enterobacteriaceae* which are opportunistic pathogens bacteria. The presence of the latter in Td may be introduced into the food as the result of

cross-contamination of utensils, use of contaminated water or introduction by food handlers at any time before, during or after fermentation or baking.

Numerous studies have shown that the Rs bacterial community is dominated by LAB, mainly belonging to *Lactobacillus* genera such as *L. helveticus*, *L. panis*, *L. pontis*, *L. amylovorus*, *L. sanfranciscensis*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum*, even if *Acetobacter* sp. and a member of the *Erwinia/Enterobacter/Pantoea* group were also found in some samples (Scheirlinck *et al.* 2008; Viiard *et al.* 2013). Rs bacterial community detected in our research belonging all to LAB mainly *Lactobacillus* at 98%, and *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*. In Finland, bakeries maintained their own sourdoughs by back slopping procedure, and the latter has been reported to be a potentially tool of the LAB selection most adapted to the substrate (De Vuyst and Neysens 2005; Kariluoto *et al.* 2004).

Overall, in the present study, high-throughput sequencing showed that there was a wide diversity of bacterial communities and species richness in the studied CBFF. Even though, most of the bacterial communities and species richness detected in our CBFF was in line with that of most of traditional CBFF in the literature. Some microbial variabilities were nevertheless observed between studied CBFF and those previously reported in literature data. For example, our results using Illumina MiSeq sequencing highlighted *Lactococcus*, and *Weissella* at high relative abundance in the Td samples which were never previously reported (Nigatu and Gashe 1998; Fischer *et al.* 2014). Besides, *Bacillus* detected in the *fura* was never reported elsewhere (Nigatu and Gashe 1998; Fischer *et al.* 2014). Different factors could explain this microbial variabilities. For example, use of culture-based methods is limited to detect some living bacteria due to selective cultivation and isolation of bacteria and may ignore several non-culturable microorganisms (Tamang *et al.* 2016). Previous studies have demonstrated on numerous CBFF including pearl millet slurries, and sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava that the raw materials, the processing and the origin of samples may have an impact on the composition of the microbiota (Humblot and Guyot 2009; Vogelmann *et al.* 2009; Turpin *et al.* 2011; Saubade *et al.* 2018).

In this study, high-throughput sequencing was exploited for the first time to directly identify microbial communities occurring in all studied CBFF from Africa as compared to approaches used for profiling microbial communities of the same CBFF in the literature (Nigatu and Gashe 1998; Owusu-Kwarteng *et al.* 2010; Owusu-Kwarteng *et al.* 2012; Fischer *et al.* 2014). Although, this approach is believed to overcome problems associated with selective

cultivation and isolation of bacteria from fermented foods, this can also carry limits. For example, *Pediococcus* and *Streptococcus* were not detected in any samples of Td contrary to what has been previously reported using culture-based methods (Fischer *et al.* 2014; Nigatu and Gashe 1998). As reviewed by Ercolini (2004), molecular techniques can carry biases. For example, the choice of the primer couple and the fragment to target may have an impact on some members of bacterial communities. Ercolini *et al.* (2003) demonstrated in Stilton cheese that the presence of *Leuconostoc* could be revealed only by analysing the region V4–V5 of the 16S rRNA while the species were not detected when the region V3 was targeted.

In conclusion, our study characterized the bacterial communities of some traditional cereal-based fermented foods commonly consumed in different African and European countries, and showed that the main actors of fermentation are LAB, mainly *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Lactococcus*. The use of wet milling using community mill, lead to a contamination by potentially pathogenic bacteria, which are reduced by fermentation.

Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

La question de recherche de cette thèse était la suivante : « Comment augmenter la contribution des aliments céréaliers fermentés à la couverture des besoins en vitamines B9 (folates) des populations africaines? Pour répondre à cette question, le statut en folates des groupes vulnérables (femmes en âge de procréer et jeunes enfants), ainsi que les stratégies de lutte contre les carences en folates dans le contexte africain ont été évalués à travers une étude bibliographique. Ensuite, une caractérisation des teneurs en folates des aliments céréaliers fermentés les plus consommés dans la région de l’Afrique de l’Ouest a été réalisée, ainsi qu’une estimation de l’influence des procédés de transformation et de la bioaccessibilité des folates. Pour estimer la faisabilité d’augmenter la contribution des aliments céréaliers fermentés à la couverture des besoins en folates des populations africaines, nous avons proposé aussi un procédé amélioré de production d’aliments céréaliers fermentés de meilleure qualité nutritionnelle en folates en utilisant une combinaison de souches de BL aux propriétés intéressantes. Enfin, nous nous sommes intéressés au microbiote des aliments céréaliers fermentés communément consommés en Afrique.

Dans l’étude bibliographique de cette thèse, le point sur le statut en folates des populations vulnérables (femmes et enfants) en Afrique ainsi que sur les stratégies en cours pour lutter contre les carences en folates montre la nécessité d’améliorer les ingérés en folates des populations. L’amélioration des ingérés en folates nécessite au préalable la connaissance des teneurs en folates des aliments couramment consommés par la population ainsi que des procédés de préparation des aliments et leur impact sur les folates.

A cet effet, 7 aliments composés de pâtes gélatinisées à base de maïs décortiqué (*akassa*) ou non (*doncounou*) ou à base de sorgho (*kaffa*), de beignets frits à base de mil (*massa*), des boulettes de pâte à base de mil cuites (*fura*), et des bouillies à base de mil contenant des grumeaux (*ben-kida*) ou non (*ben-saalga*) ont constitué notre échantillon de travail. La bioaccessibilité des folates présents dans ces aliments a été déterminée. Le procédé de préparation de chaque aliment collecté a été décrit. Une étude bilan-matière a permis l’identification des étapes des procédés de transformation susceptibles d’influencer les teneurs en folates de ces aliments.

Globalement, les matières premières étaient plus riches en folates que les produits transformés suggérant un effet procédé sur les teneurs en folates dans les produits transformés. Cet effet procédé était à la fois un effet productrice-dépendant, jour-dépendant et aliment-dépendant. L’effet procédé occasionnait plus de pertes que de gains en folates dans les produits

transformés. Les pertes en folates variaient de -44 à -59% pour les bouillies fermentées, de -3 à -53% pour le *fura*, de -59 à -76% pour le *massa*, de -22% pour le *doncounou* et de -11 à -13% pour l'*akassa*. La faible teneur en folates des produits transformés observée pourrait être due à un apport exogène d'importantes quantités d'eau occasionnant un effet dilution sur la teneur finale en folates dans les produits transformés. C'est par exemple le cas des bouillies à base de mil contenant des grumeaux (*ben-kida*) ou non (*ben-saalga*; teneur en folates variable de 1,8 à 2,9 µg/100g MF) et des pâtes gélatinisées à base de maïs décortiqué (*akassa*; teneur en folates variable de 1.8 à 3.1 µg/100g MF) dont la teneur en matières sèches était la plus faible. Toutefois la dilution n'était pas la seule cause des pertes en folates dans tous les procédés de préparation des aliments. Certaines étapes identifiées dans le descriptif du procédé de chaque aliment étaient aussi susceptibles d'impacter négativement la teneur en folates. C'est par exemple le cas du décortilage (*akassa*, *fura*), du séchage solaire (*fura*, *massa*) et de la friture (*massa*).

Deux des aliments étudiés (l'*akassa* et le *kaffa*) avaient une teneur en folates plus importante que celle de leur céréale de départ, mais la teneur en folates dans les aliments tels que consommés était tout de même très faible. L'effet procédé dans ce cas-ci paraissait bénéfique sur la teneur en folates dans les produits finis avec un gain en folates de +78% (*akassa*) et de +66% (*kaffa*). Ce gain pourrait résulter d'une production des folates au cours de la fermentation. D'après de nombreuses revues, les fermentations naturelles permettent généralement d'augmenter la teneur en folates des aliments (Blandino *et al.* 2003; Galati *et al.* 2014; Singh *et al.* 2015; Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

Quant aux résultats de l'étude bilan-matière, ils n'étaient pas toujours cohérents avec ceux d'une récente étude similaire sur le même aliment produit en conditions contrôlées (Saubade *et al.* 2018). Par exemple, à l'opposé du gain en folates de +26 à +31 % dans le mil après trempage rapporté par ces auteurs (Saubade *et al.* 2018), une perte en folates de -16 à -50% dans le mil trempé a été rapporté dans notre étude. Cette incohérence entre nos résultats et ceux de ces auteurs pourrait résulter des conditions réelles de trempage du mil au sein des UTPs, différentes de celles mises en place au sein du laboratoire. Dans l'étude de Saubade *et al.* (2018,) le trempage était réalisé à température et à durée constantes, 37°C et 16h respectivement, favorables à un début de germination, à l'origine d'une production de folates au cours du trempage (Jägerstad *et al.* 2005; Kariluoto *et al.* 2006; Katina *et al.* 2007). Au sein des UTPs, ces conditions (température et durée) n'étaient pas contrôlées. Aussi, dans le présent travail, un gain en folates variable de +15% à +27% résultant de la fermentation a été

rapporté. Ce gain en folates était productrice-dépendante. Au regard du potentiel génétique de synthèse des folates des acteurs de la fermentation du *ben-saalga* rapporté par Turpin, Humblot, et Guyot (2011) sur une collection de 155 souches de BL isolées du *ben-saalga*, et confirmé par Saubade *et al.* (20108) sur des métagénomés du même aliment, et en s'appuyant aussi sur la capacité prouvée des acteurs de la fermentation de cet aliment à produire des folates dans des bouillies de mil fermenté (Greppi, Saubade, *et al.* 2017), nous pensons pouvoir affirmer que ce gain en folates résultait d'une production de folates par les acteurs de la fermentation du *ben-saalga*. La différence de nos observations d'avec celles de Saubade *et al.* (2018) pourrait être liée à une différence du microbiote des bouillies fermentées en laboratoire par rapport à celui en présence dans la fermentation des bouillies collectées au sein des UTPs, la capacité de production des folates par les acteurs de la fermentation étant souche et espèce dépendantes (Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

La bioaccessibilité des folates des aliments céréaliers fermentés traditionnels Africains n'avait jamais été auparavant étudiée. La bioaccessibilité des folates dans les aliments étudiés était très variable d'un produit à l'autre, comprise entre 23% et 81%. Toutefois, 3 profils différents de bioaccessibilité semblent se dégager des résultats de la digestion *in vitro* : les folates étaient faiblement bioaccessibles dans l'*akassa*, le *fura* et le *kaffa* (20-30%), moyennement bioaccessibles dans les bouillies fermentées de mil (30-60%), et la bioaccessibilité des folates était plus élevée dans le *massa* et le *doncounou* (60-90%). Ce profil de bioaccessibilité suggère clairement un effet matrice alimentaire sur la bioaccessibilité des folates, lié à i) la teneur en folates totaux dans l'aliment, ii) la structure des matrices alimentaires qui conditionnent la vitesse de digestion de la fraction glucidique dans les aliments céréaliers (Lovegrove *et al.* 2017 ; Mishra et Monro, 2012) et qui a pu influencer la libération des folates au cours de la digestion, et iii) la stabilité des vitamines au cours des étapes de la digestion. On peut noter que les deux types d'aliments présentant la meilleure bioaccessibilité (le *massa* et le *doncounou*) étaient produits à partir de céréales complètes (maïs ou mil) et présentaient une structure semi-solide ou solide. La présence de particules d'enveloppes externes des grains et la texture plus compacte, moins prompte à être hydrolysée, a pu jouer un effet protecteur des folates contre l'acidité gastrique au cours de la digestion. Dans les matrices céréaliers, les folates sont généralement sous forme de polyglutamates réduits, présentant des stabilités chimiques variables en milieu acide (Arcot *et al.* 2002; Konings *et al.* 2001). Seyoum et Selhub (1998) ont montré que les formes réduites de folates (dérivés dihydro- et tétrahydro) dans les aliments étaient principalement détruites en milieu acide

(Seyoum and Selhub, 1998). Les formes sensibles aux pH acides ont donc davantage de risque d'être dégradées au cours de l'étape gastrique de la digestion des aliments. Ringling et Rychlik (2017) ont ainsi rapporté qu'au cours d'une digestion *in vitro* en présence d'enzymes digestives à concentration physiologique, le H₄folate est quasiment intégralement dégradé, et le 5-CH₃-H₄folate est quasiment totalement dégradé en l'absence d'acide ascorbique. Ces auteurs ont montré que la bioaccessibilité des folates dans divers aliments (44% pour des épinards et 21% pour du germe de blé) dépend donc en partie des vitamines présents.

La contribution des aliments étudiés à la couverture des besoins journaliers en folates des enfants, était faible dans l'ensemble. Seulement 2 à 8% et 32 à 74% des besoins journaliers en folates des enfants non allaités et allaités, respectivement, pourraient être couverts par la consommation des aliments étudiés. Ces données suggèrent globalement de potentiels déficits des ingérés en folates via la consommation des aliments céréaliers fermentés en Afrique de l'Ouest. Toutefois les résultats de la contribution des aliments étudiés à la couverture des besoins en folates devraient être nuancés en raison des pratiques alimentaires et nutritionnelles en place en Afrique. En effet, les aliments étudiés ne sont jamais consommés en l'état par la population. Par exemple, les plats familiaux (*doncounou*, *akassa* et *kaffa*) se mangent toujours accompagnés d'une sauce de légumes-feuilles dont les apports en folates n'ont pas été pris en compte dans cette étude. En effet, les légumes-feuilles sont présentés dans la littérature comme de bonnes sources en folates (WHO 2008). En outre, les galettes de mil (*massa*) et les boulettes de mil (*fura*) sont généralement consommées délayées soit dans du lait ou dans les bouillies de mil sans grumeaux (*ben-saalga*) ou avec grumeaux (*ben-kida*) (Greffeuille *et al.* 2010). Toutefois, eu égard de leur forte fréquence de consommation par toutes les couches sociales y compris les plus pauvres, toute amélioration de leur valeur nutritionnelle est la bienvenue.

En conclusion, les 7 aliments investigués dans cette partie de la thèse ne sont pas de bonnes sources en folates. En outre, les folates de certains de ces aliments sont peu bioaccessibles. Cela suggère que les ingérés en folates des populations vulnérables (femmes et enfants) en Afrique de l'Ouest, via la consommation de ces aliments, sont susceptibles d'être faibles. Est-il donc possible d'améliorer ces ingérés, en améliorant les teneurs en folates des aliments via la fermentation, par l'utilisation des souches de BL productrices de folates?

Nous avons effectué des essais de production du *ben-saalga*, inoculé avec des souches de BL productrices de folates. Les souches productrices de folates ont été co-inoculées avec des

souches amylolytiques pour obtenir une bouillie de meilleure qualité énergétique. *L. fermentum* 8.2 et *L. plantarum* 6.2 ont été utilisées comme souches productrices de folates et *L. plantarum* A6 et *L. fermentum* MW2, comme souches amylolytiques. Les souches productrices de folates étaient issues d'une collection de 155 souches de BL préalablement isolés du *ben-saalga* (Turpin, Humblot, and Guyot 2011) et leur choix s'appuyait sur leur capacité à produire des folates aussi bien en milieux de culture que dans les bouillies de mil fermenté (Greppi, Hemery, *et al.* 2017; Greppi, Saubade, *et al.* 2017). *L. plantarum* A6 et *L. fermentum* MW2 ont été respectivement isolés d'aliments fermentés à base de tubercules et de céréales (*mawè*) du centre ou de l'Ouest de l'Afrique (Giraud *et al.* 1991; Agati *et al.* 1998). Leur choix s'appuyait sur leur aptitude à hydrolyser l'amidon, principal constituant des matrices amylacées (Giraud *et al.* 1991; Agati *et al.* 1998). Une production de *ben-saalga* selon le procédé traditionnel ou par pied-de-cuve a été aussi réalisée comme bouillie contrôle. Après 24 heures de fermentation, toutes les cultures starters ont permis une augmentation significative de la teneur en folates du *ben-saalga* (*L. plantarum* 6.2 + *L. fermentum* MW2 : 7,1 µg/100 g MF ; *L. fermentum* 8.2 + *L. plantarum* A6 : 7,3 µg/100 g MF), contre une teneur de 4,2 µg/100 g MF dans le *ben-saalga* traditionnel). Le pied-de-cuve a aussi permis une augmentation de la teneur en folates (6,1 µg / 100 g MF). La cuisson était sans effet sur la teneur en folates des bouillies finales. Une augmentation similaire de la teneur en folates avait été rapportée par Greppi, Saubade, *et al.* (2017) avec la souche *L. fermentum* 8.2 seule ou en co-culture avec des levures en 4 heures de fermentation du *ben-saalga*. De nos résultats, les souches de BL productrices de folates ont été aussi capables de produire des folates en 24 heures de fermentation, soit la durée de fermentation communément pratiquée par les productrices au sein des UTPs (Tou *et al.* 2006).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les apports journaliers recommandés en folates (AJR) pour la majorité de la population sont de 400 µg de folates par jour (FAO/WHO 2005). Toutefois une dose journalière de 65-300 µg devrait satisfaire les besoins des jeunes enfants (FAO/WHO 2005). Il est aussi admis qu'un aliment se définit comme une bonne source en folates s'il contribue au moins à 15% des AJR (EC Regulation 1924 2006). Partant de ces données, une portion de 200g de bouillies préparées par pied-de-cuve ou par inoculation de cultures starters pourrait couvrir 15% des AJR des enfants âgés de 6-36 mois. Une telle portion est consommable par les enfants au regard de leur capacité gastrique de l'ordre de 30 g / kg de poids corporel (PC) / repas (WHO 1998). Toutefois, de récentes études ont rapporté

des ingérés journaliers du *ben-saalga* par les enfants de 15-20 mois variable de 7,6 à 19,7 g/kg PC / repas au Burkina Faso (Mouquet-Rivier *et al.* 2016). De tels niveaux d'ingérés ne peuvent fournir 15% de couverture des besoins journaliers en folates aux enfants, soulignant le besoin de toujours raffiner ce procédé afin d'optimiser d'avantage les teneurs en folates de cet aliment.

En perspective, une optimisation de la durée de fermentation par une approche de la cinétique de la fermentation, et l'adjonction au mil de légumineuses afin d'augmenter les teneurs en matière sèche en même temps que celles des folates sont des pistes explorables. En effet, de précédentes études ont abouti à une augmentation des teneurs en matières sèches du *ben-saalga* avec des combinaisons mil-soja, mil-arachides (Songré-Ouattara *et al.* 2009; Songré-Ouattara *et al.* 2010). En outre, plusieurs autres solutions inventoriées dans une récente revue comme la prise en compte des précurseurs de synthèse de folates (l'acide para-amino-benzoïque, la guanosine triphosphate et le glutamate), des composés inhibiteurs de croissance comme le NaCl, ou encore des prébiotiques comme le sorbitol et le mannitol etc. (Saubade, Hemery, *et al.* 2017) dans le procédé de préparation du *ben-saalga* amélioré pourraient davantage accroître les teneurs en folates dans l'aliment final. Toutefois, tous les efforts d'amélioration des ingérés en folates chez les enfants devraient être conjugués à la sensibilisation des mères à offrir aux enfants une alimentation de complément équilibrée et variée, en tenant compte de la disponibilité alimentaire, des capacités économiques du ménage et des habitudes alimentaires, obstacles majeurs à la diversification du régime alimentaire en Afrique (Semba 2012).

Dans la dernière partie de la thèse, les métagénomés de 160 échantillons de sept aliments céréaliers dont 5 provenant du Burkina Faso (mil trempé, broyat du mil trempé, pâte fermentée et surnageant, *fura*), un de l'Ethiopie (pâte fermentée de l'*injera*) et un de la Finlande (pâte fermentée du pain de seigle au levain) ont été investigués pour décrire les populations bactériennes se développant dans ces aliments. Globalement, l'analyse des résultats de séquençage a révélé une forte dominance des BL quelque soit les aliments et leur origine. Quatre genres de BL étaient communs aux sept aliments. Il s'agissait des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* et *Lactococcus*. Globalement, ces genres étaient cohérents avec le microbiote habituel des aliments céréaliers fermentés retrouvé dans la littérature (De Vuyst *et al.* 2009; Guyot 2010; Moroni, Arendt, and Bello 2011). Toutefois, certaines présences ou absences de bactéries dans les aliments n'étaient pas toujours cohérentes avec les données de la littérature. Par exemple, dans la pâte fermentée de l'*injera*

en provenance d’Ethiopie, les genres *Pediococcus* et *Streptococcus* n’ont jamais été détectés dans la présente étude. Cependant, dans le même aliment, nous avons identifié d’autres bactéries non rapportées par certains auteurs (Fischer *et al.* 2014; Nigatu and Gashe 1998). C’est l’exemple des bactéries appartenant aux genres *Lactococcus* et *Weissella* détectées avec une abondance relative élevée et des entérobactéries qui sont des bactéries potentiellement pathogènes. Ces différences entre les populations bactériennes des aliments céréaliers fermentés rapportées dans cette thèse et celles de la littérature pourraient être liées à des biais méthodologiques. Par exemple, ces auteurs ont procédé à l’isolement et à l’identification du microbiote de cet aliment sur des milieux de cultures susceptibles de sous-estimer la diversité des populations microbiennes existantes (Ercolini 2004). Outre la méthode d’analyse de la biodiversité des populations microbiennes, d’autres paramètres comme la méthode de collecte des échantillons, la variation du procédé d’un pays à un autre ou d’un atelier à un autre, et la variabilité des microorganismes apportés par la matière première peuvent aussi expliquer cette variabilité des populations bactériennes rapportée lors de cette thèse par rapport aux données de la littérature (Humblot and Guyot 2009).

Les aliments du Burkina Faso avaient les indices de diversité alpha et bêta les plus élevés, suggérant une diversité plus importante des communautés bactériennes. Cependant elle était liée à une contamination des aliments. Des germes potentiellement pathogènes du genre *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Sphingomonas*, *Comomonas*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* ont été détectés dans le broyat du mil trempé. Cette contamination résultait du broyage humide effectué dans les moulins publics. Toutefois, la proportion de ces bactéries non désirables a été réduite à l’issue de la fermentation. Cette réduction par la fermentation était cohérente avec la capacité des BL à inhiber la croissance des bactéries pathogènes par la production d’acide lactique ou de composés antimicrobiens comme les bactériocines au cours de la fermentation (Beuchat 1997; Caplice 1999). Des entérobactéries potentiellement pathogènes du genre *Erwinia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* ont aussi été identifiés dans le *fura*. Cette présence de bactéries résulterait d’une contamination liées aux conditions traditionnelles de préparation et de commercialisation de cet aliment (Jideani *et al.* 2001). Umoh *et al.* (1990) avaient aussi détecté des bactéries pathogènes dont l’espèce *Staphylococcus aureus* sur des échantillons de *fura* au Nigéria à des taux variables de 4.5×10^3 à 4.3×10^4 UFC/mL (Umoh, Adesiyun, and Gomwalk 1990).

Au Burkina Faso, et partout en Afrique, l’environnement de production et de vente des aliments dits de rue i.e des aliments prêts à être consommés, préparés et vendus par des

vendeurs ambulants ou fixes dans la rue ou dans les lieux publics (FAO 1998), est souvent insalubre à cause de la présence d'insectes, de la proximité de toilettes publiques, de caniveaux d'eaux résiduaires, de flaques d'eau à odeur désagréable envahissante (Barro *et al.* 2003). Plusieurs travaux ont montré que les produits proposés ne sont pas toujours salubres (Danwson, and Canet1991 ; FAO/OMS 1990 ; Umoh, and Odoba1999 ; Barro *et al.* 2003). Par exemple, Barro *et al.* (2003) ont montré la présence d'un microbiote bactérien pathogène constitué de différents germes comme les staphylocoques, les coliformes, les salmonelles, les shigelles et les streptocoques.

