



**HAL**  
open science

# Acide Phytique: Fermentation et réduction de la quantité d'acide phytique dans les produits alimentaires à base de céréales ou de protéagineux

Eléonor Foisnet

## ► To cite this version:

Eléonor Foisnet. Acide Phytique: Fermentation et réduction de la quantité d'acide phytique dans les produits alimentaires à base de céréales ou de protéagineux. [Stage] STLO MEM 324, Université de Rennes 1. 2020, 23p. hal-02957537

**HAL Id: hal-02957537**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02957537v1>**

Submitted on 5 Oct 2020

**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.

# ACIDE PHYTIQUE

Fermentation et réduction de la quantité d'acide phytique dans les produits alimentaires à base de céréales ou de protéagineux

TUTRICES : VALÉRIE GAGNAIRE & HÉLÈNE FALENTIN

helene.falentin@inrae.fr - valerie.gagnaire@inrae.fr

UMT STLO : +33 2 23 48 53 22

## Synthèse bibliographique en biologie

ELÉANOR FOISNET  
MASTER BIOLOGIE-GESTION 2019-2020



## **Remerciements**

Je tiens à remercier mes tutrices, Mesdames Hélène Falentin et Valérie Gagnaire, pour leur confiance, leur disponibilité et leurs précieux conseils. Chacun de nos échanges m'a permis d'alimenter ma réflexion et ma connaissance du sujet et j'espère que cette synthèse les aidera dans leurs recherches.

## Résumé

Avec une croissance constante de la population mondiale et une prise de conscience générale pour une alimentation saine et durable, les assiettes se végétalisent. La consommation d'aliments à base de céréales et de protéagineux augmente. Cependant, ces végétaux contiennent d'importante quantité d'acide phytique et une consommation trop importante peut entraîner de graves carences. En chélatant les minéraux, l'acide phytique diminue leur solubilité et les rend indisponibles à la digestion intestinale. D'importants efforts de procédés de transformation ont été faits pour réduire la présence d'acide phytique dans les produits végétaux et améliorer les qualités nutritionnelles des alimentations animale et humaine. Des méthodes telles que le trempage, la germination et la fermentation permettent une dégradation partielle de l'acide phytique, mais l'ajout de phytases exogènes, enzymes capable d'hydrolyser l'acide phytique au cours des procédés, se présente comme la solution la plus efficace. Les phytases microbiennes (bactériennes ou fongiques), plus stables que les phytases extraites des végétaux, sont privilégiées et peuvent contribuer à une dégradation totale de l'acide phytique. Un pH acide est également un facteur clé de la dégradation de l'acide phytique, en instaurant les conditions optimales à l'activité des phytases endogènes des végétaux. La connaissance de la teneur en acide phytique des aliments est aujourd'hui essentielle et peut être mesurée par diverses méthodes de dosage, directes ou indirectes. Cette connaissance permet d'identifier les aliments à forte teneur en acide phytique et ainsi que les méthodes de réduction de l'acide phytique et les microorganismes les plus efficace pour le réduire.

## Table des matières

Introduction.....	1
I. L'acide phytique et les enzymes impliquées dans sa dégradation.....	2
1. Structure de l'acide phytique et rôle dans la plante .....	2
2. Enzymes de dégradation de l'acide phytique : les phytases .....	3
II. L'acide phytique dans l'alimentation .....	4
1. Consommation d'acide phytique .....	4
2. Concentration en acide phytique dans différentes graines de céréales, de légumineuses et leur activité phytase .....	6
3. Produits alimentaires et acide phytique .....	8
III. Impact de l'acide phytique sur la santé.....	9
1. Problèmes nutritionnels rencontrés .....	9
a. Effet sur l'absorption des minéraux .....	9
b. Effet sur les macronutriments.....	10
2. Bénéfices liés à sa consommation.....	11
a. Propriétés antioxydantes .....	11
b. Agent anti cancéreux.....	11
c. Prévention des lithiases rénales.....	11
IV. Méthodes pour réduire l'acide phytique dans l'alimentation .....	12
1. Optimisation de la déphosphorylation par les phytases endogènes des végétaux.....	12
a. Trempage.....	12
b. Germination et maltage .....	12
c. Fermentation.....	13
2. Ajout de phytases exogènes isolées.....	15
3. Microorganismes producteurs des phytases .....	16
a. Bactéries .....	17
b. Levures .....	18
c. Moisissures.....	18
V. Méthodes de dosage de l'acide phytique existantes et leurs avantages et limites.....	19
1. HPLC en phase inverse.....	19
2. Précipitation par le chlorure ferrique.....	20
3. Méthode enzymatique .....	20
Conclusion et perspectives.....	22

## Liste des abréviations

**ATP** : Adénosine triphosphate

**IP1** : Monophosphate d'inositol

**IP2** : Diphosphate d'inositol

**IP3** : Triphosphate d'inositol

**IP4** : Tétraphosphate d'inositol

**IP5** : Pentaphosphate d'inositol

Phosphates d'inositol inférieurs

**IP6** : Hexaphosphate d'inositol, acide phytique

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

**LAB** : Bactéries lactiques

**PS** : Poids sec, issue de l'abréviation anglaise « DW », Dry weight.

**QPS** : "Qualified Presumption of Safety", "Présomption d'innocuité reconnue"

## Liste des définitions

**Activité intrinsèque** : « Capacité du ligand à produire un effet plus ou moins important en se liant au récepteur » (Stanke-Labesque 2011)

**Activité spécifique** : « L'activité spécifique d'une enzyme est définie en unités par mg de protéine enzymatique, une unité étant la quantité d'enzyme qui catalysera la transformation de 1 pmole de substrat par minute dans des conditions spécifiées. » (Barman 1974)

**Biodisponibilité** : « Du point de vue nutritionnel, la biodisponibilité fait référence à la fraction du nutriment ou du composé bioactif ingéré qui est disponible pour être utilisé dans des fonctions physiologiques ou pour être stocké. [Il s'agit de] la proportion d'un nutriment donné dans un aliment ou un régime alimentaire que l'organisme peut effectivement utiliser. » (Fernández-García, Carvajal-Lérida, Pérez-Gálvez 2009)

**Bioaccessibilité** : c'est « la fraction d'un composé qui est libérée de sa matrice dans le tractus gastro-intestinal et devient ainsi disponible pour l'absorption intestinale (c'est-à-dire qui entre dans le flux sanguin) » (Fernández-García, Carvajal-Lérida, Pérez-Gálvez 2009)

**Chélation et agents de chélation** : « Principe de se tenir ou de s'accrocher avec une forte emprise. Les agents de chélation sont des composés organiques ou inorganiques capables de se lier aux ions métalliques pour former une structure complexe en forme d'anneau appelée "chélates". » (Flora et Pachauri, 2010)

**Phosphates d'inositol inférieurs** : Acide phytique qui a subi des déphosphorylations

**Spécificité de substrat** : capacité de l'enzyme à distinguer des substrats étroitement liés et de contrôler les réactions pour obtenir un produit unique (Hedstrom 2010).

## Listes des figures et tableaux :

### Figure :

Figure 1- Structure moléculaire de l'acide phytique (Kumar et al. 2010) .....	2
Figure 2 – Schéma résumant l'action des phytases sur l'acide phytique et les phosphates d'inositol inférieurs, entraînant la libération de phosphate inorganique (Pi). Inspiré de (Burbano et al., 1995; Sandberg et Andlid, 2002) .....	3
Figure 3 - Principe du dosage enzymatique de l'acide phytique par le Kit K-PHYT. Inspiré de la vidéo (Libidos 2019; MegazymeVideos 2013).....	21

### Tableaux :

Tableau 1 - Classification des phytases selon le site d'initiation de l'hydrolyse de l'acide phytique. Inspiré des données de (Kumar et Sinha, 2018).....	4
Tableau 2 - Apports journaliers d'acide phytique selon les régimes, zones géographiques et les âges, d'après les données de (Schlemmer et al. 2009) .....	5
Tableau 3 - Contenu en acide phytique des diverses céréales, légumineuses, arachides et tubercules (en mg/g de matière sèche) .....	6
Tableau 6 - Taux d'acide phytique (mg/g de matière sèche) dans différentes variétés de farines et de pains. Valeurs issues de (INFOODS: FAO/INFOODS Databases).....	8
Tableau 2 – Présentation des différentes méthodes de fermentation. Inspiré des données de (Blandino et al. 2003), de (Parkouda et al. 2009), de (Yang et al. 2018) et de (Wang et Fung, 1996)..	13
Tableau 6- Microorganismes producteurs de phytases, et adaptés à une consommation alimentaire. Les microorganismes présentés sont QPS (INRA 2019) ou ont usage traditionnel reconnu. ....	16

## Introduction

Avec une croissance continue de la population mondiale, il devient toujours plus nécessaire de fournir une alimentation saine, bonne, nutritive, sûre et durable à tout le monde. Les céréales et les légumineuses représentent une part importante de l'alimentation humaine, avec 40% de l'apport calorique total dans les pays développés et 60% dans les pays en voie de développement (Schlemmer et al. 2009). Ces apports sont d'autant plus importants pour les personnes végétariennes ou végétaliennes. Un régime alimentaire riche en végétaux peut cependant entraîner une augmentation de la prévalence de carence en minéraux. Ces carences sont en partie dues à la présence de composés antinutritionnels dans la majorité des plantes.

Le composé antinutritionnel le plus connu à l'heure actuelle est l'acide phytique. Forme de stockage principale du phosphore dans les plantes, près de 14,4 millions de tonnes de l'acide phytique sont générés chaque année par la production de fruits et de graines (Coban et Demirci, 2017). Non digestible par les animaux monogastriques tels que l'homme, le cochon ou le poulet, sa consommation peut entraîner une diminution de l'absorption de minéraux, tels que le fer, le calcium, le zinc et le magnésium (Tang et al. 2010a; Kwon et al. 2014) et conduire à des carences nutritionnelles. Ces carences en minéraux peuvent avoir de lourds impacts sur la santé, comme une altération de la croissance, ou une diminution de l'immunité, et peuvent dans certains cas extrêmes entraîner la mort (Sandstead et Freeland-Graves 2014a).

Une dégradation de l'acide phytique permet une augmentation de la biodisponibilité des minéraux et du phosphore, ainsi qu'une amélioration des valeurs nutritionnelles des aliments (Kumar et Sinha, 2018). Cette dégradation peut être due à l'activité des phytases naturellement présentes dans les aliments, ou à l'ajout de phytases exogènes. Certains procédés tels que le trempage ou la germination permettent un renforcement des phytases endogènes des végétaux. Mais les phytases d'origine microbienne, présentes dans les bactéries, les levures et les moisissures, sont particulièrement prometteuses pour la dégradation de l'acide phytique lors des processus de transformation industriels (Kwon et al. 2014). Les microorganismes complets peuvent être ajoutés lors de la transformation des aliments, comme dans la fermentation, ou seules des phytases isolées peuvent être utilisées (Kumar et al. 2010).

Depuis plus de 20 ans, l'addition de microorganismes, ou de leurs phytases, pour réduire l'acide phytique est de plus en plus utilisée dans l'alimentation animale (Selle et Ravindran, 2007). Leur usage pour l'alimentation humaine se développe peu à peu, et la fermentation est un procédé déjà largement répandu. C'est sur cette application humaine que nous nous focaliserons dans cette synthèse.

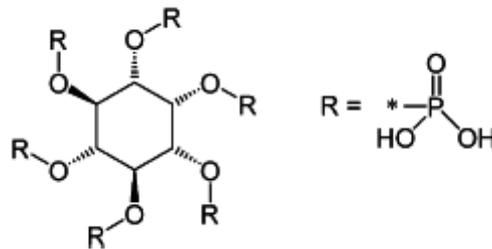
### **Dans quelle mesure la fermentation permettrait-elle de réduire la quantité d'acide phytique dans les produits alimentaires à base de céréales ou de protéagineux ?**

Cette synthèse présente un état des lieux de la connaissance actuelle concernant l'acide phytique et sa dégradation dans les produits alimentaires à base de céréales et de protéagineux. Dans un premier temps, nous décrirons ce qu'est l'acide phytique et les phytases. Dans un deuxième temps, nous étudierons l'acide phytique dans l'alimentation, et les concentrations contenues dans diverses graines et produits dérivés. Ensuite, nous analyserons l'impact de l'acide phytique sur la santé, négatifs comme positifs. Puis, les méthodes de dégradation de l'acide phytique et les microorganismes contenant des phytases d'intérêt alimentaire seront étudiés. Enfin, nous présenterons les méthodes de dosage de l'acide phytique existantes.

## I. L'acide phytique et les enzymes impliquées dans sa dégradation

### 1. Structure de l'acide phytique et rôle dans la plante

L'acide phytique, aussi appelé acide myo-inositol hexaphosphorique, est une molécule d'origine végétale qui constitue la forme principale de stockage du phosphate dans les tissus des plantes, avec 60 à 90% du phosphate total (Kumar et al. 2010). La formule de cette molécule est le  $C_6H_{18}O_{24}P_6$  et sa masse molaire est de 659,86 g/mole. Elle se compose d'un cycle myo-inositol et de 6 phosphates (Figure 1)(Kumar et al. 2010).



