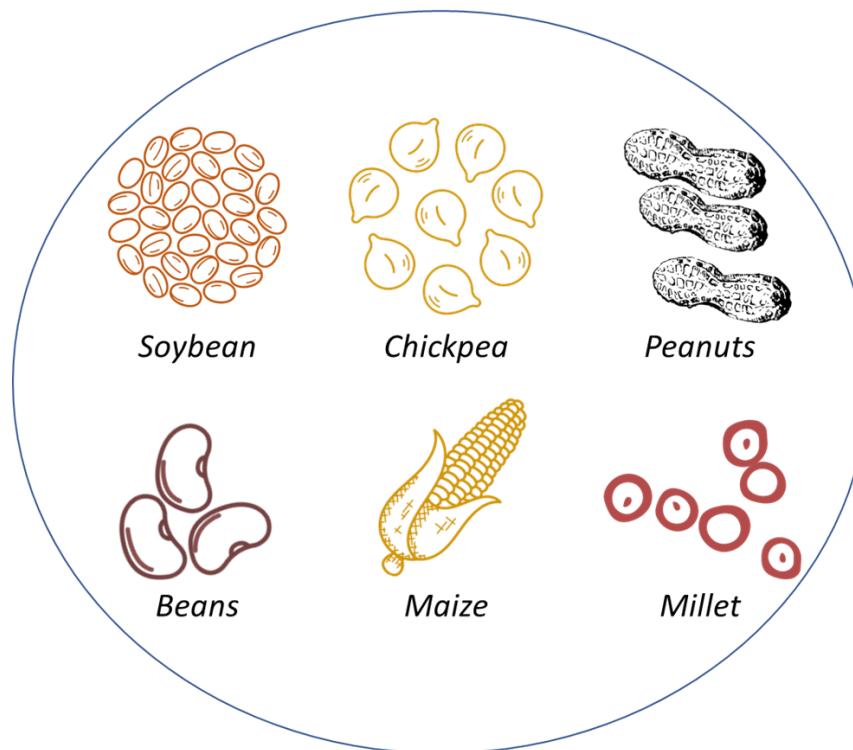


Restitution des travaux de recherche : Facteurs antinutritionnels (FAN)



Facteurs antinutritionnels : Quels composés et sources

Facteurs antinutritionnels (FAN)	Sources
Composés phénoliques	Légumineuses (Soja, lentilles, pois chiche, arachide, haricots)
1. Tannins	
2. Isoflavones	
Protéines	Céréales (Blé, Orge, avoine, mil, maïs, sorgho)
3. Inhibiteur de trypsine	
4. Lectines	
5. Inhibiteur d'alpha-amylase,	Pseudo-céréales (quinoa, teff, amarante)
6. Index uréase	
Glycosides	Noix (Amandes, Cajou, pistache,
7. Saponines	
8. Alpha-galactosides	Graines oléagineuses (sésame, tournesol, lin, courge)
Autres molécules	Tubercules (patate douce, manioc, igname...)
9. Phytates	
10. Cyanide	Solanacées (tomate, pomme de terre, piment, aubergine)
11. Oxalates	
12. Goitrigènes	



FAN prioritaires - NUTRISET

① Priorité établie par UNICEF

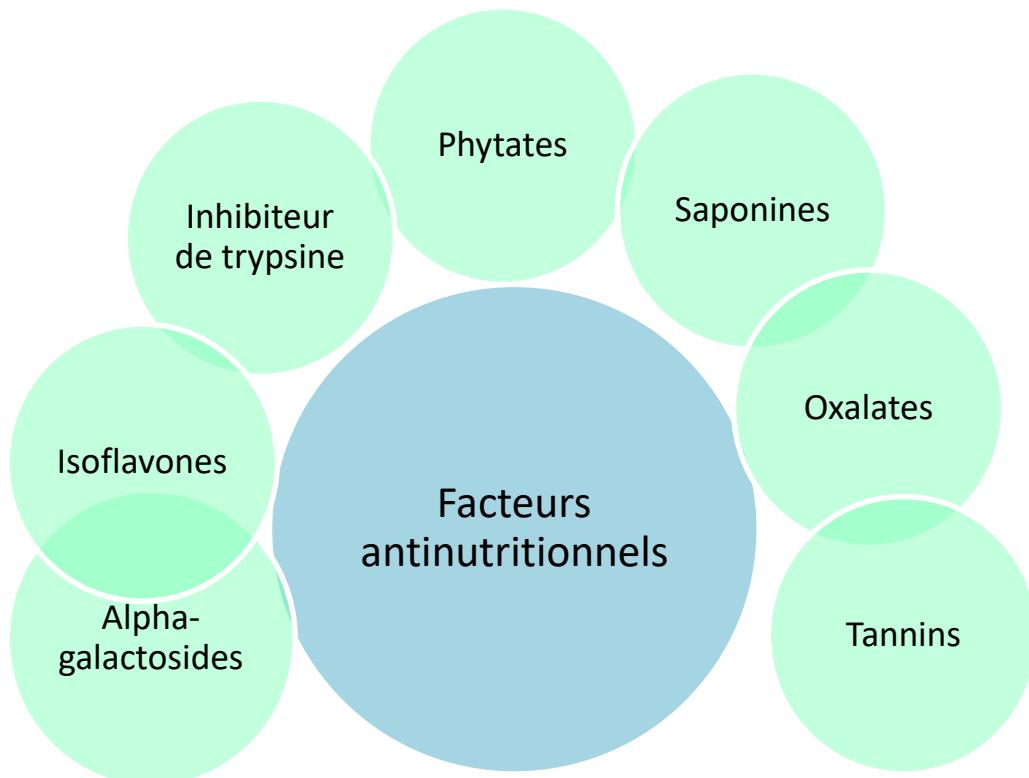
PRIORITÉ
N°1

- Facteurs anti-trypsiques
- Saponines
- Phytates
- Tanins
- ~~Glucosides cyanogènes~~
- Oxalates
- ~~Index uréase~~
- Isoflavones
- **Alpha-galactosides**

