

pRépublique Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté de Science de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

Labbaci Aissa

Kadouci Asma

En vue de l'obtention du Diplome de MASTER En Science Agro-alimentaire

Option : Agroalimentaire et Contrôle de Qualité

Thème

Evaluation de l'activité anti-microbienne des graines de sorgho
« *Sorghum bicolor* (L) »

Soutenu le :25/07 /2021

Devant le jury composés de:

Qualité	Nom	Grade	Université
Président :	Mr BRIXI Mohammed	MCB	Abou-BakerBelkaied. Tlemcen
Examinatrice :	Melle GHANEMI Fatima Zohra	MCA	Abou-BakerBelkaied. Tlemcen
promotrice :	Mme SOUALEM Zoubida	MCA	Abou-BakerBelkaied. Tlemcen

Année universitaire 2020/2021

Remerciement

Avant tout, nous remercions le bon dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé , le courage et patience pour être ce que nous sommes aujourd'hui et pour mener ce modeste travail.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements, nos vives reconnaissances et nos sincères gratitudes à notre encadreur Mme. SOUALEM ZOUBIDA, maître des conférences A, pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour son aide, ses conseils et son suivi durant la période de la réalisation de notre travail. Votre assistance et recommandations, nous furent très utiles.

Nous exprimons également notre profond respect à Melle. GHANEMI FATIMA ZOHRA, Responsable de notre spécialité Agroalimentaire et contrôle de qualité et Mr.BRIXI Mohammed d'avoir accepté d'être parmi le jury de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail moi LABBACI AISSA:

*A mon père Abdelhamid, Papa tu es le meilleur exemple que l'on doit suivre pour réussir dans la vie .ton sens de sacrifice personnel, ton courage et ta persévérance m'ont beaucoup marqué .je me souviens ,, tu nous faisais travailler tous les jours de la semaine sans repos tout en nous disant que pour l'esclave , c'est le seul moyen de s'en sortir dans la vie .ainsi, tu nous as inculqué le courage et la bravoure dans le travail .malgré le peu de moyens , tu as bravé les obstacles en comptant sur toi-même et sur le DIEU .quand je t'appelais pour te dire ça n'allait pas tu me disais que DIEU est GRAND, et le tout puissant miséricordieux nous a soutenu jusqu'au bout. Considère ce travail comme les résultats de tes immenses sacrifices. Que DIEU se souvienne de tout ce que tu as fait et continue de faire pour moi et qu'il te garde longtemps à nos coté. **Reconnaissance éternelle papa.***

*A ma maman Touria Mezouar : Ton soutien spirituel m'a permis de terminer cette formation en bonne santé .ton silence et ta capacité d'observer sans pourtant rien dire et t'en remettre au tout puissant en disant <<akraw, hna 3andna ghi kraya >> m'ont servis d'exemples pour tout supporter dans la vie .et chaque fois que je me trouvais confronté a des difficultés de la vie , je me souvenais de les propos et cela me soulageait .ainsi , je m'armais de courage pour affronter la vie .je ne pourrais jamais finir de faire tes éloges .retrouve ici le fruit de tes efforts et qu'ALLAH te garde en santé .t'accorde longue vie et me permettre de prendre soin de toi comme tu l'as fait pour moi . **Merci Maman***

A mes frères : madani et Oussama <<Seul le travail fait l'homme >> que ceci vous serve d'exemple et vous brise toutes barrières je vous aime et je ne vous veux et ne vous souhaite que le meilleur. Que l'esprit d'entente et d'amour nous unir.

Ainsi je remercie zineb d'etre la pour moi et sans oublier asma mon binome de la qualité de son travail et de son aide

Dédicace

Je dédie ce modeste travail a mes chers parents

A mes soeurs Djahida, Hanane , Fareh

A mon frère Abdelkader

A mes cheres amies Fouzia, Khalida et Chaima pour leurs aides et encouragements

A tout mes amis intimes et d'étude sans aucune exception

A mon ami Aissa qui a eu la patience de me supporter Durant ce mémoire .

Résumé

Le sorgho est une des plus anciennes plantes cultivées, qu'il est originaire d'Afrique. Le sorgho cultivé présente une très grande diversité de formes qui se déclinent en cinq races, cette variabilité génétique et phénotypique se traduit par une grande variabilité d'aspect et d'utilisation. Notre travail est basé sur une étude qui vise à estimer l'activité antimicrobienne des grains de sorgho en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et phytochimiques par une analyse d'article.

Les résultats obtenus de l'analyse des articles affirment dans le premier travail la présence de l'activité antimicrobienne in vitro exhalées par les feuilles de *Sorghum bicolor*.L en raison de la présence d'ingrédients bioactifs. Le second travail a révélé que les polyphénols de son de sorgho peuvent aider à moduler les populations microbiennes intestinales. Les résultats du dernier article sur le contrôle de la croissance de coliforme et moules dans le maltage du sorgho par les bactéries et culture de levure, ont montré une inhibition de moisissures et des coliforms.

Mots clés: activité antimicrobienne, coliforme ,moisissures, polyphénols, sorgho.

Abstract

Sorghum is one of the oldest cultivated plants, originating in Africa. Cultivated sorghum has a very wide variety of forms that come in five races, this genetic and phenotypic variability translates into a great variability in appearance and use.

Our work is based on a study that aims to estimate the antimicrobial activity of sorghum grains based on their morphological and phytochemical characteristics by article analysis.

The results obtained from the analysis of the articles affirm in the first work the presence of the in vitro antimicrobial activity exhaled by the leaves of Sorghum bicolor.L due to the presence of bioactive ingredients. The second work revealed that sorghum bran polyphenols can help modulate gut microbial populations. The results of the last article on the control of coliform and mussel growth in sorghum malting by bacteria and yeast culture, showed inhibition of crumbs and coliforms.

Key words: antimicrobial activity, coliform, molds, polyphenols, sorghum.

ملخص

تعتبر الذرة الرفيعة واحدة من أقدم النباتات المزروعة التي نشأت في إفريقيا. تحتوي الذرة الرفيعة المزروعة على مجموعة متنوعة جدا من الأشكال التي تأتي في خمسة أجناس و هذا التباين الوراثي و الظاهري يترجم إلى تنوع كبير في المظهر و الاستخدام .

تعتبر الذرة الرفيعة واحدة من أقدم النباتات المزروعة التي نشأت في إفريقيا. تحتوي الذرة الرفيعة المزروعة على مجموعة متنوعة جدًا من الأشكال التي تأتي في خمسة أجناس ، وهذا التباين الوراثي والظاهري يترجم إلى تنوع كبير في المظهر والاستخدام .

يعتمد عملنا على دراسة تهدف إلى تقدير النشاط المضاد للميكروبات لحبوب الذرة الرفيعة بناءً على خصائصها المورفولوجية والكيميائية النباتية من خلال تحليل المقالة.

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها من تحليل المقالات في العمل الأول وجود نشاط مضاد للميكروبات في المختبر يتم استنتاجه بواسطة أوراق الذرة الرفيعة ثنائية اللون لوجود مكونات نشطة بيولوجيًا. وكشف العمل الثاني أن بوليفينول نخالة الذرة الرفيعة يمكن أن يساعد في تعديل التجمعات الميكروبية في الأمعاء. أظهرت نتائج المقال الأخير حول التحكم في نمو القولونيات وبلح البحر في تخمير الذرة الرفيعة بواسطة البكتيريا وزرع الخميرة ، تثبيط الفئات والقولون .

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للميكروبات ، القولونيات ، العفن ، البوليفينول ، الذرة الرفيعة

Sommaire

Sommaire	1
Introduction.....	14
Partie 01: Étude bibliographique	16
Chapitre 01: le sorgho.....	17
1 Définition.....	17
2 Morphologie	18
2.1 Les racines.....	18
2.2 La tige.....	18
2.3 Les feuilles	18
2.4 L'inflorescence.....	18
2.5 La graine.....	19
3 Classification	19
4 le grain de sorgho	20
4.1 Définition du grain de sorgho.....	20
4.2 Race de sorgho	21
4.3 Croissance et developpement.....	22
5 Variété de sorgho.....	23
5.1 En Algerie	23
5.2 Dans le monde.....	23
6 Composition chimique.....	24
6.1 L'amidon du sorgho:.....	24
6.2 Les protéines du sorgho :	24
6.3 <i>Solution acides ou basiques diluées</i>	24

6.4	Polyphénols du sorgho :	25
6.5	L'humidité de graines de sorgho	25
6.6	Les lipides du sorgho.....	25
7	La valeur nutritive de sorgho.....	25
8	Utilisation de sorgho.....	26
8.1	Dans l'alimentation humaine	26
8.2	Dans l'alimentation animale	26
Chapitre 02 : Composés phénoliques.....		27
9	Classification des composés phénoliques.....	27
9.1	Acide phénolique simple.....	27
9.1.1	Acide benzoïque.....	27
9.1.2	Acides cinnamiques	27
9.1.2.1	flavonoïde	27
9.2	Tanins.....	27
9.2.1	Les tanins hydrolysables.....	28
9.2.2	Les tanins condensés.....	28
9.2.2.1	Coumarines.....	28
9.3	Lignanes	28
10	Composé phénolique de sorgho.....	28
10.1	Les acides phénoliques de sorgho	29
10.2	Les flavonoïdes du sorgho.....	29
10.2.1	Flavononols.....	29
10.2.2	Flavon-3-ols et procyanidines.....	29
10.2.3	Flavanones dérivés.....	29
10.3	Les tannins condensés du sorgho	30

10.4	Les anthocyanes du sorgho	30
10.5	Stilbènes	30
11	Rôle et propriétés des polyphénols	30
11.1	Activité antioxydante	31
11.2	Activité anticancéreuse	31
11.3	Activité anti-inflammatoire	31
11.4	Activité antimicrobienne	31
Article 01: Ciblage phytochimique et activité antibactérienne des feuilles de sorgho bicolor dérivés de culture <i>in vitro</i> (Sir elkhathim et al., 2019)		33
12	Introduction.....	33
13	Matériel et méthodes.....	35
13.1	Matériel végétal et préparation d'extrait	35
13.2	Culture <i>in vitro</i> de sorgho.....	35
13.3	Criblage phytochimique	35
13.4	Activité anti microbienne	36
13.5	Analyse statistique.....	36
Article 02: contrôle de la croissance de coliform et moules dans le maltage du sorgho bactérien et culture de levure (Lefyedi et Taylor, 2007)		36
14	Introduction.....	36
15	Matériel et méthodes.....	38
15.1	Grain de sorgho	38
15.2	Microorganismes.....	38
15.3	Analyse statistique.....	38
Article 03: Impact des polyphenols de la céréale du sorgho sur le microbiote de poids normal et sur les sujets en surpoids/ obèses pendant la fermentation fécale <i>in vitro</i>		39
16	Introduction.....	39