Pour se développer, les plantes ont besoin d'énergie, sous forme notamment de phosphate (Sandberg et Andlid, 2002). L'acide phytique se forme pendant la maturation des graines de la plante et dans les graines dormantes (Coban et Demirci, 2017; Kumar et al., 2010). Sa synthèse est initiée dans les graines en développement. Le glucose 6-phosphate est transformé en triphosphate d'inositol (IP3). S'en suit une série de phosphorylation qui mène à l'hexaphosphate d'inositol (IP6). Deux voies de synthèse existent (Perera et al. 2019a). L'une est dépendante des lipides et commune à tous les végétaux. L'autre est indépendante des lipides et se produit principalement dans les graines de légumineuses et de céréales (Perera et al. 2019a). L'acide phytique s'accumule dans les graines et constitue la principale forme de stockage du phosphate et de l'inositol (Kumar et al. 2010). L'acide phytique est principalement stocké dans la couche cellulaire de l'aleurone (environ 80%) ou le germe (Kumar et Sinha, 2018; Schlemmer et al., 2009). Il devient actif pendant la germination, libérant de grandes quantités de phosphore pour la production d'ATP (Selle et Ravindran, 2007). Le phosphate d'inositol participe également au transport des matières dans la cellule. Sous forme d'acide phytique, le phosphore n'est pas utilisable par les animaux monogastriques tel que l'homme, ou le cochon. En effet, ces animaux ne disposent pas des phytases intestinales permettant de le dégrader (Kumar et Sinha, 2018).

L'acide phytique est présent dans une large variété d'aliments végétaux, et plus particulièrement dans les légumineuses et les céréales (Tang et al. 2010a). La consommation d'acide phytique représente une préoccupation majeure dans la nutrition et la santé humaine. De par sa forte densité en groupement phosphate, l'acide phytique est chargé négativement sur une très large gamme de pH physiologique, de pH 1,84 à 9,7 (Tsao et al. 1997). C'est pourquoi, de nombreuses interactions ioniques sont susceptibles de se produire (Pontoppidan et al. 2007). (Tang et al. 2010a). 8 des 12 protons dissociables de l'acide phytique sont disponibles pour se lier avec des ions métalliques : calcium, magnésium, zinc, cuivre et fer. Les IP6 et IP5 possèdent la capacité de fortement chélater ces cations (Kumar et al. 2010). Les phosphates d'inositol formés après hydrolyse par les phytases possèdent par contre une plus faible capacité de fixation aux minéraux et les complexes formés sont plus solubles et donc plus absorbables. Cette liaison dépend des plusieurs facteurs : la concentration en métal, le pH de la solution, de la concentration en cation secondaire (Harland et Harland, 1980), de la teneur en eau, de la taille des particules, du processus et du temps de traitement (Castro-Alba et al.

2019). La faible solubilité du complexe acide phytique/minéraux empêche alors l'absorption de ces minéraux au niveau de l'intestin. (Harland et Harland, 1980). L'acide phytique peut également former des complexes avec les protéines, les lipides et les glucides (Kumar et al. 2010).

## 2. Enzymes de dégradation de l'acide phytique : les phytases

L'acide phytique peut être dégradé par des enzymes. Les phytases ou myo-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate phosphohydrolases (EC : 3.1.3.26 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 2019)) constituent un sous-groupe de la famille des phosphatases acides. Ces enzymes hydrolysent l'acide phytique ainsi que les phosphates d'inositol inférieur avec une affinité et une efficacité différentes selon leur origine (Schlemmer et al. 2009). Ces phosphates d'inositol sont dits inférieurs, car ils contiennent un nombre plus faible de groupements phosphates, tels que le pentaphosphate d'inositol (IP5), le tétraphosphate d'inositol (IP4), le triphosphate d'inositol (IP3) et éventuellement les di et monophosphates d'inositol (IP2 et IP1) (Burbano et al. 1995).

Les animaux et les humains sont une source de phytases qui sont générées de façon endogène par la muqueuse de l'intestin grêle et la microflore associée au gros intestin (Kumar et al. 2010). Des études menées chez l'homme ont mis en évidence que l'acide phytique était dégradé pendant la digestion gastro-intestinale (Schlemmer et al. 2009). Cependant, il est démontré que cette activité phytase de la muqueuse intestinale reste très faible chez l'homme et qu'elle ne conduit pas à une dégradation significative de l'acide phytique pour des personnes ayant un régime alimentaire de type occidental (Sandberg et Andlid, 2002). La dégradation des acides phytiques dans l'estomac et l'intestin grêle est le résultat de l'activité des phytases alimentaires d'origine végétale ou microbienne (Sandberg et Andlid, 2002). Les phytases sont naturellement présentes dans les plantes et dans certains microorganismes. Les phytases microbiennes présentent généralement une plus grande activité catalytique que les phytases végétales (Kłosowski et al. 2018). Cependant, il reste difficile de trouver des phytases thermostables, actives à pH acide, avec une large spécificité de substrat et une activité spécifique élevée (Vats et Banerjee, 2004).

Les phytases sont par définition des enzymes capables d'hydrolyser l'IP6 en IP5 et en phosphate inorganique (Pi) (Figure 2). Elles initient l'élimination progressive des groupes phosphate de l'IP6 (Figure 2). En règle générale, les phytases ne sont pas spécifiques de l'IP6, ce qui mène à l'hydrolyse de myo-inositol intermédiaires (IP5 à IP1), par des déphosphorylations en cascade jusqu'à la libération de myo-inositol libre (Sandberg et Andlid, 2002).

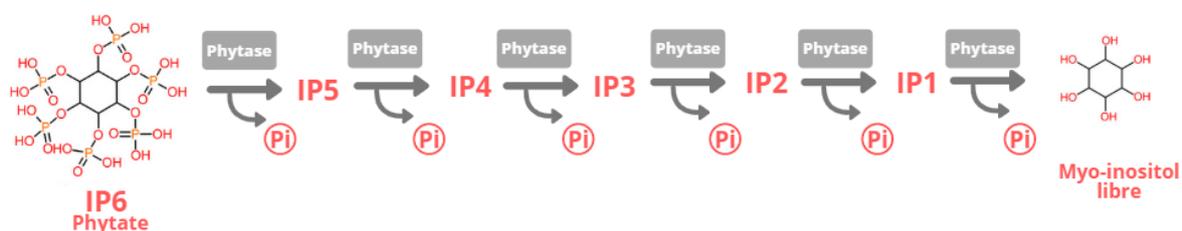


Figure 2 – Schéma résumant l'action des phytases sur l'acide phytique et les phosphates d'inositol inférieurs, entraînant la libération de phosphate inorganique (Pi). Inspiré de (Burbano et al., 1995; Sandberg et Andlid, 2002)

La phytase est d'une grande importance nutritionnelle. Elle permet de diminuer la force de liaison entre l'acide phytique et le minéral, et augmente ainsi la solubilité des complexes (Sandberg et Andlid, 2002). Ceci rend le phosphate disponible pour de nombreux processus biologiques. Cela permet également d'augmenter la biodisponibilité des minéraux alimentaires essentiels, ainsi que celle des protéines et des lipides.

Ces enzymes sont classées selon plusieurs caractéristiques : leur pH d'activité et le site d'initiation de la déphosphorylation de l'acide phytique (Kumar et Sinha, 2018). La déphosphorylation peut être initiée à différentes positions du cycle inositol. Ceci permet de distinguer trois classes de phytases : 3-phytase, 5-phytase et 6-phytase (Tableau 1).

*Tableau 1 - Classification des phytases selon le site d'initiation de l'hydrolyse de l'acide phytique. Inspiré des données de (Kumar et Sinha, 2018)*

	3-Phytase	5-Phytase	6-Phytase
Position sur IP6 à partir de laquelle a lieu la libération de la fraction phosphate	C3	C5	C6
Origine	Principalement dans champignons et bactéries, mais on la retrouve également dans les céréales et les légumineuses Classe la plus répandue	Une seule a été mise en évidence dans du pollen de lys	Dans les racines de tabac. Caractéristique des graines de plantes vasculaires (spermatophytes, angiospermes et ptéridophytes)

Ces caractéristiques d'hydrolyse différentes peuvent mener à différents isomères d'esters de phosphates de myo-inositol inférieurs (Kumar et Sinha, 2018). Les phytases peuvent également être classées selon leur pH optimal d'activité. On retrouve ainsi les phytases acides, neutres ou alcalines, avec un pH respectif d'activité de 5,0 ; 7,0 et 8,0 (Kumar et Sinha, 2018).

Pour une application à l'alimentation humaine, plus acide que basique, les phytases acides sont d'avantage étudiées. La majorité des phytases produites par les champignons et les végétaux présentent deux pH optimaux d'activité : l'un à pH 2,5 et l'autre à pH 5,0 (Schlemmer et al. 2009). Dans les conditions physiologiques de l'intestin à savoir pH 7,2-7,5, les phytases d'origine végétale sont généralement moins stables que celles d'origine fongique, en terme de pH et de température (Greiner et Konietzny, 2006; Sandberg et Andlid, 2002).

Les phytases, végétales comme microbiennes, présentent donc un réel intérêt dans l'alimentation humaine. Depuis quelques années, des efforts importants ont été faits pour réduire la quantité d'acide phytique dans les aliments (Kumar et al. 2010). Dans cette synthèse, nous nous focaliserons principalement sur les méthodes enzymatiques ayant une application alimentaire. L'activité des phytases endogènes des végétaux peut être amplifiée par des procédés de transformation tels que le trempage, le maltage, la germination et la fermentation (Castro-Alba et al. 2019). Si cela n'est pas suffisant, des phytases exogènes isolées peuvent être ajoutées lors de la fabrication des aliments de nutrition animale et humaine (Coban, Demirci 2017).

## **II. L'acide phytique dans l'alimentation**

### **1. Consommation d'acide phytique**

L'acide phytique est présent dans une large variété d'aliments végétaux, en particulier dans les céréales et les légumineuses. Il est fortement présent dans l'alimentation, avec un apport quotidien pouvant aller d'environ 110 à près de 3000 mg pour un adulte (Schlemmer et al. 2009). Cependant, ce taux varie selon les régions géographiques, les types de régime, l'âge et le sexe (Kumar et al. 2010). Généralement, les femmes consomment moins de viande rouge et plus de céréales que les hommes (Sandstead et Freeland-Graves, 2014a). Les apports journaliers moyens de différentes populations sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Toutes les analyses n'ont pas été réalisées par

les mêmes laboratoires et en employant les mêmes méthodes, ce qui peut entraîner des variations de mesure.

*Tableau 2 - Apports journaliers d'acide phytique selon les régimes, zones géographiques et les âges, d'après les données de (Schlemmer et al. 2009)*

Type de régime	Apport d'acide phytique journalier (mg)
<b>Nourrissons :</b>	
- Suède	26 – 189
- Etats-Unis	166
- Egypte	796
- Kenya	1066
<b>Régime omnivore (aliments végétaux et animaux) :</b>	
- Europe (Royaume-Unis, Italie, Suède, Finlande)	230 – 848
- Etats-Unis	750
- Inde	1290 – 2500
- Thaïlande	997 – 1139
- Nigeria	2200
<b>Régime végétarien :</b>	
- Suède	500 – 2927
- Etats-Unis	1250 – 1550

D'après les apports journaliers moyens, on observe des différences importantes entre les pays occidentaux et les pays en voie de développement. Dans les pays occidentaux, les apports journaliers sont faibles, entre 230 et 848 mg (Schlemmer et al. 2009). En Inde ou au Nigeria, où la consommation de légumineuses et de céréales est plus importante, le taux journalier est doublé voir triplé (Tableau 4). Les produits consommés sont généralement moins transformés qu'en Occident et contiennent donc généralement plus d'acide phytique que les produits transformés (Schlemmer et al. 2009). Les populations des pays en voie de développement consomment généralement des aliments avec des apports en minéraux intéressants. Cependant, les fortes concentrations en acide phytique de leurs régimes inhibent leur bonne absorption (Lazarte et al. 2015). Pour chaque 1000 mg d'acide phytique ajouté au régime alimentaire, la quantité de zinc nécessaire à l'homéostasie double (Sandstead et Freeland-Graves, 2014a). Les carences en certains minéraux, tels que le zinc, le fer ou le magnésium, sont courantes dans les pays en voie de développement, mais elles existent aussi dans les pays occidentaux (Leenhardt et al. 2005). Au Bénin, les déficits en zinc et en fer représentent un problème majeur. Une étude de Mitchikpe et al. (2008) a permis d'analyser la composition en acide phytique de 23 des aliments les plus consommés dans ce pays. Les analyses biochimiques ont mis en évidence que les principales sources de zinc (2.2 à 3.4 mg/100g) et de fer (2.6 à 8.4 mg/100g) dans le régime des enfants Béninois sont le maïs, le sorgho et le millet. Cependant, ces aliments présentent des taux très élevés d'acide phytique (104 à 503 mg/100g) et ont donc une pauvre biodisponibilité en minéraux. Pour améliorer la composition de ces aliments, le maltage et la fermentation semblent être les procédés les plus adéquats, mais ils ne conviennent pas à tous les aliments, car ils modifient les caractéristiques organoleptiques (Mitchikpe et al. 2008).

Pour les nourrissons, les observations sont les mêmes que pour celles des adultes. On observe des taux entre 26 et 189 mg dans les pays occidentalisés contre 796 et 1066 mg en Egypte et au Kenya (Schlemmer et al. 2009). Les écarts entre le taux ingérés par les adultes et les nourrissons peut certainement s'expliquer par les différences de quantités d'aliments consommés. Au Cameroun, les mères sont encouragées à ajouter des produits animaux, tels que des poissons peu coûteux, à l'alimentation de leurs nourrissons pour augmenter l'apport en minéraux et en nutriments. On leur recommande également la germination, la fermentation, ou l'ajout d'arachides et de soja dans les repas (Kana Sop et al. 2012).