PRIORITÉ
N°2

- Lectines
- Inhibiteurs de l'α-amylase
- ~~Alpha-galactosides~~
- Goitrigènes
- **Glucosides cyanogènes**

③ Liste des FAN prioritaires retenus (7 FANs)



② Réorientation de l'ordre de priorité de certains FAN (R&D NUTRISET)

- Glucosides cyanogènes** : non retrouvés dans le soja et les arachides
- Alpha-galactosides** : manque d'information teneurs, seuils maximum et impact procédé
- Index uréase** : pas un FAN mais indicateur de l'intensité d'un traitement thermique

Facteurs antinutritionnels : Impact physiologique

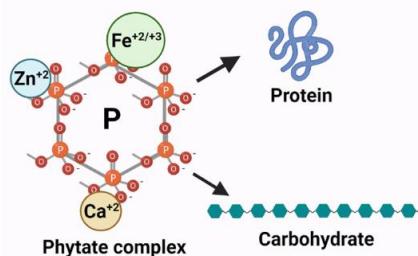
Reduction de la biodisponibilité des minéraux

Phytates

Lectines

Oxalates

Tanins



Réduction de la digestion des protéines

Facteurs antitrypsine

Phytates

Tannins

Réduction de la digestion des sucres

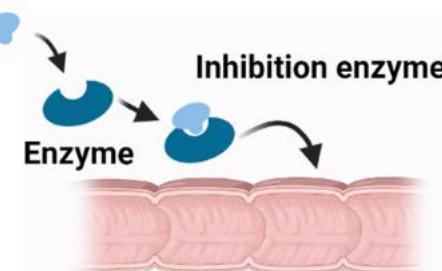
Inhibiteur de l'α-amylase

Saponines

Tannins

Altération de l'intégrité de la muqueuse intestinale

Lectines



Problématique de recherche

Résultats fournis par différents laboratoires : Exemple phytates

Echantillons	Phytates*	Méthode	Laboratoire
Mil (Gambie)	150	Enzymatic kit (total phytates)	NUTRISET (intern lab)
	509	Ferric precipitation (total phytates)	Victor Raboy
Mil (Niger)	56	HPLC-MS (IP6)	Murcia University (Spain)
	467 ± 90	Enzymatic kit (total phytates)	NUTRISET (intern lab)
SQ-LNS + phytase	487	HPIC (IP6)	JFRL (Japan)
	125	HPIC (IP6)	JFRL (Japan)
	262	Ferric precipitation (total phytates)	Victor Raboy

*mg/100g MS

① *Problème de fiabilité des méthodes d'analyses*

Seuils de consommation sans effet nocif

FAN	Seuil
Phytates	Ratio molaire : Phy/Fe < 1 Phy/Zn < 5 Phy/Ca < 0,17
Autres FANs	Seuil fixé par des études cliniques (Problème de consensus)

② *Manque d'information sur les seuils maximums de consommation*

Problématique de recherche

□ Stratégies de réduction des facteurs antinutritionnels

Décorticage

- Tannins

Toastage

- Inhibiteur de trypsine
- Glycosides cyanogènes
- Oxalates
- Lectines
- Alpha-galactosides