La plupart des BL identifiées dans les CBFF lors de cette thèse peuvent avoir des effets favorables sur l'état nutritionnel de l'Homme. Les effets favorables de ce microbiote relevés dans la littérature incluent l'immunostimulation, l'amélioration de la digestion et de l'absorption, la synthèse de vitamines, l'inhibition de la croissance de bactéries potentiellement pathogènes, la réduction du cholestérol et la diminution des tensions abdominales due à la formation de gaz (Wallace *et al.* 2011).

En conclusion, cette thèse a permis de générer des données, jusque là inexistantes, sur les folates dans les aliments céréaliers fermentés africains tels que consommés. De ces résultats, il ressort que les aliments céréaliers fermentés étudiés sont pauvres en folates. Ces faibles teneurs en folates ont de multiples causes qui cependant émanent principalement de leur procédé de transformation. La bioaccessibilité des folates est très variable, relativement faible et influencée par les caractéristiques des matrices alimentaires. La faible bioaccessibilité des folates des aliments céréaliers fermentés associée aux nombreuses pertes de ceux-ci pendant les procédés traditionnels de préparation génèrent un écart entre les besoins journaliers recommandés et les apports actuels des folates via la consommation de ces aliments en l'état au sein de la population. Il ya donc un besoin d'introduire des améliorations des procédés traditionnels afin d'augmenter les ingérés en folates pour les populations, notamment les plus vulnérables comme les femmes et les jeunes enfants. Le procédé d'amélioration des teneurs en folates développé dans cette étude donne des résultats concluants mais nécessite toujours une optimisation afin de couvrir au moins 15% des besoins journaliers recommandés des jeunes enfants. Cette optimisation devrait désormais prendre en compte l'introduction d'autres produits localement disponibles en Afrique comme les légumineuses dont les arachides, le soja, le niébé etc. dans les essais d'inoculation avec une prise en compte de la cinétique de fermentation. En attendant une mise au point effective de ces recommandations, quelques actions peuvent être réalisées afin de préserver au mieux les folates des matières

premières qui sont déjà à des niveaux satisfaisants. Il s'agit entre autre de standardiser les étapes des procédés de préparation des aliments céréaliers fermentés par le respect des temps de trempage, de fermentation, et de cuisson. Toutes les opérations de transformation devraient s'effectuer dans des enceintes closes à l'abri du soleil. Les volumes d'eau devraient être maîtrisés pour éviter les effets dilutions des nutriments dont les folates. L'utilisation de la combinaison d'une étape de précuisson et d'une inoculation par pied-de-cuve se présente comme une alternative intéressante et simple à mettre en œuvre par rapport à l'utilisation des souches productrices de folates et ce procédé devrait être implémenté dans toutes les unités traditionnelles de production des aliments céréaliers fermentés.

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. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3–4): 161–168.

Abriouel, H., Omar, N. B., López, R. L., Martínez-Cañamero, M., Keleke, S., and Gálvez, A. (2006). Culture-Independent Analysis of the Microbial Composition of the African Traditional Fermented Foods *Poto Poto* and *Dégué* by Using three Different DNA Extraction Methods. *International Journal of Food Microbiology* 111(3): 228–233.

Adebesin, A. A., Amusa, N. A., and Fagade, S. O. (2001). Microbiological Quality of Locally Fermented Milk (*Nono*) and Fermented Milk-Cereal Mixture (*Fura da Nono*) Drink in Bauchi, a Nigerian City. *The Journal of Food Technology in Africa* 6(3): 87–89.

Adeleke, R.O., and Abiodun, O. A. (2010). Physico-Chemical Properties of Commercial Local Beverages in Osun State, Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition* 9(9): 853–855.

Agarry, O., Nkama, I., and Akoma, O. (2010). Production of *Kunun-Zaki* (a Nigerian Fermented Cereal Beverage) Using Starter Culture. *International Research Journal of Microbiology* 1(2): 018–025.

Agati, V., Guyot, J.-P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P., and Hounhouigan, D. J. (1998). Isolation and Characterization of New Amylolytic Strains of *Lactobacillus fermentum* from Fermented Maize Doughs (*Mawè* and *Ogi*) from Benin. *Journal of Applied Microbiology* 85(3): 512–520.

Aka, S., Konan, G., Fokou, G., Djè, K. M., and Bonfoh, B. (2014). Review on African Traditional Cereal Beverages. *American Journal of Research* 2(5): 103–153.

Alexandraki, V., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., and Holzapfel, W. (2013). Status and Trends of the Conservation and Sustainable Use of Micro-Organisms in Food Processes. Food and Agricultural Organization of the United Nation. Background Study Paper.

Allen, L., de Benoist, B., Dary, O., and Hurrell, R. (2006). Guidelines on Food Fortification with Micronutrients. World Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations.

Allen, L. H. (2008). Causes of Vitamin B12 and Folate Deficiency. *Food and Nutrition Bulletin* 29(2): S20-34.

Allen, L. H. (2012). B Vitamins in Breast Milk: Relative Importance of Maternal Status and Intake, and Effects on Infant Status and Function. *Advances in Nutrition* 3(3): 362–369.

Amoa-Awua, W. K., Ngunjiri, P., Anlobe, J., Kpodo, K., Halm, M., Hayford, A. E., and Jakobsen M. (2007). The Effect of Applying GMP and HACCP to Traditional Food Processing at Semi-Commercial *Kenkey* Production Plant in Ghana. *Food Control* 18: 1449–1457.

AOAC. (2006). Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages: Randall/Soxtec/Hexanes Extraction–Submersion Method, Method No. 2003.05. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition. Gaithersberg, MD, USA.

Aramouni, F. M., and Godber, J. S. (1991). Folate Losses in Beef Liver due to Cooking and Frozen Storage. *Journal of Food Quality* 14(5): 357–365.

Aramouni, F. M., Godber, J. S., Hoskins, F. H., and Biede, S. L. (1986). Dynamics and Bioavailability of Folates in Bovine Liver as a Function of Processing and Frozen Storage. *Federation Proceedings* 45(4): 821

Araújo, M. M., Marchioni, E., Villavicencio, L. A. C. H., Zhao, M., di Pascoli, T., Kuntz, F., and Bergaentzle, M. (2015). Mechanism of Folic Acid Radiolysis in Aqueous Solution. *LWT - Food Science and Technology* 63(1): 599–603.

Arcot, J., Wong, S., and Shrestha, A. K. (2002). Comparison of Folate Losses in Soybean

during the Preparation of Tempeh and Soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(12): 1365–1368.

Arcot, J., Wootton, M., Alury, S., Chan, H. Y., and Shrestha, A. K. (2002). Folate Levels in Twelve Australian Wheats and Changes during Processing into Bread. *Food Australia* 54(1–2): 18–20.

Arfi Y. (2012). Application des techniques de séquençage 'nouvelle génération' à l'exploration de la diversité fongique en mangrove et à l'étude des mécanismes d'interaction entre champignons. Aix-Marseille Université, France.

Arimond, M., Wiesmann, D., Becquey, E., Carriquiry, A., Daniels, M., Deitchler, M., Fanou, N., Ferguson, E., Joseph, M., Kennedy, G., et al. (2011). Dietary Diversity as a Measure of the Micronutrient Adequacy of Women's Diets in Resource-Poor Areas: Summary of Results from Five Sites. Washington, DC: FANTA-2 Bridge, FHI 360.

Arkbåge, K., Verwei, M., Havenaar, R., and Witthöft, C. (2003). Bioaccessibility of Folic Acid and (6S)-5-Methyltetrahydrofolate Decreases after the Addition of Folate-Binding Protein to Yogurt as Studied in a Dynamic In Vitro Gastrointestinal Model. *The Journal of Nutrition* 133(11): 3678–3683.

Arsenault, J. E., Nikiéma, 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. *Journal of Nutritional Science* 3(e55): 1–9.

Aufreiter, S., Gregory III, J. F., Pfeiffer, C. M., Fazili, Z., Kim, Y. I., Marcon, N., Kamalaporn, P., Pencharz, P. B., and O'Connor, D. L. (2009). Folate is Absorbed across the Colon of Adults: Evidence from Cecal Infusion of ¹³C-Labeled [6S]-5-Formyltetrahydrofolic Acid. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90(1): 116–123.

Ayad, E. H. (2009). Starter Culture Development for Improving Safety and Quality of Domiati Cheese. *Food Microbiology* 26(5): 533–541.

Ayo, J. A., Agu, H., and Famoriyo, O. F. (2008). Effect of Different Cereals on the Quality of Masa. *Pakistan Journal of Nutrition* 7(4): 530–533.

Bailey, L. B. (1988). Factors Affecting Folate Bioavailability. *Food Technology* 10: 206–238.

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. *The Journal of Nutrition* 133(6): 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 Review. *The Journal of Nutrition* 145(7): 1636S-1680S.

Baker, H., Jaslow S. P., and Frank, O. (1978). Severe Impairment of Dietary Folate Utilization in the Elderly. *Journal of the American Geriatrics Society* 26: 218–221.

Ball, G. F. M. (2005). Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability. *CRC Press*: 824. ISBN 9781574448047.

Balogun, T. A., Lombard, M. J., and McLachlan, M. (2015). The Nutrient Intake of Children Aged 12–36 Months Living in Two Communities in the Breede Valley, Western Cape Province, South Africa. *South African Family Practice* 57(1): 1–7.

Barker, D. J. P. (2012). Developmental Origins of Chronic Disease. *Public Health* 126(3): 185–189.

Barro, N., Ouattara, C. A. T., Nikiema, P. A., Ouattara, A. S., and Traoré, A. S. (2003). Evaluation de la qualité microbiologique de quelques aliments de rue dans la ville de Ouagadougou au Burkina Faso. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé* 12(4): 369-74.

Baye, K., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., and Guyot, J. P. (2013).

Influence of Flour Blend Composition on Fermentation Kinetics and Phytate Hydrolysis of Sourdough Used to Make *Injera*. *Food Chemistry* 138(1): 430-436.

Becquey, E., and Martin-Prevel, Y. (2010). Micronutrient Adequacy of Women's Diet in Urban Burkina Faso is Low. *The Journal of Nutrition* 140(11): 2079S-2085S.

Bell, K. N., and Oakley, G. P. (2009). Update on Prevention of Folic Acid-Preventable Spina Bifida and Anencephaly. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 85(1): 102-107.

Belton, P. S., and Taylor, J. R. N. (2004). Sorghum and Millets: Protein Sources for Africa. *Trends in Food Science and Technology* 15(2): 94-98.

Benito, P., and Miller, D. (1998). Iron Absorption and Bioavailability: And Updated Review. *Nutrition Research* 18(3): 581-603.

Berger, J., Gréffeuille, V., Dijkhuizen, M., and Wieringa, F. (2013). Aliments d'Origine Animale et Nutrition des Populations Vulnérables des Pays du Sud. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 166: 318-326.

Beuchat, L. R. (1997). Traditional Fermented Foods. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Eds. Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. Washington, DC, ASM Press: 629-648.

Bhandari, S. D., and Gregory, J. F. (1990). Inhibition by Selected Food Components of Human and Porcine Intestinal Pteroylpolyglutamate Hydrolase Activity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 51(1): 87-94.

Bhutta, Z. A., Salam, R. A., and Das, J. K. (2013). Meeting the Challenges of Micronutrient Malnutrition in the Developing World. *British Medical Bulletin* 106(1): 7-17.

Binder, H. J., and Donaldson, R. M. (1978). Effect of Cimetidine on Intrinsic Factor and Pepsin Secretion. *Gastroenterology* 74(2): 373-375.

Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., Ezzati, M., Grantham-McGregor, S., Katz, J., Martorell, R., et al. (2013). Maternal and Child Undernutrition and Overweight in Low-Income and Middle-Income Countries. *The Lancet* 382(9890): 427–451.

Blakley, R. L. (1987). Nomenclature and Symbols for Folic Acid and Related Compounds. *European Journal of Biochemistry* 168(2): 251–253.

Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., and Webb, C. (2003). Cereal-Based Fermented Foods and Beverages. *Food Research International* 36(6): 527–543.

Blencowe, H., Cousens, S., Modell, B., and Lawn, J. (2010). Folic Acid to Reduce Neonatal Mortality from Neural Tube Disorders. *International Journal of Epidemiology* 39(1): i110-i121.

Bottiglieri, T., Laundry, M., Crellin, R., Toone, B. K., Carney, M. W., and Reynolds, E. H. (2000). Homocysteine, Folate, Methylation, and Monoamine Metabolism in Depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 69(2): 228–232.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., and Noller, H. F. (1978). Complete Nucleotide Sequence of a 16S ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(10): 4801-4805.

Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., Meyboom, S., Thomas, C. M., Duran, M., van het Hof, K. H., Eskes, T. K., Hautvast, J. G., and Steegers-Theunissen, R. P. (1999). Dietary Folate from Vegetables and Citrus Fruit Decreases Plasma Homocysteine Concentrations in Humans in a Dietary Controlled Trial. *The Journal of Nutrition* 129(6): 1135–1139.

Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., and Steegers-Theunissen, R. P. (2001).

Bioavailability and Bioefficacy of Folate and Folic Acid in Man. *Nutrition Research Reviews* 14(02): 267–294.

Camara, E., and Amaro, M. A. (2003). Nutritional Aspect of Zinc Availability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54(2): 143–151.

Caplice, E., and Fitzgerald, G. F. (1999). Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2): 131-149.

Carmel, R. (2008). Discussion: Causes of Vitamin B12 and Folate Deficiencies. *Food and Nutrition Bulletin* 29(2): S35–S37.

Caswell, B. L., Talegawkar, S. A., Siamusantu, W., West, K. P., and Palmer, A. C. (2018). Usual Nutrient Intake Adequacy among Young, Rural Zambian Children. *British Journal of Nutrition* 119(01): 57–65.

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. *Journal of Microbiological Methods* 44(2): 139–148.

Chandler, C. J., Wang, T. T., and Halsted, C. H. (1986). Pteroylpolyglutamate Hydrolase from Human Jejunal Brush Borders. Purification and Characterization. *Journal of Biological Chemistry* 261(2): 928–933.

Chavan, J. K., Kadam, S. S., and Beuchat, L. R. (1989). Nutritional Improvement of Cereals by Fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28(5): 349–400.

Cheldelin, V. H., Woods, A. M., and Williams, R. J. (1943). Losses of B Vitamins Due to Cooking of Foods. *The Journal of Nutrition* 26(5): 477–485.

Cibik, R., Lepage, E., and Tailliez, P. (2000). Molecular Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from Traditional French Cheeses as

Revealed by RAPD Fingerprinting, 16S rDNA Sequencing and 16S rDNA Fragment Amplification. *Systematic and Applied Microbiology* 23(2): 267-278.

Clarke, R., Grimley Evans, J., Schneede, J., Nexo, E., Bates, C., Fletcher, A., Prentice, A., Johnston, C., Ueland, P. M., Refsum, H., et al. (2004). Vitamin B12 and Folate Deficiency in Later Life. *Age and Ageing* 33(1): 34–41.

Clifford, A. J., Heid, M. K., Peerson, J. M., and Bills, N. D. (1991). Bioavailability of Food Folates and Evaluation of Food Matrix Effects with a Rat Bioassay. *The Journal of Nutrition* 121(4): 445–453.

Clifford, A. J., Wilson, D. S., and Bills, N. D. (1989). Repletion of Folate-Depleted Rats with an Amino Acid-Based Diet Supplemented with Folic Acid. *The Journal of Nutrition*, 119(12): 1956-1961.

Colman, N., Green, R., and Metz, J. (1975). Prevention of Folate Deficiency by Food Fortification. II. Absorption of Folic Acid from Fortified Staple Foods. *The American Journal of Clinical Nutrition* 28(5): 459–464.

Crittenden, R. G., Martinez, N. R., and Playne, M. J. (2003). Synthesis and Utilisation of Folate by Yoghurt Starter Cultures and Probiotic Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80(3): 217–222.

Cuskelly, G. J., McNulty, H., and Scott, J. M. (1999). Fortification with Low Amounts of Folic Acid Makes a Significant Difference in Folate Status in Young Women: Implications for the Prevention of Neural Tube Defects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70(2): 234–239.

Cuskelly, G. J., Mooney, K. M., and Young, I. S. (2007). Folate and Vitamin B 12: Friendly or Enemy Nutrients for the Elderly: Symposium on ‘Micronutrients through the Life Cycle’. *Proceedings of the Nutrition Society* 66(4): 548-558.

Czarnowska, M., and Gujska, E. (2012). Effect of Freezing Technology and Storage Conditions on Folate Content in Selected Vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition* 67(4): 401–406.

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. *African Journal of Biotechnology* 9(33): 5383–5391.

Danwson, R. J., and Canet, C. (1991). International activities in street food. *Food Control* 2(3): 135-9.

Darby, C. (2005). Interactions with Microbial Pathogens. *The Online Review of C. elegans Biology*. Doi/10.1895/ Wormbook.1.21.1.

De Filippis, F., Parente, E., and Ercolini, D. (2017). Metagenomics Insights into Food Fermentations. *Microbial Biotechnology* 10(1): 91–102.

De Vuyst, L., and Neysens, P. (2005). The Sourdough Microflora: Biodiversity and Metabolic Interactions. *Trend in Food Science & Technology* 16(1-3): 43–56.

De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., and Weckx, S. (2009). Biodiversity, Ecological Determinants, and Metabolic Exploitation of Sourdough Microbiota. *Food Microbiology* 26(7): 666–675.

Delchier, N., Herbig, A.-L., Rychlik, M., and Renard, C. M. G. C. (2016). Foliates in Fruits and Vegetables: Contents, Processing, and Stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(3): 506–528.

De-Regil, L. M., Suchdev, P. S., Vist, G. E., Walleser, S., and Peña-Rosas, J. P. (2011). Home Fortification of Foods with Multiple Micronutrient Powders for Health and Nutrition in Children under Two Years of Age. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (9). CD008959.

Dewey, K. G., and Brown, K. H. (2003). Update on Technical Issues Concerning Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries and Implications for Intervention Programs. *Food and Nutrition Bulletin* 24(1): 5–28.

Dillon, J. C. (1989). Céréales En Régions Chaudes. AUPELF-UREF. Eds John Libbey Eurotext, Paris: 299-307.

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. *Nutrition Research* 14(9): 1305–1316.

Dop, M. C., and Benbouzid, D. (1999). Regional Features of Complementary Feeding in Africa and Middle East. In: Complementary Feeding of Young Children in Africa and the Middle East. Eds. Dop M. C., Benbouzid D., Trèche S., de Benoist B., Verster A., and Delpuech F. World Health Organization, Geneva: 43-58.

EC Regulation 1924. (2006). Regulation No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods (OJ L 404): 9-25.

Ekinci, R. (2005). The Effect of Fermentation and Drying on the Water-Soluble Vitamin Content of *Tarhana*, a Traditional Turkish Cereal Food. *Food chemistry* 90(1-2): 127-132.

Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies for Detection of Microbes in Food. *Journal of Microbiological Methods* 56(3): 297-314.

Ercolini, D., Hill, P. J., and Dodd, C. E. R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3540–3548.

Edelmann, M., Kariluoto, S., Nyström, L., and Piironen, V. (2012). Folate in Oats and its Milling Fractions. *Food Chemistry* 135(3): 1938–1947.

Eichholzer, M., Tönz, O., and Zimmermann, R. (2006). Folic Acid: A Public-Health Challenge. *The Lancet* 367(9519): 1352–1361.

Eitenmiller, R. R., Ye, L., and Landen, W. O. (2008). Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. 2nd Ed. Boca Raton: *CRC Press*: 664. ISBN 9780849397714.

Etcheverry, P., Grusak, M. A., and Fleige, L. E. (2012). Application of *in Vitro* Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology* 3: 317.

FAO (1998). Street foods. Report of a FAO expert consultation, Yogyakarta, Indonesia. *FAO food and nutrition paper* 46.

FAO. (2001). Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report on a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Cordoba, Argentina. ISSN 0254-4725.

FAOSTAT. (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. [Http://Faostat3.Fao.Org/Home/E](http://Faostat3.Fao.Org/Home/E).

FAO/OMS (1990). Draft code of hygienic practice for the preparation and sale of street foods. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Alinorm 91/15 Appendix III, Rome.

FAO/WHO. (2005). Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition, Second Edition: 341. ISBN: 92 4 154612 3.

FAO/WHO. (1998). Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand.

Fehr, P. E. (1974). Editorial: Folate Deficiency due to Oral Contraceptives. *Minnesota Medicine* 57(12): 967.

FFI. (2017). Enhancing Grains for Healthier Lives.

[Http://Www.Ffinetwork.Org/Why_fortify/PreventNTDs.Html...](http://www.ffinetwork.org/Why_fortify/PreventNTDs.html) Accessed, February 7, 2017.

Fischer, M. M., Egli, I. M., Aeberli, I., Hurrell, R. F., and Meile, L. (2014). Phytic Acid Degrading Lactic Acid Bacteria in *Tef-Injera* Fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 190: 54-60.

Fiorentino, M., Landais, E., Bastard, G., Carriquiry, A., Wieringa, F. T., and Berger, J. (2016). Nutrient Intake is Insufficient among Senegalese Urban School Children and Adolescents: Results from Two 24 h Recalls in State Primary Schools in Dakar. *Nutrients* 8(10): 650.

Food Safety Authority of Ireland. (2006). Report of the National Committee on Folic Acid Food Fortification. [https://Www.Fsai.Ie/Uploadedfiles/Folic_acid.Pdf...](https://www.fsai.ie/uploadedfiles/folic_acid.pdf) Accessed January 10, 2016.

Ford, J. E., Hurrell, R. F., and Finot, P. A. (1983). Storage of Milk Powders under Adverse Conditions. *British Journal of Nutrition* 49(03): 355–364.

Forges, T., Pellanda, H., Diligent, C., Monnier, P., and Gueant, J.-L. (2008). Do folates have an impact on fertility? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36: 930–939.

Forssén, K. M., Jagerstad, M. I., Wigertz, K., and Witthöft, C. M. (2000). Folates and Dairy Products: A Critical Update. *Journal of the American College of Nutrition* 19(2): 100S-110S.

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. *International Journal of Food Microbiology* 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 Chemistry* 159: 122–127.

Fuso, A., and Scarpa, S. (2011). One-Carbon Metabolism and Alzheimer's Disease: Is it All a Methylation Matter? *Neurobiology of Aging* 32(7): 1192–1195.

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 Reviews International* 30(4): 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 Science and Technology* 44(9): 1859–1864.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A., and Nampoothiri, K. M. (2010). Folate-Producing Lactic Acid Bacteria from Cow's Milk with Probiotic Characteristics. *International Journal of Dairy Technology* 63(3): 339–348.

Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Lelong, B., and Raimbault, M. (1991). Isolation and Physiological Study of an Amylolytic Strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(3): 379–383.

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 in Food Science & Technology* 16(6-7): 229-240.

Gregory III, J. F. (1997). Bioavailability of Folate. *European Journal of Clinical Nutrition* 51: S54–S59.