17	Matériel et méthode	39
17.1	Sons, étalons et réactifs de sorgho	40
17.2	Préparation de polyphénols à partir d'échantillons de son de sorgho.....	40
17.3	Analyse de la teneur en polyphénols et de l'activité antioxydante.....	40
17.4	Fermentation fécale humaine	42
17.5	Analyse microbienne.....	43
Article 01: Criblage phytochimique et activité antibactérienne de feuilles de sorgho bicolor dérivés de culture in vitro		45
18	Résultats.....	45
18.1	Culture in vitro de sorgho.....	45
18.2	Criblage phytochimique des feuilles de sorgho	46
18.3	Activité antimicrobienne des feuilles de sorgho	46
19	Discussion	48
20	Conclusion	49
Article 02: contrôle de la croissance de coliformes et moules dans le maltage du sorgho bactérien et culture de levure.....		50
21	Résultats et discussion	50
21.1	L'inhibition de la croissance microbienne	50
21.2	Cytotoxicité et mycotoxines.....	53
22	Conclusion	53
Article 03: Impact des polyphénols de la céréale du sorgho sur le microbiote de poids normal et sur les sujets en surpoids/ obèses pendant la fermentation fécale in vitro.....		54
23	Résultats.....	54
23.1	Profil phénolique et propriétés antioxydantes des extraits de son de sorgho.....	54
23.2	Changements généraux dans le microbiote.....	55
Conclusion générale.....		65

Références:.....	67
Annexes :	84

Liste des figures

Figure 1 :Le sorgho dans le champ (<i>Sorghum bicolor</i> .L) (Flora , 2018)	17
Figure 2 :un plant de sorgho (Trouche, 2009).....	19
Figure 3 :Schéma du grain (Sautier et O'De, 1989).....	21
Figure 4 : Dynamique du microbiote (phylum et genres) en fermentation in vitro. Dans (a,b), la distribution du microbiote est illustrée dans le boxplot trié par la plus grande variance. Dans (c,d), l'effet de temps, 0 h vs. 24 h, est montré et testé par un test signé Wilcoxon, et la différence de groupe entre NW et OO est testée par un test Mann–Whitney sous le contrôle négatif (n = 22) pour deux microbiotes sélectionnés.....	56
Figure 5 :Graphique d'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) comparant les communautés bactériennes entre les traitements dans les deux groupes combinés (p < 0,05). (A) 0 h et (B) 24 h.	57
Figure 6 : Abondance relative au niveau du phylum (n = 22). (a) Bactériidés, (b) Firmicutes, (c) Protéobactéries, (d) Actinobactérie, (e) Verrucomicrobie. Les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements à 24 h, obtenues par le test de Friedman et ses comparaisons multiples post hoc au niveau de signification de 0,05. Les médianes sont marquées de triangles rouges. Les classes de poids (NW c. OO) sont marquées de cercles verts et de carrés bleus, respectivement. NC : contrôle négatif, FOS : fructooligosaccharides, ESB : extrait de son de sorgho noir, SSE : extrait de son de sorgho sumac.....	58
Figure 7: Abondance relative des genres sélectionnés (n = 22). (a) Prevotella, (b) Bacteroides, (c) Bifidobacterium, (e) Lactobacillus. Les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements à 24 h, obtenues par le test de Friedman et ses comparaisons multiples post hoc à un niveau de signification de 0,05. Les médianes sont marquées de triangles rouges. Les classes de poids (NW vs. OO) sont marquées respectivement par des cercles verts et des carrés bleus. NC : contrôle négatif, FOS : fructooligosaccharides, ESB : extrait de son de sorgho noir, SSE : extrait de son de sorgho sumac.....	59

Listes des tableaux

Tableau 1 :Les principaux caractères identitaires des races de sorgho (Chantereau et al.,2013).	21
Tableau 2 :Surfaces en sorgho des principaux pays producteurs de 1988 à 2010 (statistiques agricoles FAO).....	23
Tableau 3:Production annuelle de sorgho de 1988 à 2010 des principaux pays producteurs (statistiques agricoles FAO).....	23
Tableau 4 :les quatres classes de protéine en fonction de leur solubilité (Hamaker et al., 1995).	24
Tableau 5 :La composition chimique du grain de sorgho (g /100g MS) (Prosky et al., 1988 et Souci et al., 2000).....	26
Tableau 6:teneur en vitamines du grain de sorgho (teneur en vitamines en mg/100g) (Serna-Saldivar et Rooney, 1995 et Souci et al., 2000).	26
Tableau 7 :la structure générale des acides phénoliques du sorgho (Collin et al., 2006).....	29
Tableau 8 :Caractéristiques du sujet.....	42
Tableau 9 :Effet de la IBA et de la BA sur la longueur des pousses, le nombre de feuilles, la présence de multiples pousses et la présence de racines secondaires après 4 semaines de culture	45
Tableau 10 :Dépistage phytochimique de l'extrait de feuilles de sorgho bicolor in vitro.....	46
Tableau 11 :Activité antibactérienne de l'extrait de feuilles de sorgho	47
Tableau 12 :Principaux polyphénols des extraits de son de sorgho noir et sumac.....	54

Liste des Abréviation

BA: 6-benzyladénine

B.s: Bacillus subtilis

E.c: Escherichia coli

ESB: extrait de son de sorgho noir

FBG: Glycémie à jeun

IMC: Indice de masse corporelle

ND: non détecté

P.a: Pseudomonas aeruginosa

S.a: Staphylococcus aureus

SSE: extrait de son de sorgho sumac

PGR: Régulateur de croissance végétale

ZICO: Acide indole-3-butérique

Introduction

Introduction

Le sorgho (*Sorghum bicolor* (L) Moench) est une céréale d'origine africaine, compte parmi les céréales les plus importantes cultivées dans les zones semi-arides et tropicales du monde à cause de son bon rendement et de sa bonne adaptation aux environnements hostiles dans le monde (Dicko, 2005). En effet, le sorgho grain vient au cinquième rang de la production de céréales après le Maïs, le Riz, le Blé et l'Orge (FAOSTAT., 2012).

Les utilisations du sorgho sont très diverses d'abord le sorgho est la base des boissons fermentées très appréciées, utilisé pour l'alimentation humaine comme : farine, semoules, bouillies..., etc. Des utilisations alimentaires alternatives se diversifient : utilisation en boulangerie, produits roulés, et boissons nouvelles. Considéré comme une céréale sans gluten, le sorgho présente aussi des avantages nutritionnels pour les personnes intolérantes à ces protéines. L'utilisation pour l'alimentation animale est importante sous deux formes: les sorghos fourragers dont tiges et feuilles pour l'alimentation des herbivores, le sorgho grain responsable de l'alimentation d'autres animaux domestiques (Chantereau et al., 2014).

Le sorgho intéressant comme possible source d'antioxydant. Les raisons de choix du sorgho tiennent d'une part à la végétation de cette espèce dans nos régions saharienne et d'autre part à des données ethnopharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines maladies et également en nutrition (Kehrer et Smith, 1994).

Selon Jiménez (2000) et Baribeau (2005), une réduction du risque des maladies chroniques avec une consommation élevée des céréales.

Plusieurs études ont montré que de nombreux métabolites secondaires présents dans les céréales exercées des effets bénéfiques sur la santé humaine. Les métabolites secondaires les plus présents chez les céréales semblent être les composés phénoliques (Baribeau., 2005).

Les composés phénoliques jouent un rôle très important dans les mécanismes de défense, se trouve dans les téguments des grains, en effet l'acide férulique est le plus courant des acides phénoliques dans les grains des céréales, se concentre dans les parties extérieurs du grain (Manach et al., 2004).

Introduction

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés d'étudier les activités anti-microbiennes des graines de sorgho par une analyse d'articles.

Le présent travail est organisé en trois parties.

la première partie consacrée pour une revue bibliographique: généralités sur les grains de sorgho.

la seconde partie comprend la partie méthodologie utilisée pour les trois articles sélectionnés

la dernière partie regroupe les résultats et discussion de ces articles suivie d'une conclusion générale et des perspectives.

Partie 01: Étude bibliographique

Partie 01: Étude bibliographique

Chapitre 01: le sorgho

1 Définition

Le sorgho cultivé genre *Sorghum*, espèce *Sorghum bicolor*.L est une plante annuelle céréalière appartenant à la famille des poacées (Chantereau et al., 2013), cultivées dans les régions tropicales semi-arides de l'Afrique et de l'Asie, Il constitue avec le mil les principales céréales (Abu Assar et al., 2009).

Il est connu sous divers noms: grand mil et herbe de Guinée en Afrique de l'Ouest, blé kafir en Afrique du Sud, dura au Soudan, jowar en Inde et kaoliang en Chine. Aux Etats-Unis, on l'appelle généralement milo ou milo-maïs (FAO, 1995).



Figure 1 :Le sorgho dans le champ (*Sorghum bicolor* .L) (Flora , 2018)

Partie 01: Étude bibliographique

2 Morphologie

2.1 Les racines

Système racinaire du sorgho comprend trois types de racines, racine primaires, secondaires ou adventives, et racines nodales ou d'ancrage. Les racines primaires se développent de la radicule, les racines adventives sont petites, uniformes et peuvent atteindre 2 m, son fonction essentielle d'absorber l'eau et les éléments nutritifs. Les racine nodales sont épaisses et ont plus une fonction d'ancrage de la plante (**Agropedia, 2013**).

2.2 La tige

La tige de sorgho est cylindrique et dressée, composée de nœuds alternant avec des entre nœuds, mesurant de 0,5 à 5 cm de diamètre et de 0,5 à 4 m de la hauteur en fonction de la variété et des conditions environnementales, elle est glabre et solide avec un cortex (**Jacques et al., 2013**).

2.3 Les feuilles

Les feuilles sont distribuées de façon variable le long de la tige chez le sorgho. Elles sont de forme lancéolée. Leur nombre varie de 14 à 30, la longueur peut atteindre plus de 1 m et 10 à 15 cm de largeur. La surface des feuilles présente des poils microscopiques appelés trichomes (**Chantereau et Nicou, 1991**).

2.4 L'inflorescence

L'inflorescence est une panicule qui peut être courte et compacte ou bien lâche et ouverte de 4 à plus de 25 cm de long sur 2 à plus de 20 cm de large. L'axe central de la panicule comprend un porte des verticilles de branches primaires sur chaque nœud (**Cosette et al., 2014**).

Partie 01: Étude bibliographique

2.5 La graine

La graine de sorgho est caryops de forme sphérique légèrement aplatie, composée de trois parties : le péricarpe, l'albumen et l'embryon. Les caractéristiques morphologiques du grain à maturité complète sont :

- Longueur = 3,5 à 5mm
- Largeur = 2,5 à 4,5mm
- Poids de 1000 grains = 60 à 85g (House, 1987).