Autoclavage

- Inhibiteur de trypsine
- Lectines

Trempage

- Phytates
- Oxalates
- Isoflavones
- Lectines

Germination

- Phytates
- Alpha-galactosides

Fermentation

- Phytates
- Tannins
- Glycosides cyanogènes
- Lectines
- Alpha-galactosides

Hydrolyse enzymatique

- Phytates
- Alpha-galactosides

Cuisson - Ebullition

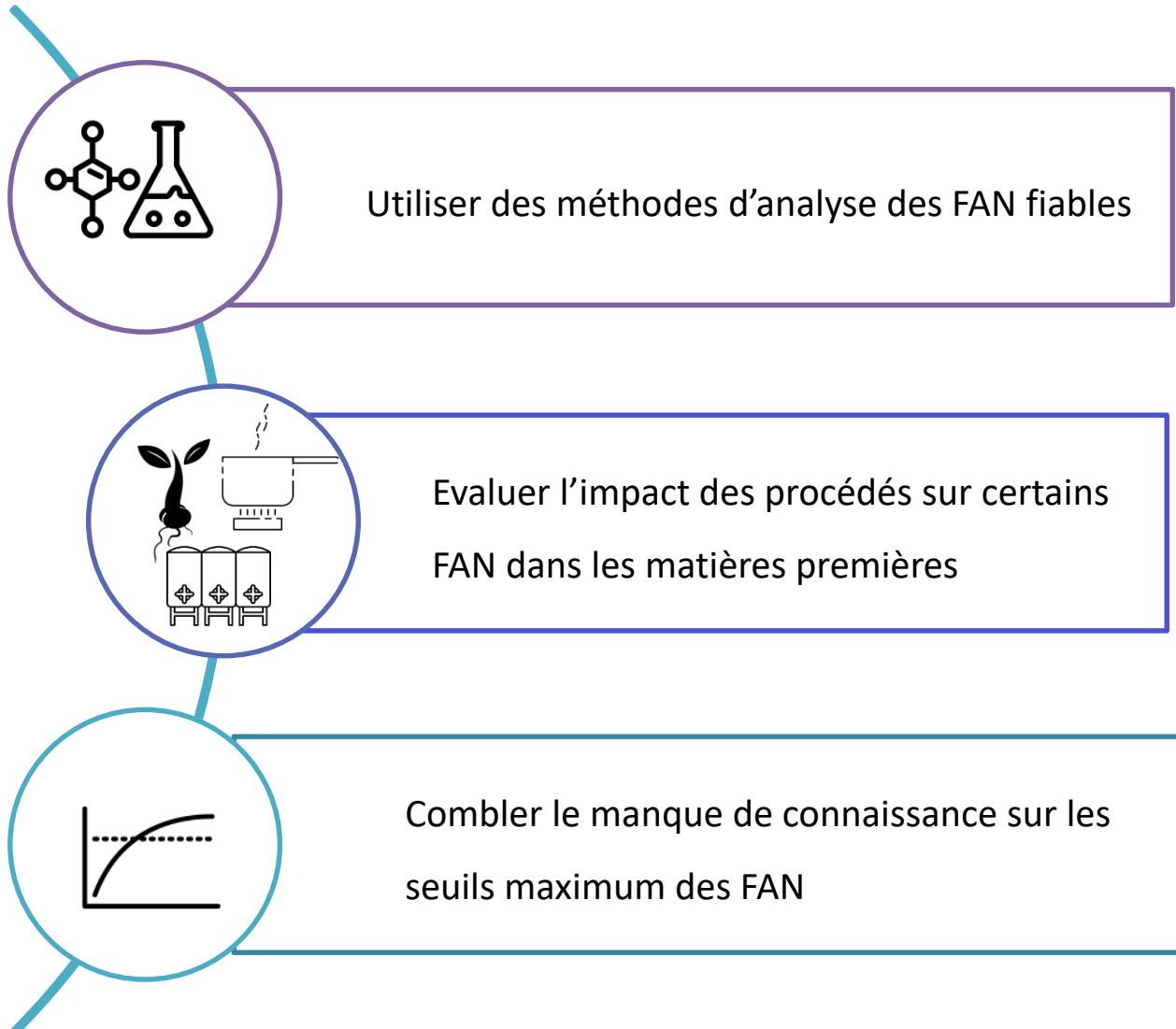
- Inhibiteur de trypsine
- Oxalates
- Isoflavones
- Lectines
- Alpha-galactosides

Cuisson à vapeur

- Oxalates

③ Quelle est l'efficacité des procédés

Axes de recherche sur les FAN



Historique des travaux : NUTRISET



Proposition de collaboration avec GAIN et l'université de Copenhague

Evaluation des teneurs en FAN : Aliments consommés (Afrique et Asie), RUF et céréales infantiles

Projet non démarré

2010

2011-2014

2015-2018

Projet Marguerite :

Etude de l'impact de ≠ procédés pour réduire les FAN*
(soja, mil, maïs, riz, lentilles corail) :

- ① : Hydrolyse enzymatique
- ② : Extrusion,
- ③ : Couplage hydrolyse / extrusion
- ④ : Couplage hydrolyse / détente instantanée contrôlée.

*phytates, inhibiteur de protéase ...

Projet LNS phytase

Reduction des phytates dans le SQ-LNS et dans l'aliment de complément (bouillie de mil) par ajout phytase pour améliorer l'absorption du zinc.

Note technique d'un comité d'experts initié par UNICEF en 2019

Demande aux producteurs de RUTF de quantifier des FAN – Utilisation de ses valeurs comme seuils à ne pas dépasser

2020

Etude de l'impact des l'extrusion ou du toastage :

Intérêt porté sur les phytates et les facteurs anti-trypsiques. Autres analyses marginales réalisées pour quantifier les isoflavones et les α -galactosides.

Historique des travaux : Collaboration CIRAD-NUTRISET

Proposition de collaboration avec GAIN et l'université de Copenhague

Analyse des FANs dans les matières premières d'intérêts de NUTRISET

Projet non démarré

2010

2011-2014

2015-2018

Projet Marguerite :

Etude de l'impact de ≠ procédés pour réduire les FAN (soja, mil, maïs, riz, lentilles corail) :

- ① : Hydrolyse enzymatique
- ② : Extrusion,
- ③ : Couplage hydrolyse / extrusion
- ④ : Couplage hydrolyse / détente instantanée contrôlée

Etude de l'impact des l'extrusion ou du toastage :

Intérêt porté sur les phytates et les facteurs anti-trypsiques. Autres analyses marginales réalisées pour quantifier les isoflavones et les α -galactosides.

Note technique d'un comité d'experts initié par UNICEF en 2019

Demande aux producteurs de RUTF de quantifier des FAN – Utilisation de ses valeurs comme seuils à ne pas dépasser