Ces dernières années, le régime végétarien s'est largement popularisé. Avec une consommation majoritaire de céréales, légumineuses, graines oléagineuses et fruits à coques, ce type de régime entraîne une consommation excessive d'acide phytique et une faible biodisponibilité des oligo-éléments. De nombreux végétariens sont sujets à des syndromes de malabsorption et à des déficiences nutritionnelles (Famularo et al. 2005). En Suède, les apports journaliers en acide phytique des végétariens peuvent frôler les 3000 mg par jour (Tableau 4) (Schlemmer et al. 2009).

La consommation journalière d'acide phytique est donc très variable d'un individu à l'autre. Certaines populations sont cependant plus enclines à absorber d'importantes quantités d'acide phytique, telles que les végétariens ou les populations des pays en voie de développement. Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à la composition en acide phytique d'une variété d'ingrédients.

## 2. Concentration en acide phytique dans différentes graines de céréales, de légumineuses et leur activité phytase

Les céréales et les légumineuses sont les aliments contenant les plus forts taux d'acide phytique, avec des valeurs généralement comprises entre 1,42 et 20,70 mg/g (Lazarte et al. 2015). Ces concentrations sont souvent plus importantes pour les légumineuses que les céréales. Les arachides sont également concentrées en acide phytique (2,0 à 19,7 mg/g) (Tableau 5). Les racines et les tubercules connaissent, elles, des concentrations plus faibles (de 0,77 à 4,27 mg/g) (Lazarte et al. 2015). De nombreuses plantes possèdent naturellement des phytases comme c'est le cas du blé, du riz, du colza, du soja, du maïs et du seigle (Kumar et Sinha, 2018).

Les teneurs en acide phytique de différents ingrédients et les optimums de température et de pH pour l'activité des phytases endogènes sont présentés dans le tableau 5.

*Tableau 3 - Contenu en acide phytique des diverses céréales, légumineuses, arachides et tubercules (en mg/g de matière sèche)*

Aliment	Acide phytique (mg/g de poids sec)	Température d'activité de la phytase (°C)	pH d'activité de la phytase	Source	
<b>Céréales</b>	Maïs	7,2 – 22,2	55	5	(Kumar et Sinha, 2018; Schlemmer et al., 2009)
	Blé	3,9 – 13,5	45 – 50	5 – 7,2	(Kumar et Sinha, 2018; Schlemmer et al., 2009)
	Avoine	4,2 – 11,6	38	5	(Kumar et Sinha, 2018; Schlemmer et al., 2009)
	Millet	1,8 – 16,7	N/A	N/A	(Schlemmer et al. 2009)
	Seigle	5,4 – 14,6	45	6	(Kumar et Sinha, 2018; Schlemmer et al., 2009)
	Riz blanc (cuit)	1,2 – 3,7	N/A	N/A	(Greiner et Konietzny, 2006)
	Riz complet (cuit)	12,7 – 21,6	N/A	N/A	(Greiner et Konietzny, 2006)
	Sorgho	5,9 – 11,8	N/A	N/A	(Greiner et Konietzny, 2006)
	Orge	3,8 – 11,6	N/A	N/A	(Schlemmer et al. 2009)
	Quinoa	2,1 – 9,7	30	6,4 – 6,5	(Lazarte et al. 2015; Castro-Alba et al. 2019)

<b>Légumineuses</b>	Lentille (cuite)	8,3 – 13,4	N/A	N/A	(Greiner et Konietzny, 2006)
	Pois chiche (cuit)	2,9 – 11,5	N/A	N/A	(Greiner et Konietzny, 2006)
	Pois	2,2 – 12,2	N/A	N/A	(Schlemmer et al. 2009)
	Haricot rouge (cuit)	8,3 – 13,4	N/A	N/A	(Greiner et Konietzny, 2006)
	Soja	9,2 – 22,2	55 – 58	4,5 – 5	(Greiner et Konietzny, 2006; Kumar et Sinha, 2018; Schlemmer et al., 2009)
	Fève (cuite)	8,2 – 16,0	50	5	(Greiner et Konietzny, 2006; Kumar et Sinha, 2018; Mattila et al., 2018)
	Lupin	6,3 – 10,0	50	5	(Kumar et Sinha, 2018; Mattila et al., 2018)
<b>Arachides</b>	Amande (crue)	3,5 – 9,6	N/A	N/A	(INFOODS: FAO/INFOODS Databases)
	Noisette	2,3 – 9,2	N/A	N/A	(Schlemmer et al. 2009)
	Cacahuète (crue)	9,2 – 19,7	55	5	(Greiner et Konietzny, 2006; Kumar et Sinha, 2018)
	Noix	2,0 – 10,0	N/A	N/A	(INFOODS: FAO/INFOODS Databases)
<b>Racines et tubercules</b>	Taro (cru)	0,4 – 1,4	N/A	N/A	(INFOODS: FAO/INFOODS Databases [sans date])
	Manioc (cuit)	0,6 – 1,6	N/A	N/A	(INFOODS: FAO/INFOODS Databases [sans date])

N/A : valeur non disponible

La dégradation de l'acide phytique varie fortement d'un microorganisme, ou d'un végétal à l'autre (Kumar et al. 2010). Les mesures de l'activité phytase doivent être réalisées dans des conditions bien définies, en termes de pH, de température, et de durée. L'activité des phytases s'exprime en unité d'activité phytase, qui peut se définir de différentes manières. Elle peut être décrite comme « la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol de P inorganique par minute à partir d'une solution d'acide phytique de sodium à 0,0015 mol/L à pH 5,5 et 37°C » (Kumar et Sinha, 2018). Egli et al., (2002) l'exprime comme l'activité enzymatique qui libère 1 µmol de P inorganique par minute. Cette activité peut être déterminée de deux manières : soit en analysant le substrat et la concentration d'acide phytique ; soit en analysant les produits de dégradation, c'est-à-dire le phosphate. Les méthodes utilisées sont principalement colorimétriques (Coban et Demirci, 2017). Sans traitement (de type trempage ou germination), le seigle, le blé et sarrasin possèdent les phytases les plus actives (6,92 ; 3,08 et 2,90 PU/g de matière sèche) que le quinoa (Tableau 3). Les pois chiches, le riz, l'avoine et le maïs (0,62 ; 0,19 ; 0,14 et 0,13 PU/g de matière sèche) ont, eux, une activité phytase moins importante (Egli et al. 2002). La température optimale d'activité de ces phytases végétales se situe entre 45 et 58 °C à un pH entre 4,5 et 7,2 (Tableau 5).

### 3. Produits alimentaires et acide phytique

Bien que les matières brutes soient généralement plus riches en acide phytique, les aliments issus de leur transformation peuvent eux aussi en contenir. Le tableau 6 suivant répertorie les concentrations en acide phytique des farines et pains issus de certaines céréales.

Tableau 4 - Taux d'acide phytique (mg/g de matière sèche) dans différentes variétés de farines et de pains. Valeurs issues de (INFOODS: FAO/INFOODS Databases)

Céréale	Taux d'acide phytique dans la farine (mg/g de matière sèche)	Taux d'acide phytique dans le pain (mg/g de matière sèche)
<b>Blé raffiné/blanc</b>	1,2 – 2,3	0,2 – 1,6
<b>Blé complet</b>	5,4 – 11,5	1,7 – 4,0
<b>Maïs</b>	2,1 – 8,0	0,2 – 2,2
<b>Riz blanc</b>	2,1	N/A
<b>Riz complet</b>	N/A	4,1 – 5,5

N/A : valeur non disponible

Les concentrations en acide phytique du blé, du maïs et du riz transformés sont plus faibles (0,2 – 5,5 mg/g de matière sèche) que les valeurs obtenues pour les céréales brutes (1,2 – 22,2 mg/g de matière sèche (Tableau 3)). Les taux d'acide phytique sont systématiquement plus faibles pour les pains (0,2 – 5,5 mg/g) que pour les farines (1,2 – 11,5 mg/g), ce qui confirme le potentiel de dégradation de l'acide phytique induit par la fermentation. Les aliments à base de blé complet sont plus riches en acide phytique (5,4-11,5 et 1,7-4,0 mg/g) que ceux au blé raffiné (1,2-2,3 et 0,2-1,6 mg/g). Depuis quelques années, la consommation de produits à base de blé complet augmente en France. Il est donc important d'encourager les particuliers et les boulangers à augmenter la quantité de levain ou le temps de levage lors de la fabrication de pain (Harland et Harland, 1980). Ceci permettra de réduire les teneurs en acide phytique pour ne pas affecter la biodisponibilité des minéraux (Lopez et al. 2001).

Des aliments fermentés sont produits partout dans le monde. On retrouve des mets traditionnels, consommés localement (Tempeh au Japon, Togwa en Afrique), mais également des recettes devenues des références dans le monde entier (sauce soja, tofu). Ces aliments peuvent être produits à travers les cinq méthodes de fermentation qui seront évoquées en partie 4 : alcoolique, lactique, acétique, alcaline et propionique. Pour la majorité des aliments, les microorganismes impliqués et leur diversité ne sont pas connus, mais les fermentations sont généralement mixtes, avec des levures, des bactéries et des champignons (Blandino et al. 2003). Les pays d'Asie et d'Afrique sont les principaux consommateurs d'aliments fermentés. De très nombreux aliments sont issus de la fermentation du soja par des moisissures telles que *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oligosporus* (Cai et al. 2014). Ces microorganismes permettent une réduction importante de l'acide phytique dans le tempeh (4,3-6,2 mg/g), le jus de soja (0,3-2,1 mg/g) et le tofu (0,9-4,1 mg/g) (INFOODS: FAO/INFOODS Databases) par rapport aux valeurs contenues dans la graine de soja (9,2 – 22,2) (Tableau 6). En Inde, le chapathu préparé à partir de farine de blé complet est un aliment largement consommé (Kumar et Sinha, 2018). Sa très importante teneur initiale en acide phytique peut être réduite à 40% par l'ajout de *Candida versatilis* comme source de phytase pendant la préparation de la pâte (Kumar et Sinha, 2018).

### **III. Impact de l'acide phytique sur la santé**

La principale caractéristique de l'acide phytique est sa forte capacité de chélation des nutriments. Cette chélation entraîne une diminution de la biodisponibilité des nutriments qui peut entraîner d'importants problèmes nutritionnels.

#### **1. Problèmes nutritionnels rencontrés**

##### **a. Effet sur l'absorption des minéraux**

Dans le monde entier, des problèmes de carences en minéraux existent. On observe cependant une prévalence dans les pays en voie de développement et chez les végétariens/végétaliens. L'acide phytique est l'une des premières causes de malabsorption des minéraux (fer, calcium, zinc, magnésium, manganèse et cuivre) (Fredlund et al. 2006). En formant des complexes avec les minéraux, l'acide phytique diminue leur solubilité et leur accessibilité au niveau de l'intestin s'amointrie (Priyodip et Balaji, 2019). Dans cette synthèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux effets sur l'absorption du fer, du calcium et du zinc.

##### **➤ Fer**

D'après l'OMS, « La carence en fer est le trouble nutritionnel le plus commun et le plus répandu au monde » (OMS 2019). Plus de 30% de la population mondiale en est atteinte. Cette carence touche à la fois les populations des pays en voie de développement, mais également les pays industrialisés. Souvent asymptomatique, il est souvent difficile de la diagnostiquer, mais elle peut avoir des graves répercussions sur la santé. L'étude de l'inhibition de l'absorption du fer a pu mettre en évidence une relation dose-dépendante. Une élimination de l'acide phytique permet une augmentation significative de l'absorption du fer et un ajout d'acide phytique entraîne à nouveau une inhibition de son absorption (Hallberg, et al. 1989). L'acide phytique est la cause principale de l'inhibition, mais les carences peuvent également être provoquées par des besoins accrus en fer lors de la grossesse, des apports alimentaires insuffisants ou par un syndrome de malabsorption (Lopez et al. 2002). Une très faible concentration en acide phytique (moins d'1  $\mu\text{mol/g}$ ) est nécessaire à l'inhibition de l'absorption du fer (Sandberg et Svanberg, 1991). Pour observer une véritable amélioration de la solubilité du fer, cette concentration doit être quasiment nulle (Sandberg et Andlid, 2002). Une dégradation complète des IP6 et IP5, dans la farine de blé complet et de seigle par les phytases, favorise l'augmentation de la solubilité du fer de 3 à 53% pour le blé et 5 à 21% pour le seigle (Sandberg et Svanberg, 1991). Les IP3 et IP4 ont également un impact négatif sur la solubilité du fer et leur dégradation permet une amélioration de l'absorption (Sandberg et Andlid, 2002). Pour prévenir les anémies ferriprives, la réduction de l'acide phytique dans les produits alimentaires est nécessaire. Il est également conseillé aux individus ayant un régime à forte teneur en acide phytique d'augmenter leur consommation d'aliments riches en acides organiques pour contrer les effets de l'acide phytique (Zhou et Jr, 1995).