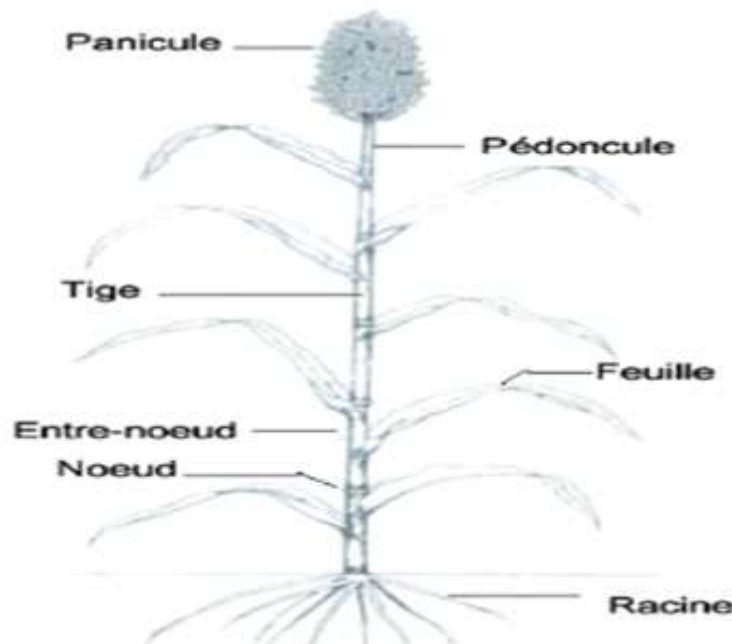


Figure 2 :un plant de sorgho (Trouche, 2009).

3 Classification

Selon USDA-ARS. (2012), la classification de sorgho (*Sorghum bicolor* (L) Moench) est la suivante :

•Règne : Plante

Partie 01: Étude bibliographique

- Sous-règne** : Végétal
- Super-embranchement** : Spermatophytes
- Embranchement** : Magnoliophytes
- Classe** : Liliopsides (monocotylédones)
- Sous-classe** : Commélinidés
- Ordre** : Cypéales
- Famille** : Poacées (graminées)
- Tribu** : Andropogonées
- Genre** : Sorghum
- Espèce** : Sorghum bicolor (L) Moench

4 le grain de sorgho

4.1 Définition du grain de sorgho

La graine de sorgho est un fruit sec à un seul germe. Elle est composée de trois parties: le péricarpe, l'albumen et l'embryon (**Balole et Legwaila , 2006**). En fonction de la pigmentation la couleur de la graine varie du blanc au jaune pâle au brun rouge profond (**FAO, 1995**).

Partie 01: Étude bibliographique

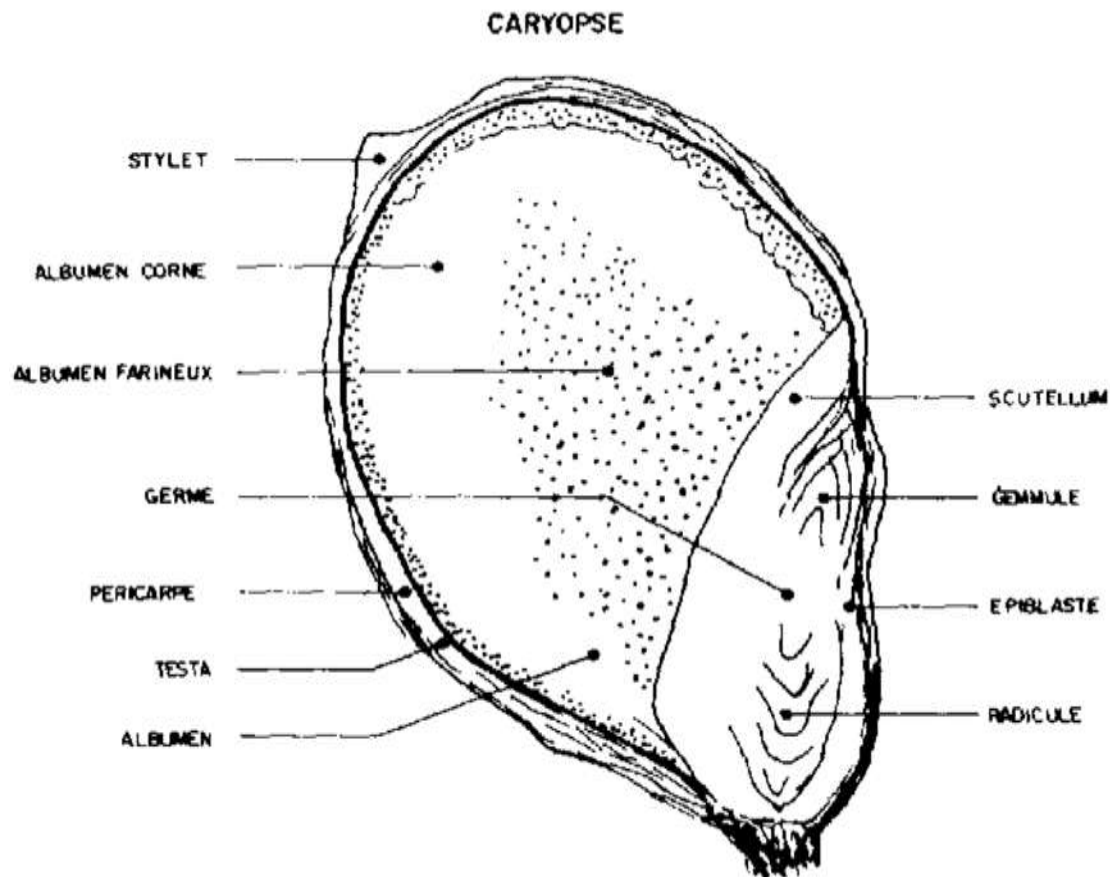


Figure 3 :Schéma du grain (Sautier et O'De, 1989)

4.2 Race de sorgho

Il y a plusieurs Race de sorgho, le tableau 01 présente les principales caractéristiques des races.

Tableau 1 :Les principaux caractères identitaires des races de sorgho (Chantereau et al.,2013).

Race	Glumes	Grain	Panicules
Bicolor	Glumes longues recouvrant les 3/4 ou la totalité du grain	Poids de 1000 grains de 15 à 25g	Panicules laches
Guinea	Glumes généralement	Grains elliptiques, plus au moins aplatis	Panicules laches à semi-laches, souvent

Partie 01: Étude bibliographique

	longues ,ouvertes.	dorso-entralement ,de taille variable.	longues à port retombant
Caudatum	Glumes courtes adherent au grain en le recouvrant partiellement .	Grains dissymétriques ,de taille moyenne à grosse.	Panicules compactes à semi-compactes forme à tendance fusoide.
Durra	Glumes courtes adherent au grain en le recouvrant partiellement .	Grains plus ou moins sphériques,de taille variable mais le plus souvent gros à très gros .	Panicules compactes à semi-compactes souvent portées par un pédoncule croisé.
Kafir	Glumes courtes adherent au grain en lerecouvrant partiellement.	Grains elliptiques de taille moyenne , poids de 1000grains de 20à35g.	Panicules moyennement compactes ,souvent de forme longue et cylindrique.

4.3 Croissance et developpment

Selon **Chantereau et al, (2013)**, la croissance et le développement du sorgho passent par trois phases successives

- **La phase vegetative:** allant de la germination à l’initiation de la panicule;
- **La phase reproductive:** allant de l’initiation paniculaire à la floraison;
- **La phase de remplissage et de maturation des graines:** allant de la floraison à la maturité physiologique.

Partie 01: Étude bibliographique

5 Variété de sorgho

5.1 En Algerie

En Algérie, le sorgho est entretenu en culture vivrière dans les régions sahariennes et plus particulièrement à l'extrême Sud (**Rahal Bouziane et al., 2004**). Mais depuis les dernières années les nouvelles variétés de sorgho sont actuellement cultivées à Maghnia, Eloued, Tiaret, Bejaia, Mostaganem dont les rendements obtenus atteignent jusqu'à 100 tonnes/ hectare (**Soltani, 2014**).

5.2 Dans le monde

Le sorgho est la cinquième céréale la plus importante dans le monde, avec une production de 69 millions de tonnes par an cultivée sur 45 millions d'hectares (**FAOSTAT, 2014**).

Les pays les plus productifs en termes de superficie sont le Soudan, l'Inde et le Nigeria. Par rapport au volume de production, les cinq plus grands producteurs sont les USA , le Mexique, le Nigeria , le Soudan et l'Inde (**FAOSTAT, 2014**) (**Tableau 02 et 03**).

Tableau 2 :Surfaces en sorgho des principaux pays producteurs de 1988 à 2010 (statistiques agricoles FAO).

Pays	Surface annuelle (milliers d'hectares)						
	1988	1990	1995	2000	2005	2007	2010
États-Unis	3.7	3.7	3.3	3.1	2.3	2.7	1.9
Mexique	1.8	1.8	1.4	1.9	1.6	1.8	1.8
Inde	14.6	14.4	11.3	9.9	9.1	8.5	7.8
Nigeria	4.8	4.2	6.1	6.9	7.3	7.8	4.7
Soudan	5.6	2.8	5.0	4.2	9.9	6.5	5.6

Tableau 3:Production annuelle de sorgho de 1988 à 2010 des principaux pays producteurs (statistiques agricoles FAO).

Pays	Production annuelle (millions de tonnes)						
	1988	1990	1995	2000	2005	2007	2010
États-Unis	14.7	14.6	11.7	12.0	10.0	12.6	8.8
Mexique	5.9	6.0	4.2	5.8	5.5	6.2	6.9
Inde	11.0	10.2	9.3	7.5	7.2	7.2	6.7

Partie 01: Étude bibliographique

Nigeria	5.2	4.2	7.0	7.7	9.2	9.1	4.8
Soudan	4.6	1.2	2.5	2.5	5.0	5.0	2.6

6 Composition chimique

6.1 L'amidon du sorgho:

La graine de sorgho constituée de (65 à 85 % d'amidon), a un diamètre compris entre 5 et 25 μm , avec une valeur moyenne autour de 15 μm (Dicko et al., 2006). Elle est constituée de 70 à 80 % d'amylopectine et les 20 à 30 % restants sont de l'amylose (Dentherage et al., 1955).

6.2 Les protéines du sorgho :

Les protéines représentent 7 à 15 % du poids sec du grain de sorgho (Dicko et al., 2006), sont localisées dans l'albumen 80%, 16% dans le germe et 3% dans le péricarpe (Serna-Saldivar et Rooney, 1995), elles sont riches en résidus prolines et ressemblent ainsi aux protéines salivaires avec lesquelles elles ont une grande affinité (Butler et al., 1984 ; Emmambux et al., 2003).

Les protéines des grains peuvent être groupées en quatre classes en fonction de leur solubilité (Hamaker et al., 1995) (Tableau04).

Tableau 4 :les quatres classes de protéine en fonction de leur solubilité (Hamaker et al., 1995).

Proteins	albumines	Globulines	glutélines	prolamines
Solubilité	eau	Solutions salones diluées	6.3 Solution acides ou basiques diluées	alcool

Partie 01: Étude bibliographique

6.4 Polyphénols du sorgho :

Les polyphénols (8000 composés connus) représentent un groupe des métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier., 2006**) on retrouve :

- Les flavonoïdes
- Les acides phénoliques de type benzoïque ou cinnamique et les tanins hydrolysables
- Les stilbenes
- Les lignines et subérines (**Collin et al., 2006**).