Gregory III, J. F. (2001). Case Study: Folate Bioavailability. *The Journal of Nutrition* 131: 1376S-1382S.

Gregory III, J. F. (1989). Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research: Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Folates. *Advances in Food and Nutrition Research* 33: 1-101.

Gregory III, J. F. (2012). Accounting for Differences in the Bioactivity and Bioavailability of Vitamers. *Food and Nutrition Research* 56: 10. Doi: 10.3402/fnr.v56i0.5809.

Greppi, A., Hemery, Y., Berrazaga, I., Almaksour, Z., and Humblot, C. (2017). Ability of *Lactobacilli* Isolated from Traditional Cereal-Based Fermented Food to Produce Folate in Culture Media under Different Growth Conditions. *LWT-Food Science and Technology* 86: 277-284.

Greppi, A., Rantsiou, K., Padonou, W., Hounhouigan, J., Jespersen, L., Jakobsen, M., and Cocolin, L. (2013). Determination of Yeast Diversity in *Ogi*, *Mawè*, *Gowé* and *Tchoukoutou* by Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *International Journal of Food Microbiology* 165(2): 84–88.

Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J.-P., and Cocolin, L. (2017). Potential Probiotic *Pichia kudriavzevii* Strains and Their Ability to Enhance Folate Content of Traditional Cereal-Based African Fermented Food. *Food Microbiology* 62: 169–177.

Gujaska, E., and Kuncewicz, A. (2005). Determination of Folate in Some Cereals and Commercial Cereal-Grain Products Consumed in Poland Using Trienzyme Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Methods. *European Food Research and Technology* 221(1–2): 208–213.

Guyot, J.-P. (2010). Fermented Cereal Products. In: *Fermented Foods and Beverages of the World*. Eds. Tamang, J. P. and Kailasapathy, K. New York, CRC Press, Taylor and Francis Group: 247–261. Doi: 10.1201/Ebk1420094954-C8.

Guyot, J.-P. (2012). Cereal-Based Fermented Foods in Developing Countries: Ancient Foods

for Modern Research. *International Journal of Food Science & Technology* 47(6): 1109-1114.

Haidar, J., Melaku, U., and Pobocik, R. S. (2010). Folate Deficiency in Women of Reproductive Age in Nine Administrative Regions of Ethiopia: An Emerging Public Health Problem. *South African Journal of Clinical Nutrition* 23(3): 132–137.

Halsted, C. H. (1990). Intestinal Absorption of Dietary Foliates. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Eds. Picciano, M. F., Stokstad, E. L. R., and Gregory, J. F. New York: *Wiley-Liss Inc*: 23–45.

Hama, F. (2012). Rétention et Biodisponibilité du Fer et du Zinc au Cours des Procédés de Préparation des Plats Traditionnels à Base de Céréales Locales ou Biofortifiées, Consommés par les Jeunes Enfants au Burkina Faso. Université de Montpellier, France.

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. *Journal of Cereal Science* 54(3): 425–433.

Hama, F., Savadogo, A., Ouattara, C. A., and Traoré, A. S. (2009). Biochemical, Microbial and Processing Study of *Déguè*, a Fermented Food (From Pearl Millet Dough) from Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition* 8(6): 759–764.

Hamad, A. M., and Fields, M. L. (1979). Evaluation of the Protein Quality and Available Lysine of Germinated and Fermented Cereals. *Journal of Food Science* 44(2): 456–459.

Hamad, S. H., Dieng, M. C., Ehrmann, M. A., and Vogel, R. F. (1997). Characterization of the Bacterial Flora of Sudanese Sorghum Flour and Sorghum Sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83(6): 764–770.

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 Foliates in a Controlled Intervention Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(4): 911–918.

Harland, B. F., and Morris, E. R. (1995). Phytate: A Good or a Bad Food Component? *Nutrition Research* 15(5): 733–754.

Harold, M., and Tabo, R. (2016). Les Cultures Céréalières: Riz, Maïs, Millet, Sorgho et Blé. Document de Référence: 37.

Harvey-Leeson, S., Karakochuk, C. D., Hawes, M., Tugirimana, P. L., Bahizire, E., Akilimali, P. Z., Michaux, K. D., Lynd, L. D., Whitfield, K. C., Moursi, M., et al. (2016). Anemia and Micronutrient Status of Women of Childbearing Age and Children 6–59 Months in the Democratic Republic of the Congo. *Nutrients* 8(2): 98.

Hawkes, J. G., and Villota, R. (1989). Foliates in Foods: Reactivity, Stability during Processing, and Nutritional Implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28(6): 439–538.

Hefni, M., and Witthöft, C. M. (2011). Increasing the Folate Content in Egyptian Baladi Bread Using Germinated Wheat Flour. *LWT - Food Science and Technology* 44(3): 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. *Journal of Cereal Science* 56(2): 374–378.

Hefni, M., and Witthöft, C. M. (2014). Folate Content in Processed Legume Foods Commonly Consumed in Egypt. *LWT - Food Science and Technology* 57(1): 337–343.

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*. *International Journal of Food Microbiology* 153(1–2): 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. *Journal of Cereal Science* 53(1): 9–18.

Herbert, V., and Bertino, J. R. (1967). Folic Acid. In: The vitamin. Eds. Gryorgy, P. New York, *Academic Press*: 243–76.

Herrador, Z., Sordo, L., Gadisa, E., Buño, A., Gómez-Rioja, R., Iturzaeta, J. M., de Armas, L. F., Benito, A., Aseffa, A., and Moreno, J. (2014). Micronutrient Deficiencies and Related Factors in School-Aged Children in Ethiopia: A Cross-Sectional Study in Libo Kemkem and Fogera Districts, Amhara Regional State. *PLoS One* 9(12): e112858.

Hinterberger, M., and Fischer, P. (2013). Folate and Alzheimer: When Time Matters. *Journal of Neural Transmission* 120(1): 211–224.

Hjortmo, S. B., Hellström, A. M., and Andlid, T. A. (2008). Production of Folates by Yeasts in Tanzanian Fermented *Togwa*. *FEMS Yeast Research* 8(5): 781–787.

Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J., and Andlid, T. (2005). Inherent Biodiversity of Folate Content and Composition in Yeasts. *Trends in Food Science & Technology* 16(6–7): 311–316.

Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J., and Andlid, T. (2008). Biofortification of Folates in White Wheat Bread by Selection of Yeast Strain and Process. *International Journal of Food Microbiology* 127(1–2): 32–36.

Holasova, M., Fiedlerova, V., Roubal, P., and Pechacova, M. (2004). Biosynthesis of Folates by Lactic Acid Bacteria and Propionibacteria in Fermented Milk. *Czech Journal of Food Sciences* 22(5): 175–181.

Holzappel, W. H. (2002). Appropriate Starter Culture Technologies for Small-Scale Fermentation in Developing Countries. *International Journal of Food Microbiology* 75(3): 197–212.

Hounhouigan, D. J., Nout, M. J. R., Nago, C. M., Houben, J. H., and Rombouts, F. M. (1993). Composition and Microbiological and Physical Attributes of *Mawé*, a Fermented Maize Dough from Bénin. *International Journal of Food Science & Technology* 28(5): 513–517.

Hounhouigan, D. J., Nout, M. J. R., Nago, C. M., Houben, J. H., and Rombouts, F. M. (1994). Microbiological Changes in *Mawé* during Natural Fermentation. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 10(4): 410–413.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 75(13): 4354–4361.

Hyde, J. E. (2005). Exploring the Folate Pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica* 94(3): 191–206.

Icart-Vernière, C., Ouattara, L., Avallone, S., Hounhouigan, J., Kayodé, P., Amoussa, W., and Hama, F. (2010). Traditional Recipes of Millet-, Sorghum- and Maize-Based Dishes and Related Sauces Frequently Consumed by Young Children in Burkina Faso and Benin – European Project INSTAPA. The Netherlands: *Wageningen University Publisher*.

Inyang, C. U., and Zakari, U. M. (2008). Effect of Germination and Fermentation of Pearl Millet on Proximate, Chemical and Sensory Properties of Instant “Fura”- A Nigerian Cereal Food. *Pakistan Journal of Nutrition* 7(1): 9–12.

Iyer, R., and Tomar, S. K. (2009). Folate: A Functional Food Constituent. *Journal of Food Science* 74(9): R114–R122.

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 Science & Technology* 91(2): 237–246.

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*. *Journal of Dairy Research* 77(3): 350–356.

Jägerstad, M., Jastrebova, J., and Svensson, U. (2004). Folates in Fermented Vegetables—A Pilot Study. *LWT - Food Science and Technology* 37(6): 603–611.

Jägerstad, M., Piironen, V., Walker, C., Ros, G., Carnovale, E., Holasova, M., and Nau, H. (2005). Increasing Natural Food Folates through Bioprocessing and Biotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 16(6–7): 298–306.

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 Microbiology Letters* 212(1): 29–34.

Jespersen, L. (2003). Occurrence and Taxonomic Characteristics of Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Predominant in African Indigenous Fermented Foods and Beverages. *FEMS Yeast Research* 3(2): 191–200.

Jideani, V. A., Nkama, I., Agbo, E. B., and Jideani, I. A. (2001). Survey of *Fura* Production in Some Northern States of Nigeria. *Plant Foods for Human Nutrition* 56(1): 23–36.

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. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(9): 938–942.

Kariluoto, S., Aittamaa, M., Korhola, M., Salovaara, H., Vahteristo, L., and Piironen, V. (2006). Effects of Yeasts and Bacteria on the Levels of Folates in Rye Sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology* 106(2): 137–143.

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. *International Journal of Food Microbiology* 176: 38–48.

Kariluoto, S., Liukkonen, K.-H., Myllymäki, O., Vahteristo, L., Kaukovirta-Norja, A., and Piironen, V. (2006). Effect of Germination and Thermal Treatments on Folates in Rye. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(25): 9522–9528.

Kariluoto, S., and Piironen, V. (2009). Total Folate. In: HEALTHGRAIN Methods, Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals. Eds. Shewry, P. R., and Ward, J. L. St Paul, Minnesota, USA: *AACC International*: 59–68.

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 Chemistry* 81(1): 134-139.

Kariluoto, S., Edelman, M., and Piironen, V., (2010). Effects of Environment and Genotype on Folate Contents in Wheat in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(17): 9324–9331.

Karovičová, Z. K. J. (2007). Fermentation of Cereals for Specific Purpose. *Journal of Food and Nutrition Research* 46(2): 51–57.

Katan, M. B., Boekschoten, M. V., Connor, W. E., Mensink, R. P., Seidell, J., Vessby, B., and Willett, W. (2009). Which are the Greatest Recent Discoveries and the Greatest Future Challenges in Nutrition? *European journal of clinical nutrition* 63(1): 2-10.

Katina, K., Liukkonen, K.-H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.-M., Lampi, A.-M., Pihlava, J.-M., and Poutanen, K. (2007). Fermentation-Induced Changes in the Nutritional Value of Native or Germinated Rye. *Journal of Cereal Science* 46(3): 348–355.

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. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65(6): 1790–1795.

Kennedy, G., Fanou, N., Seghieri, C., and Brouwer, I. D. (2009). Dietary Diversity as a Measure of the Micronutrient Adequacy of Women's Diets: Results from Bamako, Mali Site. Washington, DC: Food and Nutrition Technical Assistance II Project (FANTA-2), FHI 360.

Kennedy, G., Fanou-Fogny, N., Seghieri, C., Arimond, M., Koreissi, Y., Dossa, R., Kok, F. J., and Brouwer, I. D. (2010). Food Groups Associated with a Composite Measure of Probability of Adequate Intake of 11 Micronutrients in the Diets of Women in Urban Mali. *The Journal of Nutrition* 140(11): 2070S-2078S.

Kim, Y.-I. (2007). Folate and Colorectal Cancer: An Evidence-Based Critical Review. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(3): 267–292.

Kingamkono, R., Sjogren, E., Svanberg, U., and Kaijser, B. (1994). pH and Acidity in Lactic-Fermenting Cereal Gruels: Effect on Viability of Enteropathogenic Microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(6): 664–669.

Koehler, P., Hartmann, G., Wieser, H., and Rychlik, M. (2007). Changes of Folates, Dietary Fiber, and Proteins in Wheat as Affected by Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(12): 4678–4683.

Konings, E. J. M. (1999). A Validated Liquid Chromatographic Method for Determining Folates in Vegetables, Milk Powder, Liver, and Flour. *Journal of AOAC International* 82(1): 119–127.

Konings, E. J., Roomans, H. H., Dorant, E., Goldbohm, R. A., Saris, W. H., and van den Brandt, P. A. (2001). Folate Intake of the Dutch Population According to Newly Established Liquid Chromatography Data for Foods. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(4): 765–776.

Konkobo, Y. C., Karimou, A. R., Kaboré, S., and Diasso, K. (2002). Les Pratiques Alimentaires à Ouagadougou, Burkina Faso: Céréales, Légumineuses, Tubercules et Légumes. CNRST/ CIRAD : 147. ISBN: 2- 87614-511-1.

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. *Journal of Applied Microbiology* 117(3): 679-89.

Korkalo, L., Freese, R., Alfthan, G., Fidalgo, L., and Mutanen, M. (2015). Poor Micronutrient Intake and Status is a Public Health Problem among Adolescent Mozambican Girls. *Nutrition Research* 35(8): 664–673.

Kunene, N. F., Geornaras, I., von Holy, A., and Hastings, J. W. (2000). Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid Bacteria from a Sorghum-Based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Proteins and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1084–1092.

Laiño, J. E., del Valle, M. J., de Giori, G. S., and LeBlanc, J. G. J. (2013). Development of a High Folate Concentration Yogurt Naturally Bio-Enriched Using Selected Lactic Acid Bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 54(1): 1–5.

Laiño, J. E., del Valle, M. J., de Giori, G. S., and LeBlanc, J. G. J. (2014). Applicability of a *Lactobacillus amylovorus* Strain as Co-Culture for Natural Folate Bio-Enrichment of Fermented Milk. *International Journal of Food Microbiology* 191: 10-16.

Laiño, J. E., LeBlanc, J. G. J., and de Giori, G. S. (2012). Production of Natural Folates by Lactic Acid Bacteria Starter Cultures Isolated from Artisanal Argentinean Yogurts. *Canadian Journal of Microbiology* 58(5): 581-588.

Laiño, J. E., Zelaya, H., del Valle, M. J., de Giori, G. S., and LeBlanc, J. G. J. (2015). Milk Fermented with Selected Strains of Lactic Acid Bacteria is Able to Improve Folate Status of Deficient Rodents and also Prevent Folate Deficiency. *Journal of Functional Foods* 17: 22-32.

Laskin, A. I., and Lechevalier, H. A. (1977). Handbook of Microbiology, Vol. 1. *CRC Press*, Boca Raton, FL.

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(7): 835-841.

LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., del Valdez, G F., de Giori, G. S., and Sesma, F. (2011). B-Group Vitamin Production by Lactic Acid Bacteria—Current Knowledge and Potential Applications. *Journal of Applied Microbiology* 111(6): 1297-1309.

LeBlanc, J. G., de Giori, G. S., Smid, E. J., Hugenholtz, J., and Sesma, F. (2008). Folate Production by Lactic Acid Bacteria and Other Food-Grade Microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 112: 975–984.

Lei, V., and Jakobsen, M. (2004). Microbiological Characterization and Probiotic Potential of *Koko* and *Koko* Sour Water, African Spontaneously Fermented Millet Porridge and Drink. *Journal of Applied Microbiology* 96(2): 384–397.

Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry. *Trends in Food Science & Technology* 15(2): 67–78.

Lestienne, I. (2004). Contribution à l'Etude de la Biodisponibilité du Fer et du Zinc dans le Grain de Mil et Conditions d'Amélioration dans les Aliments de Complément. Université de Montpellier 2, France: 226.

Liang, L., Zhang, J., Zhou, P., and Subirade, M. (2013). Protective Effect of Ligand-Binding Proteins against Folic Acid Loss due to Photodecomposition. *Food Chemistry* 141(2): 754–761.

Lin, M. Y., and Young, C. M. (2000). Biosynthesis of Folates by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruekii* ssp *bulgaricus*. *Journal of Food and Drug Analysis* 8(3): 195–199.

Lin, Y., Dueker, S. R., Follett, J. R., Fadel, J. G., Arjomand, A., Schneider, P. D., Miller, J. W., Green, R., Buchholz, B. A., Vogel, J. S., et al. (2004). Quantitation of *in Vivo* Human Folate Metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(3): 680–691.

Liu, D., and Tong, C. (2017). Bacterial Community Diversity of Traditional Fermented Vegetables. *LWT - Food Science and Technology* 86: 40–48.

Liu, S.-N., Han, Y., and Zhou, Z.-J. (2011). Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Chinese Foods. *Food Research International* 44(3): 643–651.

Liukkonen, K.-H., Katina, K., Wilhelmsson, A., Myllymäki, O., Lampi, A. M., Kariluoto, S., Piironen, V., Heinonen, S. M., Nurmi, T., Adlercreutz, H., et al. (2003). Process-Induced Changes on Bioactive Compounds in Whole Grain Rye. *Proceedings of the Nutrition Society* 62(01): 117–122.

Lovegrove, A., Edwards, C. H., De Noni, I., Patel, H., El, S. N., Grassby, T., Zielke, C., Ulmius, M., Nilsson, L., Butterworth, P. J., et al. (2017). Role of Polysaccharides in Food, Digestion, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(2): 237–253.

Lucock, M. D., Nayeemuddin, F. A., Habibzadeh, N., Schorah C. J., Hartley, R., and Leven, M. I. (1994). Methylfolate Exhibits a Negative *in Vitro* Interaction with Important Dietary Metal Cations. *Food Chemistry* 50(3): 307–310.

MacIntyre, U. E., Kruger, H. S., Venter, C. S., and Vorster, H. H. (2002). Dietary Intakes of an African Population in Different Stages of Transition in the North West Province, South Africa: The THUSA Study. *Nutrition Research* 22(3): 239–256.

Malin, J. D. (1977). Total Folate Activity in Brussels-Sprouts - Effects of Storage, Processing, Cooking and Ascorbic-Acid Content. *Journal of Food Technology* 12(6): 623–632.

March of Dimes Birth Defects Foundation. (2006). Global Report on Birth Defects.

[Http://Www.Marchofdimess.Org/Materials/Global-Report-on-Birth-Defects-the-Hidden-Toll-of-Dying-and-Disabled-Children-Full-Report.Pdf...](http://www.marchofdimess.org/materials/global-report-on-birth-defects-the-hidden-toll-of-dying-and-disabled-children-full-report.pdf) Accessed June 10, 2017.

Maruyama, T., Shiota, T., and Krumdieck, C. L. (1978). The Oxidative Cleavage of Folates. *Analytical Biochemistry* 84(1): 277–295.

Masuda, M., Ide, M., Utsumi, H., Niino, T., Shimamura, Y., and Murata, M. (2012). Production Potency of Folate, Vitamin B12, and Thiamine by Lactic Acid Bacteria Isolated from Japanese Pickles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76(11): 2061-2067.

Matherly, L. H, and Goldman, I. D. (2003). Membrane Transport of Folates. *Vitamins & Hormones* 66: 403–456.

Matoth, Y., Zehavi, I., Topper, E. and Klein, T. (1979). Folate Nutrition and Growth in Infancy. *Archives of Disease in Childhood* 54(9): 699–702.

Mbugua, S. K., and Njenga, J. (1992). The Antimicrobial Activity of Fermented *Uji*. *Ecology of Food and Nutrition* 28(3): 191–198.

McDonough, C. M., and Rooney, L. W. (2000). The Millets. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*. Eds. Kulp, K., Ponte, J. New York, Marcel Dekker, Inc.: 177-201.

McGarel, C., Pentieva, K., Strain, J. J., and McNulty, H. (2015). Emerging Roles for Folate and Related B-Vitamins in Brain Health across the Life Cycle. *Proceedings of the Nutrition Society* 74(01): 46–55.

McLean, E., de Benoist, B., and Allen, L. H. (2008). Review of the Magnitude of Folate and Vitamin B12 Deficiencies Worldwide. *Food & Nutrition Bulletin* 29(2): 38–51.

McNulty, H. (1995). Folate Requirements for Health in Different Population Groups. *British Journal of Biomedical Science* 52(2): 110–119.

McNulty, H., and Pentieva, K. (2004). Folate Bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society* 63(04): 529–536.

McNulty, H., and Scott, J. M. (2008). Intake and Status of Folate and Related B-Vitamins: Considerations and Challenges in Achieving Optimal Status. *British Journal of Nutrition* 99(3): S48–S54.

Melse-Boonstra, A., Verhoef, P., Konings, E. J. M., van Dusseldorp, M., Matser, A., Hollman, P. C., Meyboom, S., Kok, F. J., and West, C. E. (2002). Influence of Processing on Total, Monoglutamate and Polyglutamate Folate Contents of Leeks, Cauliflower, and Green Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(12): 3473–3478.

Miller, D. D., and Welch, R. M. (2013). Food System Strategies for Preventing Micronutrient Malnutrition. *Food Policy* 42: 115–128.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014). A Standardised Static *in Vitro* Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. *Food & Function* 5(6): 1113–1124.

Mishra, S., Hardacre, A., and Monro, J. (2012). Food Structure and Carbohydrate Digestibility, Carbohydrates Chuan-Fa Chang, *IntechOpen*, doi: 10.5772/51969.

Mitchell, L. E., Duffy, D. L., Duffy, P., Bellingham, G., and Martin, N. G. (1997). Genetic Effects on Variation in Red-Blood-Cell Folate in Adults: Implications for the Familial Aggregation of Neural Tube Defects. *The American Journal of Human Genetics* 60(2): 433–438.

Mo, H., Kariluoto, S., Piironen, V., Zhu, Y., Sanders, M. G., Vincken, J. P., Wolkers-Rooijackers, J., and Nout, M. J. (2013). Effect of Soybean Processing on Content and Bioaccessibility of Folate, Vitamin B12 and Isoflavones in *Tofu* and *Tempe*. *Food Chemistry* 141(3): 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. *Journal of Food Composition and Analysis* 30(2): 73–79.
- Moroni, A. V., Arendt, E. K., and Bello, F. D. (2011). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Spontaneously-Fermented Buck Wheat and Teff Sourdoughs. *Food Microbiology* 28: 497–502.
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L., and Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* 2(4): 449–473.
- Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Guyot, J.-P., Tou, el H., Rochette, I., and Trèche, S. (2008). Consumption Pattern, Biochemical Composition and Nutritional Value of Fermented Pearl Millet Gruels in Burkina Faso. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59(7–8): 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.
- Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A., and Sørhaug, T. (2003). Microbiological and Fermentation Characteristics of *Togwa*, a Tanzanian Fermented Food. *International Journal of Food Microbiology* 80(3): 187–199.
- Munyaka, A. W., Verlinde, P., Mukisa, I. M., Oey, I., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2010). Influence of Thermal Processing on Hydrolysis and Stability of Folate Poly- γ -Glutamates in Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *italica*), Carrot (*Daucus carota*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 4230–4240.
- Murty, D. S., and Kumar, K. A. (1995). Traditional Uses of Sorghum and Millets. In:

Sorghum and Millets. Ed. Dendy D. A.V. Chemistry and Technology, St Paul : American Association of Cereal Chemists, Inc.:185-222.

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 rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695–700.