2020

2020-2021

2022-2024

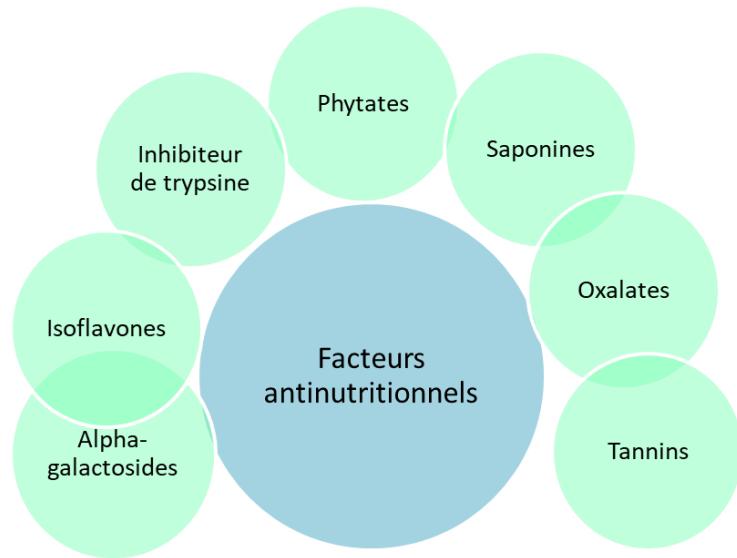
Poursuite des travaux du projet Phytates et intégration d'autres FAN

Projet FAN en collaboration avec l'UMR QUALISUD

Projet Phytates en collaboration avec l'UMR QUALISUD

Développement d'analyse des phytates.

Activités des projets PHYTATES et FAN



Soja



Arachide

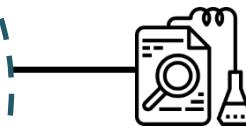


Maïs

*Mise au point de méthodes
de caractérisation des FAN
prioritaires*



Recenser dans la littérature des **méthodes existantes**



Développer de **nouvelles stratégies analytiques**



Adapter certaines techniques à des voies de quantification **plus « low-tech »** pour les laboratoires peu équipés (pays du Sud)



Méthode d'analyse des phytates dans les matières premières et produits finis

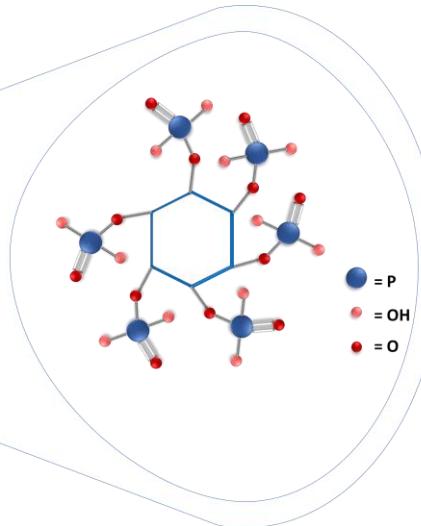
*Lorène Akissoe^{1,2}, Adrien Servent^{1,2}, Christian Mertz^{1,2},
Pascale de Saint Priest³, Maxime Bohin³*

¹ Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon, Université de La Réunion, Montpellier, France.

² CIRAD, UMR QualiSud, F-34398 Montpellier, France

³ Nutriset S.A.S., Malaunay, France

Structure et types de phytates

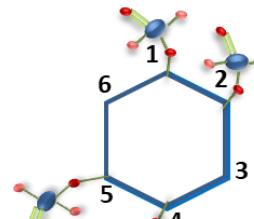


- Myo-inositol hexaphosphate (IP6) : Acide phytique
- Myo-inositol mono à pentaphosphate (IP1 à IP5)
- IP1 à IP5 : plusieurs isomères, 63 au total (Chen and Li, 2003))

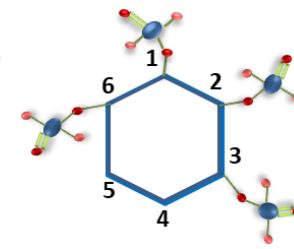
Phytates : 60–80% des phosphates totaux

Myo-inositol hexaphosphate

Myo-inositol Monophosphate



Myo-inositol-
1,2,4,5-
tetraphosphate



Myo-inositol-
1,2,3,6-
tetraphosphate

Méthodes analytiques des phytates : littérature

16 méthodes HPLC recensées dans la littérature et testées

Méthodes	Phases Mobile	Détecteur	Température colonne (°C)	Débit (mL · min ⁻¹)	Volume d'injection (μL)	Référence
Méthode avec colonne C18	0.05M CH ₂ O ₂ : MeOH (49: 51) + 1.5% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H ₂ SO ₄ 9M	UV (220 nm, 280 et 360 nm)	30	0.7	20	(Fredlund et al., 1997; Sandberg & Ahderinne, 1986)
	0.012M CH ₂ O ₂ : MeOH (48.5: 51.5) + 0.8% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H ₂ SO ₄ 9M		45	0.7	20	(Burbano et al., 1995; Centeno et al., 2001)
	H ₂ O : ACN (90: 10) + 0.1% TBA-OH pH 4.3 adjusted with CH ₂ O ₂		45	0.7	20	
	H ₂ O : MeOH (49: 51) + 0.1% TBA-OH pH 4 adjusted with CH ₂ O ₂		45	0.7	20	
	0.02M CH ₂ O ₂ : ACN (53: 47) + 0.4% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H ₂ SO ₄		25	1	20	(Lehrfeld, 1994)
	(A) ACN (B) H ₂ O + TBA-OH 2% pH 5.4 (C) H ₂ O + TBA-OH 0.5% pH 5.5 (D) H ₂ O + TBA-OH 0.01% pH 4.4		25	1	20	
	(A) H ₂ O and (B) ACN		25	0.7	10 or 2	(Patel et al., 2016)
HILIC	(A) H ₂ O pH 4 adjusted with H ₂ SO ₄ 9M and (B) ACN	UV (220 nm, 280 et 360 nm)	25	0.7	10 and 2	
	(A) ACN and (B) H ₂ O		25	0.4	10 and 2	
	(A) H ₂ O and (B) ACN		25	0.4	10	
	CH ₂ O ₂ 0.2% (A) et ACN (B)		25	0.4	10	
	(A) H ₂ O + TBA-OH 10 Mm + 0.5% CH ₂ O ₂ (B) H ₂ O:ACN (30:70) + TBA-OH 10 Mm + 0.5% CH ₂ O ₂		25	0.4	10	
	(A) Tampon carbonate de sodium pH 9 à 0.015 M (B) MeOH:H ₂ O (5:95)	Réfractométrie (RID)	25	0.4	10	(Lee & Mitchell, 2019)
	(A) Tampon carbonate de sodium pH 9 à 0.2 M (B) MeOH:H ₂ O (5:95)		25	0.4	10	
par échange d'anions	0.035M CH ₂ O ₂ : ACN (57: 43) + 0.4% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H ₂ SO ₄	Réfractométrie (RID)	25	0.6	20	(Lehrfeld, 1994)
	0.035M CH ₂ O ₂ : MeOH (44: 56) + 0.4% TBA-OH pH 4.3 adjusted with H ₂ SO ₄ 72%		40	0.6 et 0.7	20	(Lehrfeld, 1994)
par appariement d'ions		Réfractométrie (RID)				Méthode choisie