##### **➤ Calcium**

Minéral le plus abondant de l'organisme, le calcium joue un rôle essentiel sur la santé humaine. Il est impliqué dans de très nombreux processus métaboliques, comme la contraction musculaire, la coagulation ou encore la prolifération cellulaire (OMS 2011). La biodisponibilité du calcium est contrôlée par des facteurs intrinsèques (âge, sexe, grossesse...) et extrinsèques (alimentation : lactose, sel, protéines, alcool, caféine...) (Lopez et al. 2002). 50 à 80% du calcium alimentaire provient des produits laitiers et 25% est issu des végétaux (OMS 2019). Des apports alimentaires trop faibles peuvent entraîner une déminéralisation osseuse importante et un risque d'ostéoporose (OMS 2011). Ces dernières années, la consommation des jus végétaux connaît une croissance importante, surtout

chez certains individus (femmes pré-ménopausées, végétariens, intolérants au lactose...), au détriment des produits laitiers. Souvent, ces jus sont fortifiés en calcium pour atteindre des valeurs nutritionnelles proches du lait de vache. Cependant, les concentrations importantes d'acide phytique contenues dans ces boissons peuvent compromettre cet apport (Tang et al. 2010a). L'acide phytique dans l'alimentation inhibe l'absorption du calcium dans l'intestin grêle en formant des complexes insolubles. En plus de diminuer la biodisponibilité du calcium, ces complexes contribuent également à la réduction de la biodisponibilité des autres minéraux qui peuvent s'y lier et former des complexes encore plus insolubles (Zhou et al., 1995). La solubilité des complexes augmente avec la déphosphorylation de l'acide phytique en phosphates d'inositol inférieurs. Une étude menée par Tang et son équipe (2010a), met en évidence que la fermentation par des *Lactobacilles* du jus de soja fortifié avec du calcium permet une augmentation de la solubilité du calcium jusqu'à 89,3% en 24 h. Cette amélioration de la solubilité est principalement liée à la diminution du pH due à la production d'acide acétique et d'acide lactique (Tang et al. 2010a). Ces complexes sont solubles à pH acide et insolubles au-dessus d'un pH de 6 (Grynspan et Cheryan, 1989).

### ➤ Zinc

Une étude réalisée par Sandstead et Freeland-Graves (2014b), sur la relation entre l'acide phytique et les carences en zinc, met en évidence que le déficit en zinc touche une personne sur cinq. Ces déficits sont liés à la fois à une consommation trop faible d'aliments riches en zinc biodisponible, mais également à une trop forte ingestion de produits riches en acide phytique (Sandstead et Freeland-Graves, 2014a). Le seuil de danger n'est pas connu, et les premiers effets de cette carence sont donc difficiles à détecter. Cependant les conséquences peuvent être très graves et toucher : l'expression génétique, le développement du fœtus, la croissance de l'enfant et de l'adolescent, la capacité de cicatrisation, l'immunité, la résistance au stress oxydatif et à l'inflammation, le développement du cerveau et la fonction neuropsychologique (Sandstead et Freeland-Graves, 2014a). Une corrélation a été établie entre la consommation par la mère d'aliments riches en acide phytique et/ou pauvre en zinc et l'apparition de malformations fœtales (Zhou et al., 1995). Les effets inhibiteurs de l'acide phytique peuvent être prédits par le rapport molaire acide phytique zinc. Un rapport supérieur à 15 est néfaste à l'absorption du zinc (Lopez et al. 2002). Les phosphates d'inositol avec un degré élevé de phosphorylation, IP5 et IIP6, sont responsables de cette inhibition et le calcium a tendance à l'amplifier. En effet, des taux élevés de calcium (>1 g par jour) ont un impact négatif sur l'utilisation par le corps du zinc alimentaire, en formant des complexes calcium-acide phytique-zinc encore moins solubles que les complexes zinc-acide phytique (OMS, 2011; Zhou et al., 1995). Les protéines alimentaires peuvent, elles, améliorer la biodisponibilité du zinc en empêchant sa précipitation dans la lumière intestinale (Lopez et al. 2002).

#### **b. Effet sur les macronutriments**

L'acide phytique pourrait également créer des interactions négatives avec certains macronutriments que sont les protéines et les glucides. Ces effets restent cependant à prouver sur la santé humaine. A des valeurs de pH inférieures au point isoélectrique des protéines, l'acide phytique forme de puissants complexes avec certaines protéines (Kumar et al. 2010). Ces complexes insolubles sont moins susceptibles d'être dégradés par les enzymes protéolytiques et digestives. L'acide phytique est aussi capable de complexer les glucides via des ponts hydrogènes et d'affecter leur digestibilité. Cela entraîne une réduction de l'indice glycémique (Kumar et al. 2010).

Les nombreuses recherches effectuées ont permis de prouver les capacités anti-nutritionnelles d'acide phytique. Cependant, depuis quelques années, des chercheurs ont mis en évidence le potentiel bénéfique de cette substance sur la santé humaine.

## 2. Bénéfices liés à sa consommation

### a. Propriétés antioxydantes

La caractéristique la plus intéressante de l'acide phytique est sa capacité antioxydante. En chélatant fortement le fer, l'acide phytique l'empêche d'interagir avec le peroxyde d'hydrogène. Le fer est complexé entre trois groupes phosphates et les autres ligands, de plus faible affinité, ne peuvent s'y fixer. La formation de radicaux hydroxylés est alors inhibée (Buades Fuster et al. 2017), et les chances de peroxydation des lipides par le fer sont également réduites (Kumar et al. 2010). Cette inhibition de la formation de radicaux libres peut avoir lieu dans les aliments eux-mêmes ou après ingestion, dans le tractus gastro-intestinal. Bien que des capacités antioxydantes *in vitro* aient été mises en évidence, des études sur l'homme sont encore nécessaires pour affirmer l'impact bénéfique de l'acide phytique sur la santé humaine (Buades Fuster et al. 2017). Cette protection des dommages oxydatifs par l'acide phytique pourrait avoir une application thérapeutique (Zhou et Jr, 1995).

### b. Agent anti cancéreux

L'acide phytique est régulièrement étudié pour ses activités anticancéreuses, notamment au travers de ses capacités antioxydantes (Kumar et al. 2010). Ses activités ont été démontrées dans le cas de nombreux cancers différents, comme celui du côlon, des poumons, du sein, du pancréas, de la prostate, de la peau, ou encore des tissus mous (Schlemmer et al. 2009). Les populations végétariennes connaissent une incidence plus faible du cancer, due notamment à une consommation plus importante de l'acide phytique (Kumar et al. 2010). L'IP6 possède un double rôle anticancéreux, en diminuant la prolifération cellulaire et en augmentant la différenciation des cellules malignes avec un retour au phénotype normal de certaines lignées de cellules (Shamsuddin 2002). Une étude menée chez le rat, montre l'effet du Na-IP6 sur l'incidence du cancer du côlon (Shamsuddin, Elsayed, Ullah 1988). De l'eau phytatée à 1% est donnée à boire à des rats. Une semaine plus tard un cancer du côlon est provoqué chez les animaux. L'incidence du cancer chez les rats ayant consommé de l'eau contenant de l'acide phytique est diminuée de 34,7% par rapport aux rats contrôles (Shamsuddin, Elsayed, Ullah 1988). Les capacités antioxydantes de l'acide phytique pourraient entraîner une réduction favorable de la formation de radicaux hydroxyle dans le côlon. Somasundar et son équipe (2005) ont évalué les effets de l'IP6 sur la cancer du pancréas *in vitro*. Ils ont démontré que l'IP6 réduisait significativement la croissance cellulaire (de 37,1 à 91,5% de réduction) et entraîné une augmentation de l'apoptose (Somasundar et al. 2005). Bien que les capacités anticancéreuses aient été étudiées et mises en évidence sur des modèles animaux, il est nécessaire de poursuivre les recherches sur l'homme.

### c. Prévention des lithiases rénales

La lithiase rénale est une pathologie, en constante augmentation dans les pays occidentaux, qui touche 10% de la population en France (Champy, Traxer, Mozer 2016). On observe la formation de calculs sur les surfaces internes des reins, des dépôts durs de sels et d'acides (Kumar et al. 2010). Cette prévalence de la maladie dans les pays industrialisés s'explique notamment par la consommation plus importante des produits plus transformés, moins riches en fibres et en acide phytique (Zhou et Jr, 1995). Des études ont mis en évidence l'efficacité de l'acide phytique contre certains types de calculs. Il interfère dans la formation des cristaux d'oxalate et de phosphate de calcium (Kumar et al. 2010). L'excrétion urinaire d'acide phytique des individus sujets aux calculs rénaux est plus faible que celle des individus sains, ce qui démontre l'implication de l'acide phytique et son potentiel rôle dans la diminution de la lithiase (Buades Fuster et al. 2017; Kumar et al. 2010).

Malgré ses fortes capacités anti-nutritionnelles, l'acide phytique présente des effets bénéfiques contre le développement de certaines pathologies. Cependant, la majorité des études sur le sujet ont

été réalisée *in vitro*, ou sur des modèles animaux. De plus, l'acide phytique utilisé dans les études était pur, et non compris dans une matrice complexe, tel qu'on le trouve dans les légumineuses, ou le pain. Des recherches plus approfondies sur l'homme sont donc nécessaires pour affirmer le rôle préventif et thérapeutique de l'acide phytique.

#### **IV. Méthodes pour réduire l'acide phytique dans l'alimentation**

##### **1. Optimisation de la déphosphorylation par les phytases endogènes des végétaux**

La déphosphorylation de l'acide phytique est essentielle à l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments, pour permettre une biodisponibilité accrue des minéraux (Kwon et al. 2014). Pour cela, il est nécessaire d'augmenter l'activité des enzymes présentes dans les aliments en connaissant leurs conditions optimales d'activité (Kumar et al. 2010). Ces conditions varient selon les végétaux et les procédés mis en jeu (Sandberg et Andlid, 2002).

###### **a. Trempage**

Le trempage est une méthode de prétraitement que l'on fait subir aux légumineuses et aux céréales avant des traitements comme le maltage ou la germination (Schlemmer et al. 2009). Les graines sont mises à tremper dans un milieu à une température et un pH contrôlés. Ce prétraitement peut être de courte durée (15-20 minutes) ou de longue durée (12-16 heures) (Schlemmer et al. 2009). La réduction de la quantité d'acide phytique est liée à la fois à la solubilité de l'acide phytique dans l'eau mais également au renforcement de l'activité des phytases endogènes (Kumar et al. 2010). Dans des conditions optimales de température et de pH pour les phytases, l'acide phytique peut être réduit efficacement par trempage (Schlemmer et al. 2009). Il a été établi qu'une température entre 45 et 65 °C et des valeurs de pH comprises entre 5,0 et 6,0 étaient optimales (Greiner et Konietzny, 1999). Une étude menée par Sandberg et Svanberg (1991) montre une dégradation totale du contenu en IP6 et IP5 dans le son de blé en 2 heures de trempage dans des conditions optimales. En revanche, seule une réduction de 45% est observée pour les échantillons d'avoine, même après 17 heures de trempage (Sandberg et Svanberg, 1991).

###### **b. Germination et maltage**

La germination, aussi appelée maltage est un processus au cours duquel la graine devient une plante. Pour croître et devenir des plantes, les graines utilisent l'acide phytique comme source de phosphate (Schlemmer et al. 2009). L'acide phytique est alors dégradé par les phytases endogènes. Pendant la phase de germination, une augmentation considérable de l'activité des phytases intrinsèques est observée dans la plupart des légumineuses et dans certaines céréales (maïs, millet, sorgho...) (Gibson et al. 2006). L'activité des phytases varie fortement en fonction de l'espèce et de la variété. Ces variations dépendent également du stade de germination, du pH, de la température (Egli et al. 2003). Le maïs et le sorgho ont, par exemple, une activité phytasique endogène plus faible que le seigle, le blé, et le sarrasin (Gibson et al. 2006). Une étude menée par Egli et al. (2002) et réalisée sur les céréales, légumineuses et oléagineux, montre une diminution de la teneur en acide phytique de toutes les céréales et plantes pendant la germination, sauf pour l'avoine, le sarrasin et le niébé pour lesquels la teneur en acide phytique semble augmenter (102% à 107%). Les diminutions les plus importantes ont été observées chez le riz, le millet et le haricot mungo (66%, 56% et 50%) (Egli et al. 2002). Des méthodes existent pour optimiser l'élimination de l'acide phytique par germination. Il est, par exemple, conseillé d'allonger la période de germination, de précéder ce procédé d'un broyage ou d'un trempage du germe ou encore de réaliser une incubation post germination (Schlemmer et al. 2009).

### c. Fermentation

La fermentation est utilisée pour la transformation et la conservation des aliments depuis de nombreux siècles (Schlemmer et al. 2009). C'est une méthode microbienne et enzymatique de transformation des aliments qui permet de prolonger la durée de conservation ou encore une amélioration des propriétés sensorielles, un accroissement de la sécurité alimentaire (Kumar et al. 2010; Castro-Alba et al. 2019). De nombreux végétaux sont utilisés pour préparer des aliments fermentés, et on distingue quatre méthodes de fermentation : alcoolique, lactique, acétique et alcaline (Tableau 2) (Blandino et al. 2003).