Nabarro, D. (2013). Global Child and Maternal Nutrition-the SUN Rise. *The Lancet* 382: 666–667.

Nanson, N. J., and Fields, M. (1984). Influence of Temperature of Fermentation on the Nutritive Value of Lactic Acid Fermented Cornmeal. *Journal of Food Science* 49(3): 958–959.

National Research Council. (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press.

Ndaw, S., Bergaentzlé, M., Aoudé-Werner, D., Lahély, S., and Hasselmann, C. (2001). Determination of Folates in Foods by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection after Precolumn Conversion to 5-Methyltetrahydrofolates. *Journal of Chromatography A* 928(1): 77–90.

Nebié, B., Gapili, N., Traoré, R. E., Nanema, K. R., Bationo/Kando, P., Sawadogo, M., and Zongo, J. D. (2012). Diversité Phénotypique des Sorghos à Grains Sucrés du Centre Nord du Burkina Faso. *Sciences et Techniques, Sciences Naturelles et Agronomie* 32(12): 2010-2012.

Norme Française (NF) ISO 7954. (2003). Directives Générales pour le Dénombrement des Levures et Moisissures, Techniques de Comptage des Colonies à 25°C.

Nguyen, D. T., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Binh Thanh, L., and Vandamme, P. (2013). A Description of the Lactic Acid Bacteria Microbiota Associated with

the Production of Traditional Fermented Vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology* 163(1): 19–27.

Nigatu, A., and Gashe, B. A. (1998). Effect of Heat Treatment on the Antimicrobial Properties of Tef Dough, *Injera*, *Kocho* and *Aradisame* and the Fate of Selected Pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14(1): 63-69.

Norme Internationale (NI) ISO 4833-1. (2013). Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Partie 1: Comptage des colonies à 30 degrés C par la technique d'ensemencement en profondeur.

Nout, M. J. R. (1980). Microbiological Aspects of Traditional Manufacture of *Bussa*, a Kenyan Opaque Maize Beer. *Food chemistry, microbiology, technology* 16: 137–142.

Nout, M. J. R. (2009). Rich Nutrition from the Poorest – Cereal Fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiology* 26(7): 685–92.

Nout, M. J. R., and Motarjemi, Y. (1997). Assessment of Fermentation as a Household Technology for Improving Food Safety: A Joint FAO/WHO Workshop. *Food Control* 8: 221–226.

Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., and Hautvast, G. J. (1989). Accelerated Natural Lactic Fermentation of Infant Food Formulations. *Food and Nutrition Bulletin* 11(1): 65–73.

Nuss, E.T., and Tanumihardjo, S. A. (2011). Quality Protein Maize for Africa: Closing the Protein Inadequacy Gap in Vulnerable Populations. *Advances in Nutrition* 2(3): 217–224.

Obadina, A., Oyewole, O., and Awojobi, T. (2008). Effect of Steeping Time of Milled Grains on the Quality of *Kunnu-Zaki* (A Nigerian Beverage). *African Journal of Food Science* 2: 033–036.

Odunfa, S. A. (1985). African Fermented Foods. In: *Microbiology of Fermented Foods*. Ed. Wood, B.J. DOI: 10.1007/978-1-4613-0309-1_23.

Odunfa, S. A., Adeniran, S. A., Teniola, O. D., and Nordstrom, J. (2001). Evaluation of Lysine and Methionine Production in Some *Lactobacilli* and Yeasts from *Ogi*. *International Journal of Food Microbiology* 63(1-2): 159–163.

Oguntoyinbo, F. A., Turlomousis, P., Gasson, M. J., and Narbad, A. (2011). Analysis of Bacterial Communities of Traditional Fermented West African Cereal Foods Using Culture Independent Methods. *International Journal of Food Microbiology* 145(1): 205–210.

Oguntoyinbo, F. A., and Narbad, A. (2012). Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria and *in Situ* Amylase Expression during Traditional Fermentation of Cereal Foods. *Food Microbiology* 31(2): 254–262.

Olasupo, N., Odunfa, S. A., and Obayori, O. (2010). Ethnic African Fermented Foods. In: *Fermented Foods and Beverages of the World*. Eds. Tamang J., and Kailasapathy, K.: 323–352.

Omar, N. B., Abriouel, H., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Guyot, J.-P., Gálvez, A. (2006). Isolation of Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* Strains from *Ben-Saalga*, a Traditional Fermented Gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology* 112(1): 44–50.

Omar, N. B., and Ampe, F. (2000). Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough *Pozol*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9): 3664–3673.

Onyango, C., Noetzold, H., Bley, T., and Henle, T. (2004). Proximate Composition and Digestibility of Fermented and Extruded *Uji* from Maize-Finger Millet Blend. *LWT - Food Science and Technology* 37(8): 827–832.

Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Glover, R. L., and Jespersen, L. (2012). Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated during Traditional *Fura* Processing in Ghana. *Food Microbiology* 32(1): 72–78.

Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debra, K., Akabanda, F., and Glover, R. (2010). Process Characteristics and Microbiology of *Fura* Produced in Ghana. *Nature and Science* 8(8). [https://works.bepress.com/james_owusu-kwarteng/2/...](https://works.bepress.com/james_owusu-kwarteng/2/) Accessed June 7, 2017.

Oyewole, O. B. (1997). Lactic Fermented Foods in Africa and Their Benefits. *Food Control* 8(5–6): 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. *International Dairy Journal* 27(1–2): 27–33.

Papathakis, P. C., Rollins, N. C., Chantry, C. J., Bennish, M. L., and Brown, K. H. (2007). Micronutrient Status during Lactation in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Women during the First 6 Mo after Delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85(1): 182–192.

Parada, J., and Aguilera, J. M. (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science* 72(2): R21–R32.

Patring, J. D. M., Jastrebova, J. A., Hjortmo, S. B., Andlid, T. A., and Jägerstad, I. M. (2005). Development of a Simplified Method for the Determination of Folates in Baker's Yeast by HPLC with Ultraviolet and Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(7): 2406–2411.

Petridou, E. T., Kousoulis, A. A., Michelakos, T., Papathoma, P., Dessypris, N., Papadopoulos, F. C., and Stefanadis, C. (2016). Folate and B12 Serum Levels in Association with Depression in the Aged: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Aging & Mental Health* 20(9): 965–973.

Pfeiffer, C. M., Rogers, L. M., Bailey, L. B., and Gregory, J. F. (1997). Absorption of Folate from Fortified Cereal-Grain Products and of Supplemental Folate Consumed with or without

Food Determined by Using a Dual-Label Stable-Isotope Protocol. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66(6): 1388–1397.

Pfeiffer, C. M., Rogers, L. M., and Gregory III, J. F. (1997). Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(2): 407–413.

Piironen, V., Edelmann, M., Kariluoto, S., and Bedó, Z. (2008). Folate in Wheat Genotypes in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(21): 9726-9731.

Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Raimondi, S., Matteuzzi, D., and Rossi, M. (2007). Administration of Folate-Producing Bifidobacteria Enhances Folate Status in Wistar Rats. *The Journal of Nutrition* 137(12): 2742-2746.

Preedy, V. R. (2013). B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects. In: *Food and Nutritional Components in Focus*. Ed. Royal Society of Chemistry: 875. DOI: 10.1039/9781849734714.

Prinz-Langenohl, R., Brönstrup, A., Thorand, B., Hages, M., and Pietrzik, K. (1999). Availability of Food Folate in Humans. *The Journal of Nutrition* 129(4): 913–916.

Promeranz, Y. (1988). Wheat, Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists* 3: 562.

Puwastien, P., Pinprapai, N., Judprasong, K., and Tamura, T. (2005). International Inter-Laboratory Analyses of Food Folate. *Journal of Food Composition and Analysis* 18(5): 387–397.

Raimbault, M. (1995). Importance des Bactéries Lactiques dans les Fermentations du Manioc. Eds. Agbor Egbe, T., Brauman, A., Griffon, D., and Trèche. S. Orstom, Paris: 747.

Rao, D. R., Reddy, A. V., Pulusani, S. R., and Cornwell, P. E. (1984). Biosynthesis and Utilization of Folic Acid and Vitamin B12 by Lactic Cultures in Skim Milk. *Journal of Dairy Science* 67(6): 1169–1174.

Rijkers, G. T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Wijnkoop, I., Mercenier, A., Myllyluoma, E. et al. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. *The Journal of Nutrition* 140(3): 671S-676S.

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. *International Journal of Food Microbiology* 135(1): 53–59.

Robinson, D. R. (1971). [184] The Nonenzymatic Hydrolysis of N⁵, N¹⁰ -Methenyltetrahydrofolic Acid and Related Reactions. *Methods in Enzymology* 18(B): 716–725.

Rohner, F., Northrop-Clewes, C., Tschannen, A. B., Bosso, P. E., Kouassi-Gohou, V., Erhardt, J. G., Bui, M., Zimmermann, M. B., and Mascie-Taylor, C. G. (2014). Prevalence and Public Health Relevance of Micronutrient Deficiencies and Undernutrition in Pre-School Children and Women of Reproductive Age in Cote d'Ivoire, West Africa. *Public Health Nutrition* 17(09): 2016–2028.

Rong, N., Selhub, J., Goldin, B., and Rosenberg, I. (1991). Bacterially Synthesized Folate in Rat Large-Intestine is Incorporated into Host Tissue Folyl Polyglutamates. *The Journal of Nutrition* 121(12): 1955–1959.

Rossi, M., Amaretti, A., and Raimondi, S. (2011). Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients* 3(1): 118-134.

Ringling, C., and Rychlik, M. (2017). Simulation of Food Folate Digestion and Bioavailability of an Oxidation Product of 5-Methyltetrahydrofolate. *Nutrients* 9(9): 969. <https://doi.org/10.3390/nu9090969>.

Sanna, M. G., Mangia, N. P., Garau, G., Murgia, M. A., Massa, T., Franco, A., and Deiana, P. (2005). Selection of Folate-Producing Lactic Acid Bacteria for Improving Fermented Goat Milk. *Italian Journal of Food Science* 17(2): 143–154.

Saubade, F., Hemery, Y. M., Guyot, J.-P., and Humblot, C. (2017). Lactic Acid Fermentation as a Tool for Increasing the Folate Content of Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(18): 3894-3910.

Saubade, F., Hemery, Y. M., Rochette, I., Guyot, J.-P., and Humblot, C. (2018). Influence of Fermentation and Other Processing Steps on the Folate Content of a Traditional African Cereal-Based Fermented Food. *International Journal of Food Microbiology* 266: 79–86.

Saubade, F., Humblot, C., Hemery, Y. M., and Guyot, J.-P. (2017). PCR Screening of an African Fermented Pearl-Millet Porridge Metagenome to Investigate the Nutritional Potential of its Microbiota. *International Journal of Food Microbiology* 244: 103–110.

Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Savadogo, P. W., Ouattara, A. S., Barro, N., and Traoré, A. S. (2004). Microorganisms Involved in *Fulani* Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition* 3(2): 134–139.

Sawadogo, N., Nebié, B., Kiebré, M., Kando, P. B., Nanema, R. K., Traoré, R. E., Naoura, G., Sawadogo, M., and Zongo, J. D. (2014). Caractérisation Agromorphologique des Sorghos à Grains Sucrés (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8(5): 2183–2197.

Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Traoré, A. S., and Jakobsen, M. (2008). Technological Properties of *Lactobacillus fermentum* Involved in the Processing of *Dolo* and *Pito*, West African Sorghum Beers, for the Selection of Starter Cultures. *Journal of Applied Microbiology* 104(3): 873–883.

Scheirlinck, I., der Meulen, R. V., Schoor, A. V., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., and Huys, G. (2008). Taxonomic Structure and Stability of the Bacterial Community in Belgian Sourdough Ecosystems as Assessed by Culture and Population fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2414–2423.

Scott, J., Rébeillé, F., and Fletcher, J. (2000). Folic Acid and Folates: The Feasibility for Nutritional Enhancement in Plant Foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 795–824.

Seck, P. A., Touré, A. A., Coulibaly, J. Y., Diagne, A., and Wopereis, M. C. S. (2013). Impact of Rice Research on Income, Poverty and Food Security in Africa: An Ex-Ante Analysis. In: *Realizing Africa's Rice Promise*. Eds. Wopereis, M. C. S., Johnson, D. E., Ahmadi, N., Tollens, E., and Jalloh, A. CAB International, Wallingford: 24-33.

Semba, R. D. (2012). The Historical Evolution of Thought Regarding Multiple Micronutrient Nutrition. *The Journal of Nutrition* 142(1): 143S-156S.

Seyoum, E., and Selhub, J. (1998). Properties of Food Folates Determined by Stability and Susceptibility to Intestinal Pteroylpolyglutamate Hydrolase Action. *The Journal of Nutrition* 128(11): 1956–1960.

Shahab-Ferdows, S., Engle-Stone, R., Hampel, D., Ndjebayi, A. O., Nankap, M., Brown, K. H., and Allen, L. H. (2015). Regional, Socioeconomic, and Dietary Risk Factors for Vitamin B-12 Deficiency Differ from Those for Folate Deficiency in Cameroonian Women and Children. *The Journal of Nutrition* 145(11): 2587–2595.

Singh, A. K., Rehal, J., Kaur, A., and Jyot, G. (2015). Enhancement of Attributes of Cereals by Germination and Fermentation: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(11): 1575–1589.

Slavin, J. L., Jacobs, D., and Marquart, L. (2000). Grain Processing and Nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(4): 309–326.

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. *International Journal of Food Microbiology* 128(2): 395–400.

Songré-Ouattara, L. T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Humblot, C., 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. *International Journal of Food Microbiology* 130(3): 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. *Journal of Food Science* 75(5): M261–M269.

Soro-Yao, A. A., Brou, K., Koffi-Nevry, R., and Djè, K. M. (2013). Microbiology of Ivorian Fermented Products: A Review. *Asian Journal of Agriculture and Food Science* 1(2): 37–47.

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. *Scientia Horticulturae* 16(2): 125–130.

Souci, S., Fachmann, W., and Kraut, H. (2000). Food Composition and Nutrition Tables, 6th Revised and Completed Edition. *CRC Press*: 1182

SPRING/USAID. (2016). National Anemia Profiles.

<https://www.spring-nutrition.org/publications/series/national-anemia-profiles...> Accessed October 5, 2016.

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 de l'Afrique de l'Ouest. FAO, Rome, Italy. [Http://Www.Fao.org/3/a-I2698b.Pdf...](http://www.fao.org/3/a-I2698b.pdf) Accessed January 15, 2015.

Steinkraus, K. H. (1994). Nutritional Significance of Fermented Foods. *Food Research International* 27(3): 259–267.

Stevens, H. C, and Nabors, L. (2009). Microbial Food Cultures : A Regulatory Update. *Food Technology* 63(3): 36–41.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(9): 2367–2377.

Suitor, C. W., and Bailey, L. B. (2000). Dietary Folate Equivalents: Interpretation and Application. *Journal of the American Dietetic Association* 100(1): 88-94.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. N., and Hugenholtz, J. (2003). Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8): 4542–4548.

Tamang, J. P., and Samuel, D. (2010). Dietary Cultures and Antiquity of Fermented Foods and Beverages : In: Fermented Foods and Beverages of the World. Eds. J Tamang, .P., and Kailasapathy, K. London, *CRC Press*: 1–40.

Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*7: 377.

Tamene, A., Baye, K., Kariluoto, S., and Humblot, C. (2018). Folate in Tef Grain: Quantification and Effect of Traditional Processing of *Injera*, a Cereal Fermented Ethiopian Staple Food. Unpublished.

Tamura, T., Shin, Y. S., Buehring, K. U., and Stokstad, E. L. R. (1976). The Availability of

Folates in Man: Effect of Orange Juice Supplement on Intestinal Conjugase. *British Journal of Haematology* 32(1): 123–134.

Tamura, T., and Stokstad, E. L. R. (1973). The Availability of Food Folate in Man. *British Journal of Haematology* 25(4): 513–532.

Tamura, T., and Picciano, M. F. (2006). Folate and Human Reproduction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 83(5): 993–1016.

Tankoano, A., Diop, M. B., Sawadogo-Lingani, H., Kaboré, D., and Savadogo, A. (2017). Les Aspects Technologiques, Microbiologiques et Nutritionnels des Aliments Fermentés à Base de Lait et de Mil En Afrique de l’Ouest. *International Journal of Advanced Research* 5(8): 1509–1526.

Tankoano, A., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Kaboré, D., and Traoré, Y. (2016). Study of the Process and Microbiological Quality of *Gappal*, a Fermented Food and Beverage from Burkina Faso Based on Milk and Millet Dough. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research* 5: 104–110.

Tawaba, J. C. B., Ba, K., Destain, J., Malumba, P., Béra, F., and Thonart, P. (2013). Vers une Intégration du Sorgho Comme Matière Première pour la Brasserie Moderne (Synthèse Bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 17(4): 622–633.

Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, R. E., Mack, R. N., and Regal, P. J. (1989). The Planned Introduction of Genetically Engineered Organisms: Ecological Considerations and Recommendations. *Ecology* 70(2): 298-315.

Tou, E. H. (2007). Caractérisation et Amélioration du Peocédé Traditionnel de Préparation de la Bouillie de Mil Fermenté, *Ben-Saalga*, Utilisé comme Aliment de Complément au Burkina Faso. Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

Tou, E. H., Guyot, J.-P., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Counil, 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. *International Journal of Food Microbiology* 106(1): 52–60.

Tou, E. H., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Traoré, A. S., Trèche, S., and Guyot, J.-P. (2007). Effect of Different Process Combinations on the Fermentation Kinetics, Microflora and Energy Density of *Ben-saalga*, a Fermented Gruel from Burkina Faso. *Food Chemistry* 100(3): 935–943.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 77(24): 8722–8734.

Uher, C., De Raïssac, M., and Bricas, N. (2011). Les Cultures Vivrières Pluviales En Afrique de l'Ouest et du Centre: Éléments d'Analyse et Propositions pour l'Action. AFD/CIRAD/FIDA. *A Savoir* N° 6.

Umeta, M., and Faulks, R. M. (1989). Lactic Acid and Volatile (C2-C6) Fatty Acid Production in the Fermentation and Baking of Tef (*Eragrostis tef*). *Journal of Cereal Science* 9(1): 91-95.

Umoh, V.T., Adesiyun, A. A., and Gomwalk, N. E. (1990). The Occurrence of *Staphylococcus aureus* in Fermented Milk Products (*Fura* and *Manshanu*) in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology* 10: 343–348.

Umoh, V. J., and Odoaba, M. B. (1999). Safety and quality evaluation of street foods sold in Zaria, Nigeria. *Food Control* 10: 9-14.

United States Department of Agriculture (USDA). (2014). Agricultural Statistics, Washington, DC 20402-0001. <https://www.nass.usda.gov>... Accessed July 10, 2016.

USDA. (2015). National Agricultural Library. USDA Nutrient Data Laboratory. <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition/usda-nutrient-data-laboratory>... Accessed July 10, 2016.

Vahteristo, L., Ollilainen, V., and Varo, P. (1996). HPLC Determination of Folate in Liver and Liver Products. *Journal of Food Science* 61(3): 524–526.

Van Daele, J., Blancquaert, D., Kiekens, F., Van Der Straeten, D., Lambert, W. E., Stove, C. P. (2016). Degradation and Interconversion of Plant Pteridines during Sample Preparation and Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry* 194: 1189–1198.

Van Der Walt, J. P. (1956). Kaffircorn Malting and Brewing Studies. II.—Studies on the Microbiology of *Kaffir* Beer. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7(2): 105–113.

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. *British Journal of Nutrition* 82(3): 203–212.

Verwei, M., Arkbåge, K., Mocking, H., Havenaar, R., and Grooten, J. (2004). The Binding of Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolate to Folate-Binding Proteins during Gastric Passage Differs in a Dynamic *in Vitro* Gastrointestinal Model. *The Journal of Nutrition* 134(1): 31–37.

Vieira-Dalode, G., Jespersen, L., Hounhouligan, J., Moller, P. L., Nago, C. M., and Jakobsen, M. (2007). Lactic Acid Bacteria and Yeasts Associated with *Gowe* Production from Sorghum in Benin. *Journal of Applied Microbiology* 103(2): 342–349.

Viiard, E., Mihhalevski, A., Rühka, T., Paalme, T., and Sarand, I. (2013). Evaluation of the Microbial Community in Industrial Rye Sourdough upon Continuous Back-Slopping Propagation Revealed *Lactobacillus helveticus* as the Dominant Species. *Journal of Applied Microbiology* 114(2): 404–412.

Visentin, M., Zhao, R., and Goldman I. D. (2012). The Antifolates. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 26(3): 629–648.

Voigt, M., and Eitenmiller, R. (1978). Comparative Review of Thiochrome, Microbial and Protozoan Analyses of Vitamins-B. *Journal of Food Protection* 41(9): 730–738.

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. *International Journal of Food Microbiology* 130(3): 205–212.

Wallace, T. C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M. D., Gibson, G., Hentges, E., and Sanders, M. E. (2011). Human Gut Microbiota and its Relationship to Health and Disease. *Nutrition Reviews* 69(7): 392–403.

Wei, M.-M., and Gregory III, J. F. (1998). Organic Acids in Selected Foods Inhibit Intestinal Brush Border Pteroylpolyglutamate Hydrolase *in Vitro*: Potential Mechanism Affecting the Bioavailability of Dietary Polyglutamyl Folate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(1): 211–219.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703.

WHO. (1998). Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries, A Review of Current Scientific Knowledge. WHO/NUT/98.1.
http://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/WHO_NUT_98.1/en/... Accessed June 3, 2018.

WHO. (2008). Conclusions of a WHO Technical Consultation on Folate and Vitamin B12 Deficiencies. *Food and Nutrition Bulletin* 9(2): S238–S244.

WHO. (2009). Weekly Iron-Folic Acid Supplementation (WIFS) in Women of Reproductive Age: Its Role in Promoting Optimal Maternal and Child Health.

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. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1324(1): 40–47.

Wigertz, K., and Jägerstad, M. (1995). Comparison of a HPLC and Radioprotein-Binding Assay for the Determination of Folates in Milk and Blood Samples. *Food Chemistry* 54: 429–436.

Wintzingerode, F. V., Göbel, U. B., and Stackebrandt, E. (1997). Determination of Microbial Diversity in Environmental Samples: Pitfalls of PCR-Based rRNA Analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21(3): 213–229.

Wirth, J. P., Rohner, F., Woodruff, B. A., Chiwile, F., Yankson, H., Koroma, A. S., Russel, F., Sesay, F., Dominguez, E., Petry, N., et al. (2016). Anemia, Micronutrient Deficiencies, and Malaria in Children and Women in Sierra Leone Prior to the Ebola Outbreak - Findings of a Cross-Sectional Study. *PLoS One* 11(5): e0155031.

Witthöft, C. M., Arkbåge, K., Johansson, M., Lundin, E., Berglund, G., Zhang, J. X., Lennernäs, H., and Dainty, J. R. (2006). Folate Absorption from Folate-Fortified and Processed Foods Using a Human Ileostomy Model. *British Journal of Nutrition* 95(1): 181–187.

Witthöft, C. M., Forssén, K., Johannesson, L., and Jägerstad, M. (1999). Folates - Food Sources, Analyses, Retention and Bioavailability. *Näringsforskning* 43(1): 138–146.

Wouters, J. T.M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., and Smit, G. (2002). Microbes from Raw Milk for Fermented Dairy Products. *International Dairy Journal* 12(2–3): 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 Science and Technology* 44(1): 231–238.