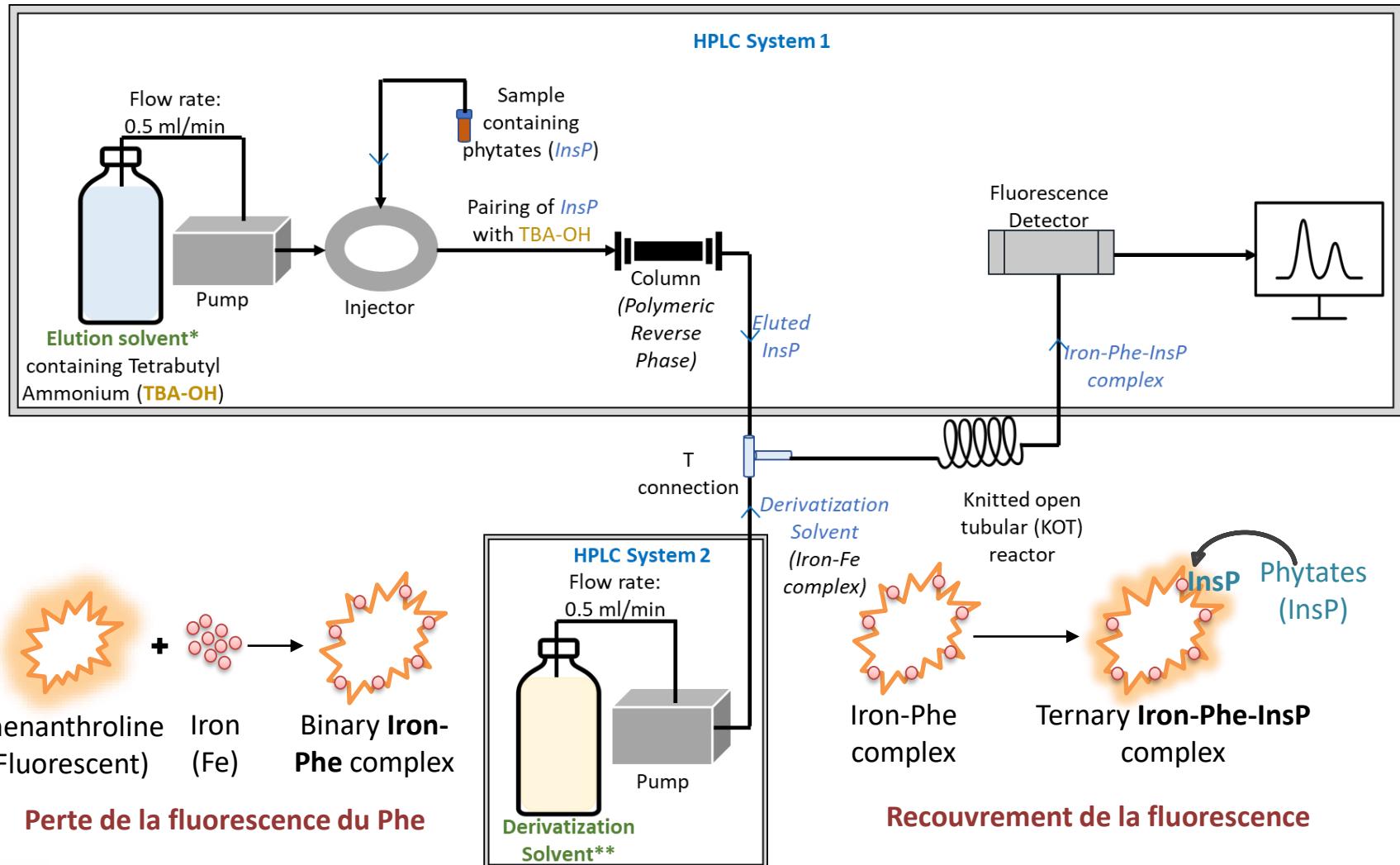
Influence du pH des phases mobiles

Problème d'élution des phytates



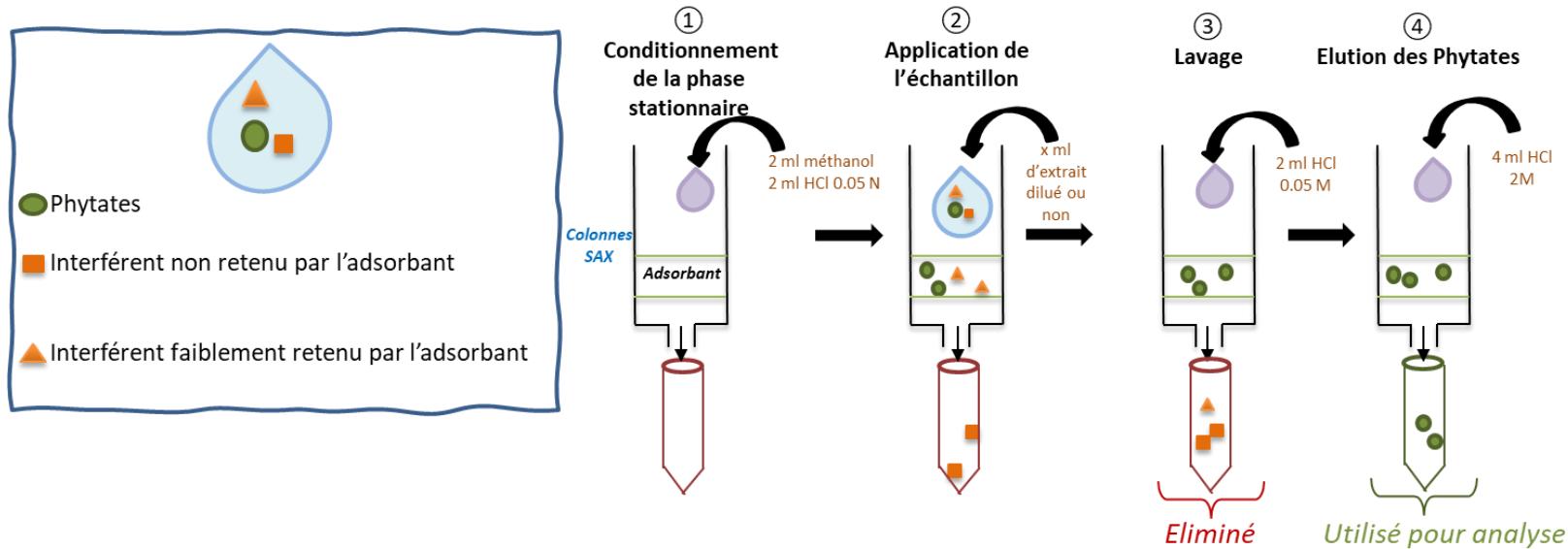
Chromatographie par appariement d'ions- Dérivatisation post-colonne (Détection par Fluorescence, HPLC-FLD)

Modification de la méthode spectrophotométrique avec le complexe **Fer-Phenanthroline (Fe-Phe)** Chen et al. (2009)



Analyse échantillons

□ Analyse échantillons : Extraction acide + Nécessité de purification sur cartouche SAX