*Tableau 5 – Présentation des différentes méthodes de fermentation. Inspiré des données de (Blandino et al. 2003), de (Parkouda et al. 2009), de (Yang et al. 2018) et de (Wang et Fung, 1996)*

Type de fermentation	Procédé	Usage	Microorganismes	Impact sur le pH
<b>Alcoolique</b>	Production d'éthanol	Vins, bières	Levures	
<b>Lactique</b>	Production d'acide lactique	Pain, lait fermenté, yaourt, kimchi, sauce soja, kéfir de lait	Bactéries lactiques, <i>Lactobacillus</i> ; <i>Pediococcus</i> ; <i>Lactococcus</i> ; <i>Streptococcus</i>	Acidification
<b>Acétique</b>	Conversion de l'alcool en acide acétique en présence d'un excès d'oxygène	Vinaigre	Bactéries acétiques, <i>Acetobacter</i>	Acidification
<b>Alcaline</b>	Dégradation des protéines en peptides, acides aminés et ammoniac	Surtout pour aliments traditionnels en Asie et en Afrique : natto et thua-nao, (fermenté à partir de soja), dawadawa (fermenté à partir de caroube)	Bactéries de genre <i>Bacillus</i> : <i>Bacillus subtilis var. natto</i>	Basification
<b>Propionique</b>	Production d'acide propionique et d'acide éthanoïque	Fromages à pâte cuite (Comté, Gruyère, Emmental)	Bactéries propioniques : <i>Propionibacterium</i>	Acidification

Généralement, la fermentation lactique est privilégiée pour la fermentation des céréales et légumineuses. Un abaissement du pH est observé en raison de la production d'acide lactique et acétique par les microorganismes (Blandino et al. 2003). Ces changements de pH fournissent les conditions optimales pour l'activation des phytases végétales endogènes et des phytases microbiennes (Castro-Alba et al. 2019). En fermentant des graines de quinoa cuites avec *Rhizopus oligosporus*, la teneur en acide phytique est réduite de 72% (Castro-Alba et al. 2019). Le pH acide est favorable à l'activité des phytases endogènes des végétaux, ce qui mène à une réduction de l'acide phytique (Sandberg et Andlid, 2002). Les micro-organismes ou de leurs enzymes présents lors de la fermentation peuvent être endogènes et déjà présents dans la matière première qui est fermentée, ou issus de cultures microbiennes ensemencées à escient (Kumar et al. 2010). Les bactéries les plus fréquemment

utilisées pour la fermentation sont des espèces de *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus* (Blandino et al. 2003). Les levures privilégiées sont les *Saccharomyces* et pour les champignons, se sont principalement les *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichothecium* (Blandino et al. 2003). Les propriétés de fermentation sont influencées par source de phytase utilisée et la quantité ajoutée. L'ajout de farine d'orge ou d'avoine malté à une solution nutritive à base d'avoine, entraîne une dégradation moins importante de l'acide phytique que l'ajout de phytases d'*Aspergillus niger* (Marklinder et al. 1995). L'étude du contenu en acide phytique de pseudocéréales (quinoa, canihua et amarante) a montré une dégradation plus importante lors de la fermentation des farines (64-93%) que des graines (12-51%), par *Lactobacillus plantarum* (Castro-Alba et al. 2019). Les phytases de *Lactobacillus* sont souvent privilégiées pour des applications alimentaires. La plupart des LAB dégradant l'acide phytique agissent sur l'acide phytique de calcium, le plus abondant présent dans les aliments à base de céréales et de légumineuses (Tang et al. 2010a). L'acide lactique produit par les lactobacilles joue un rôle important dans la l'amélioration de la solubilité des minéraux complexés par l'acide phytique. La solubilité de ces complexes augmente à pH acide (Famularo et al. 2005).

Une étude réalisée sur 7 souches de LAB a mis en évidence une plus forte activité phytase dans le jus de soja pour les souches *Lactobacillus acidophilus* ATCC4161 (+91%) et *Lactobacillus casei* ASCC290 (+85%). Une augmentation de la solubilité du calcium est alors observée (Tang et al. 2010a).

De nombreuses études se sont focalisées sur la réduction de l'acide phytique dans le pain. Pour faire lever le pain, les boulangers utilisent des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou du levain. Le levain contient principalement des lactobacilles, responsable de l'acidification de la pâte à pain (Lopez et al. 2001). Leenhardt et al. (2005), ont cherché à distinguer l'impact des phytases endogènes de blé et celui des phytases microbiennes ajoutées sur la réduction de la quantité d'acide phytique. Ils ont comparé les capacités de réduction de l'acide phytique de différents types de panifications : levain ; levure ; levain + levure ; pâte acidifiée à l'acide lactique sans ajout d'agent levant ; pâte témoin sans ajout d'agent levant et d'acide. Les résultats montrent une réduction de la teneur en acide phytique variant de 13 à 100% selon le type de pain, avec une réduction plus faible pour les pains sans levain et maximale pour la panification avec le levain. Ils ont mis en évidence une contribution très faible de la levure dans la dégradation de l'acide phytique (Leenhardt et al. 2005). Cette différence de résultat, entre la panification avec et sans levain, est expliquée par une baisse de pH induite par le levain et non observée en présence de la levure. L'acidification est essentielle à l'activité des phytases endogènes du blé. Les résultats obtenus montre que l'acidification par ajout d'acide lactique induit une dégradation de l'acide phytique similaire à celle observée par ajout de levain, ce qui met en évidence le rôle clé du pH de la pâte (Leenhardt et al. 2005). Un pH optimum de 5,5 a été mise en évidence pour l'activité de la phytase endogène du blé, et de 4,6 pour celle de l'avoine et du son de seigle (Leenhardt et al. 2005). En conclusion, la réduction de l'acide phytique lors de la fermentation est principalement due aux phytases endogènes (Castro-Alba et al. 2019). Une acidification significative de la pâte à pain peut suffire à réduire considérablement le taux d'acide phytique, en augmentant l'activité des phytases endogènes. Il faut cependant bien sélectionner les variétés de blé pour obtenir un niveau d'activité des phytases endogènes suffisant (Leenhardt et al. 2005), et ne pas trop acidifier pour conserver des caractéristiques organoleptiques acceptables (Schlemmer et al. 2009).

Les méthodes les plus efficaces pour réduire la teneur en acide phytique des légumineuses et des céréales, sont la germination et la fermentation (Schlemmer et al. 2009). Une étude menée par Rasane et al. (2015), sur des aliments de nutrition infantile, conclut qu'une germination suivie d'une fermentation permet d'améliorer les qualités nutritionnelles d'aliments à base de millet, de sorgho et d'avoine. Pour la bouillie de sorgho blanc et de maïs, une dégradation presque complète de l'acide phytique a été ainsi mise en évidence (Sandberg et Andlid, 2002).

D'autres méthodes permettent une optimisation de la dégradation de l'acide phytique par les phytases endogènes, telles que la cuisson. Des études menées sur le blé et l'orge démontrent également que la torréfaction, à 70°C pendant 2 heures, peut permettre jusqu'à 40% de diminution du contenu en acide phytique (Coban et Demirci, 2017). Cette diminution est attribuée majoritairement à une destruction de l'acide phytique pendant le processus, mais une partie peut être expliquée par la formation de complexes acide phytique/minéraux qui ne peuvent pas être extraits et dosés (Gahlawat 1993). Cependant, une exposition prolongée à la chaleur peut entraîner une inactivation des phytases endogènes (Kumar et al. 2010).

Bien souvent, il est impossible d'éliminer la totalité de l'acide phytique lors de l'action des phytases endogènes (Carnovale, Lugaro, Lombardo-Boccia 1988). Si l'activité phytase endogène est faible ou difficile à optimiser, l'ajout de phytases exogènes est également une méthode courante d'élimination de l'acide phytique.

## 2. Ajout de phytases exogènes isolées

L'ajout de phytase exogène est principalement utilisé pour les produits alimentaires dérivés des céréales et des légumineuses (Coban et Demirci, 2017). Des phytases microbiennes sont disponibles sur le marché et peuvent être ajoutées pendant la transformation des aliments (Kumar et al. 2010). La première phytase commerciale, utilisée en alimentation animale chez les monogastriques, Natuphos (BASF), a été mise sur le marché en 1991, elle était issue d'*Aspergillus Nige* (Kumar et al. 2010). Pour résister aux procédés de transformation industriels, les phytases ajoutées doivent être très résistantes aux hautes températures et aux variations de pH (Kumar et al. 2010). Les microorganismes sélectionnés doivent être non-pathogènes et doivent être viables dans le tractus gastro-intestinal (Famularo et al. 2005). Jain et Singh (2017) ont mis en évidence une amélioration de la biodisponibilité des nutriments d'aliments pour animaux (farine de blé, farine de maïs et farine de soja) en ajoutant des phytases de *Bacillus subtilis subsp. subtilis* JJBS250 isolées d'un échantillon de sol. La libération de phosphate inorganique est maximale pour la farine de soja (39.52 mg/g) (Jain et Singh, 2017).

Cette supplémentation en phytases isolées de microorganismes présente de nombreux avantages. L'élimination partielle ou totale de l'acide phytique permet une amélioration des qualités nutritionnelles des aliments, notamment en minéraux et en phosphore (Tang et al. 2010a). Les qualités organoleptiques, comme le goût ou la texture peuvent être positivement impactées par l'ajout de phytases microbiennes (Kumar et Sinha, 2018). La fermentation entraîne la formation de composés volatils qui contribuent à un mélange complexe de saveurs (Blandino et al. 2003).

Pour améliorer ce procédé, des préparations de phytases microbiennes ont été développées par biotechnologie (Sandberg et Andlid, 2002). Les gènes des microorganismes codant pour les phytases peuvent être clonés et insérés dans les végétaux afin d'améliorer l'expression des phytases. Les plantes transgéniques sont capables d'exprimer des concentrations de phytases plus importantes que les plantes sauvages (Coban et Demirci, 2017). Le clonage du gène phyA d'*Aspergillus Niger* a permis de multiplier par dix l'activité phytase de la plante par rapport à la souche sauvage (Sandberg et Andlid, 2002). La manipulation de l'expression des gènes peut également cibler l'altération de la biosynthèse ou du transport de l'acide phytique dans les plantes (Perera et al. 2019b). Plus économique et moins contraignant et adaptable à grande échelle (Vats et Banerjee, 2004), cette méthode présente cependant des limites. En modifiant génétiquement les plantes, d'autres conséquences sont à prévoir comme par exemple : une résistance et une viabilité plus faible des cultures, des taux de germination et des rendements plus faibles...

### 3. Microorganismes producteurs des phytases

De très nombreuses sources de phytases existent, mais les sources microbiennes sont les plus prometteuses (Park et al. 2011). Cependant, la sécurité alimentaire de certains microorganismes n'a pas été prouvée ou pour d'autres un risque pour la santé humaine existe. Dans cette partie, nous nous focaliserons uniquement sur les microorganismes ayant des applications alimentaires vérifiées, c'est-à-dire avec une présomption d'innocuité reconnue (QPS) ou un usage dans la cuisine traditionnelle suffisamment connu.

Bien que les phytases soient largement présentes dans la nature, il reste difficile de trouver des phytases adaptables à l'industrie alimentaire. Les phytases utilisées doivent être thermostables, pour permettre une dégradation intéressante de l'acide phytique et leur production ne doit pas représenter un coût trop important. La production de phytases par les microorganismes dépend des conditions de culture et d'isolement des enzymes (Kłosowski et al. 2018). L'immobilisation des phytases sur des supports, tel qu'un milieu de billes d'agarose activées par du N-hydroxysuccinimide, pourraient améliorer leur thermo stabilité (Pandey et al. 2001).

*Tableau 6- Microorganismes producteurs de phytases, et adaptés à une consommation alimentaire. Les microorganismes présentés sont QPS (INRA 2019) ou ont usage traditionnel reconnu.*

	Microorganisme	QPS	Aliment étudié	Température (°C)	pH	Source
<b>Bactéries</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	✓		60	6,0-6,5	(Liu et al. 1998)
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	✓		70	7 – 8	(Coban et Demirci, 2017; Kumar et Sinha, 2018)
	<i>Bifidobacterium lactis</i>		Pain, boisson de soja	N/A	N/A	(Song, El Sheikha, Hu 2019; García-Mantrana, Monedero, Haros 2015)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	✓	Levain	N/A	N/A	(De Angelis et al. 2003)
	<i>Lactobacillus casei</i>	✓	Actimel®, boisson de soja	N/A	N/A	(Haros et al. 2009; García-Mantrana, Monedero, Haros 2015)
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>		Levain	N/A	N/A	(De Angelis et al. 2003)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>		Millet et farine de quinoa, levain	30	6,0	(Castro-Alba et al. 2019)
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	✓	Levain	45 – 50	4,0	(De Angelis et al., 2003; Kumar et Sinha, 2018)
	<i>Lactococcus lactis</i>	✓	Levain	N/A	N/A	(De Angelis et al. 2003)
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	✓		N/A	N/A	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	✓		N/A	N/A		
<b>Levures</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		Pain	N/A	N/A	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	✓	Vin, Farine de millet perlé et de blé raffiné	55 – 60	5,0 – 5,5	(Kłosowski et al., 2018; Pandey et al., 2001; Roopashri et Varadaraj, 2015)
<b>M</b>	<i>Aspergillus ficuum</i>			50-60	4-6	(Pandey et al. 2001)

<i>Aspergillus fumigatus</i>			60	5,0 – 6,0	(Greiner et Konietzny, 2006)
<i>Aspergillus niger</i>		Farine de maïs et de soja	55-63	2,5 – 3,0 et 5,0-5,5	(Liu et al. 1998; Pandey et al. 2001; Marklinder et al. 1995)
<i>Rhizopus oligosporus</i>		Tempeh	55	4,5	(Liu et al. 1998)
<i>Rhizopus oryzae</i>		Farine de colza, tourteau de coco, son de blé	N/A	N/A	(Bogar et al. 2003)

\* pâte de soja fermentée

\*\* boisson issue de la fermentation du lait

\*\*\* légumes lactofermentés

\*\*\*\* alcool de riz

N/A : non disponible

✓ : QPS sur Florilege

Généralement, les conditions optimales pour l'activité des phytases microbiennes se situent dans une gamme de pH entre 4,5 – 6 et de températures entre 45 – 60°C (Liu et al. 1998). Contrairement aux phytases endogènes des végétaux, les phytases microbiennes peuvent permettre une dégradation totale de l'acide phytique (Song et al. 2019). Les phytases fongiques peuvent être privilégiées aux phytases bactériennes pour leur plus grande stabilité et leur activité plus élevée. Cependant, les phytases bactériennes ont une activité sur une plus large gamme de pH et elles sont plus spécifiques du substrat (Song et al. 2019).