Yabaya, A. (2008). Microorganisms Associated with Starter Cultures of Traditional *Burukutu*

Liquor in Madakiya, Kaduna State, Nigeria. Short Communication. *Science World Journal* 3(3): 3.

Yetneberk, S., de Kock, K. L., Rooney, L. W., and Taylor, J. R. N. (2004). Effects of Sorghum Cultivar on *Injera* Quality. *Cereal Chemistry* 81(3): 314-321.

Youngblood, M. E., Williamson, R., Bell, K. N., Johnson, Q., Kancherla, V., and Oakley, G. P. J. (2013). 2012 Update on Global Prevention of Folic Acid–Preventable Spina Bifida and Anencephaly. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 97(10): 658–663.

Yousif, N. M. K., Huch, M., Schuster, T., Cho, G. S., Dirar, H. A., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. (2010). Diversity of Lactic Acid Bacteria from *Hussuwa*, a Traditional African Fermented Sorghum Food. *Food Microbiology* 27(6): 757–768.

Zhao, R., Matherly, L. H., and Goldman, I. D. (2009). Membrane Transporters and Folate Homeostasis; Intestinal Absorption, Transport into Systemic Compartments and Tissues. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11: e4. Doi: 10.1017/S1462399409000969.

Zulu, R., Dillon, V. M., and Owens, J. D. (1997). *Munkoyo* Beverage, a Traditional Zambian Fermented Maize Gruel using *Rhynchosia* Root as Amylase Source. *International Journal of Food Microbiology* 34(3): 249–258.

Annexe 1 : Folate status of women and children in Africa- current situation and improvement strategies

Folate status of women and children in Africa - current situation and improvement strategies

Fabrice Bationo^{1, 2*}, Laurencia Touloumé Songré-Ouattara¹, Fatoumata Hama-Ba¹, Kaleab Baye³, Youna M. Hemery², Charles Parkouda¹, Hagrétou Lingani-Sawadogo¹, Bréhima Diawara¹ and Christèle Humblot²

¹Département Technologie Alimentaire / Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies/ Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso

² Food and nutrition research in the global south / Institut de Recherche pour le Développement / University of Montpellier / Montpellier SupAgro, Montpellier, France

³Center for Food Sciences and Nutrition, PoBox-1176, College of Natural Sciences, Addis Ababa University, Ethiopia

***Corresponding author:**

E-mail address: fabationo@gmail.com

Phone: +226 70700635

Abstract:

Most African countries suffer from maternal and child micronutrient deficiencies. Despite worldwide public health interventions to address folate deficiencies, data on both the magnitude of folate deficiencies and responses to address vulnerable groups' needs are very scarce. The aim of this review was to identify patterns of maternal and child folate status as well as current strategies to tackle women and children's health disorders related to folate deficiencies in Africa. Published articles or surveys conducted from 2005 to 2018 in Africa reporting on mean folate intake, prevalence of inadequate intake, and serum folate concentrations were reviewed. Folate status surveys were identified in eleven countries among the 54 countries of the African continent. No national data were available. Folate deficiencies among women and children ranged from 0.7 to 86.1% across Africa. The prevalence of folate adequacy was very low in all countries where food frequency data were available. Policies or strategies to support the reduction of anemia and neural tube defects were found to be in place in Africa but their coverage is still limited. The use of some selected traditional processes is one possible way to increase folate consumption by providing folate-enriched foods to the population. The use of local materials would help to make folate-rich foods available for the poorest.

Keywords: Africa, Children, Developing countries, Folic acid, Strategies, Women

1. Introduction

Folate deficiencies are one of the most prevalent vitamin deficiencies that affect women and children in all areas of the world (McLean, de Benoist, and Allen 2008). Formerly identified as a cure for megaloblastic anemia during pregnancy, folate is now viewed as an essential vitamin for women's reproduction and for child growth (Tamura and Picciano 2006). Poor folate status at conception increases the risk of neural tube defects (NTD), possibly pre-eclampsia and other adverse outcomes (Tamura and Picciano 2006). In low-income countries, 29% of neonatal deaths related to visible congenital abnormalities are attributed to NTD (Blencowe *et al.* 2010). In addition, anemia can also be caused by folate deficiency. In 2011, Africa had the highest proportion of anemia for pregnant women and children under 5 years old compared to other continents (Black *et al.* 2013).

Unlike plants and micro-organisms, humans do not have a metabolic system to synthesize folate, which must thus be acquired entirely from dietary sources (Zhao, Matherly, and Goldman 2009). Typical folate intakes are not always optimal in the diets of many women of childbearing age and of children, and folate intake is further limited by poor bioavailability and losses during cooking (McNulty 1995). The global prevalence of folate deficiencies worldwide is not known precisely, but is even more marked in Africa, where most data are derived from local surveys which are not representative of the general population (McNulty 1995; McLean, de Benoist, and Allen 2008).

Different options exist to reach the daily dose required for effective prevention of folate deficiencies. These include dietary diversification, folic acid fortification or supplementation with folic acid. Supplementation with folic acid is very efficient and since the US Food and Nutrition Board recommended folic acid supplementation for pregnant women, it has substantially reduced pregnancy-induced severe folate deficiency (Blencowe *et al.* 2010). Policies for fortification of cereals with folic acid have been implemented in several industrialised countries, and have significantly reduced the incidence of NTD (Food Safety Authority of Ireland 2006). Some African countries have also chosen to fortify foods and to use folic acid supplements, but programme coverage is often low (FFI 2017). This is due to the low level of education of women and children in many places and also to the limited access to public health services and fortified foods for the poorest populations, who mainly rely on their own products for domestic consumption (MacIntyre *et al.* 2002).

Recommendations for folate intakes differ slightly from one country to another, but the World Health Organization (WHO) and the Food and Agricultural Organization (FAO) of the United Nations (UN) issued joint recommendations (Table 1) (FAO/WHO 2005). Folate requirements, expressed as recommended nutrient intakes (RNI) of most of the population including adolescents, adults and the elderly are 400 µg of folate per day (FAO/WHO 2005). However, a dose of 65-300 µg of folate per day would satisfy the folate requirements of infants and young children (FAO/WHO 2005). For lactating and pregnant women, 500-600 µg of folate per day should be enough to cover their needs (FAO/WHO 2005).

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

Target population	Age groups	EAR (µg/day)	RNI (µg/day)
Infants and children	0-12 months ^a	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	15-49 years	520	600
Lactation	15-49 years	450	500

^aBased on a human milk intake of 0.75 L/day

An adequate diet rich in folate is the mainstay. However, in populations where it is unlikely that diet will provide the recommended intakes of this nutrient, addressing folate deficiencies must include supplementation and fortification with folic acid (WHO 2008). The WHO recommends periconceptional use of folic acid supplements (WHO 2009). Folic acid can be taken alone or combined with iron or other prenatal vitamins. In population groups where the prevalence of anemia is above 20% among women of reproductive age, combined folic acid and iron supplementation should be administered weekly to all women of reproductive age to prevent anemia (WHO 2009).

In this context, this paper reviews current information available on maternal and child folate status in the African countries for which data were available. We also examined the current response of each country to address maternal and child folate needs and the food processing techniques which could be used to enhance the natural folate content of food in Africa.

1. Availability of data

This review was designed to identify maternal and child folate status in the last decade in Africa. Published articles and surveys conducted between 2005 and 2018 reporting on mean folate intake, prevalence of adequate intake, or serum folate concentrations were reviewed. The indicators used to assess folate status included folate intake ($\mu\text{g/day}$), prevalence of folate adequacy (%), and prevalence of low serum or plasma folate concentrations (%). In the eleven countries identified in the literature, five assessed serum/plasma folate concentrations (Rohner *et al.* 2014; Harvey-Leeson *et al.* 2016; Haidar, Melaku, and Pobocik 2010; Wirth *et al.* 2016; Korkalo *et al.* 2015), five estimated the adequacy of folate intake (Becquey and Martin-Prevel 2010; Arsenault *et al.* 2014; Kennedy *et al.* 2010; Fiorentino *et al.* 2016; Balogun, Lombard, and McLachlan 2015; Caswell *et al.* 2018), while both folate intake and serum folate were reported in only one country (Shahab-Ferdows *et al.* 2015). In addition, the threshold used in the different surveys varied from 6.8 to 10 nmol/L. Owing to the wide variability of informations per country and the low final sample size, the prevalence of folate deficiencies among countries is not compared in this review.

2. Folate status of women and children in Africa

Among the eleven African countries for which data was available, five assessed folate status only for women of reproductive age while others assessed folate status either for children or both women and children (Table 2). No study has been designed to assess the folate status of the whole population in any country of Africa in the last 10 years.

Table 2. Prevalence of folate deficiencies in women and children in African countries

Target population	Countries	Age groups in years	Sample size	Study method	Thresholds (nmol/L)*	Folate status		References
						FD =Folate Deficiency (%)	FI= Folate intake (µg/d) PA=Prevalence of Folate adequacy (%)	
Women	Burkina Faso	15-49	178	24-hour dietary recall	NA	FI= 253; PA= 12	(Becquey and Martin-Prevel 2010)	
		15-49.	457 ^a ; 455 ^b	24-h dietary recall	NA	FI= 150 ^a ; 276 ^b ; PA= 5 ^a ; 20 ^b	(Arsenault <i>et al.</i> 2014)	
	Cameroon	15-49	900	Plasma folate assessment; 24-h dietary recall	10	FD =17.3; PA=41; FI=285	(Shahab-Ferdows <i>et al.</i> 2015)	
	Côte d'Ivoire	15-49	734	Plasma folate assessment	10	FD=86.1	(Rohner <i>et al.</i> 2014)	
	Democratic Republic of Congo	18-45	641 ^c ; 796 ^d	Serum folate assessment	6.8	FD= 0.7 ^c -1.0 ^d	(Harvey-Leeson <i>et al.</i> 2016)	
	Ethiopia	15-49	970	Serum folate assessment	10	FD= 31.3	(Haidar, Melaku, and Pobocik 2010)	
	Mali	15-49	102	24-h dietary recall	NA	FI= 131; PA= 0	(Kennedy <i>et al.</i> 2010)	
	Mozambique	14-19	448	Serum folate assessment	10	FD= 4.1	(Korkalo <i>et al.</i> 2015)	
	Sierra Leone	15-49	871	Plasma folate assessment	10	FD = 79.2	(Wirth <i>et al.</i> 2016)	
Children	Burkina Faso	36-59 months	425 ^a ; 448 ^b	24-h dietary recall	NA	FI= 91 ^a ; 175 ^b PA= 28 ^a ; 64 ^b	(Arsenault <i>et al.</i> 2014)	
	Cameroon	12-59-months	677	Plasma folate assessment; 24-h dietary recall	10	FD= 8.4; PA=61; FI= 136	(Shahab-Ferdows <i>et al.</i> 2015)	
	Ethiopia	4-15	74	Serum folate assessment	10	FD =13.9	(Herrador <i>et al.</i> 2014)	
	Senegal	5-17	545	24-h dietary recall	NA	FI= 50; PA : 0	(Fiorentino <i>et al.</i> 2016)	
	South Africa	12-36 months	55 ^e ; 65 ^f	Food frequency questionnaire	NA	FI= 84.2 ^e ; 92.8 ^f ; 97.2 ^g , 98.2 ^h .	(Balogun, Lombard, and McLachlan 2015)	
	Zambia	4-8	200	24-h dietary recall	NA	PA= 43	(Caswell <i>et al.</i> 2018)	

^a Lean season; ^b Post-harvest season, ^c South Kivu, ^d Kongo central, ^e Girls in Avian Park, ^f Girls in Zweektemba, ^g Boys in Avian Park, ^h Boys in Zweektemba; * Thresholds used to delineate normal from deficient values for the concentration of folate in the blood.

NA: Not applicable

3.1. Burkina Faso

In two cross-sectional studies in Burkina Faso, folate was identified as one of the most problematic micronutrients among children and their mothers (Becquey and Martin-Prevel 2010; Arsenault *et al.* 2014). According to the first study, only 12% of women aged 15-49 years in the capital city of Ouagadougou had sufficient intakes of folate (Becquey and Martin-Prevel 2010). The second study showed substantial seasonal variation in the adequacy of folate intakes among children and their mothers. Folate intakes were significantly higher during the post-harvest season than in the lean season. The probability of adequacy in women and children was respectively 0.05 and 0.28 in the lean season, but increased significantly from the lean to the post-harvest season (Arsenault *et al.* 2014).

3.2. Cameroon

A cross-sectional survey conducted in Cameroon in 2015 examined the folate status of women of reproductive age and young children before the beginning of a fortification programme. Plasma folate concentrations revealed deficiencies in 17.3% of the women and in 8.4% of the children (Shahab-Ferdows *et al.* 2015). This prevalence did not differ in children between regions but in women, varied from 13% in the south to 26% in Yaoundé/Douala (Shahab-Ferdows *et al.* 2015). The prevalence of inadequate folate intake among women was 59% (Shahab-Ferdows *et al.* 2015).

3.3. Côte d'Ivoire

In a cross-sectional survey conducted in 2013, folate deficiencies were identified as a severe public health problem among non-pregnant women of reproductive age. Folate deficiencies were 86.1% in non-pregnant women of reproductive age (Rohner *et al.* 2014), and the prevalence was even higher in urban areas, the highest prevalence (96%) being measured in the capital city of Abidjan (Rohner *et al.* 2014).

3.4. Democratic Republic of the Congo

In 2016, a subnational survey indicated the almost complete absence of folate deficiencies in the mother-child pairs from South Kivu and Kongo Central, as the rate was < 1% in both women and children (Harvey-Leeson *et al.* 2016).

3.5. Ethiopia

In 2010, folate deficiencies were assessed in 940 Ethiopian women of reproductive age in nine out of the 11 regions of the country (Haidar, Melaku, and Pobocik 2010). Folate

deficiencies were identified in almost half the women of reproductive age (46.1%) (Haidar, Melaku, and Pobocik 2010). Another study conducted in two districts of Ethiopia showed that in 2014, 13.9% of the school-aged children surveyed suffered from folate deficiency (Herrador *et al.* 2014). Both studies suggested that folate deficiencies are currently one of main public health problems in Ethiopia.

3.6. Mali

In 2010, a cross-sectional survey, which examined the dietary intake of micronutrients among women of reproductive age in urban Mali, indicated that the median folate intake (119 µg per day) was below the estimated average requirement (EAR) (320 µg per day) and the probability of adequacy for folate was zero (Kennedy *et al.* 2010).

3.7. Mozambique

In 2015, a cross-sectional study examined the prevalence of deficiencies and dietary intakes of selected micronutrients including folate in adolescent girls (Korkalo *et al.* 2015). The prevalence of folate deficiencies was 4.1% (Korkalo *et al.* 2015). Significantly lower serum folate concentrations were found in urban areas than in rural districts. According to this study, adolescent Mozambican girls are at risk of folate deficiencies.

3.8. Senegal

In Senegal, a cross-sectional survey targeting children registered in state primary schools in the vicinity of the capital city of Dakar revealed that 100% of children had insufficient folate intakes (Fiorentino *et al.* 2016).

3.9. Sierra Leone

A cross-sectional survey conducted in 2016 to assess the magnitude of micronutrient deficiencies in Sierra Leone showed that 79.2% of women suffered from folate deficiency, emphasising that folate deficiencies in women are a serious public health problem in the country (Wirth *et al.* 2016).

3.10. South Africa

To assess the micronutrient intakes of children, a cross-sectional study was performed in two communities in Western Cape in 2011 and concluded that folate intakes in children were inadequate in both communities. The folate intake of more than 20% of the children was more than 50% below the EAR in both communities (Balogun, Lombard, and McLachlan 2015).

3.11. Zambia

In Mkushi, a rural district of Zambia, a cross-sectional study which estimated the likelihood of intake adequacy of fourteen nutrients including folate among 4–8-year-old children, ascertained that the prevalence of adequate intakes of folate was 43% (Caswell *et al.* 2018). This study suggested that the heavily plant-based diet of rural Zambian children provided inadequate folate to meet recommended nutrient intakes for children (Caswell *et al.* 2018).

Direct comparison of available data is impossible due to methodologic differences in the estimation of folate deficiencies. But, among the eleven countries, all were concerned by strong folate deficiencies with the exception of Democratic Republic of the Congo only.

4. Current available strategies for the prevention of folate deficiencies

Three strategies exist to prevent folate deficiencies, the use of folic acid supplements, the consumption of foods fortified with folic acid, and dietary diversification to promote the consumption of folate-rich foods (Bhutta, Salam, and Das 2013). However, the effectiveness of each strategy differs depending on the context.

4.1. Use of folic acid supplements

Folic acid is an oxidised synthetic form of folate which is commonly used for nutritional supplementation (Iyer and Tomar 2009). Fulfilling recommendations for folic acid intakes presents a particular challenge in low-income countries where unplanned pregnancies are common and access to folic acid and its cost are serious obstacles (Blencowe *et al.* 2010). Data on the implementation of folic acid supplementation programmes are very scarce in Africa and estimations of the impacts of these programmes are almost non-existent. As can be seen in the table 3, information on periconceptional folic acid supplementation was available for 14 African countries, but with considerable variation in programme targets and in the percentage of pregnant women who follow WHO recommendations. In most African countries, folic acid supplements are reserved for pregnant women and coverage is low, since the maximum of women taking folic acid daily during gestation is 63% in only one country (SPRING/USAID 2016). Elsewhere the percentage ranged from 1.4% to 50%. This means that supplements alone are unlikely to be effective for primary prevention of NTD. Consumption of foods fortified with folic acid is an alternative which is consequently more likely to succeed (Cuskelly, McNulty, and Scott 1999).

Table 3. Periconceptual folic acid supplementation in some African countries

African region	Country	Year of study	% of women who receive folic acid supplements (400 µg/d) during gestation	Beneficiary population of folic acid supplementation in the national system of providing folic acid
West Africa	Benin	2011-2012	29	Pregnant women
	Burkina Faso	2010	50	Women of reproductive age
				Pregnant women
	Guinea	2012	41	Adolescent girls
				Women of reproductive age
	Mali	2012-2013	18	Pregnant women
	Niger	2012	29	Pregnant women
Senegal	2010-2011	63	Women of reproductive age Pregnant women	
Central Africa	Cameroon	2011	54	Adolescent girls Pregnant women
	Congo	2011-2012	43	Pregnant women
	Malawi	2010	32	Pregnant women
East Africa	Rwanda	2010	1.4	Pregnant women
	Tanzania	2010	3.5	Pregnant women
	Uganda	2011	3.9	Adolescent girls
				Women of reproductive age
				Pregnant women
South Africa	Madagascar	2008-2009	7.6	Women of reproductive age Pregnant women
	Zimbabwe	2010-2011	4.9	Pregnant women

Source: National Anemia Profiles. <https://www.spring-nutrition.org/publications/series/national-anemia-profiles> (SPRING/USAID 2016).

4.2. Consumption of foods fortified with folic acid

Fortification or enrichment can be carried out at home (“home fortification”) or during industrial food processing. Multiple micronutrient powders were recently introduced in many African countries as part of a “home fortification” programme to fight against multinutrient deficiencies in children, including folate (De-Regil *et al.* 2011). This single-dose packet containing multiple vitamins and minerals includes 150 µg of folate (equivalent to 88 µg of folic acid) in powder form, which can be sprinkled on any semi-solid food destined for children (De-Regil *et al.* 2011).

Different types of programmes for fortification by manufacturers are in place in many African countries including voluntary and mandatory fortification (Eichholzer, Tönz, and Zimmermann 2006). Voluntary fortification is when a food company voluntarily adds nutrients to a food that is not mandated by the governments to be fortified (Allen *et al.* 2006). Mandatory fortification is when governments issue laws or regulations that require the fortification of certain foods (Allen *et al.* 2006). Due, in part, to the efforts of Food Fortification Initiative, in 2017 (FFI 2017), wheat flour is fortified with folic acid in 17 African countries, and both wheat and maize flours are fortified in 9 African countries. This shows that mandatory fortification is adopted at least in 17 countries among the 54 countries of the African continent and that wheat flour is the main food vehicle used for this programme. However, wheat is not the most commonly consumed cereal in Africa, where other cereals such as millet, sorghum, maize, represent the staple foods in many countries (Guyot 2012; Galati *et al.* 2014). In addition, wheat flour is imported into most parts of Africa and is consequently not always accessible to the general population (FFI 2017). The poorest may also consume their own production, thus avoiding beneficial effects of fortification (MacIntyre *et al.* 2002).

4.3. Dietary sources of folate

A varied and diverse diet is the “gold standard” for fighting against folate deficiencies around the world. Monotonous diets consisting of a limited number of staple foods often lead to deficiencies in one or more micronutrients including folate (Miller and Welch 2013). However, to conclude that such and such a component of the human diet can be considered as a good source of folate, not only its folate content but also the frequency of consumption needs to be taken into account (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Foods rich in folate include liver (136-963 µg/100 g fresh matter), green leafy vegetables (88-187 µg/100 g fresh matter),

legumes and pulses (140-540 µg/100 g fresh matter), nuts (39-169 µg/100 g fresh matter) (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). But despite their rather low folate content (26-170 µg/100 g fresh matter for wholegrain products), other food types including cereals are consumed in considerable quantities worldwide and thus can be considered as possible sources of folate (Saubade, Hemery, *et al.* 2017).

In several African countries, the variety of foods available may be limited due to agroecological conditions and seasonal effects (Arsenault *et al.* 2014). Food habits can also be a great barrier to diversifying the diet (Semba 2012).

5. Other promising ways to increase folate in African foods

Data in the literature showed that some traditional food processing techniques including fermentation, germination and cereal fractionation could increase the folate content of foods (Table 4) (Jägerstad *et al.* 2005). Although most, including fermentation and germination, are already used in the domestic processing of food in Africa (Blandino *et al.* 2003), they are rarely used as a way to increase folate content. It has been shown that fermentation can effectively increase the folate content of different fermented foods compared with the raw material since fermented foods can contain up to 7-fold more folate than their non-fermented counterparts (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Since some microorganisms may also consume folate during fermentation, selection of the best agents of fermentation used alone or in combination, and optimisation of the duration and temperature of incubation are important criteria (Saubade, Hemery, *et al.* 2017). Germination can result in 1-3.5-fold more folate than native grains when carried out under controlled duration and temperature conditions (Jägerstad *et al.* 2005). It has been also established that using a combination of germination and fermentation can have synergistic effects. In addition, the presence of naturally occurring yeasts of germinated grains may allow further folate synthesis during fermentation (Katina *et al.* 2007).

Simple milling and fractionation of the cereal can yield several folate-rich fractions (Liukkonen *et al.* 2003). The use of whole grain or the reincorporation of part of the outer layers which are rich in folate in the food product is another feasible way of natural fortification of human foods (Jägerstad *et al.* 2005).

Other processes may also decrease folate content of raw material, and the overall effect of food processing is rarely taken into account in food composition databases. For example, in

Ethiopia, folate are not present at all, and many traditional staple foods are endemic to this country, thus making it impossible to estimate their folate content from other sources. In Burkina Faso, the effect of fermentation has never been estimated as several staple foods undergo a fermentation step (Guyot 2012).