□ Analyse des phytates par d'autres méthodes existantes : Comparaison

HPLC-RID (Chromatographie par appariement d'ions)

- Chromatographie liquide par appariement d'ions
- Détection par réfractométrie

HPIC (Chromatographie ionique)

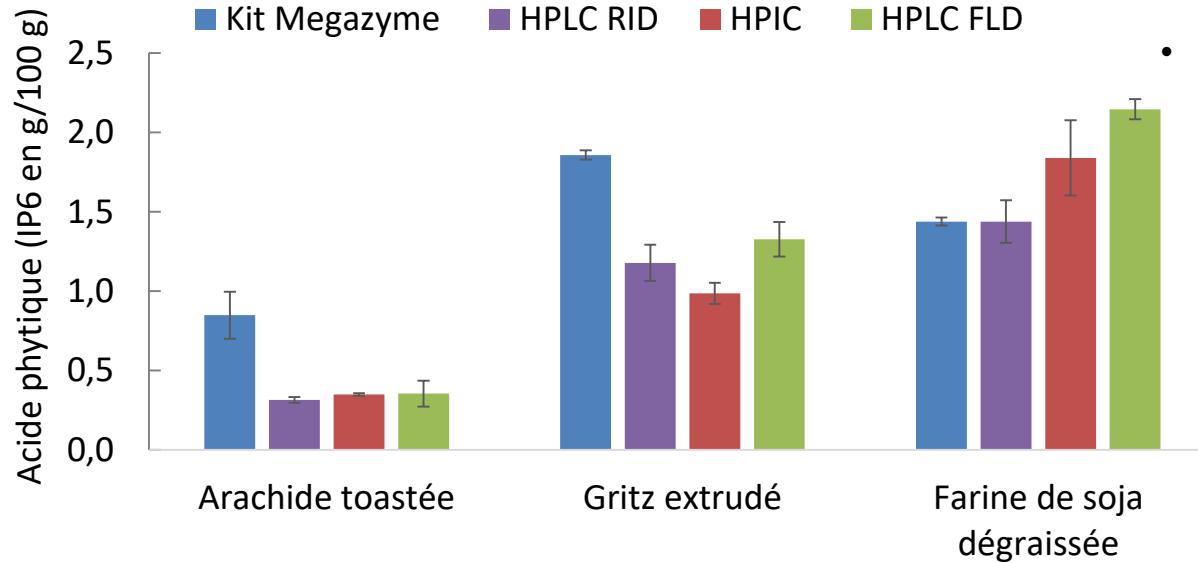
- Chromatographie ionique
- Détection par conductimétrie

Kit MEGAZYME (méthode spectrophotométrique)

- Dégradation enzymatique des phytates en phosphates
- Réaction colorimétrique à 655 nm