6.5 L'humidité de graines de sorgho

L'humidité des grains est un facteur important pour la conservation et le transport des différents traitements subis par les grains. Les valeurs d'humidité des grains de sorgho seraient comprises entre 8 et 12 % (poids humide) (**Dicko et al., 2006**). Elle est réduite par séchage, jusqu'au tour de 3,5-4 % pour les malts pâles et 1,5-2 % pour les malts foncés mais augmentation de l'humidité crée aussi des conditions favorables au développement des bactéries, levures et moisissures ainsi qu'à l'activation des spores (**Esslinger et al., 2005**).

6.6 Les lipides du sorgho

Les lipides représentent, dans les grains de sorgho, entre 1,5 à 6 % de matière humide, ils sont composés majoritairement d'acides gras polyinsaturés (**Dicko et al., 2006**), qui représentent 75 à 80% des acides gras, surtout représentés par l'acide linoléique C18:2 (49%) et l'acide oléique C18:1 (31%); le principal acide gras saturé est l'acide palmitique C16:0 (14%) (**Rooney. 1978**).

7 La valeur nutritive de sorgho

Le sorgho, dont la valeur nutritive est proche de celle du maïs, contient plus de protéines et d'amidon que ce dernier, mais moins de graisses. Il est riche en fer, potassium, phosphore, vitamines B1 et B3 (**Arvalis, 2013-2014**) (**Tableau 05 et 06**).

Partie 01: Étude bibliographique

Tableau 5 :La composition chimique du grain de sorgho (g /100g MS) (Prosky et al., 1988 et Souci et al., 2000).

Composition grains	glucides	Fibres totales	Proteins brutes	Lipide
Sorgho	73,8	9,4	12,3	3,6

Tableau 6:teneur en vitamines du grain de sorgho (teneur en vitamines en mg/100g) (Serna-Saldivar et Rooney, 1995 et Souci et al., 2000).

Vitamine	B1	B2	B3	B5	B6	E
Sorgho	0.24	0.14	2.92	1.25	0.59	0.07

8 Utilisation de sorgho

8.1 Dans l'alimentation humaine

Le grain de sorgho est la céréale la plus utilisée dans l'alimentation humaine pour la préparation de pâte et de différents plats traditionnels (couscous, galettes, etc.). Il est consommé sous forme grillé ou cuit comme le riz (**Balole et Legwaila, 2006**). Le sorgho reste un symbole identitaire et garde une réputation d'aliment bon pour la santé (**Bricas, 1998**).

8.2 Dans l'alimentation animale

Les résidus de récolte, soit l'ensemble des tiges, feuilles et panicules égrenées, sont des sources importantes de fourrage pour l'alimentation du bétail, l'importance de ces résidus varie suivant les races de sorgho (**Balole et Legwaila, 2006**).

Partie 01: Étude bibliographique

Chapitre 02 : Composés phénoliques

9 Classification des composés phénoliques

9.1 Acide phénolique simple

9.1.1 Acide benzoïque

Sont parmi les formes phénoliques les plus simple avec une formule générale de C₆-C₁, la variation de structure des différents dérivés de l'acide Benzoïque se situe dans l'hydroxylation et la méthylation du noyau aromatique (**Ben Abbas, 2011**).

9.1.2 Acides cinnamiques

Les acides cinnamiques ont une structure générale de C₆-C₃, les plus répandus chez les végétaux sont l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Dacosta, 2003**).

9.1.2.1 flavonoïde

C'est le group le plus répandu des composés phénoliques dans le règne végétal, concentrées dans les graines , la peau ou le pelage des fruits , l'écorce et les fleurs (**Dusan et Vesna., 2006**). Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de nombreux systèmes cellulaires ainsi sont responsables des couleurs vives des fleurs, fruits et feuilles Les anthocyanins pigments rouge ou bleu, les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair (**Marfak, 2003**).

9.2 Tanins

Les tannins forment une classe de polyphénol hydrosolubles, d'une masse moléculaire variante entre 500 et 3000 kDa, ont la capacité de précipiter des protéines (**Smith et Swain., 1962**). Ils ont une activité inhibitrice sur les microorganismes en bloquant leur pouvoir de digestion (**Kamra et al., 2006**). On peut distinguer deux groupes de tannins:

Partie 01: Étude bibliographique

9.2.1 Les tanins hydrolysables

Sont des polyphénols avec un noyau central de polyol (**Castels et al., 2005**). Ils libèrent une partie phénolique qui peut être soit:

- L'acide gallique dans le cas des gallo tannins.
- L'acide ellagique dans le cas des ellagitannins (**Macheix et al., 2006**).

9.2.2 Les tanins condensés

Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (**Bruneton, 1999**). Ils sont résistants à l'hydrolyse et dégradés par des attaques chimiques fortes. Ils se transforment en pigment rougeâtre et par traitement acide à chaud (**Macheix et al., 2006**).

9.2.2.1 Coumarines

Les coumarines dérivées des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (**Macheix et al., 2006**). Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres, et sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**O'Kennedy et Thornes, 1997**).

9.3 Lignanes

La lignine est un constituant polyphénolique complexe de la paroi cellulaire secondaire végétale. Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ 70 familles (**Cowan, 1999**).

10 Composé phénolique de sorgho

Le sorgho est le plus riche en composé phytochimique (acide phénolique, flavonoïde, tanins) et peut en contenir jusqu'à 6% (**Beta et al., 2000**).

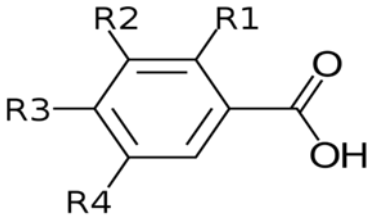
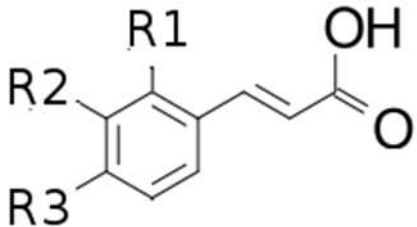
Les polyphénols majoritaires se regroupent en quatre catégories: les acides phénoliques, les tanins, les anthocyanes, les flavonoïdes et les stilbènes (**Mottiar et al., 2016**).

Partie 01: Étude bibliographique

10.1 Les acides phénoliques de sorgho

Il existe deux types: les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques, se trouvent majoritairement sous forme liée. Ils sont plus concentrés dans le son (enveloppe céréalière) (Tableau07).

Tableau 7 :la structure générale des acides phénoliques du sorgho (Collin et al., 2006).

Groupe d'acide phénolique	Acide hydroxybenzoïque	Acide hydroxycinnamique
Structure générale		

10.2 Les flavonoïdes du sorgho

10.2.1 Flavononols

Un glycoside du kaempférol a également été identifié dans le sorgho (Nip et Burns., 1969).

10.2.2 Flavon-3-ols et procyanidines

Isomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine les deux sont trouvés dans le sorgho (10-180 mg/l) (Freidrich et Galensa., 2002).

10.2.3 Flavanones dérivés

Partie 01: Étude bibliographique

Le sorgho est une source significative d'ériodictyols et des deux flavones l'apigénine, la lutéoline (**Nip et Burns., 1969**).

10.3 Les tannins condensés du sorgho

Ils sont polymérisés en flavan -3,4-diols, forment des proanthocyanidines (**dykes et al., 2009**).
Peuvent être utilisés comme additifs antioxydants dans les aliments gras (**Sikwese et al., 2007**).
Ces tannins prouvent une résistance contre les moisissures (**Rooney., 2005**).

10.4 Les anthocyanes du sorgho

Les anthocyanes font partie de la famille des flavonoïdes, sont solubles et s'accumulent dans les vacuoles des cellules de l'épiderme des feuilles (**Lambert., 2011**). mais les anthocyanes du sorgho sont unique car ils ne contiennent pas le groupement qui permet d'augmenter leur stabilité dans un pH élevé (**Dykes et Rooney., 2006**).

10.5 Stilbènes

Les stilbenes sont des composés phénoliques pas très répandus dans le règne végétal, le trans-resvératrol et le trans-picéide sont le plus particulièrement au niveau des grains de sorgho (**Brohan et al., 2011**).

11 Rôle et propriétés des polyphénols

Les composants phénoliques jouent un rôle important dans les processus physiologiques (la croissance cellulaire, la germination des grains et la maturation des fruits) (**Biozot et charpentier., 2006**). Utilisés en thérapeutique comme : antioxydants, antiradicalaires, antimicrobiens, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques (**Bahorun., 1997 ; Cetkovic et al., 2008**).

Partie 01: Étude bibliographique

11.1 Activité antioxydante

Les composés phénoliques présentent une activité antioxydante, il possède de potentiel antioxydant in vitro que les vitamines et les caroténoïdes (**Weichselbaum et Buttriss, 2010**). Les polyphénols sont capables aussi de chélater des métaux pro-oxydants comme le fer et le cuivre (**Yang et al., 2001**).

11.2 Activité anticancéreuse

Certains flavonoïdes provoquent une activité anticancérogène, la quercétine inhibe la croissance cellulaire et peut être considérée dans la prévention du cancer de la peau (**Marfek, 2003**).

11.3 Activité anti-inflammatoire

Il y a des flavonoïdes qui permettent de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire in vitro et autre agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (**Laughton., 1991 ; Read., 1995 ; Sánchez De Medina et al ., 2002**).

11.4 Activité antimicrobienne

Les effets antimicrobiens sont très complexes, il faut citer :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne.
- L'inhibition du métabolisme microbien (**Milane. 2004**).

Le mécanisme de toxicité lié par l'inhibition des enzymes hydrolytiques ou d'autres interactions (**Cowan. 1999**).

Partie 02: Analyse des articles

Partie 02: Analyse des articles

Article 01: Ciblage phytochimique et activité antibactérienne des feuilles de sorgho bicolor dérivés de culture *in vitro* (Sir elkhatim et al., 2019)

12 Introduction

Sorgho bicolor (L.) Moench subsp. Bicolor (Famille: Poaceae) est l'une des cultures céréalières les plus importantes cinquièmes après le riz, le blé, le maïs et l'orge dans le monde et la principale production céréalière vivrière en Afrique, en Amérique centrale et en Asie du Sud (FAO., 2012). Cependant, le sorgho est plus tolérant aux maladies, aux ravageurs, à la sécheresse et aux sols pauvres. Le sorgho est la culture prédominante au Soudan couvrant une superficie de 9,8 millions d'hectares qui représentaient plus de 60% de la superficie totale des céréales cultivées, avec une production d'environ 4,9 millions de tonnes contribuant à 9,1% de la production mondiale totale en 2018 (FAO., 2019).