Table 4: Other promising ways to increase folate in foods

Processing techniques	Agents/mechanisms	Conditions for success	Applications	Folate increases	References
Fermentation	Lactic acid bacteria and/or yeasts	Selection of strains Combination of strains Control of duration and temperature	Cereals and Vegetables products, Fruits	-0.83 to + 2.67-fold ^a (LAB) +2 to > +7-fold ^a (yeasts) -1 to > +2-fold ^a (LAB and yeasts)	(Jägerstad <i>et al.</i> 2005; Katina <i>et al.</i> 2007; Moslehi-Jenabian, Lindegaard, and Jespersen 2010; Saubade, Hemery, <i>et al.</i> 2017)
Germination	<i>de novo</i> synthesis of folate by cotyledons	Control of duration and temperature	Cereal and vegetable products	1 to 3.5-fold ^b	(Jägerstad <i>et al.</i> 2005; Katina <i>et al.</i> 2007; Hefni and Witthöft 2012; Singh <i>et al.</i> 2015)
Combined germination and fermentation	Synergistic effects on folate content	Same conditions of germination and fermentation	Cereal and vegetable products	up to 2-fold ^c	(Katina <i>et al.</i> 2007)
Milling fractionation	Reincorporation of outer layers, use of whole grains	Correct separation of milling fractions	Cereal products	10-fold ^d	(Jägerstad <i>et al.</i> 2005)

^a As compared to the unfermented foods

^b As compared to ungerminated cereals

^c Fermentatin applied to the germinated wholegrain cereals

^d Differences between inner kernel and bran fractions

6. Conclusion and future outlook

The data presented in the present review clearly shows that folate deficiencies are a reality among women and children in Africa and that their prevalence varies widely depending on the region. However, it is still difficult to draw any final conclusions on the extent of folate deficiencies across the Africa due to the limited amount of data available.

In the future, the main issues which need to be overcome to accurately assess the magnitude of folate deficiencies among women and children in Africa and to tackle them are (i) determining the gap between actual dietary folate intake and recommended intakes for women and children in all African countries more precisely, (ii) identifying the shortcomings of strategies currently used in African countries to overcome folate deficiencies, including folic acid supplements and consumption of foods fortified with folic acid, (iii) understanding and evaluating folate losses during the different food processing steps in Africa, (iv) finding new ways to make folate rich foods available to the poorest populations.

We hope that this review will draw the attention of governments in all African countries to the public health challenge represented by folate deficiencies among vulnerable populations.

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. Fabrice Bationo acknowledges a grant from the French Embassy in Burkina Faso and from the Institute of Research for Development.

All authors have made substantial contributions. FB contributed significantly to the work's design, review of literature, interpretation of findings and write-up of the manuscript; LTSO, FHB, CP, HLS and BD contributed significantly to the review of literature, and critically reviewed the article; YMH, KB and CH contributed significantly to the work's design and interpretation of findings, and critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript being submitted

Annexe 2 : *Lactobacillus plantarum* P2R3FA isolated from traditional cereal-based fermented food improves the folate status of deficient rats

***Lactobacillus plantarum* P2R3FA isolated from traditional cereal-based fermented food improves the folate status of deficient rats.**

Aynadis Tamene^a, Kaleab Baye^a, Susanna Kariluoto^b, Minnamari Edelmann^b, Fabrice Bationo^c, Nicolas Leconte^d, Christèle Humblot^d

^a Center for food science and nutrition, Addis Ababa University, P.O. Box 150201, Addis Ababa, Ethiopia. aynadis.tamene@aau.edu.et and kaleabbaye@gmail.com

^b Department of Food and Nutrition, University of Helsinki, P.O. Box 66, FIN-00014, Helsinki, Finland. susanna.kariluoto@helsinki.fi and minnamari.edelmann@helsinki.fi

^c Département Technologie Alimentaire, IRSAT, CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso. fabationo@gmail.com

^d UMR Nutripass, IRD, University of Montpellier / Montpellier SupAgro, Montpellier, France. christele.humblot@ird.fr

*correspondence should be addressed to:

Declaration of interest: None

Abstract

Screening, isolation and identification of LAB from fermented tef dough were conducted to study their folate production capability. Total folate contents of the isolated LAB were determined by microbiological assay using *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469). The bioavailability of folate produced by the selected LAB was evaluated using a rat depletion-repletion bioassay. A total of 162 potential folate producing LAB were isolated, 19 of which were able to grow and produce folate on folic acid casei medium. Total folate content of the isolates ranged from 1 to 43 µg/L. Four high folate producing isolates were selected, and based on 16S rRNA sequencing all of them were members of the family *Lactobacillaceae* showing 98-100 % sequence identity to *L. plantarum*. The folic acid deficient diet supplemented with lyophilized cells of isolated food grade LAB (*L. plantarum*) was able to increase the folate concentration in serum and erythrocytes and restore normal blood folate status of folate-depleted rats.

Key words: Bioavailability, Cereal, Fermentation, Folate, Lactic acid bacteria, Rats

1. Introduction

Folate is currently one of the most actively studied vitamins. This is mainly due to its well established role in preventing neural tube defects (NTDs) in the developing foetus, which is considered as one of the most important nutritional discoveries of the last 50 years (Katan et al. 2009). NTDs are congenital malformations of the brain and spinal cord caused by failure of neural tube closure between 21 and 28 days following conception (Blencowe et al. 2010). Thus, sufficient folate is essential during early pregnancy when the embryo is rapidly growing and the folate requirement for DNA synthesis and methylation reactions is intense. Insufficient or suboptimal intake of folate is also classically associated with megaloblastic anaemia (Laiño et al. 2015).

Folic acid supplementation, food fortification with folic acid and dietary diversification have been suggested to address the problems associated with folate deficiencies (Bhutta et al. 2013). Though it has been recorded that consumption of the synthetic form of folate (folic acid) in supplementation and food fortification could prevent up to 75 % of spina bifida and anencephaly (Bell and Oakley 2009), several studies indicated the health concern over the serious side effect of absorption of high amount of folic acid (Cuskelly, 2007; FAO/WHO, 2005). Dietary diversification and promoting consumption of folate-rich foods could be one of the sustainable options to minimize folic acid deficiency consequences. However, these foods are not always available, depending on the season, and on the geographic, agro-ecological and socio-economic context (Saubade, Hemery, et al. 2017). In these cases, interest to innovate sustainable ways of increasing the folate content in the diet is high.

In many African countries, numerous cereal-based staple foods undergo a fermentation step with numerous microorganisms involved in the processes, including lactic acid bacteria (LAB) (Guyot 2012). Fermentation, in addition to improving the safety, shelf life, sensory characteristics, can improve the nutritional value and even health-promoting properties of fermented foods (Holzapfel, 2002). For example, many studies suggest that fermented foods contain more folate than the original raw material (Ekinci, 2005 and Forssén et al. 2000). As reviewed by Saubade, Hemery, et al. (2017) fermented cereal products could significantly contribute to the daily folate intake in Africa.

Fermentation leads to net production or consumption of folate by the microorganisms involved in the process (LeBlanc et al. 2011). Yeasts are well known for their ability to produce folate, but LAB were found to be folate producers and consumers (Saubade, Hemery,

et al. 2017). Many strains of LAB belonging to different species are able to synthesize folate in culture media or in food (Saubade, Hemery, et al. 2017). Nevertheless, this is a strain dependent trait as it has been shown several times that within a species, different strains can synthesize or consume folate when grown even in the same condition (Saubade, Hemery, et al. 2017).

In Ethiopia, *injera* is a fermented pancake widely consumed by the population as a staple food (Baye et al. 2013). It is often prepared from tef (*Eragrostis tef*), an ancient cereal crop indigenous to Ethiopia (Yetneberk et al. 2004). We have recently shown that fermentation, one of the major processing steps in *injera* making can increase the folate content of tef dough up to 48 % (Tamene et al. 2018), suggesting that some microorganisms are able to synthesize folates. Considering the observed folate content variability of tef dough in traditional processing units, there is a need to conduct study about microorganisms responsible for folate production in tef *injera* fermentation.

Folate bioavailability is defined as “the fraction of the ingested nutrient that is available for utilization in normal physiologic functions and for storage” (Gregory et al. 2005). It is usually accepted that the bioavailability of natural folate is lower than the synthetic folic acid used in supplementation and food fortification (Suitor and Bailey 2000). Nevertheless, the folate produced by engineered LAB strains were able to compensate the folate depletion in the rat diet and showed similar bioavailability compared with the synthetic folic acid (LeBlanc et al. 2010).

Therefore, the aim of this research was to screen, isolate and identify folate producing LAB from the fermentation step of tef *injera* making. The strain producing highest folate content in culture medium was selected to evaluate its ability to restore a normal folate status after depletion in a rat model.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise specified, chemicals used in this work were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland.

2.2. Sampling of tef dough

In this study a total of 60 tef dough samples were collected from ten subcities of Addis Ababa, capital city of Ethiopia. From each sub city, two households were randomly selected and a total of twenty households were included. Detailed observations of *injera* making in these households allowed us to generate a standard flow diagram (Tamene et al. 2018). From each household, tef dough samples were collected on three separate occasions. Immediate microbiological analysis was done on one aliquot of dough sample for enumeration of presumptive LAB and isolation of folate producing LAB. After measuring moisture content and pH, the remaining dough samples were frozen at -20°C for further folate analysis.

2.3. Enumeration of presumptive LAB

Duplicate samples of tef dough (1 g) were homogenized with 9 mL of sterile 0.9 % saline solution by using Stomacher 400 Lab Blender (Seward Medical, UK). The homogenates were serially diluted, and 0.1 mL of subsequent serial ten-fold dilutions were spread plated on De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar (Merck, Schaffhausen, Switzerland) plates in duplicate. The plates were incubated under aerobic conditions at 30°C for 48 h for enumeration of presumptive LAB.

2.4. Isolation of potential folate producing LAB

In order to have high chance of isolating folate-producing strains, the LAB were isolated and collected using a selection pressure on culture media without folate but containing folate synthesis precursors (PABA, guanosine triphosphate) (FACM, Difco, France). Briefly; 1 g of each dough sample was homogenized in 9 mL of sterile 0.9 % saline solution. The homogenates were serially diluted, and 0.1 mL of the dilution (10^{-5} - 10^{-9}) was inoculated in to 5 mL sterile liquid FACM in duplicate and incubated under aerobic conditions at 30°C for 48 h.

After incubation, the media showing visible growth (10^{-5} and 10^{-6}) were used to be streak plated on sterile solid FACM (94 g/L casei and 20 g/L agar) and incubated at 30°C for 72 h. Plates were prepared in duplicate for each dilution. One plate with the media alone was left aside and served as a control to verify the absence of contamination.

Single colonies with divergent morphology were picked and restreaked twice on fresh medium to obtain pure cultures. After morphological examination (cell and colony morphology and Gram staining), the bacterial strains in liquid media were stored at -80°C in 80 % glycerol.

2.5. Analysis of total folate

Bacterial cell suspensions were cultured in 4 mL of FACM (1 % v/v) at 30 °C for 24 h. Total folate contents of the resulting cultures were determined by microbiological assay on microtiter plates using *L. rhamnosus* ATCC 7469 as the growth indicator organism and (6S)-5-formyltetrahydrofolate (5-HCO-H₄folate, calcium salt) (Merck, Schaffhausen, Switzerland) as the calibrant (Kariluoto et al. 2004). The sample preparation procedure included heat extraction followed by tri-enzyme treatment (conjugase, α -amylase and protease). Deconjugation of folate polyglutamates was done by hog kidney conjugase as reported previously (Piironen et al. 2008). Two dilutions were made from each sample extract, and eight levels of calibrant were included into each plate. Plates were incubated for 18 h at 36 °C and turbidity was measured with a microplate reader at 595 nm. Method performance was confirmed by analyzing a blank sample and as well as using certified reference material (CRM 121 Wholemeal flour) in each set of samples.

2.6. Identification of isolated folate producing LAB

Morphological identification was performed for all isolates of potential folate producing LAB and genotypic identification was conducted for high folate producing isolates using sequencing of 16S rRNA coding genes.

DNA extraction. The isolated LAB were routinely cultured overnight at 30 °C in MRS broth. The overnight bacterial culture (2 mL) were centrifuged at 10000 X g for 10 min at 4 °C to pellet the bacteria. The final pellet was then washed one more time in 0.9 % (w/v) NaCl. DNA was extracted from the pellets using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with an additional lysis step using bead beater (tissue lyser II, Qiagen, Les Ulis-Courtaboeuf, France) with zirconium beads (Biospect, Bartlesville, USA) as described previously (Turpin 2011). First, the cells were lysed with 0.1-mm-diameter zirconium beads for 30 s, followed by 1 h of incubation at 37 °C with lysozyme (40 kU; Euromedex, France) and mutanolysin (10 U; Sigma, France). According to the manufacturer's instructions, cell lysis was completed with the Nuclei lysis solution (Promega). RNA was removed with the RNase solution (Promega) and proteins with the Protein Precipitation solution (Promega). DNA was precipitated with isopropanol and washed with 70 % ethanol. DNA pellets were dried for 15 min at 37 °C using a speedvac (Thermo

Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Pellets were then resuspended with 200 μ L of rehydration solution with overnight agitation at 4 °C. DNA concentration, purity and quality were confirmed by measuring absorbance at 230, 260 and 280 nm (NanoVue™, GE Healthcare, Sweden) and then separated on an agarose gel, followed by ethidium bromide staining.

Identification of bacterial isolates. For 16S rRNA gene sequencing, primers W001 (Brosius et al. 1978; Cibik et al. 2000) and 23S1 (GenBank accession no. J01695) were used to amplify the 16S rRNA gene, including the intergenic region located between 16S rRNA and 23S rRNA. PCR products were sequenced by GENEWIZ (Takley-Essex, UK) using the primers SP3, SP4 and SP5 (Cibik et al. 2000; Weisburg et al. 1991). Gene sequences were aligned using the ClustalW program to generate a unique consensus sequences. Each sequence was identified by comparing it with sequences from the Ribosomal Database Project 11 (RDP11) (<http://rdp.cme.msu.edu>) and similarity above 97 % was accepted.

2.7. Bioavailability of folate produced by the selected strain.

The most efficient folate producing strain (*L. plantarum P2R3FA*) obtained from tef dough was lyophilized and added in to folic acid deficient diet (FADD) (Cat. N° 517812, Dyets, Bethlehem, PA, USA) of rats for the evaluation of folate bioavailability produced by the strain. Briefly, the selected LAB strain was grown at 30 °C in MRS agar medium for 24 h. A colony was picked from each pure culture plate, grown successively in MRS broth. Several batches of fermentations were performed to obtain the desired amount of cells with intracellularly accumulated folate. Cells were harvested by centrifugation at 14000 x g/7 min. The pellet was washed in a 0.9 % sterile saline solution. Subsequently, cells were freeze dried in dark to prevent folate loss and were homogenously mixed with the FADD. The folate concentrations of the freeze dried cells were quantified using a microbiological assay method as described in section 2.5.

2.7.1. Rat depletion-repletion assay

Experimental procedures were performed in accordance to the animal care guidelines of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Research Council of National Academics (2011). All procedures were approved by Addis Ababa University Ethical Clearance Review Board. After weaning, a total of 30 male Wistar rats, 3

weeks old with initial weight 316 ± 23 g were obtained from the Ethiopian Public Health Institute and were housed individually in stainless steel covered plastic cages.

Animals remained under controlled environmental conditions (temperature 22 ± 2 °C, humidity 55 ± 2 %) with 12 h light/dark cycles and were allowed free access to food and water throughout the study. Certified FADD (Cat. N° 517812, Dyets, Bethlehem, PA, USA), and FADD with 2 mg of folic acid per kg of diet (Control diet) (Cat. N° 517802, Dyets) were used in this study. Diet composition is listed in Table 1 and the overall experimental protocol is summarized in Figure 1.

The rats were randomly selected for the study, and were fed with FADD (negative control) for 30 days (depletion period). After the depletion period, ten rats were randomly selected and sacrificed for red blood cells and serum folate analysis.

The 20 remaining rats were divided into two experimental groups, each containing ten rats with equal mean weights (depleted-repleted group). The first group of rats was fed with control diet (positive control group) and the other group was fed with FADD supplemented with the lyophilized cells having 250 µg of folates per kg of diet (strain group) for 28 days (repletion phase).

Animal growth (live weight) and food consumption were recorded during the depletion and repletion periods.

Table 1. Diets composition

Ingredient	Folate-free diet^a	Control diet^b	Experimental diet
	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
L-Alanine	3.5	3.5	3.5
L-Arginine (free base)	11.2	11.2	11.2
L-Asparagine, H ₂ O	6.82	6.82	6.82
L-Aspartic acid	3.5	3.5	3.5
L-Cystine	3.5	3.5	3.5
L-Glutamic acid	35	35	35
Glycine	23.3	23.3	23.3
L-Histidine (free base)	3.3	3.3	3.3
L-Isoleucine	8.2	8.2	8.2
L-Leucine	11.1	11.1	11.1
L-Lysine HCl	18	18	18
L-Methionine	8.2	8.2	8.2
L-Phenylalanine	11.6	11.6	11.6
L-Proline	3.5	3.5	3.5
L-Serine	3.5	3.5	3.5
L-Threonine	8.2	8.2	8.2
L-Tryptophan	1.74	1.74	1.74
L-Tyrosine	3.5	3.5	3.5
L-Valine	8.2	8.2	8.2
Dextrin	397	397	397
Sucrose	196.64	196.64	196.64
Cellulose	50	50	50
Corn oil (Stab. With 0.15 % BHT)	100	100	100
Salt mix #210020	50	50	50
Vitamin mix #317759 (Folate free)	10	10	10
Choline chloride	2	2	2
Sodium acetate	8.1	8.1	8.1
Folic acid/Sucrose premix (5 mg/g)	–	0.4	–
Folate/Lyophilized strain (5.7 µg/g)	–	–	43.85

Diets based on clifford/koury. Folate deficient L-Amino acid rodent diet.

^a Cat. No 517812 (Dyets, Bethlehem, USA)

^b Cat. No 517802 (Dyets, Bethlehem, USA)

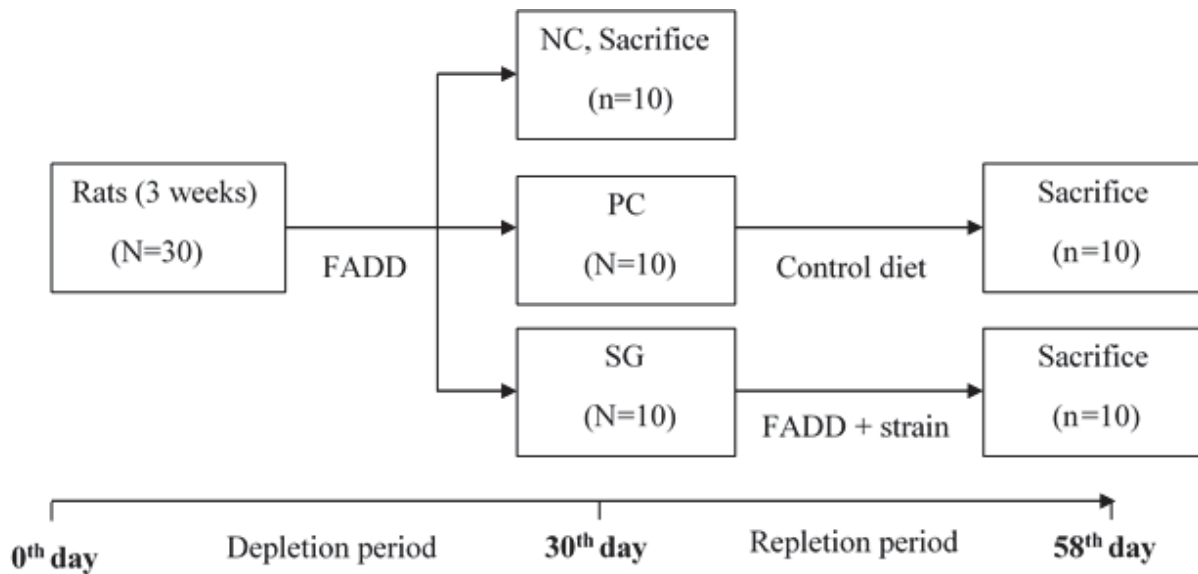


Figure 1. Folate depletion-repletion feeding protocol.

NC: Negative control group, rats fed with FADD; PC: Positive control group, rats fed FADD containing 2 mg folic acid/kg of diet; SG: Strain group, rats fed with FADD supplemented with lyophilized *L. plantarum* P2R3FA strain that produce 250 µg of folate/kg of diet. N = total number of animals per group. n = number of animals used for folate analysis.

2.7.2. Blood samples collection

Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 3.0 mL of ketamine (10 % w/v)–xylazine (2 % w/v; 40:60 v/v, Alfasan, Woerden, The Netherlands) per kilogram of animal weight and bled by cardiac puncture. Blood was transferred into tubes with or without anticoagulant depending on interest of analysis.

For serum samples, blood without anticoagulant was allowed to clot; and serum was separated by centrifugation (1500 x g for 10 min). For preparation of whole-blood samples for erythrocyte folate analysis, an aliquot of blood containing anticoagulant was mixed with 1 mL of 1 % ascorbic acid solution. The solution was then mixed well by inverting the sample tubes 10 times to lyse the red blood cells. Folate analysis was done for all samples using microbiological assay as described earlier in section 2.5 without tri-enzyme treatment.

3. Results

3.1. Enumeration of presumptive LAB from tef fermentation

The total count of presumptive LAB ranged from 3.8×10^6 to 1.5×10^8 with an average of 2.5×10^7 colony forming units per gram (cfu/g) of dough (Figure 2). There was a slight intra- and

inter-household variability on the total number of presumptive LAB but the differences were not significant ($P > 0.05$).

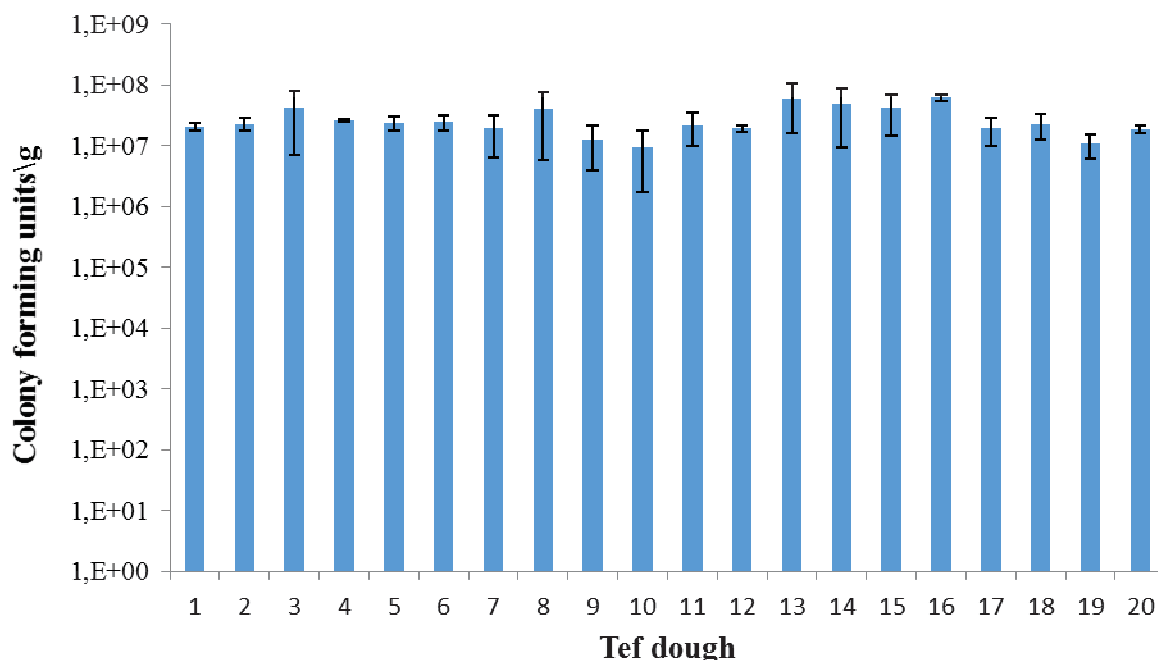


Figure 2. Counts of presumptive LAB at the end of tef fermentation. Bars indicate standard deviation among analytical replicates.