### a. Bactéries

L'activité maximale des phytases bactériennes se situe généralement à des pH de 6,0 – 6,5 et à une température autour de 65°C. Leur activité peut être inhibée par la présence de certains ions : Zn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> et Al<sup>3+</sup> (Kumar et Sinha, 2018). Dans une étude menée par De Angelis et al., (2003), l'activité phytase de 12 espèces de bactéries a été analysée. *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 présente la plus forte activité phytase, et cette activité est d'autant plus importante pour les bactéries ayant été cultivées en présence de maltose et de fructose (augmentation de l'activité phytase de 35%) (De Angelis et al. 2003). *Lactobacillus plantarum* possède une activité phytase particulièrement élevée et est notamment utilisé dans la préparation du levain (Tang et al. 2010a; Lopez et al. 2001). Les *lactobacilles* sont également souvent utilisés comme probiotiques dans l'alimentation, ainsi que dans des thérapies médicales, notamment contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Famularo et al. 2005). Ils améliorent la réponse immunitaire (innée et adaptative), et peuvent être utilisées dans le traitement de troubles inflammatoires. Leur production importante de phytase et leur sécurité alimentaire, leur permet d'améliorer les apports nutritionnels de régimes à faible potentiel de biodisponibilité minérale (Famularo et al. 2005). Les lactobacilles permettent également une amélioration des qualités organoleptiques des aliments et un allongement de la durée de conservation (Tang et al. 2010a). Le substrat privilégié des LAB est l'acide phytique de calcium, acide phytique le plus abondant dans les aliments à base de céréales et de légumineuses (Tang et al. 2010b). La dégradation de l'acide phytique de sodium est moins fréquente et ne se produit qu'en présence de calcium (Tang et al. 2010b). Garcia-Mantrana a étudié la fermentation d'une boisson de soja par 7 souches de lactobacilles différentes (2015). La souche de *Lactobacillus casei* BL23 modifiée pour exprimer la phytase de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 permet l'élimination de l'acide phytique la plus importante (90%) (García-Mantrana, Monedero, Haros 2015). Cependant, les Organismes Génétiquement Modifiés sont interdits en France.

Les *Bacillus* présentent également des activités phytases intéressantes, notamment *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 (Kwon, Park, Kwon, K.- H. Kim, et al. 2014). Cette bactérie produit des phytases alcalines, fortement thermostables avec des ions calciums. Ces phytases sont actives sur une large gamme de pH, ce qui permet une application en industrie alimentaire. Des mesures sur du pain fabriqué à partir de farine de blé complet ont permis de mettre en évidence une amélioration de la biodisponibilité minérale du pain lorsque la bactérie était ajoutée (Park et al. 2011). L'utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 dans les jus de soja permet une dégradation de 60% de l'acide phytique en 25 minutes, et une amélioration de la biodisponibilité des minéraux (Kwon, Park, Kwon, K.-H. Kim, et al. 2014). L'introduction d'un gène de phytase de *Bacillus subtilis* dans les plants de tabac permet d'améliorer les performances de croissance (Song, El Sheikha, Hu 2019).

Des souches de *Bifidobacterium* peuvent être utilisées pour la fabrication du pain. Elles permettent une dégradation intéressante de l'acide phytique et ainsi une amélioration du contenu en fer (Song, El Sheikha, Hu 2019).

### **b. Levures**

Parmi les levures, *Saccharomyces cerevisiae* est la souche la plus couramment utilisée dans la production commerciale de phytases (Kumar et Sinha, 2018). Il en existe plus de 10 souches différentes (Sandberg et Andlid, 2002). Cette levure est essentielle pour la production de pain (Kumar et Sinha, 2018). La souche « finarome » est utilisée dans la fabrication de vin, en fermentation submergée (Kłosowski, Mikulski, Jankowiak 2018). L'utilisation de phytase de *Saccharomyces cerevisiae* dans la farine de millet perlé et la farine de blé raffiné a permis une élimination de l'acide phytique de 94% et 100% respectivement (Roopashri et Varadaraj, 2015). Cette phytase présente une activité maximale à pH 5,0 et à 50°C. D'après Fekri et al., (2020), *Kluveromyces marxianus* aurait l'une des capacités de production de phytases les plus élevées.

### **c. Moisissures**

*Aspergillus* est l'une des espèces les plus communes pour la production de phytases industrielles, on retrouve principalement *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger* (Kumar et Sinha, 2018). Ces phytases sont largement utilisées pour leur stabilité dans une large gamme de pH et de températures (Song, El Sheikha, Hu 2019). L'utilisation d'*Aspergillus* dans les farines de maïs et de soja données aux poussins permet une nette amélioration de l'utilisation du phosphore (Kumar et Sinha, 2018). *Aspergillus niger* se présente comme le producteur de phytases fongiques les plus actives (Liu et al. 1998). Son ajout à une solution nutritive d'avoine, fermentée par *Lactobacillus plantarum*, permet une dégradation complète de l'acide phytique, cependant les qualités organoleptiques ne sont pas satisfaisantes (trop amer) (Marklinder et al. 1995). Il est donc nécessaire d'optimiser la quantité de microorganismes ajoutée pour obtenir un équilibre acceptable entre la dégradation de l'acide phytique et le goût. Son utilisation dans la nutrition animale pour des régimes à faible teneur de phosphore permet une augmentation de la biodisponibilité du phosphore de 60% (Coban et Demirci, 2017).

*Rhizopus oligosporus* est utilisé dans la cuisine Indonésienne pour fermenter les graines de soja et produire du tempeh. Cette fermentation permet une amélioration de la digestibilité et des qualités nutritionnelles et gustatives du soja (Liu et al. 1998).

Les microorganismes producteurs de phytases sont donc essentiels pour une dégradation efficace de l'acide phytique et une amélioration satisfaisante du contenu minéral des aliments. L'utilisation de certaines espèces remontent à des centaines d'années dans la cuisine traditionnelle,

d'autres demandent encore à être testées. Des associations de microorganismes, telles que *Lactobacillus plantarum* et *Aspergillus niger* peuvent également être souhaitable pour avoir un effet synergique de la dégradation de l'acide phytique.

## V. Méthodes de dosage de l'acide phytique existantes et leurs avantages et limites

La meilleure connaissance de l'acide phytique, son omniprésence dans le règne végétal et son impact sur la santé rend son dosage indispensable. Il existe diverses méthodes de dosage avec des reproductibilités et des performances différentes. Dans cette synthèse, nous nous focaliserons sur les quatre méthodes les plus courantes que sont : la chromatographie liquide à haute performance, l'hydrolyse enzymatique, la précipitation par le chlorure ferrique et la rétention sur une résine échangeuse d'ions.

### 1. HPLC en phase inverse

La chromatographie liquide à haute performance est la méthode la plus communément utilisée pour le dosage de l'acide phytique. Elle permet une séparation des différents composés de l'échantillon, et donc un dosage séparé de l'acide phytique et de chacun des phosphates d'inositol inférieur. Après l'extraction, la méthode développée par Lehrfeld (1989) utilise une chromatographie échangeuse d'anions SAX (amine quaternaire à base de silice) pour purifier les échantillons, et isoler les IP6, IP5, IP4 et IP3. Les échantillons élués sont ensuite séchés par évaporation par vortex puis, les résidus sont remis en solution et centrifugés. Les surnageants sont ensuite injectés dans un système d'HPLC. La phase stationnaire est une colonne C18 en phase inverse. La différence d'affinité qu'elle possède pour les molécules de l'échantillon permet une séparation des composés. Une phase mobile composée de méthanol, d'eau, d'hydroxyde de tétrabutylammonium, d'acide sulfurique et d'acide formique est conseillée, à un pH compris entre 4,2 et 5,2 (Lehrfeld 1989). Le premier pic obtenu après le front de solvant, et le phosphate d'inositol possédant le moins de groupement phosphate. L'IP6 possède le temps de rétention le plus important (Lehrfeld 1989). Burbano et al., (1995) ont analysé de nombreuses légumineuses par HPLC, en utilisant C18 en phase inverse. La variation des proportions de méthanol dans la phase mobile diminue le temps d'élution et une augmentation du pH augmente le temps de rétention (Burbano et al. 1995). L'IP6 est le phosphate d'inositol principal dans des légumineuses analysées. La dégradation de l'acide phytique dans des aliments à base d'avoine fermenté par *Aspergillus* a également été analysée par HPLC (Marklinder et al. 1995). Selon la source de phytase (farine d'orge, d'avoine, de seigle, de blé et d'*Aspergillus*) une dégradation de l'acide phytique de 72 à 100% est observée (Marklinder et al. 1995).

Le principal intérêt de cette méthode est qu'elle permet de doser de manière distincte les IP6 et les phosphates d'inositol inférieurs. Avec l'HPLC, des matrices complexes peuvent être dosées et elle trouve donc tout son intérêt pour des mesures alimentaires (Burbano et al. 1995). Cependant, le matériel utilisé est très coûteux et demande une main d'œuvre qualifiée. Il s'agit d'une méthode relativement longue, et donc difficile à adopter pour des mesures de routine (McKie et McCleary, 2016). Lehrfeld (1989) a proposé des modifications du procédé pour permettre un temps d'analyse par HPLC de 8 minutes et permettant l'analyse de très faibles quantités d'échantillons (50 mg de blé).

L'acide phytique est retenu lors de son passage dans la colonne par les cations (ions positifs) fixés sur la colonne. Une solution de NaCl à différentes concentrations (0,05 et 0,7 M) permet une élution séparée du phosphate inorganique et de l'acide phytique (Harland et Oberleas, 1987) selon le pallier de sel utilisé.

## 2. Précipitation par le chlorure ferrique

Cette méthode, développée par Wheeler et Ferrel (1971), permet un dosage indirect de l'acide phytique par le fer. Elle consiste à précipiter l'acide phytique sous forme d'acide phytique ferrique. Du chlorure ferrique en excès, mais en quantité connue, est utilisé comme précipitant. L'échantillon est placé au bain marie pendant 45 minutes puis centrifugé. Le précipité d'acide phytique ferrique obtenu est récupéré sous forme de culot et mis en suspension dans du NaOH (1,5N) et est placé au bain-marie 30 minutes. Le précipité de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  est centrifugé et lavé, puis il est dissout dans du  $\text{HNO}_3$  (3,2N) chaud. Le  $\text{HNO}_3$  permet la formation d'un précipité de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ . Du thiocyanate de potassium est ajouté et entraîne une coloration de l'échantillon, les ions  $\text{SCN}^-$  réagissent spécifiquement avec le  $\text{Fe}^{3+}$ . L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 480 nm. A partir du contenu en  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  calculé, le résultat peut être converti en équivalent phosphate. Le ratio moléculaire fer : phosphate est de 4 : 6 (Wheeler et Ferrel, 1971).

Cette méthode a été utilisée par Lee (1990) pour évaluer la teneur en acide phytique du malt de 9 variétés d'orge. Le taux d'acide phytique de l'orge malté est inférieur (diminution de 26%) à celui de l'orge non malté. Les taux variaient de 0,67 à 0,88% pour le malté contre 0,97 à 1,08% pour le non malté (Lee 1990). Mattila et son équipe (2018), ont quant à eux utilisé la précipitation ferrique pour doser l'acide phytique dans les fèves, le lupin, le colza, les graines de lin, de chanvre, de sarrasin et de quinoa (Tableau 3). Les teneurs en acide phytique des oléagineux (colza et lin) sont très élevées comparé aux autres échantillons de l'étude (19 à 35 mg/g). Mais en règle générale, les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur que dans d'autres études (Mattila et al. 2018).