Le Sorgho utilisé principalement pour la production de céréales en plus de la culture pour la production de sirop, l'alimentation et la production de biocarburants. D'autres utilisations importantes, en particulier des feuilles, des graines, des tiges, des glumes et des racines, étaient également disponibles, notamment les additifs alimentaires et les produits pharmaceutiques populaires. Les pigments rouges ou violets sont en grande partie extraits de la gaine et utilisés comme colorants alimentaires tels que le fromage et les bouillies, et colorants pour le cuir, le textile et le bois dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie (Adetuyi et al., 2007 ; Akogou et al., 2018). Les extraits de sorgho auraient des propriétés anti-avortement, cyanogènes, adoucissantes, diurétiques, émoullientes, intoxicantes et toxiques (Duke et Wain., 1981). Divers remèdes traditionnels ont été préparés à partir de sorgho pour traiter le cancer, les maladies du sein, le paludisme, les gonflements tuberculeux, l'eczéma, la dysenterie, la diarrhée, les maux d'estomac, les helminthes, les douleurs osseuses, l'épilepsie, la drépanocytose, l'anémie et comme hématopoïétique (Duke et Wain., 1981 ; Ademiluyi et al., 2014).

Les rôles thérapeutiques rapportés sur le sorgho sont des résultats des effets anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, antibiotiques, antifongiques, propriétés antivirales, hépatoprotectrices, anti-ulcéreuses, antinéoplasiques, hypocholestérolémiantes et ralentissant la digestibilité (Duke et

Partie 02: Analyse des articles

Wain., 1981 ; Dykes et al., 2009). Ces fonctions pharmaceutiques sont liées aux contenus phytochimiques de la plante tels que les phytostérols, les policosanols, les saponines, les caroténoïdes et les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, les tanins et les anthocyanes (**Salazar-lopez et al., 2018**). Différents flavonoïdes et acides phénoliques importants ont été identifiés dans l'extrait de feuilles de sorgho, notamment l'acide gallique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide ellagique, la rutine, l'isoquercitrine, la quercitrine, la quercétine et le kaempférol (**Borokini., 2017**). La coque pigmentée contient une forte concentration de composés phénoliques, notamment des acides phénoliques, des 3-désoxyanthocyanes et tanins condensés (**Dykes et al., 2009**). Presque toutes les classes de composés phénoliques se trouvent dans le sorgho sous forme d'acides phénoliques, de flavonoïdes et de tanins condensés (**Ayala-soto et al., 2014**). Les concentrations totales de phénol sont estimées à 1,1-1,5% du poids sec des racines et 1,1-2,2% du poids sec des parties aériennes du sorgho cultivé au Sénégal (**Sene et al., 2001**). Les métabolites secondaires rapportés sur le sorgho font partie intégrante de la structure cellulaire ou des composants des parois cellulaires végétales et les compositions dépendent du génotype du sorgho et des facteurs environnementaux au cours de la croissance des cultures (**Duodu et Awika., 2019**). Des facteurs génétiques contrôlant aussi la couleur et la caractéristique des grains.

En raison de l'extraordinaire contenu phytochimique bénéfique des parties végétatives du sorgho, diverses recherches sur les activités biologiques ont été effectuées. De telles études incluent l'activité antimicrobienne de l'extrait de tige (**Adetuyi et al., 2007**). Les propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices in vitro de la gaine foliaire (**Benson et al., 2013**), et diverses études in vivo sur des rats utilisant des extraits de feuilles de sorgho, de base de feuille et de graine foliaire se sont avérées anti-falciformes (**Mojisola et al., 2009**), rehaussent les paramètres hématologiques (**Salawu et Salimon., 2014**), écorce de tige anti-anémique (**Oladiji et al., 2007**), pour les activités anti-nociceptives et anti-inflammatoires (**Nwinyi et Kwanashie., 2009**) et hépatotoxicité et inhibiteur de stress oxydatif (**Ademiluyi et al., 2014**).

L'objectif de cette étude est le criblage phytochimique et l'évaluation de pouvoir antimicrobien des extraits des feuilles du sorgho

Partie 02: Analyse des articles

13 Matériel et méthodes

13.1 Matériel végétal et préparation d'extrait

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des feuilles entièrement dévolues qui ont été collectées à partir de pousses de sorgho élevées in vitro, séchées à l'air et croquées puis stockées dans un récipient étanche jusqu'à utilisation. Les feuilles en poudre (100 g) ont été extraites successivement dans l'éthanol à l'aide d'un appareil d'agitation magnétique pendant 4 heures à température ambiante. L'extrait éthanolique a été filtré sur papier filtre (Whatman n°1) puis évaporé et séché à l'air et le résidu, après obtention du poids final, a été maintenu à 4°C jusqu'à utilisation.

13.2 Culture in vitro de sorgho

Pousse in vitro (1,5-2,0 cm de long avec 2-3 feuilles) de *Sorghum bicolor* cultivar Butana utilisé comme explants. Les pousses étaient déjà maintenues sur du milieu Murashige et Skoog (MS) (Murashige et Skoog, 1962). Enrichi d'adénine 6-benzyle (BA) à 1,0 mg/L. Les explants des pousses ont été sous-cultivés sur un milieu MS complété par différentes concentrations (0,0, 1,0, 2,0 mg/L) de BA ou d'acide indole-3-butyrique (IBA). Le milieu de la sclérose en plaques a été augmenté de 3 % de saccharose et le pH a été ajusté à 5,8 avant d'être autoclavé à 121 °C (1,1 kg/cm³) pendant 15 min. Toutes les cultures ont été incubées à 252 °C sous une photopériode de 16 h de lumière/8 h de noirceur. Des données sur l'induction des pousses, la longueur des pousses, le nombre de feuilles et l'enracinement par pousse ont été recueillies après quatre semaines de culture.

13.3 Criblage phytochimique

Le dépistage phytochimique des matières actives a été effectué pour les extraits à l'aide des méthodes décrites avec quelques modifications. La présence d'alcaloïdes dans les extraits est

Partie 02: Analyse des articles

testée à l'aide du réactif de Wagner (Mamts et Jyoti., 2012). Le test pour les stéroïdes a été effectué selon la méthode avec modifications (Khan et Ranjini., 2013). Test pour les flavonoïdes dans le matériel végétal en prenant 2 ml de l'extrait dans un tube à essai et 2 à 3 gouttes de NaOH dilué ont été ajoutées (Khan et Ranjini., 2013). Des essais de tanins ont été effectués avec quelques modifications (Doherty et al., 2010).

13.4 Activité anti microbienne

L'activité antibactérienne des extraits étudiés a été testée sur 04 souches bactériennes, deux souches à Gram positif *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et deux souches à Gram négatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. La méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques) a été utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne, *in vitro* des extraits des feuilles du sorgho (NCCLS., 1999).

13.5 Analyse statistique

Chaque expérience a été répétée trois fois. Les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA). La séparation moyenne a été analysée à l'aide du nouveau test à intervalles multiples de Duncan à la valeur $P < 0,05$. Toutes les valeurs ont été exprimées sous forme d'erreurs-types moyennes.

Article 02: contrôle de la croissance de coliform et moules dans le maltage du sorgho bactérien et culture de levure (Lefyedi et Taylor, 2007)

14 Introduction

Le sorgho malté traditionnel à plancher extérieur peut être contaminé par des bactéries et des moisissures coliformes qui peuvent potentiellement produire des mycotoxines (Lefyedi et al., 2005). Récemment nous avons montré que ces microflore indésirables de malt de sorgho

Partie 02: Analyse des articles

peuvent être contrôlées par trempage dans du NaOH16 dilué. Cependant, un développement récent vise à inhiber la croissance de bactéries et de moisissures indésirables par l'ajout de cultures microbiennes souhaitables en tant qu'agents de biocontrôle naturels dans steps (**Lowe et Arendt., 2004**). La bactérie de l'acide lactique (LAB) (**Laitila et al., 2002**), et la levure *Geotrichum candidum*⁴ se sont avérées efficaces pour inhiber les microorganismes indésirables dans le maltage de l'orge. L'inhibition des coliformes et des moisissures par LAB est attribuée principalement au faible pH, résultant de la production de lait et d'autres acides (**Noutet Rombouts., 1992 ; Lowe et Arendt., 2004**). La synthèse des bactériocines (**Batishet al., 1997 ; Gourama et Bullerman., 1995 ; O'Mahony et al., 2000**). et des composés antifongiques (**Vaughan et al., 2005**), et l'appauvrissement des nutriments peuvent également jouer un rôle (**O'Mahony et al., 2000**). En ce qui concerne le maltage du sorgho, il est important de noter que de nombreuses bactéries d'acide lactique antimicrobiennes ont été isolées à partir d'échantillons de sorgho cru (**Hartnett et al., 2002**). Deux d'entre elles, qui ont été identifiées comme étant des espèces d'*Escherichia*, se sont révélées être des producteurs de bactériocine. En ce qui concerne l'activité antifongique de LAB, le mécanisme précis par lequel elle a lieu est apparemment difficile à définir car elle peut souvent être due à une interaction complexe entre différents composés et le champignon visé (**Vaughan et al., 2005**). En ce qui concerne le mécanisme des activités antimicrobiennes de la levure, Boivin et Malanda⁴ ont signalé que lorsque la levure *G. candidum* a été ajoutée pendant le trempage du grain d'orge, elle a inhibé d'autres microorganismes par la concurrence. Ce mode d'inhibition a également été observé lorsque des levures ont été utilisées comme agents de lutte biologique contre les maladies post-récolte (**Jone et Prusky., 2002**), comme les levures ont pu coloniser et survivre sur la surface des fruits pendant de longues périodes dans différentes conditions et elles ont également utilisé les nutriments disponibles pour proliférer rapidement, limitant la disponibilité des nutriments pour les pathogènes. En plus d'offrir la possibilité d'améliorer la sécurité et la qualité du malt, l'utilisation de cultures microbiennes pour le trempage est considérée comme facile à utiliser, respectueuse de la nature, peu coûteuse et ne conduit pas à la formation de composés toxiques, ni modifier les propriétés nutritionnelles et gustatives du produit céréalier (**Lowe et Arendt., 2004**).

L'objectif de cette étude consiste à déterminer et contrôler la croissance des coliformes et des moisissures dans le maltage du sorgho en présence de quelques souches microbiennes

Partie 02: Analyse des articles

15 Matériel et méthodes

15.1 Grain de sorgho

Deux cultivars de sorgho rouge sans tanin condensé, NK 283 et PAN 8546, ont été utilisés comme décrit dans notre travail précédent (Lefyedi et al., 2005; Lefyedi et Taylor., 2006).

15.2 Microorganismes

Des souches bactériennes: (*Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus*, *Saccharomyces spp.* et *Bacillus spp*) et des souches fongiques (*Aspergillus flavus*, *Phoma sorghina*, *Curvularia sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus fumigatus* et *Alternaria alternata*). ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne *in vitro*.

Différents milieux de cultures ont été préparés pour la culture et la conservation de ces microorganismes:

La gélose dextrose de pomme de terre (PDA) pour les souches fongiques.

Le milieu MRS (gélose et bouillon) pour *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus*

Extrait de malt (gélose et bouillon) pour *Saccharomyces spp*

La gélose et le bouillon nutritif pour les *Bacillus spp.*

15.3 Analyse statistique

Des échantillons en double ont été évalués au cours de chaque analyse et les expériences ont été répétées trois fois pour obtenir un total de six observations pour chaque analyse. Les données ont été analysées à l'aide du programme STATGRAPHICS 5.0 (Statistical Graphics Corporation,

Partie 02: Analyse des articles

Rockville, États-Unis). L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée au niveau de signification de 0,05. Les différences entre les moyennes ont été déterminées par la méthode de la différence la moins significative.