Résultats : Comparaison entre les différentes méthodes

□ Teneurs en acide phytique (IP6) déterminées par toutes les méthodes



- Sur/sous-estimation kit vs méthodes HC
=> Même procédé d'extraction mais étape de purification de l'échantillon supplémentaire pour méthodes HC,
- Méthodes HC plus spécifiques

- Résultats significativement corrélés entre les méthodes chromatographiques (**HPLC-FLD** vs **HPLC-RID** + **HPLC-FLD** vs **HPIC**)

- Faible corrélation entre les données obtenues avec la méthode spectrophotométrique et la nouvelle méthode (**HPLC-FLD** vs kit **Megazyme**)

Avantages et limites des méthodes



Kit MEGAZYME

Données reproductibles

- Durée d'analyse
- **Non spécifique :** Dégradation de tous les phytates en phosphate
- **Risque de sur/sous estimation**

HPIC

- Résolution du pic d'IP6
- Sensibilité

- Séparation d'autres composés

- Identification des isomères de IP1 à IP5

- Forte variabilité avec échantillons non purifiés

HPLC-RID

Simple et rapide

- Présence de pics parasites (Ex Sucres)

- Pics négatifs

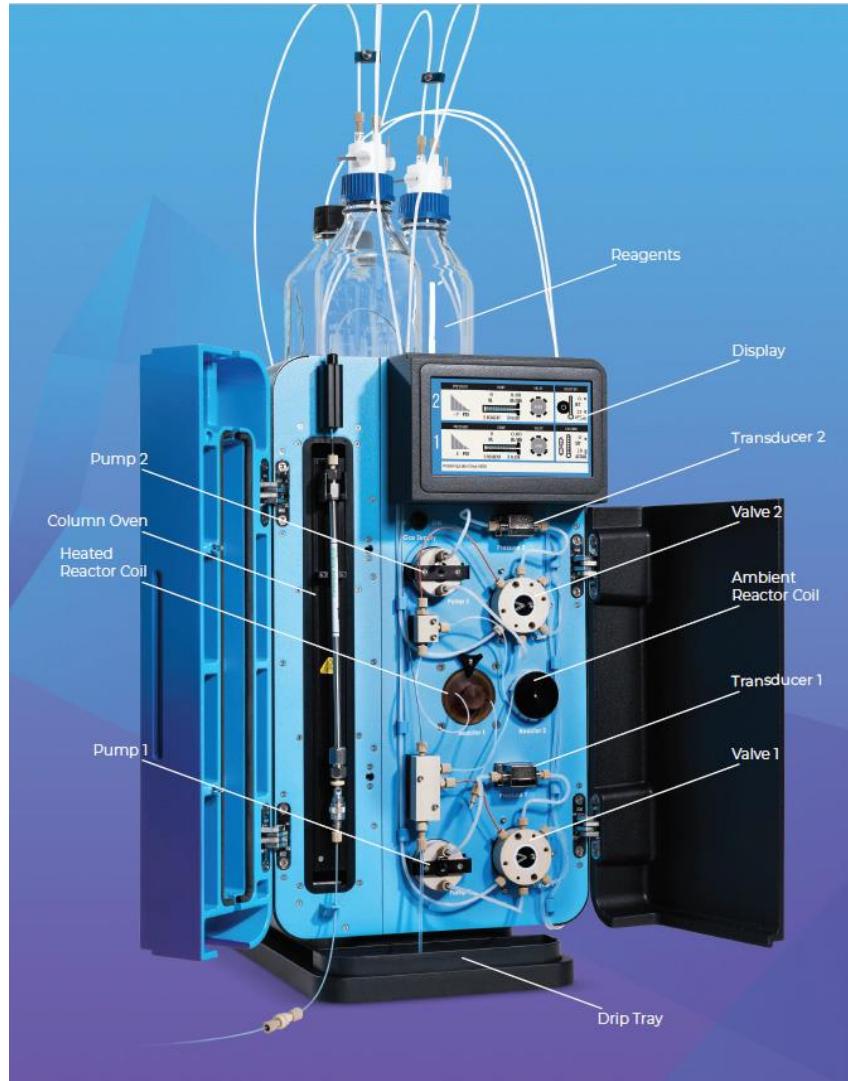
- Limite de détection élevée par rapport au HPLC-FLD

HPLC-FLD

- Spécifique aux phytates
- Pas de pics parasites

Système interne nécessitant un contrôle pendant l'analyse

Système de dérivatisation commercialisé



<https://www.pickeringlabs.com/products/analysis-products/post-column-instruments/>

Système de dérivatisation automatique
type Pickering (entre 5 et 10 K€)

Données tous les échantillons (nouvelle méthode HPLC-FLD)

Type échantillon	Echantillons	IP6* obtenu	IP6 théorique*
Matières premières	Arachide toastée – fournisseur 1	0,35 ± 0,08	
	Arachide toastée – fournisseur 2	0,35 ± 0,08	
	Arachide toastée – fournisseur 3	0,39 ± 0,01	
	Farine de soja dégraissée - 13/11/2018	2,00 ± 0,10	
	Farine de soja dégraissée – fournisseur 1	1,63 ± 0,05	
	Farine de soja dégraissée – fournisseur 2	2,15 ± 0,06	
	Farine de soja dégraissée – fournisseur 3	2,09 ± 0,54	
Produits finis (RUTF)	ENB+	ND	0,07
	Plumpy'Mum (MISAME)	0,04 ± 0,01	0,453
	Plumpy Nut	0,03 ± 0,0	0,08
Produits non extrudés	Gritz de soja – 17/11/22	1,38 ± 0,16	
	Mix Soja/maïs	1,25 ± 0,02	
Produits extrudés	Gritz extrudé – 31/01/23	1,06 ± 0,16	
	Mix Soja/maïs extrudé	1,21 ± 0,03	