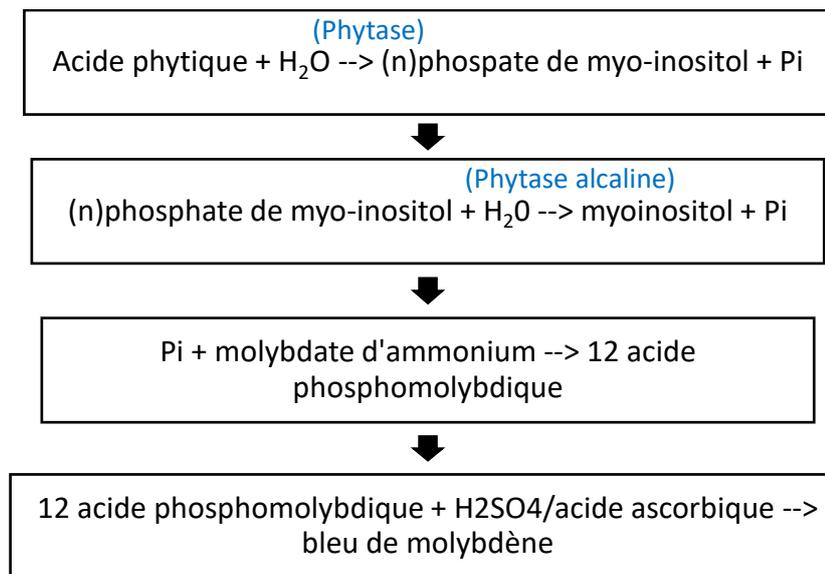
L'un des principaux désavantages de cette technique est qu'il s'agisse d'un dosage indirect et qu'il est nécessaire de retirer tous les précipités avant l'analyse. De faibles teneurs en acide phytique peuvent entraîner des erreurs de dosage (Marquie et al. 1993). De plus, cette technique part du principe que l'acide phytique est la seule source de phosphate dans l'échantillon et qu'une précipitation complète uniquement de l'IP6 se produit (Lehrfeld 1989). Il peut donc y avoir des erreurs dans les résultats. L'acide phytique et les phosphates d'inositol inférieurs ne sont pas différenciés. Et ce dosage fait appel à des substances toxiques comme les ions  $\text{SCN}^-$  par exemple.

## 3. Méthode enzymatique

La méthode de référence pour le dosage par hydrolyse enzymatique du phosphate est celle de Uppstrom et Svensson (1980). Elle est basée sur un dosage spectrophotométrique du contenu en phosphate libre avant et après hydrolyse enzymatique, à une absorbance de 780 nm. L'acide phytique est extrait de l'échantillon par de l'acide trichloroacétique à 15%. Les extraits sont mesurés. L'extrait obtenu est hydrolysé par la phytase isolée du blé, et du phosphate inorganique est libéré et dosé par spectrophotométrie (Lemieux, Amiot, Brisson 1985).

Des kits de dosage ont aujourd'hui été développés afin de tester aisément le contenu en acide phytique de divers végétaux et matrices. Ces kits de test enzymatique permettent un dosage colorimétrique de l'acide phytique libéré, par le bleu de molybdène. Le principe du dosage est présenté dans la figure 3. L'action des phytases permet de libérer les groupements phosphate de l'acide phytique et des phosphates d'inositol inférieurs. Le phosphate libéré interagit avec le molybdate d'ammonium pour former de l'acide phosphomolybdique. Ce complexe phosphomolybdique est réduit

par l'acide ascorbique en présence d'acide sulfurique en bleu de molybdène (MegazymeVideos 2013). La coloration obtenue est mesurée par spectrophotométrie, à 655 nm.



*Figure 3 - Principe du dosage enzymatique de l'acide phytique par le Kit K-PHYT. Inspiré de la vidéo (Libidos 2019; MegazymeVideos 2013)*

Cette méthode présente de nombreux avantages. Elle ne nécessite pas une purification de l'acide par une colonne, comme c'est le cas d'autres méthodes évoquées. Le réactif reste stable des années après leur préparation et le kit inclut un contrôle, de la farine d'avoine (Libidos 2019).

Le dosage de l'acide phytique est essentiel pour établir et améliorer les qualités nutritionnelles des aliments. La chromatographie liquide à haute performance se présente comme la méthode la plus courante et la plus précise. Cependant, son coût et sa technicité peuvent être un frein à son usage. Un dosage par des kits enzymatiques peut être une alternative favorable, relativement couteuse.

## Conclusion et perspectives

Depuis plusieurs dizaines d'années, l'étude de l'acide phytique est devenue essentielle pour les industries alimentaires pour la nutrition animale et humaine, comme pour les professionnels de santé. Présent dans une large variété d'aliments végétaux, d'importantes quantités d'acide phytique sont consommées chaque jour. Puissant agent complexant des minéraux, il entraîne une diminution de la solubilité du fer, du calcium, du zinc, du magnésium et un amoindrissement de leur absorption intestinale. Sa consommation représente une préoccupation majeure pour la santé humaine et son élimination est un passage obligatoire à l'amélioration de l'absorption du contenu minéral des aliments.

L'acide phytique est fortement présent dans l'alimentation, avec un apport quotidien pouvant aller d'environ 110 à près de 3000 mg pour un adulte. La consommation journalière d'acide phytique est très variable d'un individu à l'autre, selon la zone géographique, le régime, le sexe, l'âge. Certaines populations sont plus enclines à absorber d'importantes quantités d'acide phytique, telles que les végétariens ou les populations des pays en voie de développement. Les céréales et protéagineux contiennent les plus fortes concentrations en acide phytique. Bien que les matières brutes soient généralement plus riches en acide phytique, les aliments issus de leur transformation peuvent eux aussi en contenir. Les taux d'acide phytique diminuent avec la transformation des aliments, les pains contiennent de plus faibles quantités d'acide phytique que les farines de céréales.

Le taux d'acide phytique peut être dosé de multiples manières. Certaines méthodes, telles que l'HPLC, permettent une détermination directe du contenu en acide phytique et en phosphates d'inositol inférieurs. D'autres dosent la quantité de phosphate libéré par la dégradation de l'acide phytique de manière colorimétrique. L'HPLC est la méthode la plus précise, mais son coût et sa technicité sont un frein. Le kit de dosage enzymatique, facile et rapide d'utilisation, est une alternative favorable.

La dégradation principale de l'acide phytique se fait de manière enzymatique. Les phytases sont naturellement présentes dans les plantes et l'activité de ces phytases endogènes peut être amplifiée par des procédés de transformation tels que le trempage, le maltage, la germination et la fermentation. Si cela n'est pas suffisant, des phytases exogènes peuvent être ajoutées lors de la fabrication des aliments. Ces phytases ont généralement une origine microbienne, car elles présentent une plus grande activité catalytique que les phytases végétales. Elles peuvent permettre une dégradation totale de l'acide phytique. Les phytases de *Saccharomyces* et *Aspergillus* sont les enzymes fongiques les plus couramment utilisées dans la production commerciale. Pour les phytases bactériennes, celles de *Lactobacillus* sont très largement utilisées. Les phytases fongiques peuvent être privilégiées pour leur stabilité et leur activité plus importante. Cependant, les phytases bactériennes ont une activité sur une plus large gamme de pH et ont une plus grande spécificité.

Très largement pointé du doigt pour son impact négatif sur la santé humaine, des études ont mis en évidence de potentiels bénéfiques liés à la consommation d'acide phytique. Ses capacités antioxydantes, anticancéreuses et de protection contre les lithiases rénales ont été révélées sur des modèles *in vitro*, et/ou animaux. Des études menées sur l'homme sont cependant encore nécessaires pour confirmer ces bénéfices et envisager un usage thérapeutique de cette substance. La balance bénéfices/risques de la consommation d'acide phytique restera également à établir.

La diminution de l'acide phytique alimentaire par les microorganismes est une réflexion majeure de l'industrie alimentaire. La fermentation des aliments par l'ajout de bactéries et/ou de champignons est ancestrale. Elle découle généralement plus de traditions que d'une réflexion scientifique. L'activité phytase de chaque microorganisme est pourtant différente et nécessite des

conditions de température et de pH particulières. Des études concernant l'identification de ces conditions sont en cours, mais doivent être poursuivies pour optimiser leurs capacités dégradations de l'acide phytique. Par ailleurs, des modifications des gènes codants pour les phytases peuvent être envisagées pour accroître leurs applications alimentaires. L'introduction d'acides aminés stabilisants dans la séquence codant pour la phytase, pourraient par exemple permettre une meilleure thermostabilité des enzymes (Vats et Banerjee, 2004).

## Bibliographie :

1. BARMAN, T. E., 1974. *Enzyme Handbook* [en ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. [Consulté le 5 mars 2020]. ISBN 978-3-662-11692-0. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-11691-3>
2. BLANDINO, A., AL-ASEERI, M. E., PANDIELLA, S. S., CANTERO, D. et WEBB, C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*. 2003. Vol. 36, pp. 527-543.
3. BOGAR, B., SZAKACS, G., PANDEY, A., ABDULHAMEED, S., LINDEN, J. C. et TENDERDY, R. P., 2003. Production of Phytase by *Mucor racemosus* in Solid-State Fermentation. *Biotechnology Progress*. 2003. Vol. 19, n° 2, pp. 312-319.
4. BUADES FUSTER, J. M., SANCHÍS CORTÉS, P., PERELLÓ BESTARD, J. et GRASES FREIXEDAS, F., 2017. Plant phosphates, phytate and pathological calcifications in chronic kidney disease. *Nefrología (English Edition)*. 2017. Vol. 37, n° 1, pp. 20-28.
5. BURBANO, C., MUZQUIZ, M., OSAGIE, A., AYET, G. et CUADRADO, C., 1995. Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. *Food Chemistry*. 1995. Vol. 52, n° 3, pp. 321-325.
6. CAI, S., GAO, F., ZHANG, X., WANG, O., WU, Wei, ZHU, S., ZHANG, D., ZHOU, F. et JI, B., 2014. Evaluation of  $\gamma$ -aminobutyric acid, phytate and antioxidant activity of tempeh-like fermented oats (*Avena sativa* L.) prepared with different filamentous fungi. *Journal of Food Science and Technology*. 2014. Vol. 51, n° 10, pp. 2544-2551.
7. CARNOVALE, E., LUGARO, E. et LOMBARDO-BOCCIA, G., 1988. Phytic acid in faba bean and pea : effet on protein availability. *Cereal Chem*. 1988. Vol. 65, n° 2, pp. 114-117.
8. CASTRO-ALBA, V., LAZARTE, C. E., PEREZ-REA, D., CARLSSON, N.-G., ALMGREN, A., BERGENSTÅHL, B. et GRANFELDT, Y., 2019. Fermentation of pseudocereals quinoa, canihua, and amaranth to improve mineral accessibility through degradation of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019. Vol. 99, n° 11, pp. 5239-5248.
9. CHAMPY, C., TRAXER, O. et MOZER, P., 2016. Chapitre 15 - Lithiase urinaire. *Association française d'urologie* [en ligne]. 2016. [Consulté le 5 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.urofrance.org/congres-et-formations/formation-initiale/referentiel-du-college/lithiase-urinaire.html>
10. COBAN, H. B. et DEMIRCI, A., 2017. Chapter 2 - Phytase as a diet ingredient : from microbial production to its applications in food and feed industry. In : *Microbial Production of Food Ingredients and Additives* [en ligne]. Academic Press. pp. 33-55. Handbook of Food Bioengineering. [Consulté le 27 septembre 2019]. ISBN 978-0-12-811520-6. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128115206000027>
11. DE ANGELIS, M., GALLO, G., CORBO, M. R., MCSWEENEY, P. L. H., FACCIA, M., GIOVINE, M. et GOBBETTI, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*. 2003. Vol. 87, n° 3, pp. 259-270.
12. EGLI, I., DAVIDSSON, L., JUILLERAT, M. A., BARCLAY, D. et HURRELL, R. F., 2002. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feedin. *Journal of Food Science*. 2002. Vol. 67, n° 9, pp. 3484-3488.
13. EGLI, I., DAVIDSSON, L., JUILLERAT, M.-A., BARCLAY, D. et HURRELL, R., 2003. Phytic acid degradation in complementary foods using phytase naturally occurring in whole grain cereals. *Journal of Food Science*. 2003. Vol. 68, n° 5, pp. 1855-1859.

14. FAMULARO, G., DE SIMONE, C., PANDEY, V., SAHU, A. R. et MINISOLA, G., 2005. Probiotic lactobacilli : an innovative tool to correct the malabsorption syndrome of vegetarians? *Medical Hypotheses*. 2005. Vol. 65, n° 6, pp. 1132-1135.
15. FEKRI, A., TORBATI, M., YARI KHOSROSHAHI, A., BAGHERPOUR SHAMLOO, H. et AZADMARD-DAMIRCHI, S., 2020. Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food Chemistry*. 2020. Vol. 306, pp. 125620.
16. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I. et PÉREZ-GÁLVEZ, A., 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*. 2009. Vol. 29, n° 11, pp. 751-760.
17. FLORA, S. J.S. et PACHAURI, V., 2010. Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2010. Vol. 7, n° 7, pp. 2745-2788.
18. FREDLUND, K., ISAKSSON, M., ROSSANDER-HULTHÉN, L., ALMGREN, A. et SANDBERG, A.-S., 2006. Absorption of zinc and retention of calcium: Dose-dependent inhibition by phytate. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. mai 2006. Vol. 20, n° 1, pp. 49-57.
19. GAHLAWAT, P, 1993. Antinutritional content of developed weaning foods as affected by domestic processing. *Food Chemistry*. 1993. Vol. 47, n° 4, pp. 333-336.
20. GARCÍA-MANTRANA, I., MONEDERO, V. et HAROS, M., 2015. Reduction of phytate in soy drink by fermentation with *Lactobacillus casei* expressing phytases from bifidobacteria. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2015. Vol. 70, n° 3, pp. 269-274.
21. GIBSON, R. S., PERLAS, L. et HOTZ, C., 2006. Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2006. Vol. 65, n° 2, pp. 160-168.
22. GREINER, R. et KONIETZNY, U., 1999. Improving enzymatic reduction of myo-inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans (*phaseolus vulgaris* var. *preto*). *Journal of Food Processing and Preservation*. 1999. Vol. 23, n° 3, pp. 249-261.
23. GREINER, R. et KONIETZNY, U., 2006. Phytase for Food Application. *Food Technology & Biotechnology*. 2006. Vol. 44, n° 2, pp. 125-140.
24. GRYNSPAN, F. et CHERYAN, M., 1989. Phytate-calcium interactions with soy protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1989. Vol. 66, n° 1, pp. 93-97.
25. HALLBERG, L, BRUNE, M et ROSSANDER, L, 1989. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1 janvier 1989. Vol. 49, n° 1, pp. 140-144. DOI 10.1093/ajcn/49.1.140.
26. HARLAND, B. F. et OBERLEAS, D., 1987. Phytate in Foods. In : *World Review of Nutrition and Dietetics* [en ligne]. S. Karger AG. pp. 235-259. [Consulté le 13 novembre 2019]. ISBN 978-3-8055-4664-5. Disponible à l'adresse : <https://www.karger.com/Article/FullText/415199>
27. HARLAND, B.F. et HARLAND, J., 1980. Fermentative Reduction of Phytate in Rye, White, and Whole Wheat Breads. *Cereal Chem*. 1980. Vol. 57, n° 3, pp. 226-229.
28. HAROS, M., CARLSSON, N.- G., ALMGREN, A., LARSSON-ALMINGER, M., SANDBERG, A. S. et ANDLID, T., 2009. Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *International Journal of Food Microbiology*. 2009. Vol. 135, n° 1, pp. 7-14.
29. HEDSTROM, L., 2010. Enzyme Specificity and Selectivity. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2010. pp. 1-8.