Article 03: Impact des polyphénols de la céréale du sorgho sur le microbiote de poids normal et sur les sujets en surpoids/ obèses pendant la fermentation fécale in vitro.

16 Introduction

Au cours des dernières décennies, le côlon humain est devenu un centre d'activités microbiennes qui ont une incidence sur de nombreux aspects de la santé humaine. La dysbiose, ou déséquilibre microbien, a été impliquée dans un certain nombre de maladies chroniques évolutives, dont l'obésité. Plus de 70 % des adultes aux États-Unis sont classés comme étant en surpoids ou obèses; non seulement ces conditions menacent la qualité de vie, mais elles augmentent aussi le risque de maladies chroniques comme le diabète de type 2, les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux (**Obesty et Overweight., 2018 ; Adult obesity causes ; 2018**). Des études sur des animaux et des humains indiquent que le microbiote intestinal joue un rôle dans le maintien du poids corporel et le développement de l'obésité, bien que les mécanismes exacts demeurent imprécis (**Khan et al., 2016**). Des différences marquées dans la population bactérienne ont été observées dans le microbiote des individus en surpoids/obèses par rapport aux individus de poids normal (**Collado et al., 2008 ; Riva et al., 2017**). Ces résultats impliquent le microbiote intestinal comme cible potentielle des thérapies nutritionnelles pour prévenir/réduire la prise de poids et l'obésité.

17 Matériel et méthode

Partie 02: Analyse des articles

17.1 Sons, étalons et réactifs de sorgho

Des sons de sorgho noirs et de sumac ont été achetés au marché local et au marché Nu Life (Scott City, KS, USA) et des fructooligosaccharides (FOS) de Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Irlande). Le réactif de Folin–Ciocalteu, le 4-diméthylaminocinnamaldehyde (DMAC), le 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide butyrique, l'acide propionique et l'acide acétique ont été obtenus de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, É.-U.). La lutéolinidine et l'apigéninidine provenaient de Chromadex (Irvine, Californie, États-Unis).

17.2 Préparation de polyphénols à partir d'échantillons de son de sorgho

Les extractions de polyphénols ont été effectuées selon (Awika et al., 2004) avec des modifications. Des échantillons de son de sorgho dégraissé (5 g) et du solvant d'extraction (1 % de HCl dans 70 % de méthanol) ont été mélangés à un rapport de 1:60. Les mélanges ont été agités à température ambiante pendant 2 h et filtrés sur du papier filtre Whatman No. 42 (GE Healthcare, Amersham, Royaume-Uni). Le solvant a été éliminé par évaporation rotative à 30 C et le filtrat aqueux a été appliqué sur une colonne d'extraction en phase solide (SPE) C-18 préactivée (Grace Davidson Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA). Les sucres ont été élués avec 100 ml d'eau et jetés, puis les polyphénols restants ont été élués avec 100 ml de méthanol. Après élution des polyphénols, 50 ml d'eau désionisée ont été ajoutés à l'extrait méthanolique et le méthanol a été éliminé par évaporation rotative à 30 C. L'extrait aqueux concentré a ensuite été congelé puis lyophilisé dans un lyophilisateur VirTis Benchtop SLC (SP Industries, Warminster, PA, USA). Les extraits de polyphénol en poudre, l'extrait de son de sorgho noir (ESB) et l'extrait de son de sorgho sumac (SSE), ont ensuite été regroupés et stockés dans un dessiccateur à 4 C jusqu'à une analyse plus poussée. Des extraits de polyphénols séchés ont été utilisés comme substrats dans l'expérience de fermentation fécale in vitro.

17.3 Analyse de la teneur en polyphénols et de l'activité antioxydante

Partie 02: Analyse des articles

La teneur totale en polyphénols des extraits de son de sorgho (ESB et ESS) a été déterminée à l'aide de l'essai Folin-Ciocalteu selon Singleton et Rossi (**Singleton et al., 1965**) avec des modifications mineures. Les étalons ont été préparés à l'aide d'acide gallique à des concentrations de 3, 125, 6, 25, 12,5, 25, 50 et 100 µg/g. L'ESB et l'ESS ont été dissous pour une dilution de 8000 fois. Dans une plaque de 48 puits, 0,1 mL d'échantillon ou d'étalon, 0,5 ml de réactif de 0,2 N Folin-Ciocalteu et 0,4 ml de 7,5 % de Na₂CO₃ ont été combinés. La plaque a été incubée à température ambiante pendant 2 h et l'absorbance à 760 nm a été déterminée dans un lecteur de microplaques Synergy TT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Tous les échantillons et toutes les normes ont été mesurés en trois exemplaires. La concentration a été déterminée par rapport à une courbe standard d'acide gallique et les résultats ont donc été exprimés en équivalents d'acide gallique (GAE). La teneur totale en proanthocyanidine a été déterminée à l'aide de l'essai de 4-diméthylaminocinnamaldehyde (DMAC) (**Payne et al., 2009**). Des étalons ont été préparés à l'aide de catéchine et d'éthanol (95 %) à des concentrations de 0, 125, 6, 25, 12,5, 25, 50 et 100 µg/g. Dans une plaque à 48 puits, on a combiné 0,15 ml d'échantillon (ESB et PSE dans de l'éthanol pour une dilution de 8000 fois) ou un étalon et 0,75 mL de solution DMAC de 5,7 N, tous en au moins trois exemplaires. Les plaques ont été lues immédiatement à 640 nm dans le lecteur de microplaques. La concentration a été déterminée par rapport à une courbe standard de catéchine et exprimée en équivalents de catéchine. Pour l'analyse quantitative des 3-désoxyanthocyanes (3-DXA), on a utilisé un système HPLC Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) System Gold. Le système était équipé d'une pompe 126, d'un détecteur 168 et d'un échantillonneur automatique 508. Le logiciel utilisé pour la collecte et l'intégration des données était 32 Karat (**Riva et al., 2017**).

Une colonne C18 de 250 4,6 mm (YMC America Inc, Allentown, Pennsylvanie, États-Unis) a été utilisée pour la séparation du 3-DXA dans le sorgho et les normes. La phase mobile était composée de A : acide formique à 5 % dans l'eau et de B : méthanol à 100 %. Le débit était de 1 mL min⁻¹ et le volume d'injection était de 30 µl. Le gradient de phase mobile a été utilisé, avec des modifications mineures : 0–60 min : 2-60 % B, 60–61 min : 60-2 % B, 61–66 min : 2 % B, 66–75 min : 2-0 % B. Les longueurs d'onde surveillées étaient de 280, 340 et 480 nm (**Cho et al., 2004**). L'apigéninidine et la lutéolinidine ont été identifiées et quantifiées à l'aide de courbes standard.

Partie 02: Analyse des articles

Les propriétés antioxydantes ont été déterminées à l'aide du test du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) selon (Brand-Williams et al., 1995). La solution de DPPH a été préparée par dissolution dans du méthanol (0,15 mM) et stockée à 20 C entre les utilisations. Des dilutions en série de l'ESB et de l'ESS (1 à 140 ppm) ont été préparées dans du méthanol. La solution de DPPH (0,95 ml) a été ajoutée à des extraits de 0,05 mL de concentrations variables et agitée. Les plaques ont été lues dans le lecteur de microplaques à 30 min à 517 nm. La concentration efficace pour réduire le radical de 50 % (CE50) a été déterminée pour les deux extraits de son et exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique par gramme. Tous les échantillons et les étalons ont été plaqués en au moins trois exemplaires.

17.4 Fermentation fécale humaine

Après l'approbation de l'étude par l'International Review Board (University of Arkansas; IRB #17-02-433), 22 sujets ont été recrutés dans la région du Nord-Ouest de l'Arkansas : 11 sujets de poids normal (NW, indice de masse corporelle (IMC) < 25) et 11 sujets en surpoids/obèses (OO, IMC ≥ 25). Les critères d'exclusion comprenaient le tabagisme, les maladies digestives, la glycémie à jeun (FBG 100 mg/dl), les médicaments actuels et l'utilisation d'antibiotiques au cours des six derniers mois. Des formulaires de consentement et de dépistage ainsi que des questionnaires sur la fréquence des repas ont été remplis pendant les séances de dépistage. Les réponses à la FFQ (Food Frequency Questionnaire) ont été analysées à l'aide du logiciel Axxya System Nutritionist Pro™ version 4.3.0 (Stafford, TX, É.-U.) basé sur les références de l'USDA. Aucune différence significative dans l'apport en macronutriments et en micro-nutriments n'a été observée entre les groupes de classe de poids ou les sexes. Les caractéristiques des participants sont fournies dans le tableau 8.

Tableau 8 :Caractéristiques du sujet

	All (n = 22)	-----		-----	
		Male (n = 5)	Female (n = 6)	Male (n = 5)	Female (n = 6)
Age (years)	29.0 ± 6.7	29.4 ± 4.8	24.2 ± 2.1	28.2 ± 3.5	34.2 ± 9.7
BMI (kg/m ²)	27.1 ± 5.5	23.0 ± 0.7	22.2 ± 1.2	30.9 ± 2.9	32.2 ± 5.4
FBG (mg/dL)	92.1 ± 4.9	92.9 ± 3.1	90.6 ± 5.0	92.6 ± 6.9	96.3 ± 3.3

Partie 02: Analyse des articles

17.5 Analyse microbienne

Les changements des profils microbiens en réponse aux traitements ont été déterminés en analysant l'ADN bactérien des échantillons à partir du point 0 et 24 h suivant les protocoles décrits précédemment (**Mayta-aoaza et al., 2018**). L'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA). La région V4 du gène bactérien 16S-rRNA a été amplifiée par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) dans Eppendorf Mastercycler Pro S (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) en utilisant AccuPrime Pfx SuperMix et V4 index primers (**Kozich et al., 2013**). Après confirmation de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose, les échantillons d'ADN ont été normalisés avec le kit de plaque de normalisation SequalPrep (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA). La concentration de la bibliothèque regroupée finale de la région V4 du gène ARNr 16S des bactéries a été séquencée à l'aide de la plateforme Illumina MiSeq (**Kozich et al., 2013**).

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

Article 01: Criblage phytochimique et activité antibactérienne de feuilles de sorgho bicolor dérivés de culture in vitro

18 Résultats

18.1 Culture in vitro de sorgho

La présence d'IBA 2,0 mg/l a considérablement amélioré la croissance des pousses (tableau 8) avec les pousses les plus longues ($P > 0,05$) (5,7 cm) et le plus grand nombre de feuilles (7,9 feuilles). De plus, certaines des pousses étaient des racines induites affectées par la concentration de la ZICO. Ajout d'IBA à une concentration plus faible (1,0 mg/l) pour l'enracinement préféré des pousses comparativement à d'autres traitements de régulation de la croissance des plantes (RPG) (tableau 9). L'amélioration de la croissance des pousses et l'enracinement des pousses de sorgho in vitro par l'utilisation de la ZICO ou des auxines ont été identifiés par plusieurs auteurs (Liu et al., 2013). La présence de BA a détérioré la longueur des tiges (à 1,9 cm à 2,0 mg/l BA) par rapport au témoin (2,0 cm) compte tenu de la longueur initiale des pousses (moyenne de 1,7 cm). Un effet négatif similaire de l'augmentation de la concentration de BA sur la longueur des pousses de sorgho a été signalé (Baskaran et Jayabalan., 2005).