3.2. Isolation and identification of folate producing LAB

A total of 162 potential folate producing LAB strains were isolated from the 60 different tef fermentation. Phenotypic characterization was done for all of the 162 isolates and the result showed all of them to be rod shaped and Gram-positive bacteria. Out of the 162 isolated strains, 19 were able to grow on FACM after 24 h incubation period at 30 °C. After 24 h incubation period, total folate level was assessed using microbiological assay and it ranged from 1 to 43 $\mu\text{g/L}$ with strong individual variability (Figure 3). The four highest folate producing isolates of bacteria, P1R3FB, P2R3FA, P6R3FB and P9R3FB, were selected for identification purpose. The result of 16S rRNA coding gene sequencing revealed that all of the four isolates showed 98-100 % sequence identity to *L. plantarum*.

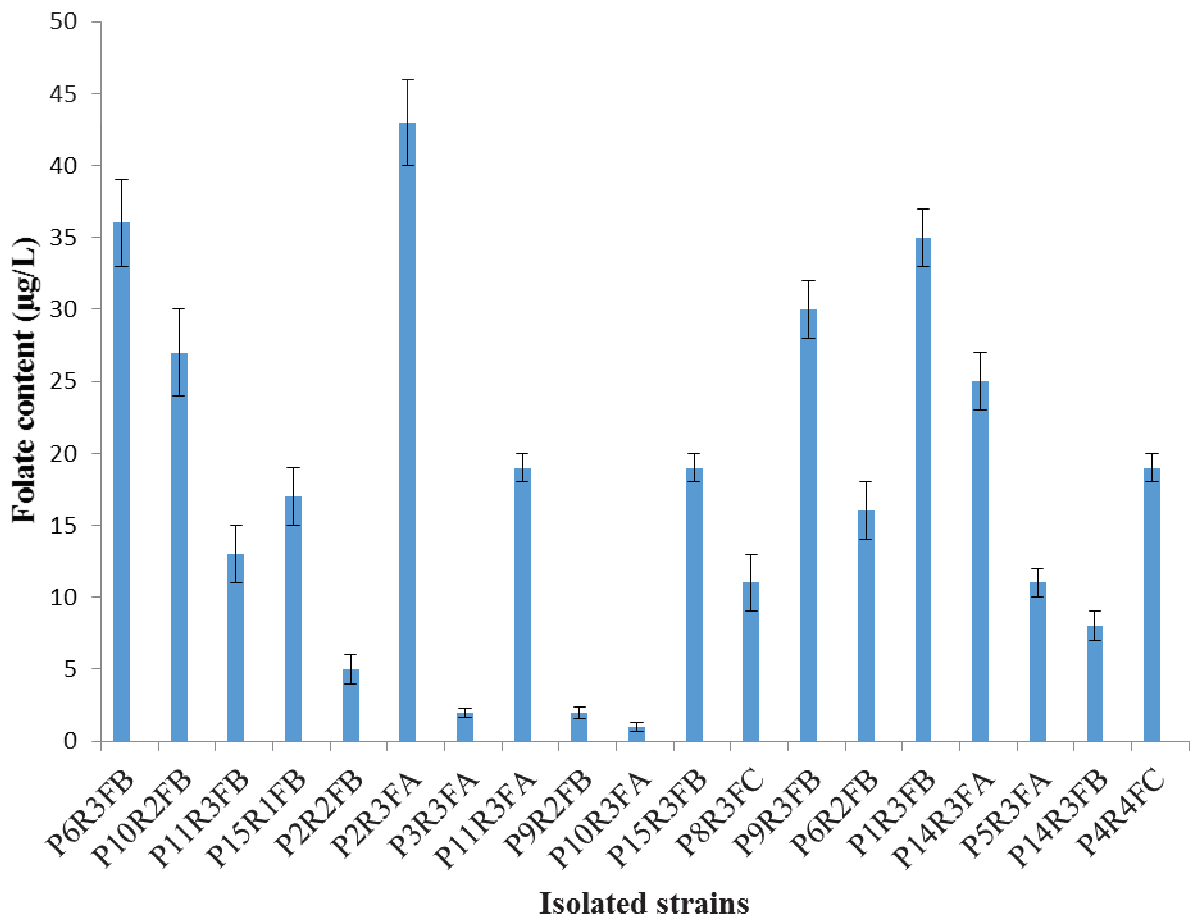


Figure 3. Production of folate by 19 LAB isolated from tef dough when incubated at 30 °C, 24 h in FACM. Bars indicate standard deviation among analytical replicates.

3.3. Rat depletion-repletion assay

The total feed intake in the negative control group (660 ± 79 g) was significantly lower than the positive control group (699 ± 65 g) and strain group (700 ± 86 g) ($P < 0.05$). The weight gained by the negative control group (54 ± 20 g) was also significantly lower than the other two groups and. It is important to consider that the later two groups were 28 days older and took more feed than the negative control group. The calculated total folate intake by the positive control group which consumed 2000 µg of folate per kg of diet (1398 ± 129 µg) was significantly higher than the strain group that consumed 150 µg of folate per kg of diet (175 ± 21 µg, $p < 0.05$) (Table 2).

Table 2. Feed and folate intakes and body weight gain values of rats after depletion-repletion assay

Indices	Depletion		Repletion
	Negative control group	Positive control group	Strain group
Total feed intake (g)	660 ± 79 ^a	699 ± 65 ^b	700 ± 86 ^b
Weight gained (g)	54 ± 20 ^a	66 ± 19 ^b	70 ± 19 ^b
Total folate intake (µg)	0	1398 ± 129 ^b	175 ± 21 ^a

Negative control group: rats fed with FADD during 30 d; Positive control group: rats fed a FADD during 30 d followed by 28 d of feeding with a FADD supplemented with 2 mg of folic acid/kg; Strain group: rats fed a FADD during 30 d followed by 28 d of feeding with FADD supplemented with *L. plantarum* P2R3FA strain that produce 250 µg of folate/kg of diet.

Values are means ± standard deviations. Mean values across the treatment groups with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

The mean folate concentrations in the erythrocytes and serum samples are shown in Figure 4. Mean folate concentrations in erythrocytes and serum of rats of the three groups were significantly different ($p < 0.05$). The depletion period was successful and in which both erythrocytes and serum folates of all depleted rats were found to be below normal level (< 340 and 6.8 nmol/L), respectively.

Both groups of repleted rats (positive control and strain group) returned to normal erythrocytes and serum folate levels. The folate concentration in erythrocytes was significantly higher in positive control group (888 ± 86 nmol/L) than in strain group (534 ± 29 nmol/L). The same was true for serum samples, where a significantly higher folate concentration was observed in positive control group (80 ± 10 nmol/L) than in strain group (18 ± 2 nmol/L).

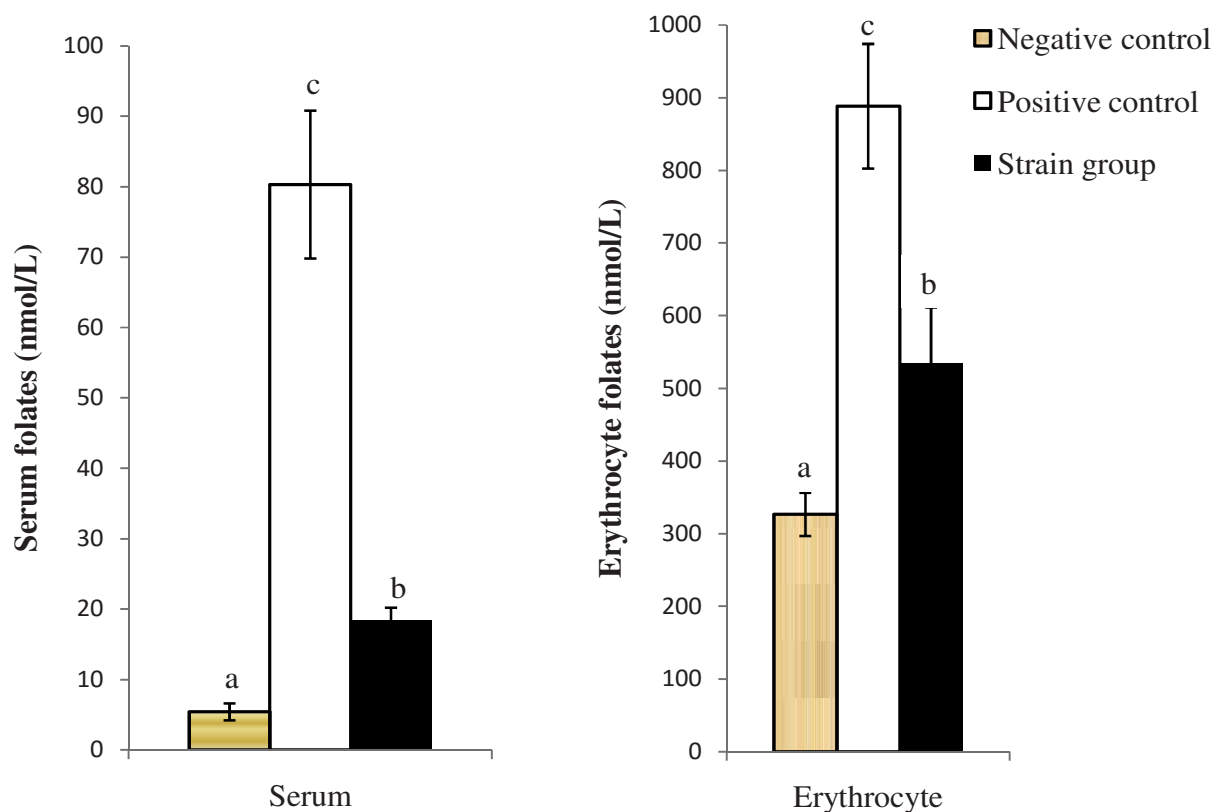


Figure 4. Folate concentrations determined in serum and erythrocytes after folate depletion-repletion periods.

Negative control: rats fed with FADD during 30 d; Positive control: rats fed a FADD during 30 d followed by 28 d of feeding with a FADD supplemented with 2 mg of folic acid/kg; Strain group: rats fed a FADD during 30 d followed by 28 d of feeding with FADD supplemented with *L. plantarum* P2R3FA strain that produce 250 µg of folate/kg of diet.

Values are means ± standard deviations. Mean values with different superscript letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$).

4. Discussion

The few literatures sources on microbial investigation of fermented *tef-injera* dough showed the predominance of LAB in the fermentation process even if low numbers of Enterococci, yeast and mold species were also reported (Nigatu and Gashe 1998; Umeta and Faulks 1989; Fischer et al. 2014). This was the reason why we focused on LAB count in this particular work and we confirmed the presence of high number of presumptive LAB. The total count of presumptive LAB in the 60 dough samples showed small individual variability (3.8×10^6 to 1.5×10^8 cfu/g). The result we got in this work was even somehow higher than the result reported by Fischer et al. (2014) (10^4 - 10^8 cfu/g) for total count of LAB in 7 dough samples (Fischer *et al.*, 2014).

Interest in isolation and identification of LAB to maximize folate production during fermentation of food products has significantly developed since 2000 and most of the studies focused on dairy products. Only a few studies have been conducted on cereal based fermented products (Saubade, Hemery, et al. 2017). Even with the existing data, due to differences in methods and media used in different studies, it is often difficult to compare data on total folate content of LAB. However, the total folate concentration obtained in this study (1-43 µg/L) was in the range of previously reported folate concentration (0-148 µg/L) of LAB isolated from different sources and grown in the same FACM (Saubade, Hemery, et al. 2017).

The highest folate producer of our isolates (*L. plantarum* P2R3FA) was able to grow and produced total folate of 43 µg/L in FACM. As reviewed by Rossi et al. (2011), *L. plantarum* constitutes an exception among lactobacilli, since it is capable of folate production in presence of para-aminobenzoic acid. Previously reported results on the production of folate by LAB in culture media have been reviewed and proved the folate production capability of *L. plantarum* both on folate containing and folate free media (Saubade, Hemery, et al. 2017). One *L. plantarum* isolated from fermented pearl millet and incubated in FACM for 24 h, was able to produce 44 µg/L (Greppi, Hemery, et al. 2017). Some *L. plantarum* strains isolated from fermented milk and pickles were also able to produce up to 108 µg/L folate on FACM (Laiño et al. 2014; Masuda et al. 2012). Compared to previously reported folate concentration produced by some other LAB, the folate produced by our strain was higher than the calculated folate concentration (13-24 µg/L) produced by *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* isolated from yoghurt and incubated at 37 °C in FACM (Laiño et al. 2012). However it was lower than the calculated folate concentration (up to 132 µg/L) produced by *Streptococcus thermophilus*, isolated from the same yoghurt (Laiño et al. 2012). Therefore, if the culture medium and incubation conditions keep consistent, folate production capacity of LAB depend on the specific strains which can be isolated from different sources.

For better understanding of the folate produced by the strain, the bioavailability of folate produced by our high folate producing isolate (*L. plantarum* P2R3FA) was assessed using rat depletion repletion assay. The protocol of rat depleted-repleted bioassay was conducted based on the model described previously (Clifford et al. 1989). Serum and erythrocytes folate deficiencies were observed in the rats that were fed with FADD during depletion period for 30 days. This result has indicated that there was no significant folate production in rat gut by folate-producing micro-organisms that are sometimes present in the indigenous microbiota of rats (Herbert and Bertino 1967). Both of these deficiencies were reversible because the serum

and erythrocytes folates returned to normal folate status in both group of rats (rats that were fed with FADD with 2 mg of folic acid/kg of diet and rats that were fed with FADD supplemented with lyophilized cells of *L. plantarum P2R3FA* having 250 µg of folate/kg of diet) during repletion period of 28 days.

In our study we also observed that, even though the amount of folate consumed by the strain group ($175 \pm 21.5 \mu\text{g}$) was significantly lower than the total folate consumed by the positive control group ($1398 \pm 129.2 \mu\text{g}$), it was able to return the folate status of depleted rats to the normal serum and erythrocyte folate levels. These results confirmed the potential of the isolated food grade strain, *L. plantarum P2R3FA* to restore normal folate level and revert folate deficiencies.

Interest in administration of food grade folate producing bacteria to improve folate status has grown and certain studies indicated that the serum, erythrocytes and liver folate concentration could be increased (Pompei et al. 2007; LeBlanc et al. 2010). For example, our findings are in agreement with what has been reported by LeBlanc et al. (2010) who studied the bioavailability of different folates produced by engineered *Lactococcus lactis* strains using a rodent depletion–repletion bioassay. They observed that the low amount of folate from *L. lactis strains* (250 µg/kg of diet) was able to compensate the folate depletion and showed similar bioavailability in terms of increasing serum and erythrocytes folate concentration in animals receiving folate-producing strains compared with commercial folic acid. It has been also reported by Pompei and his colleagues that administration of food grade folate producing *Bifidobacteria* enhanced folate status in wistar rats (Pompei et al. 2007). They observed that the administration of 2×10^8 live cells of folate producing strains of *Bifidobacteria*, as probiotic strains were able to restore normal serum folate of repleted male wistar rats in a depletion-repletion bioassay but the amount of folate produced by the strains were not measured or considered.

Though these previously reported results of rat folate depleted-repleted assay are in good agreement with our current findings, concern has frequently been expressed regarding the potential for genetically engineered organisms to displace resident species in the receiving organisms, particularly on microbial species performing key functional roles (Tiedje et al. 1989). Therefore, considering the existing serious health and environmental concern on application of genetically modified organisms, the method we followed in this current study was clearly a natural way of administration of endogenous LAB together with the normal diet.

Since cereal based fermented foods are widely consumed in Africa, using such strains as starter culture during fermentation of foods could be considered as a natural way of enhancing folate status. Therefore, we highly recommend the development of small-scale starter production and studies to be conducted on use of this strain as a starter culture for making folate-enriched foods. The bioavailability of the folate in the food matrices should be also evaluated.

Acknowledgement

This work was carried out in the framework of the FoIEA project (www.folea.eu), which is part of the ERA- Net « Developing African-European joint collaboration for Science and Technology » (ERAfrica), financial support provided by the European Commission under the 7th Framework Program (ERAfrica ERAFRICA IC-027, FP-226154). Additional financial support was obtained from the graduate program of Addis Ababa University. The authors would like to thank the families in Addis Ababa who gave us the possibility to collect samples from their private tef-fermentations. The authors also thank Ethiopian Public Health Institute for allowing us access to the National Food Science and Nutrition Laboratory for some of laboratory works and to their help in the care of animals (rats).

**Annexe 3 : Fiche de collecte des données sur le procédé traditionnel de
préparation du *ben-saalga***

FICHE DE COLLECTE DES DONNEES SUR LE PROCEDE TRADITIONNEL DE PREPARATION
DU BENSALGA
BURKINA FASO-2015

Numéro Fiche
 <hr/>

SECTION A : Identification de l'atelier de production		
N°	Pays/ ville	village/ville/secteur
001 Code :
002	Nom de la productrice Date de collecte : jj/mm/aaaa	Code :
SECTION B : Céréales transformées		
003	A. Mil B. Autres Si autre préciser :	Code :
SECTION C : Ingrédients		
004	Ingrédient 1 :	
	Ingrédients 2 :	
	Ingrédients 3 :	
	Ingrédients 4 :	
	Autres ingrédients : /_oui /_non	
	Préciser :	

N°	Etapes	Cocher les étapes réalisées dans les atelier	Ech	Codes	Pesée	Echantil lonage	Durée	Masse Ech	pH	T°
1	Mil initial		Mil		x	x				
2	Trempage-Egouttage		Eau avant trempage		x					
			Au de trempage		x		x			
3	Mil trempé		Mil trempé		x	x				
4	Lavage-Epiérrage-Egouttage		Eau avant lavage.		x					
			Eau de lavage		x	x				
			Cailloux/ autres débris etc							
5	Mil Lavé		Mil lavé		x	x				
6	Mouture humide		Eau de mouture		x					
			Pertes de farines/		x					
7	Farine /pâte de farine		Farine		x	x				
8	Filtration		Eau de Filtration		x	x			x	x
			Résidue		x	x			x	x
9	Filtat		Filtrat							

005		SECTION D : Décrire le processus traditionnel de préparation du BENSALGA								
N°	Étapes	Cocher les étapes réalisées dans les atelier	Ech	Codes	Pesée	Echantil lonage	Durée	Masse Ech	pH	T°
10	Fermentation		Pâte fermentée		x	x	x		x	x
			Surnageant							
11	Cuisson		Surnageant				x		x	x
			Eau ajoutée							
12	Ben-saalga		Bouillie							

006		SECTION C : Observations Commentaires
Mil initial		
Trempage -Egouttage		
Mil trempé		
Lavage-Egouttage		
Mil lavé		
Mouture Humide		

Farine humide	
Filtration-Décantation	
Filtrat	
Résidu	
Fermentation	
Pâte fermentée	
Cuisson	
Ben-saalga	

Merci pour m'avoir pris beaucoup de votre temps pour réaliser ce travail

**Annexe 4 : Fiche de collecte des données sur le procédé traditionnel de
préparation de 6 autres aliments céréaliers fermentés**

**FICHE DE COLLECTE DES DONNEES SUR LE PROCEDE TRADITIONNELLE DE
PREPARATION DES ALIMENTS CEREALIERS FERMENTS**

BURKINA FASO-2015

Numéro Fiche
<hr/>

SECTION A : Identification de l'atelier de production		
N°	Pays/ ville	village/ville/secteur
001 Code :
002	Nom de la productrice Date de collecte : jj/mm/aaaa	Code :
SECTION B : Céréales transformées		
003	A. Mil B. Autres Si autre préciser :	Code :
SECTION C : Ingrédients		
004	Ingrédient 1 :	
	Ingrédients 2 :	
	Ingrédients 3 :	
	Ingrédients 4 :	
	Autres ingrédients : / oui / non	
	Préciser :	

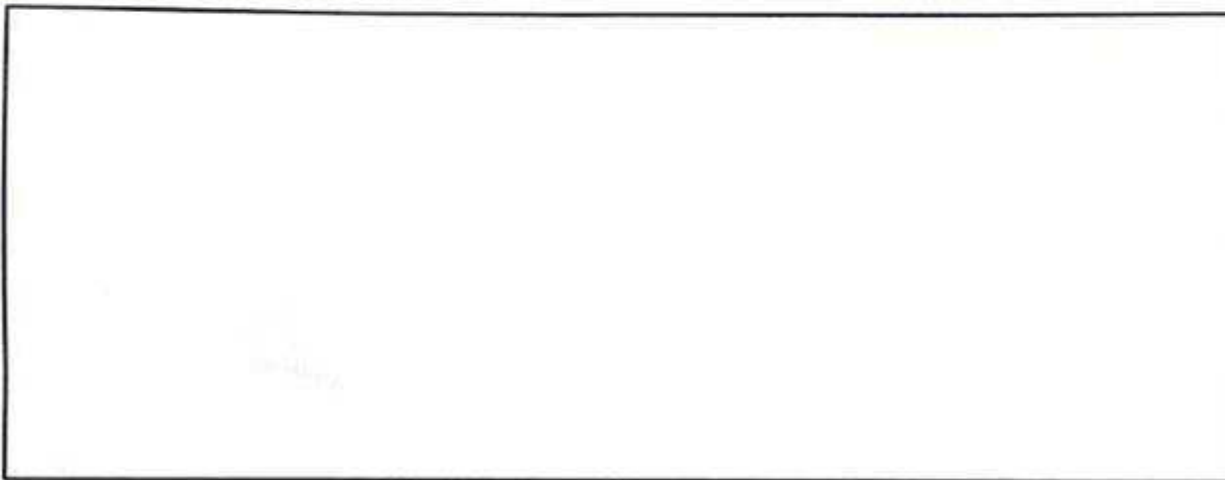
N°	Etapas	Durée	pH	T°
1				
2				
3				
4				
5				
6				

7			x	x
8				
9				
10				
11				

Prélèvements

- faire des prélèvements de la matière première de départ,
- faire des prélèvements de l'aliment fermenté

006. Description de l'Aliment/Utilisations possibles



007. Autres Observations/Commentaires



Annexe 5 : Etude du potentiel de contribution des aliments céréaliers fermentés à la couverture des besoins en folates (vitamine B9) au Burkina Faso : impact des procédés sur les teneurs en folates

F. Bationo¹, C. Humblot², LT. Songré-Ouattara¹, F. Ba-Hama¹, C. Parkouda¹, M. Chapron², M. Le Merrer², H. Lingani-Sawadogo¹, B. Diawara¹, Y. Hemery²

¹Département Technologie Alimentaire (DTA/ IRSAT/ CNRST), 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso

² Laboratoire NUTRIPASS, UMR-204, Equipe Nutrition & Aliments, IRD, UM, SupAgro, Montpellier

Résumé :

Les folates (vitamine B9) sont essentielles à la bonne santé de l'Homme. Le régime alimentaire au Burkina Faso est essentiellement basé sur les céréales, dont la transformation peut diminuer ou augmenter les teneurs en folates. Cette étude visait à i) évaluer le potentiel de contribution des aliments céréaliers fermentés (ACF) à la couverture des besoins en folates, et ii) évaluer l'effet des procédés de préparation sur les teneurs en folates des ACF. Les teneurs en folates de sept ACF du Burkina Faso ont été analysées par une méthode microbiologique (indicateur utilisé : *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469), sur les matières premières et les produits finis. Deux aliments (le *to kafa* et *akassa*) présentaient des teneurs en folates supérieures à celles des matières premières, tandis que pour les cinq autres ACF, les teneurs en folates avaient été réduites par les transformations. Du fait de la grande consommation d'un des aliments, le *ben-saalga* (bouillie de mil fermenté utilisée comme aliment de complément à l'allaitement maternel des jeunes enfants), un bilan-matière a été réalisé au cours de toutes les étapes de production. Les étapes de trempage, broyage, et filtration conduisent à des pertes en folates, tandis que la fermentation permettrait une production de folates.