* : IP6, g/100 g

Valeurs obtenues ne seraient pas adéquation avec valeurs théoriques

- Phytates dégradés au cours du procédé industriel ? *Bilan matière : Suivi de teneurs en phytates*
- Influence du premix sur la méthode d'analyse ? *Analyse RUTF avec/sans premix prévu*

Suite projet -Identification de composés à analyser

FAN	Echantillons	Mérieux	Up Sciences	Phytocontrol	Eurofins FR	CIRAD
Inhibiteur de trypsine TIU/g	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	600 3400 11100 1000	500 3200 12300 1500	< 1000 < 1200 X	X
Saponines en mg/g	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	X	1,5 6,5 4,3 4,2	1,6 ± 0,3 4,6 ± 0,6 3,4 ± 0,03 3,3 ± 0,3	X
Tanins en mg/kg	Arachides Soja Pois chiches Maïs	1160 ± 120 2090 ± 210 721 ± 72 345 ± 35	X	1220 2180 1110 383	2810 ± 661 3960 ± 916 1880 ± 451 1740 ± 420	X
Oxalates en mg/kg	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	1003 ± 201 373 ± 75 71 ± 14 219 ± 44	X	856 ± 171 300 <200 200	X
Isoflavones	Arachides Soja Pois chiches Maïs	0,451 1823,6 ± 141,6	< 0,5 3020,69	ND 0,112 ND ND	106 2930 32,3 38	X
Alpha-galactosides raffinose (en %)	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	< 0,1 1,39 ± 0,11 0,4 0,13 ± 0,01	0,084 1,79 0,46 0,164	0,06 1,39 0,35 0,1	X
Alpha-galactosides stachyose (en %)	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	0,56 4,38 ± 0,35 1,67 < 0,10	0,583 6,1 1,78 < 0,001	0,62 5,2 1,86 < 0,05	X
Phytates en g/100g MS	Arachides Soja Pois chiches Maïs	X	X	X		0,35 1,55

Activités réalisées chez NUTRISET

- ❑ Revue de littérature méthodes analytiques : Oxalates
- ❑ Revue de littérature méthodes analytiques : Tannins
- ❑ Rédaction article scientifique : Méthode analytique phytates
- ❑ Recensement données FANs : Tableau de scoring des matières premières - NUTRISET

Scoring MP 2023.xlsx - Excel

Rechercher

Lorene AKISSE

	B1	AS	AT	AU	AV	AW	
1	Type de MP	Matière première	NUT - FAN - Facteurs anti-trypsiques (UTI/g)	NUT - FAN - alphagalactosides (raffinose + stachyose, en g/100g)	NUT - FAN - Phytates (totaux, en g/100g)	NUT - FAN - Lectines (HU/mg)	NUT - FAN - Saponines (mg/g)
16	Végétal	Soja entier (graine, sèche, dry seed)	8570-83700	3.35	0,478-2,01	692.82	43
17	Végétal	Soja dégraissé (farine, flour)	3300	5.77	1.72	1600-3200	5.55
18	Végétal	Soja farine grasse (ou flocons or flakes)			1.84		
19	Végétal	Soja, isolat PROD2020 (ALLIX)			1.62		
20	Végétal	Haricot mungo/mungbean (graine sèche)		4,5-8,89	0,69		28.48
25	Végétal	Pois jaunes (graine sèche)	3160	4.75	0.993	5.64	
26	Végétal	Pois carre (graine sèche)	19640		0.303		
27	Végétal	Pois commun (graine sèche)	800-8400	2,26-6,34	0,28-0,71		
31	Végétal	Niébé	1113	4,417	0,979	2.4E-07	27,5-35,7
35	Végétal	Féverole	2240-4470	1,35-3,27	0,112-1,281	49.3	4.3
38	Végétal	Blé (grain entier)	31,48-40,28	0.34	1.346		
39	Végétal	Blé (farine type 405/45)			0.0306		
40	Végétal	Blé (farine type 812/150-160)					
41	Végétal	Avoine (grain entier déglumé)		0.25	0.9		
42	Végétal	Avoine (flocos)/ rolled oats					
43	Végétal	Avoine (farine)/ oat meal			0,89-2,4		
44	Végétal	Sorgho		0,1-0,39	0,57		7.08
45	Végétal	Orge (déglumé grain entier)	5440	0.49	1.01		
47	Végétal	Mil/millet (grain décortiqué)			0.85		
48	Végétal	Millet (farine)	7810		0.96		
51	Végétal	Sesame (graine sèche)			3.15		
52	Végétal	Sesame (graine décortiquée)			0.03	nd	
53	Cecile6+C	Pois Chiche (graine sèche)	10430	2,4-4,8	0.338	2.73	
54	Végétal	Pois Chiche (farine)					
55	Végétal	Riz (naturel)		nd	0.89		

Suite du projet : Analyse des Oxalates et Tannins

Travaux à réaliser

Tester en laboratoire les méthodes recensées

Faire une analyse critique des méthodes d'analyse des oxalates et tannins (identification des verrous analytiques)

Identifier pour chacun des deux FAN la méthode adéquate

Valorisation travaux

- Poster réalisé lors du congrès ICEF 14 (Nantes, Juin 203)
- Correction de l'article « méthode analytique phytates » + Soumission
- Valorisation de la méthode analytique phytates avec l'ITERG



Merci!