Tableau 9 : Effet de la IBA et de la BA sur la longueur des pousses, le nombre de feuilles, la présence de multiples pousses et la présence de racines secondaires après 4 semaines de culture

PGRs (mg/L)	Longueur de la pousse (cm)	Nombre de feuilles	Plusieurs pousses	Enracinement
Control	2.0 ± 0.1c	3.0 ± 0.0d	-	-
IBA 1	3.15 ± 0.3b	5.62 ± 0.5b	-	++
IBA2	5.69 ± 0.4a	7.85 ± 0.5a	+	+
BA1	1.73 ± 0.1c	3.62 ± 0.2cd	++	-
BA2	1.88 ± 0.4c	4.23 ± 0.3c	++	-

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

18.2 Criblage phytochimique des feuilles de sorgho

Les résultats du dépistage phytochimique qualitatif de l'extrait d'éthanol de feuilles de sorgho ont indiqué la présence d'alcaloïdes, de tanins, de flavonoïdes, de saponines, de stérol et de triterpènes (tableau 10). De même, la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de saponines et de terpénoïdes a été détectée dans différentes parties aériennes du sorgho, comme l'extrait aqueux de feuilles (Salawu et Salimon., 2014) et l'extrait aqueux de tige/tige dans lequel les terpénoïdes n'ont pas été détectés (Adenike et Olalekan., 2018). En revanche, on n'a pas décelé d'alcaloïdes et de stéroïdes dans le méthanol et les extraits aqueux de feuilles de sorgho (Borokini., 2017).

Tableau 10 :Dépistage phytochimique de l'extrait de feuilles de sorgho bicolor in vitro.

Phytochimique	Indice de présence
Alcaloïdes	+
Flavonoïdes	+
Stéroïdes et triterpènes	+
Tanins	+
Saponines	+

Les feuilles et la gaine du sorgho avaient des teneurs en phénols plus élevées, jusqu'à 600 fois plus élevées que leurs grains respectifs, avec des propriétés antioxydantes in vitro que celles que l'on retrouve couramment dans les grains (Njongmet., 2009). Les phénols des sorghos appartiennent à deux grandes catégories : les acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique) et les flavonoïdes (tanins et anthocyanes) (Ademiluyi et al., 2014). Divers flavonoïdes ont été identifiés chez le sorgho, notamment les flavanones eriodictyol, la naringénine et l'eriodictyol glucoside, la flavone apigénine et les 3-désoxyanthocyanines lutéolinidine et apigéninidine (Dukes et al., 2009).

18.3 Activité antimicrobienne des feuilles de sorgho

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

Toutes les concentrations de l'extrait de feuilles de sorgho ont montré une activité antimicrobienne élevée contre les quatre souches bactériennes étudiées (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *E. coli*) par rapport aux antibiotiques testés de la ciprofloxacine .

Évidemment, l'effet inhibiteur de l'extrait a augmenté de façon significative (P 0,05) avec l'augmentation de la concentration. L'effet inhibiteur le plus fort (19,0 mm) a été observé contre *B. subtilis* à 100 mg/l d'extrait de feuilles. La zone inhibitrice minimale enregistrée (avec une concentration de 100 mg/l) était de 17,5 mm contre *P. aeruginosa* (tableau 11).

L'extrait de feuilles brutes de sorgho était légèrement plus efficace contre les bactéries à Gram positif que les souches à Gram négatif . Plusieurs auteurs ont signalé des variations dans la réponse des bactéries à Gram positif et des souches à Gram négatif aux différents extraits des parties aériennes du sorgho. Par exemple, les extraits bruts de graine de feuille de sorgho ont démontré une activité contre *B. subtilis* (**Oriola et al., 2015**). En revanche, l'extrait brut de tige de sorgho a montré une inhibition élevée contre le *P.aeruginosa* par rapport à *B. subtilis* (**Adetuyi et al., 2007**). D'autre part, les extraits de gaines de feuilles de sorgho colorant trouvés n'ont pas de propriétés antibactériennes sur *E. coli* testé dans un fromage traditionnel ouest-africain riche en nutriments (**Akogou et al., 2018**).

Tableau 11 :Activité antibactérienne de l'extrait de feuilles de sorgho

Zone d'inhibition (mm)	Dose (MG/L)	Antibiotic			
		Bactéries gram-positif	Bactéries gram-négatives		
B.s	S.a	P.a	E.c		
Extrait de sorgho	0	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e
12.5	10.2 ± 0.1e	11.0 ± 1.0d	10.0 ± 0.1e	11.1 ± 1.0d	
25	14.1 ± 0.1d	12.1 ± 1.0d	13.2 ± 1.2d	14.0 ± 0.1c	
50	16.0 ± 0.1c	16.0 ± 0.1c	15.0 ± 0.1c	17.0 ± 0.1c	

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

				1.0b	
100	19.0 ± 1.0b	18.0 ± 1.0b	17.5 ± 0.1b	18.0 ± 1.0b	
Ciprofloxacine	100	31.0 ± 0.01a	30.0 ± 1.0a	29.0 ± 1.0a	30.0 ± 0.1a

19 Discussion

Cependant, des tendances similaires à exercer une activité plus élevée contre les bactéries gram-positives par rapport aux souches gram-négatives ont également été signalées sur les extraits de graines de sorgho. L'extrait de graines de sorgho a présenté une activité modérée à élevée contre *B. subtilis* et *S. aureus* comparativement aux bactéries gram négatives étudiées (**Mosovska et al., 2011**). De plus, l'extrait phénolique brut condensé de sorgho sans tanin s'est révélé efficace seulement contre *B. cereus* (gram positif), alors qu'aucun des types d'extraits phénoliques de sorgho testés n'a eu d'effets inhibiteurs sur *E. coli* (gram négatif) (**Khadambi., 2007**). De plus, l'extrait de saponines de graines de sorgho a inhibé la croissance de *S. aureus*, ce qui indique que l'extrait a un effet inhibiteur sur les organismes gram positifs, mais pas sur les organismes gram négatifs (**Soetan et al., 2006**). De plus, l'extrait de tanin de graines de sorgho a montré un effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* plus élevé que sur *E. coli* (**Suliman et al., 2007**). En revanche, tous les extraits et fractions de graines de sorgho ont montré un fort effet inhibiteur contre *E. coli*, et parmi les quatre cultivars étudiés, un seul a montré un effet inhibiteur contre *B. subtilis* (**Kil et al., 2009**). De même, aucun des extraits méthanoliques de grains pigmentés de dix lignées de sorgho n'a montré d'activité antibactérienne contre *B. subtilis*, alors que neuf d'entre eux ont fortement inhibé la croissance d'*E. coli* (**Mohamed et al., 2009**).

Ces variations de l'activité antibactérienne entre les bactéries gram-positives et gram-négatives sont principalement dues à des variances dans les structures de la paroi cellulaire du type gram-bactéries. En règle générale, les métabolites secondaires présents dans les extraits de plantes peuvent inhiber les bactéries gram-positives plus que les bactéries gram-négatives (**Rakholiya et al., 2013**). Par exemple, la paroi cellulaire des bactéries gram négatives est entourée d'une membrane supplémentaire de lipopolysaccharide externe, qui fonctionne comme une surface

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

hydrophile qui empêche la perméabilité des composés hydrophobes tels que les tanins et d'autres extraits de nombreuses plantes (**Mosovska et al., 2001 ; Rakholiya et al., 2013 ; Helander et al., 1998**).

La dissimilarité observée dans les activités antimicrobiennes des extraits de sorgho pourrait être attribuée au génotype végétal ou au type de solvant utilisé pour l'extraction qui produit des substances bioactives et une composition différente, entre autres. Par exemple, diverses études ont montré que les niveaux de flavonoïdes et leur composition étaient affectés par le génotype du sorgho (**Dykes et al., 2009**). De même, on a constaté une grande variation de la teneur en tanins de trois cultivars de sorgho soudanais (**Sulieman et al., 2007**).

Les types de solvants ont produit différents composés phytochimiques qui exercent une activité antimicrobienne différente au moyen de différents mécanismes. Ainsi, l'analyse phytochimique des feuilles de sorgho a révélé l'absence de saponine et d'extrait aqueux de tanin dans l'extrait de méthanol (**Borokini., 2017**). Les composés phénoliques sont toxiques pour les cellules bactériennes et peuvent inhiber la croissance des bactéries par plusieurs actions telles que la modification de la perméabilité des membranes cellulaires, les changements dans diverses fonctions intracellulaires induites par la liaison de l'hydrogène aux enzymes ou par la modification de la rigidité de la paroi cellulaire avec des pertes d'intégrité dues à différentes interactions avec la membrane cellulaire (**Bouarab-chiban et al., 2019**). Dans le cas des bactéries gram positives, des modifications intracellulaires du pH des composés phénoliques, ainsi que des interférences avec le système générateur d'énergie (ATP), ont été signalées (**Djilani et Diko., 2012**). Les autres métabolites secondaires, tels que les saponines, contribuent également à l'activité antimicrobienne du sorgho et peuvent endommager les membranes cellulaires causant des fuites de matériaux cellulaires, conduisant finalement à la mort cellulaire (**Mshvildadze et al., 2000**).

20 Conclusion

Les cultures de tissus végétaux sont une technique alternative intéressante à la plante entière pour la production de la valeur élevée des substances actives. Les résultats de cette étude ont montré que les activités antimicrobiennes exhalées par les feuilles in vitro de *Sorghum bicolor* en raison de la présence d'ingrédients bioactifs. D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

l'identité du composé thérapeutique dans cet extrait brut de la plante, ainsi que pour déterminer leurs spectres complets d'efficacité.

Article 02: contrôle de la croissance de coliforms et moules dans le maltage du sorgho bactérien et culture de levure

21 Résultats et discussion

21.1 L'inhibition de la croissance microbienne

On a découvert que parmi les microorganismes étudiés, les deux LAB *P. pentosaceus* (L5) et *L. plantarum* (L9) et un *Saccharomyces sp.* (Y1) activité antifongique et croissance microbienne contrôlée en laboratoire , le maltage montre qu'avec l'essai de diffusion discale, *P. pentosaceus* (L5) a montré une inhibition contre cinq espèces de moisissures. Le *Saccharomyces sp.* (Y1) a inhibé quatre moisissures et le *L. plantarum* (L9) trois moisissures. L'inhibition des moisissures observée avec cet essai peut être attribuée à l'acide 21, 28 lactique de production et aux composés antimicrobiens extracellulaires, car il a été constaté que certaines souches de *L. plantarum* et de *P. pentosaceus* 1,9,10,25,27 produire des protéines antifongiques. Cependant, une telle activité chez *Saccharomyces* n'est pas documentée.