Mots clés: Folates, Aliments céréaliers fermentés, Fermentation, Procédés, Couverture, Burkina Faso



CERTIFICAT DE PARTICIPATION

Le Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique

Atteste que


Les auteurs : F. Bationo, LT. Songré-Ouattara, Y. Hemery, F. Ba-Hama, C. Parkouda, M. Chapron,
M. Le Merrer, H. Lingani-Sawadogo, B. Diawara, C. Humblot

ont présenté une Communication orale intitulée


« Etude du potentiel de contribution des aliments céréaliers fermentés à la couverture des besoins en folates (vitamine B9) au Burkina Faso : impact des procédés de transformation sur les teneurs en folates »

Au Symposium International sur la Science et la Technologie (SIST 2017)
tenu à Ouagadougou (Burkina Faso) du 04 au 08 Décembre 2017
organisé en collaboration avec WASCAL et le CORAF/WE CARD

Le Président du Comité scientifique


Dr Michel P. SEDOGO
Directeur de recherche
Officier de l'Ordre National

Le Président du Comité d'organisation


Dr Roger H. Ch. NEBIE
Directeur de recherche
Chevalier de l'Ordre National

Annexe 6 : Mise au point d'une méthode d'évaluation de la bioaccessibilité des folates (vitamine B9): Application à des aliments céréaliers fermentés

Mise au point d'une méthode d'évaluation de la bioaccessibilité des folates (vit B9): Application à des aliments céréaliers fermentés

F. Bationo^{1*}, C. Humbiot², L.T. Songré-Ouattara¹, F. Ba-Hama¹, C. Parkouda¹, S. Kariluoto³, M. Charpron², M. Le Merrer², H. Lingani-Sawadogo¹, B. Diawara¹, Y. Hemery³

¹Département Technologie Alimentaire (DTA) IRSAT/ CNRST, 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²Laboratoire NUTRIPASS, UMR-204, Equipe Nutrition & Aliments, IRD, UM, SupAgro, Montpellier

³Université d'Helsinki, Département des sciences alimentaires et environnementales, POBOK27/Latokartanonkaari 11, FI-00014

*Contact: fbationo@gmail.com

Introduction

Les folates (vit. B9), sont indispensables à la prévention des anémies mégaloblastiques, des maladies cardiovasculaires et des malformations du tube neural pendant la grossesse. Cependant ces derniers ne sont pas synthétisés par l'organisme mais sont apportés par l'alimentation. L'estimation de la couverture des besoins en folates doit s'appuyer sur les données de teneurs en folates biodisponibles. La bioaccessibilité des folates correspond à la fraction de folates libérée de la matrice alimentaire au cours de la digestion, disponible pour absorption par la barrière intestinale. Cette fraction représente presque la fraction biodisponible *in vitro*.

Objectifs

L'objectif était de mettre au point un protocole expérimental d'étude de bioaccessibilité à partir d'un modèle de digestion *in vitro* et d'une méthode de dosage microbiologique des folates totaux et bioaccessibles

Méthodes

- Collecte des échantillons:**
Burkina Faso: 7 Aliments Céréalières fermentés (ACF), dont 2 bouillies de mil (*ben-saalga*, *ben-kida*), 4 pâtes fermentées cuites de maïs (*akassa*, *dancounou*), de mil (*fura*, *massa*), de sorgho (*kafa*)
Finlande: 4 types de pains de seigle au levain (*Koulinäkki*, *Tosi*, *Ruisreikäleipa*, *Real ruis*)
- Analyses:** Laboratoire NUTRIPASS, UMR 204, IRD (Montpellier)
- Tests préliminaires:**
Choix des sels biliaires (détermination des teneurs en folates),
Enzymes (détermination de l'activité enzymatique)
Préparation des fluides digestifs simulés: FSS, FGS, FIS

Conditions expérimentales

Bioaccessibilité des folates: Digestion *in vitro* (comportant trois phases: orale, gastrique, et intestinale), adaptation du protocole de Minekus *et al.* 2014

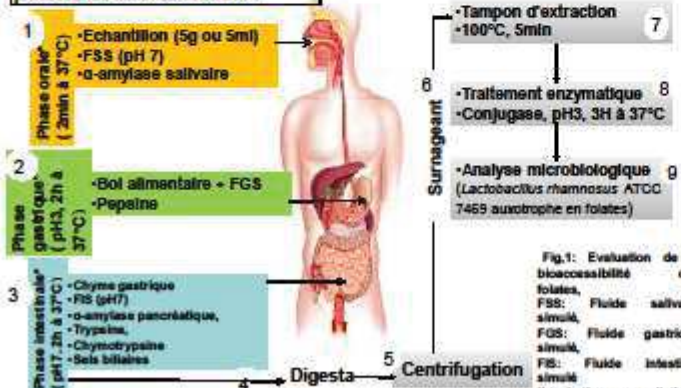


Fig.1: Evaluation de la bioaccessibilité des folates, FSS: Fluide salivaire simulé, FGS: Fluide gastrique simulé, FIS: Fluide intestinal simulé
*Incubation sous agitation

- Analyses statistiques:** Les échantillons ont été analysés en triplicata. Une ANOVA et un T-test ont été réalisés en utilisant SPSS 20.0. Le seuil de signification était $p < 0,05$

Résultats

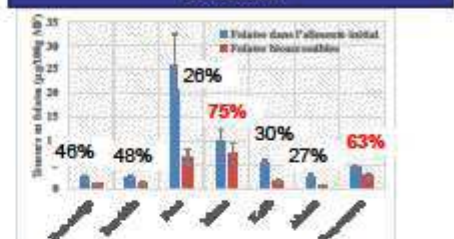


Fig.2: Folates bioaccessibles de 7 ACF du Burkina Faso. Les pourcentages (%) correspondent aux teneurs en folate bioaccessibles sur les teneurs en folates dans les aliments avant digestion. La bioaccessibilité était très variable selon la forme de consommation des ACF. Les pâtes fermentées cuites friables (*Fura*), moins consistantes et à base de céréales décortiquées (*akassa*, *kafa*) avaient une bioaccessibilité faible d'environ 30%. La bioaccessibilité des folates des bouillies était moyenne (environ 50%) tandis que celle des pâtes plus consistantes (*dancounou*, *massa*) était importante, 60-70%.

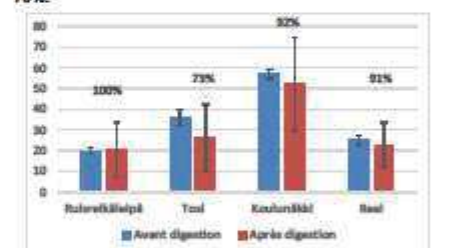


Fig.3: La bioaccessibilité des folates des ACF (pains de seigle au levain) de la Finlande était importante, variable de 73% à 100% et supérieure à celle des ACF du Burkina Faso.

Conclusion

Cette variabilité de la bioaccessibilité des folates suggère un effet protecteur différent des matrices alimentaires contre l'acidité gastrique au cours de la digestion, les folates étant instables en milieu acide. Cet effet matrice est lié aux textures différentes des aliments (beignets, bouillies, pâtes, pain). Ce protocole expérimental est maintenant validé et pourra être utilisé pour des études ultérieures.

Références

M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu *et al.* (2014). A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus, *Food Funct.* DOI: 10.1039/c3fo60702j

S. Kariluoto, and V. Pilonen (2009). Total health grain methods: Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals. Ed. P. Shewry and J. Ward. St Paul, Minnesota, USA: AACCI International, p59-68.





CERTIFICAT DE PARTICIPATION

Le Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique

Atteste que

Les auteurs : F. Bationo, C. Humblot, LT. Songré-Ouattara, F. Ba-Hama, C. Parkouda, S. Kariluoto,
M. Chapron, M. Le Merrer, H. Lingani-Sawadogo, B. Diawara, Y. Hemery

ont présenté un Poster intitulé

« Mise au point d'une méthode d'évaluation de la bio-accessibilité des folates (vitamine B9) :
Application à des aliments céréaliers fermentés »

Au Symposium International sur la Science et la Technologie (SIST 2017)
tenu à Ouagadougou (Burkina Faso) du 04 au 08 Décembre 2017
organisé en collaboration avec WASCAL et le CORAF/WECARD

Le Président du Comité scientifique

Dr Michel P. SEDOGO

Directeur de recherche
Officier de l'Ordre national

Le Président du Comité d'organisation

Dr Roger H. Ch. NEBIE

Directeur de recherche
Chevalier de l'Ordre national

Annexe 7 : Fortification *in situ* de la bouillie de mil fermenté de type *ben-saalga* en vitamine B9 (folates) par des bactéries lactiques



Fortification *in situ* de la bouillie de mil fermenté de type *ben-saalga* en vitamine B9 (folates) par des bactéries lactiques



F. Babiono^{1*}, L.T. Songré-Ouattara¹, Y. Hemery², F. Ba-Hama¹, C. Parikouda¹, M. Charpron², M. Le Merrer², H. Lingani-Sawadogo¹, B. Diawara¹, C. Humblof²

¹Département Technologie Alimentaire (DTA/ IRSAT/ CNRST), 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso
²Laboratoire NUTRIPASS, UMR-204, Equipe Nutrition & Aliments, IRD, UM, SupAgro, Montpellier
 *Contact: fabatono@gmail.com

Introduction

Les folates (vit. B9) sont indispensables au développement et à la croissance du fœtus et du jeune enfant. Une déficience peut entraîner des conséquences graves sur la santé comme des anémies mégaloblastiques ou des malformations du tube neural pendant la grossesse. L'homme est cependant incapable de synthétiser de novo ces vitamines qui doivent lui être apportées par son alimentation. Les teneurs en folates du *ben-saalga* (0,5µg/100g de matière fraîche), une bouillie traditionnelle de mil fermenté du Burkina Faso, sont très en deçà des besoins métaboliques des enfants qui l'utilisent au quotidien comme aliment de complément.

Objectifs

L'objectif était d'évaluer la capacité de souches de bactéries lactiques (BL), productrices de folates en milieu de culture, à produire des folates lors de la fermentation du *ben-saalga*. L'utilisation combinée de BL amylolytiques visait à produire une bouillie de meilleure densité énergétique.

Méthodes

- Cultures starter productrices de folates (origines, sources)
Lb. plantarum 6.2 (*ben-saalga* du Burkina Faso, Turpin et al. 2011)
Lb. fermentum 8.2 (*ben-saalga* du Burkina Faso, Turpin et al. 2011)
- Cultures starter amylolytiques (origines, sources)
Lb. plantarum A.6 (Manioc roui du Congo, Giraud et al. 1991)
Lb. fermentum MW2 (Ogi du Bénin, Agali et al. 1998)
- Lieux de études:
 Production du *ben-saalga* et tests d'inoculation: DTA/IRSAT/CNRST
 Analyses des folates: Laboratoire NUTRIPASS, UMR 204, IRD (Montpellier)
- Dosages des folates: Méthode microbiologique de référence (Kariluoto et Pilonen, 2009)
- Diagramme de production du *ben-saalga* biofortifié en folates

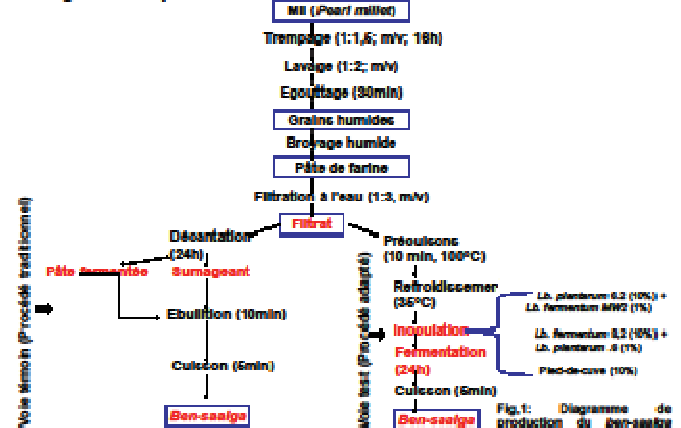


Fig.1: Diagramme de production du *ben-saalga* biofortifié en vit. B9

- Echantillonnage à différents stades de la fermentation: T0 (immédiatement après inoculation), T24 (après fermentation), T7 (*ben-saalga*)
- Fermentation: 24h à 37°C
- Analyses: Dénombrement microbien, mesures de pH, dosages des folates totaux
- Analyses statistiques: Les échantillons ont été analysés en triplicata. Une ANOVA et un T-test ont été réalisés en utilisant SPSS 20.0. Le seuil de signification était p<0,05

Résultats

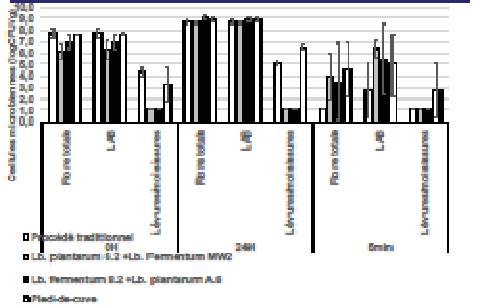
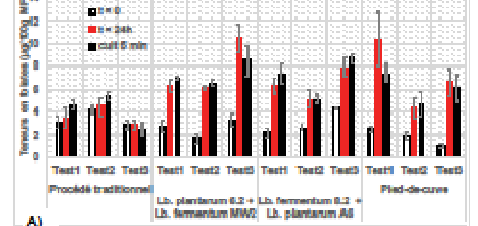
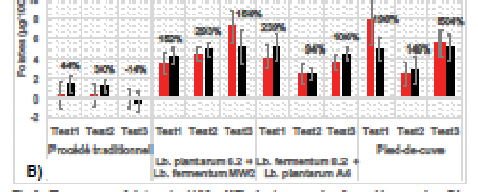


Fig2: Dénombrement microbien u cours de la fermentation



A) Production en folates après 24h de fermentation



B) Gain final en folates dans le ben-saalga sortit (%)

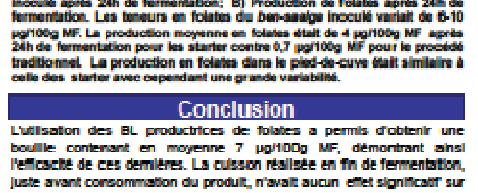


Fig.3: Teneurs en folates (µg/100g MF) de *ben-saalga* inoculé avec les BL productrices de folates. A) Evolution des teneurs en folates du *ben-saalga* inoculé après 24h de fermentation. B) Production de folates après 24h de fermentation. Les teneurs en folates du *ben-saalga* inoculé variait de 6-10 µg/100g MF. La production moyenne en folates était de 4 µg/100g MF après 24h de fermentation pour les starter contre 0,7 µg/100g MF pour le procédé traditionnel. La production en folates dans le pied-de-cuve était similaire à celle des starter avec cependant une grande variabilité.

Conclusion

L'utilisation des BL productrices de folates a permis d'obtenir une bouillie contenant en moyenne 7 µg/100g MF, démontrant ainsi l'efficacité de ces dernières. La cuisson réalisée en fin de fermentation, juste avant consommation du produit, n'avait aucun effet significatif sur les teneurs en vitamine B9. Ces résultats permettent d'envisager des applications pratiques qui permettront de contribuer à l'augmentation des ingérés en folates naturels par les jeunes enfants.

Références

Agali V, Gayet JP, Morlon-Guyot J, Tseloniou P & Hounhouigan DJ (1998). Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize dough (masa) and ogi from Benin. *J Appl Microbiol* 85: 593-599

Olsson E, Eriksson A, Valiela S, Laksoy B & Rönkä-Suutari M (1991). Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 20

Kariluoto S and Pilonen P (2009). Total yeast count methods: Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals. In: P. Shetty and J. Varal, St Paul, Minnesota, USA: AACCI International, p26-30

Rayin M, Havelle C, and Gayet JP (2011). Genetic Screening of Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in a fermented wheat flake: study tool in the development of fermented dietary foods. *Appl Environ Microbiol* 77: 872-878





CERTIFICAT DE PARTICIPATION

Le Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique

Atteste que

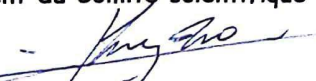
**Les auteurs : F. Bationo, C. Humblot, LT. Songré-Ouattara, F. Ba-Hama, C. Parkouda, S. Kariluoto,
M. Chapron, M. Le Merrer, H. Lingani-Sawadogo, B. Diawara, Y. Hemery**

ont présenté un Poster intitulé


«Fortification d'une bouillie traditionnelle de mil fermenté en folates (ut B9)»

**Au Symposium International sur la Science et la Technologie (SIST 2017)
tenu à Ouagadougou (Burkina Faso) du 04 au 08 Décembre 2017
organisé en collaboration avec WASCAL et le CORAF/WECARD**

Le Président du Comité scientifique


Dr Michel P. SÉDOGO
Directeur de recherche
Officier de l'Ordre national

Le Président du Comité d'organisation


Dr Roger H. Ch. NEBIE
Directeur de recherche
Chevalier de l'Ordre national

Liste des tableaux

Tableau 1 : Méthodes de digestion <i>in vitro</i> (Etcheverry, Grusak, and Fleige 2012).....	31
Tableau 2 : Influence des procédés de transformation sur les folates dans les aliments céréaliers.....	35
Tableau 3. Prévalence des carences en folates chez les femmes et chez les enfants en Afrique	40
Tableau 4. Supplémentation périconceptionnelle en acide folique dans les pays Africains....	44
Tableau 5: Procédés de fabrication permettant d'améliorer les teneurs en folates dans les aliments	47
Tableau 6. Production de folates par les BL dans différentes matrices alimentaires fermentées	49
Tableau 7. Production de folates par les levures dans différentes matrices alimentaires fermentées	52
Tableau 8. Production de cultures céréalières en Afrique.....	55
Tableau 9. Origines, noms scientifiques et communs des principaux types de mils	58
Tableau 10. Produits fermentés traditionnels à base de céréales et leur microbiote.....	62
Tableau 11. Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments dans les grains de céréales les plus consommés en Afrique	66
Tableau 12. Teneur en énergie et en différents macronutriments et micronutriments du <i>bensaalga</i>	68
Tableau 13. Réponses induites par les dérivés du folate par rapport à l'acide folique.....	75
Tableau 14. Composition du diluant	78
Tableau 15. Composition du bouillon MRS.....	79
Tableau 16. Composition du folic acid casei medium	80
Tableau 17. Composition du milieu PCA	81
Tableau 18. Composition du milieu Sabouraud	81

Tableau 19. Composition du MRS gélosé.....	82
Tableau 20. Diffrents microorganismes utilisés.....	83
Tableau 21. Composition des fluides digestifs simulés	88
Tableau 22. Dry matter content and total folate content in raw materials and fermented foods	114
Tableau 23. Folate loss or gain during the processing of cereal grains into fermented foods	117
Tableau 24. Bioaccessible folate and folate bioaccessibility in fermented food products.....	121
Tableau 25. Potential contribution of West-African cereal-based fermented foods to the recommended folate intakes for children aged 6-35 months	123
Tableau 25. (In supplementary material), Potential contribution of West-African cereal-based fermented foods to the recommended folate intakes for children aged 6-35 months	124
Tableau 26. Primers used to quantify the genus or species of bacteria from <i>ben-saalga</i> samples using real-time PCR.	143
Tableau 27. Dry matter content of samples taken during the preparation of the porridges using the different processes at the beginning of the fermentation (0 h), at the end of the fermentation (24 h) and after cooking (for 5 min.).	148
Tableau 28. Folate contents of samples taken during the preparation of the porridges according to the different processes at the beginning of the fermentation (0 h), at the end of the fermentation (24 h) and after cooking (for 5 min).	149
Tableau 29. Information of CBFF samples used in this study.	163

Liste des figures

Figure 1 : Structure de a) l'acide folique et b) des autres vitamines de folates	23
Figure 2 : Rôle de la vitamine B9 dans le métabolisme cellulaire	25
Figure 3: Causes des carences en folates	33
Figure 4 : Conséquences des carences en folates	38
Figure 5: Diagramme des procédés traditionnels utilisables pour la fabrication de farine de céréales	55
Figure 6: Centrifugations différentielles d'échantillons complexes pour éliminer la matrice alimentaire et obtenir un culot bactérien	91
Figure 7: Processing of cereal-based fermented foods in traditional processing units.	112
Figure 8. Changes in folate content distribution among the indicated products	119
Figure 9: Processing of pearl-millet into fermented porridges using a process based on the traditional process, or including precooking of the paste followed by inoculation with three different starters: back slopping using dough taken from the traditional fermentation process, a combination of <i>L. fermentum</i> 8.2 and <i>L. plantarum</i> A6, and a combination of <i>L. plantarum</i> 6.2 and <i>L. fermentum</i> MW2.	140
Figure 10. Microbial counts of fermented porridges obtained following a process based on the traditional process, or including precooking of the paste followed by inoculation with three different starters: back slopping using dough taken from the traditional fermentation, a combination of <i>L. fermentum</i> 8.2 and <i>L. plantarum</i> A6 and a combination of <i>L. plantarum</i> 6.2 and <i>L. fermentum</i> MW2. Samples were taken at the beginning of the fermentation (0 h : white bars), at the end of the fermentation (24h : black bars) and after cooking (for 5 min : grey bars).	145
Figure 11. Real-time PCR quantification of <i>L. plantarum</i> (white bars), <i>L. fermentum</i> (black bars), <i>Leuconostoc</i> (striped bars) and <i>Weissella</i> (grey bars) during the preparation of the porridges using the different processes at the beginning of fermentation (0 h), at the end of the fermentation (24 h) and after cooking (for 5 min).	147

Figure 12: Alpha diversity of the microbiomes of cereal-based fermented foods based on Shannon’s diversity index and observed OTUs 166

Figure 13: Alpha rarefaction curve based on Shannon’s diversity index 167

Figure 14: PCoA score plot representation of the microbiota of CBFF based on Jaccard distance (A) and unweighted UniFrac distance (B). 168

Figure 15. Relative abundance of bacterial taxa in the cereal-based fermented foods samples at the genus (A) and species (B) levels. 172