30. INFOODS: FAO/INFOODS Databases, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 27 septembre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/>
31. INRA, 2019. Florilege, a database gathering microbial habitats, phenotypes and uses. *Florilege* [en ligne]. 2019. [Consulté le 10 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : <http://genome.jouy.inra.fr/FlorilegeDev/#&welcome>
32. JAIN, J. et SINGH, B., 2017. Phytase production and development of an ideal dephytinization process for amelioration of food nutrition using microbial phytases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017. Vol. 181, n° 4, pp. 1485-1495.
33. KANA SOP, M. M., GOUADO, I., MANANGA, M.-J., DJEUKEU ASONGNI, W., AMVAM ZOLLO, P. H., OBERLEAS, D. et TETANYE, E., 2012. Trace elements in foods of children from Cameroon : A focus on zinc and phytate content. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2012. Vol. 26, n° 2-3, pp. 201-204.
34. KŁOSOWSKI, G., MIKULSKI, D. et JANKOWIAK, O., 2018. Extracellular phytase production by the wine yeast *S. cerevisiae* (Finarome strain) during submerged fermentation. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018. Vol. 23, n° 4.
35. KUMAR, V., SINHA, A. K., MAKKAR, H. P. S. et BECKER, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. *Food Chemistry*. 2010. Vol. 120, n° 4, pp. 945-959. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.11.052.
36. KUMAR, V. et SINHA, A. K., 2018. Chapter 3 - General aspects of phytases. In : *Enzymes in Human and Animal Nutrition* [en ligne]. Academic Press. pp. 53-72. [Consulté le 27 septembre 2019]. ISBN 978-0-12-805419-2. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128054192000034>
37. KWON, D.- A., PARK, S., KWON, D., KIM, K.- H., OH, B.- C. et AUH, J.- H., 2014. Improving mineral availability in soymilk by dephosphorylation of phytic acid using an alkaline phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Food Science and Biotechnology*. 2014. Vol. 23, n° 4, pp. 1067-1072.
38. KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES, 2019. Hexakisphosphate phosphohydrolase. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [en ligne]. 2019. [Consulté le 23 février 2020]. Disponible à l'adresse : [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&locale=en&serv=kegg&dbkey=kegg&keywords=hexakisphosphate+phosphohydrolase&page=1](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&locale=en&serv=kegg&dbkey=kegg&keywords=hexakisphosphate+phosphohydrolase&page=1)
39. LAZARTE, C. E., CARLSSON, N.-G., ALMGREN, A., SANDBERG, A.S. et GRANFELDT, Y., 2015. Phytate, zinc, iron and calcium content of common Bolivian food, and implications for mineral bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015. Vol. 39, pp. 111-119.
40. LEE, W. J., 1990. Phytic acid content and phytase activity of barley malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1990. Vol. 48, n° 2, pp. 62-65.
41. LEENHARDT, F., LEVRAT-VERNY, M.-A., CHANLIAUD, E. et RÉMÉSY, C., 2005. Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. Vol. 53, n° 1, pp. 98-102.
42. LEHRFELD, J., 1989. High-Performance Liquid Chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem*. 1989. Vol. 66, pp. 510-515.
43. LEMIEUX, L., AMIOT, J. et BRISSON, G. J., 1985. Dosage de l'acide phytique dans une farine et un concentré protéique de colza suivant différentes méthodes. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1985. Vol. 18, n° 1, pp. 29-33.

44. LIBIDOS, 2019. K-PHYT : kit de dosage enzymatique acide phytique / Phosphore total. *Libidos* [en ligne]. 2019. [Consulté le 7 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : [https://www.libios.fr/kits\\_dosage\\_enzymatiques\\_product\\_4e40fphndfdf.html](https://www.libios.fr/kits_dosage_enzymatiques_product_4e40fphndfdf.html)
45. LIU, B.-L., RAFIQ, A., TZENG, Y.-M. et ROB, A., 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998. Vol. 22, n° 5, pp. 415-424.
46. LOPEZ, H. W., KRESPINE, V., GUY, C., MESSENGER, A., DEMIGNE, C. et REMESY, C., 2001. Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. Vol. 49, n° 5, pp. 2657-2662.
47. LOPEZ, H. W., LEENHARDT, F., COUDRAY, C. et REMESY, C., 2002. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition ? *International Journal of Food Science and Technology*. 2002. Vol. 37, n° 7, pp. 727-739.
48. MARKLINDER, I. M., LARSSON, M., FREDLUND, K. et SANDBERG, A.-S., 1995. Degradation of phytate by using varied sources of phytases in an oat-based nutrient solution fermented by *Lactobacillus plantarum* strain 299 V. *Food Microbiology*. 1995. Vol. 12, pp. 487-495.
49. MARQUIE, C., SEGUEILHA, L., MOULIN, G., VIALETES, V. et GALZY, P., 1993. Analyse des phytates d'une farine de graines de cotonnier par chromatographie en phase liquide. *Coton Fibres Trop*. 1993. Vol. 48, pp. 87-97.
50. MATTILA, P. H., PIHLAVA, J.-H., HELLSTRÖM, J., NURMI, M., EUROLA, M., MÄKINEN, S., JALAVA, T. et PIHLANTO, A., 2018. Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products. *Food Quality and Safety*. 2018. pp. 2018.
51. MCKIE, V. A. et MCCLEARY, B. V., 2016. A novel and rapid colorimetric method for measuring total phosphorus and phytic acid in foods and animal feeds. *Journal of AOAC International*. 2016. Vol. 99, n° 3, pp. 738-743.
52. MEGAZYMEVIDEOS, 2013. *Phytic Acid Assay Kit Training Video (K-PHYT)* [en ligne]. 2013. [Consulté le 7 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.youtube.com/watch?v=6p8mgPa43jI&feature=youtu.be>
53. MITCHIKPE, E. C., DOSSA, R. A. M., ATEGBO, E.-A. D., VAN RAAIJ, J. M. A., HULSHOF, P. J. M. et KOK, F. J., 2008. The supply of bioavailable iron and zinc may be affected by phytate in Beninese children. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008. Vol. 21, n° 1, pp. 17-25.
54. OMS, 2011. *Directives sur l'enrichissement des aliments en micronutriments* [en ligne]. [Consulté le 5 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : [https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/GFF\\_Part\\_2\\_fr.pdf?ua=1](https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/GFF_Part_2_fr.pdf?ua=1)
55. OMS, 2019. OMS | Carences en micronutriments. *WHO* [en ligne]. 2019. [Consulté le 5 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/fr/>
56. PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEON, J. A. et SOCCOL, V.T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*. 2001. pp. 12.
57. PARK, Y. J., PARK, J., PARK, K.-H., OH, B.-C. et AUH, J.-H., 2011. Supplementation of alkaline phytase (Ds11) in whole-wheat bread reduces phytate content and improves mineral solubility. *Journal of Food Science*. 2011. Vol. 76, n° 6, pp. C791-C794.
58. PARKOUDA, C., NIELSEN, D. S., AZOKPOTA, P., IVETTE IRÈNE OUOBA, L., AMOA-AWUA, W., THORSEN, L., HOUNHOUGAN, J. D., JENSEN, J. S., TANO-DEBRAH, K., DIAWARA, B. et JAKOBSEN, M., 2009. The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical Reviews in Microbiology*. 2009. Vol. 35, n° 2, pp. 139-156.

59. PERERA, I., FUKUSHIMA, A., AKABANE, T., HORIGUCHI, G., SENEWEERA, S. et REDDY, N., 2019a. Expression regulation of myo-inositol 3-phosphate synthase 1 (INO1) in determination of phytic acid accumulation in rice grain. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, n° 1, pp. 14866.
60. PONTOPPIDAN, K., PETERSSON, D. et SANDBERG, A. -S., 2007. Interaction of phytate with protein and minerals in a soybean–maize meal blend depends on pH and calcium addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007. Vol. 87, n° 10, pp. 1886-1892.
61. PRIYODIP, P. et BALAJI, S., 2019. An in vitro chicken gut model for the assessment of phytase producing bacteria. *3 Biotech*. 2019. Vol. 9, n° 8, pp. 294.
62. RASANE, P., JHA, A., KUMAR, A. et SHARMA, N., 2015. Reduction in phytic acid content and enhancement of antioxidant properties of nutriceals by processing for developing a fermented baby food. *Journal of Food Science and Technology*. 2015. Vol. 52, n° 6, pp. 3219-3234.
63. ROOPASHRI, A. N. et VARADARAJ, M. C., 2015. Functionality of Phytase of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 5421 to Lower Inherent Phytate in Selected Cereal Flours and Wheat/Pearl Millet-Based Fermented Foods with Selected Probiotic Attribute. *Food Biotechnology*. 2015. Vol. 29, n° 2, pp. 131-155.
64. SANDBERG, A.-S. et ANDLID, T., 2002. Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002. Vol. 37, n° 7, pp. 823-833.
65. SANDBERG, A.-S. et SVANBERG, U., 1991. Phytate hydrolysis by phytase in cereals : effects on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*. 1991. Vol. 56, n° 5, pp. 1330-1333.
66. SANDSTEAD, H. H. et FREELAND-GRAVES, J., 2014b. Dietary phytate, zinc and hidden zinc deficiency. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2014. Vol. 28, n° 4, pp. 414-417.
67. SCHLEMMER, U., FRØLICH, W., PRIETO, Rafel M. et GRASES, F., 2009. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009. Vol. 53 Suppl 2, pp. S330-375.
68. SELLE, P. H. et RAVINDRAN, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 2007. Vol. 135, n° 1, pp. 1-41.
69. SHAMSUDDIN, A., ELSAYED, A. M. et ULLAH, A., 1988. Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis*. 1988. Vol. 9, n° 4, pp. 577-580.
70. SHAMSUDDIN, A., 2002. Anti-cancer function of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002. Vol. 37, n° 7, pp. 769-782.
71. SOMASUNDAR, P., RIGGS, D. R., JACKSON, B. J., CUNNINGHAM, C., VONA-DAVIS, L. et MCFADDEN, D. W., 2005. Inositol Hexaphosphate (IP6): A Novel Treatment for Pancreatic Cancer1. *Journal of Surgical Research*. 2005. Vol. 126, n° 2, pp. 199-203.
72. SONG, H.-Y., EL SHEIKHA, A. F. et HU, D.-M., 2019. The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2019. Vol. 86, pp. 553-562.
73. STANKE-LABESQUE, F., 2011. *Chapitre 1 : Aspects Pharmacodynamiques*. Université Joseph Fourier de Grenoble.
74. TANG, A. L., WILCOX, G., WALKER, K. Z., SHAH, N. P., ASHTON, J. F. et STOJANOVSKA, L., 2010a. Phytase activity from *Lactobacillus spp.* in calcium-fortified soymilk. *Journal of Food Science*. 2010. Vol. 75, n° 6, pp. M373-M376.

75. TSAO, George T., ZHENG, Yizhou, LU, Jean et GONG, Cheng S., 1997. Adsorption of heavy metal ions by immobilized phytic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. mars 1997. Vol. 63-65, n° 1, pp. 731-741.
76. UPPSTRÖM, B. et SVENSSON, R., 1980. Determination of phytic acid in rapeseed meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1980. Vol. 31, n° 7, pp. 651-656.
77. VATS, P. et BANERJEE, U. C., 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases) : an overview. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004. Vol. 35, n° 1, pp. 3-14.
78. WANG, J. et FUNG, D. Y., 1996. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. *Critical Reviews in Microbiology*. 1996. Vol. 22, n° 2, pp. 101-138.
79. WHEELER, E. L. et FERREL, R. E., 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem*. 1971. Vol. 48, pp. 312-320.
80. YANG, H., WANG, Z., LIN, M. et YANG, S.-T., 2018. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology*. février 2018. Vol. 250, pp. 1-9.
81. ZHOU, J. R. et JR, J. W. E., 1995. Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995. Vol. 35, n° 6, pp. 495-508.