Les cultures (L5, L9 et Y1) ont ensuite été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des moisissures et des coliformes pendant le maltage. Le cultivar de sorgho NK 283 représentait une très mauvaise qualité du grain, avec seulement 40 % de germes et un niveau de contamination microbienne plus élevé que le PAN 8546, qui représentait un grain de meilleure qualité avec 88 % de germes. Les conditions de trempage étaient idéales pour la croissance microbienne du grain de sorgho, car l'APC est passé de 104 à 107 ufc/g au début de la trempage à 107 à 109 ufc/g à la fin des 8 heures de trempage, avant le rinçage. Cette augmentation est probablement attribuable au fait que, pendant le trempage, les nutriments s'écoulent des grains dans l'eau abrupte et deviennent disponibles pour les micro-organismes (Priest et Campbell., 1996). À la fin du trempage, le rejet de l'eau à forte pente a réduit le nombre de microorganismes, car ceux-ci ont été emportés. Le nombre a encore augmenté pendant les quatre jours de germination, puis

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

le séchage du malt a réduit le nombre. Toutes les cultures ont ajouté une VAP accrue, à l'exception de la VAP dans l'échantillon inoculé Y1 de NK 283, qui était plus faible tout au long du processus de maltage. Une raison possible pour cela est que les VAP ont été dépassées par la levure inoculée. Aucune des cultures n'a inhibé le LAB ou les levures. En fait, le nombre de LAB dans les échantillons L5 et L9 était plus élevé que dans les échantillons Y1 à 0 h et tout au long du processus de maltage.

C'est parce que l'inoculation a été effectuée avec *L.plantarum* (L5) et *P. pentosaceus* (L9), qui sont eux-mêmes LAB. De même, l'inoculation de *Saccharomyces* sp. (Y1) a entraîné un nombre élevé de levures tout au long du processus de maltage. En général, les cultures ont provoqué une réduction significative des moisissures d'un à deux cycles logarithmiques.

Les cultures L5, L9 et Y1 ont également inhibé les coliformes (tableau 11). Dans le malt NK 283, où les coliformes étaient présents en nombre significatif, ils ont été inhibés par trois cycles logarithmiques par les cultures *Lactobacillus* et *Pediococcus* et deux cycles logarithmiques par la culture *Saccharomyces*. Avec les deux cultivars de sorgho, l'ajout des cultures L5 et L9 a réduit le pH de l'eau à forte pente de 6,0 à 6,4 au début du trempage à 3,9 à 4,0 à la fin, tandis que les pHs des témoins n'ont été réduits qu'à 4,5 à 4,8. En revanche, les pHs des témoins ont également été réduits dans une certaine mesure, passant d'environ 6,0 au début de la trempe à 4,5 à 4,8 à la fin de la trempe, tandis que le pH des cultures de levure (Y1) n'a pas été réduit de façon substantielle. Le faible pH observé avec les cultures LAB était dû à la production d'acide lactique par les cultures et ceci était probablement responsable de l'inhibition des coliformes. Un faible pH inhibe les coliformes et autres contaminants d'origine alimentaire en dissociant leurs membranes²⁶. Une étude de la souche de *P. pentosaceus* utilisée dans la présente enquête a montré qu'elle produisait la bactériocine pédiocine et qu'elle était responsable de ses activités antimicrobiennes contre d'autres bactéries, notamment *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* (**Gurira et Buys., 2005**). Cependant, la pédiocine n'est pas active contre les pathogènes à Gram négative (**Holzappel et al., 1995**), et pourrait donc ne pas avoir été responsable de l'inhibition des coliformes. La production par le LAB de composés de faible poids moléculaire (acide benzoïque, 5-méthyl-2,4 imidazolinedione, tétrahydro-4-hydroxy-4-méthyl-2H-pyran-2-one et 3-(2-méthylpropyl)-2,5 pipérazine) qui sont actifs contre les bactéries Gram négative (**Niku-Pavoola et al., 1999**). Il est possible que la souche de *P. pentosaceus* utilisée dans cette étude ait produit de tels composés antimicrobiens. Il est également possible

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

que la souche de *P. pentosaceus* ait produit des composés antifongiques, car il a été démontré que de nombreuses activités antifongiques de LAB et les facteurs actifs ont été identifiés¹⁸. L'inhibition des coliformes par d'autres bactéries peut aussi être attribuable à la concurrence des nutriments (**Holzapfel et al., 1995**) .

Comme il a été mentionné, la production de composés inhibiteurs de moisissures par *Saccharomyces* spp. n'est pas documentée. Par conséquent, l'effet antimicrobien de la culture Y1 contre les moisissures et les coliformes pourrait être attribuable à la concurrence microbienne, comme c'est le cas avec *G. candidum* pendant le maltage de l'orge (**Boivin et Malanda., 1997**). Les levures sont de bons agents de biocontrôle parce qu'elles sont capables d'utiliser les nutriments disponibles pour proliférer rapidement, coloniser et survivre pendant de longues périodes dans différentes conditions et donc limiter la disponibilité des nutriments aux bactéries et moisissures (**Jones et Prusky., 2002**). La détection de levures en plus grand nombre que les moisissures et les coliformes dans le traitement Y1 est une indication qu'elle a pu concurrencer ces autres microorganismes et inhiber leur croissance.

Les malts où la plus grande inhibition de moisissures avait eu lieu, c.-à-d. les malts à grains trempés L5 et Y1, ont fait l'objet d'une analyse plus poussée afin d'évaluer dans quelle mesure chaque espèce de moisissure était inhibée .

Notons que le PAN 8546 était moins contaminé par les moisissures que le NK 283. Encore une fois, cela est probablement lié au fait que le PAN 8546 était d'une meilleure qualité que le NK 283 en ce qui concerne la germabilité. Grain de mauvaise qualité est plus sensible aux infections fongiques, en raison du fait que l'oxygène disponible n'est pas utilisé entièrement par le grain et donc les champignons l'utilisent pour leur propre croissance (**Briggs., 1998**). Toutes les espèces de moisissures (*Penicillium* sp., *Eurotium* sp., *F.chlamydosporum*, *A. alternata*, *P. sorghina*, *F. verticillioides*, *R. oryzae* et *Mucor* sp.) ont été considérablement réduites par trempage avec L5 et Y1. La réduction de la plupart des moisissures (*P. sorghina*, *R. oryzae*, *Mucor* sp., *Eurotium* sp., *A. alternata* et *Penicillium* sp.) a été significativement plus importante avec le malt trempé Y1 que dans le malt trempé L5. En fait, avec le traitement Y1, la contamination par les moisissures du malt PAN 8546 était négligeable. Le tableau VIII montre également que l'addition de cultures L5 et Y1 n'a pas augmenté le DP des malts, contrairement à une trempage avec des alcalis dilués (**Lefyedi et Taylor., 2006**) .

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

Cependant, les cultures n'ont pas non plus inhibé l'activité de l'amylase de malt, la culture Y1 *Saccharomyces* a permis d'éliminer plus d'espèces de moisissures que la culture *L5 Pediococcus*. Cependant, la culture L5 a pu inhiber les coliformes dans une plus grande mesure que la culture Y1. Par conséquent, les deux cultures ont été combinées dans divers rapports et ajoutées pendant le trempage dans le but d'obtenir une activité antimicrobienne synergique. Cependant, il n'y a eu aucune inhibition des moisissures ou des coliformes. Le manque d'inhibition est probablement le résultat de la concurrence entre les cultures combinées pour les nutriments, ce qui a pour conséquence qu'ils ne poussent pas de façon optimale, contrairement à la situation où ils ont été inoculés individuellement.

21.2 Cytotoxicité et mycotoxines

Le malt fabriqué à partir de NK 283 présentait une cytotoxicité légèrement supérieure à celle du PAN 8546. Cela pourrait être le résultat de produits toxiques provenant de grains morts, puisque seulement 40% de la NK 283 était germable.

Les valeurs de la CI50 indiquaient que tous les malts étaient relativement non toxiques. Les mycotoxines (aflatoxines, fumonisines, DON et ZEA) n'ont pas été trouvées dans les témoins ou les malts imprégnés des cultures L5 et Y1. Cela est en contradiction apparente avec nos travaux antérieurs qui ont montré la présence de mycotoxines dans le sorgho malt (**Lefyedi et al., 2005**) non traité. Cette différence est probablement attribuable au fait que la température de germination n'a pas été contrôlée et que l'excès d'eau après la pulvérisation n'a pas été retiré du grain. Les moisissures produisent des mycotoxines à une teneur élevée en humidité et dans des conditions environnementales stressantes, comme des fluctuations de température ou des températures extrêmes (très froides ou très chaudes) (**D'Mello et McDonald., 1997**).

22 Conclusion

L'utilisation de *P. pentosaceus* et de *Saccharomyces spp.* comme culture pendant le trempage ont un potentiel comme méthode naturelle de biocontrol microbien dans le maltage du sorgho.

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

Ces cultures inhibent les moisissures et les coliformes à de faibles concentrations qui ne devrait pas présenter de risques pour la santé dans le malt de sorgho.

Le traitement alcalin décrit antérieurement (Lefyedi et Taylor., 2006) . Cependant, en raison de la complexité de maintenir et de grandir les cultures, il est probable que cette technologie ne serait pas appropriée pour les maltages de sorgho avec des infrastructure.

Article 03: Impact des polyphénols de la céréale du sorgho sur le microbiote de poids normal et sur les sujets en surpoids/ obèses pendant la fermentation fécale in vitro

23 Résultats

23.1 Profil phénolique et propriétés antioxydantes des extraits de son de sorgho

Les polyphénols et les proanthocyanidines totaux étaient significativement plus élevés dans l'extrait de son de sorgho sumac (ESS) et les 3-désoxyanthocyanes dans l'extrait de son de sorgho noir ($p < 0,01$) (tableau 12). La capacité de récupération des radicaux a été évaluée à l'aide du radical DPPH et les extraits de sorgho noir (ESB, 274, 0 20, 3 μg d'acide gallique (GAE)/g) et sumac (SSE, 269,5 21,0 μg de GAE/g) ont démontré des capacités antioxydantes sans différence significative entre les deux.

Tableau 12 :Principaux polyphénols des extraits de son de sorgho noir et sumac

	BSE	SSE
Polyphenols (mg gallic acid equiv./g extract)	321.5 \pm 2.7	571.7 \pm 6.0*
Proanthocyanidins (mg catechin equiv./g extract)	8.4 \pm 1.4	86.9 \pm 1.1*
3-Deoxyanthocyanins (mg/g extract)	10.1 \pm 0.3 *	2.0 \pm 0.4
Luteolinidin	9.3 \pm 0.4 *	2.0 \pm 0.4
Apigeninidin	0.9 \pm 0.1 *	ND

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

23.2 Changements généraux dans le microbiote

Après l'extraction et le séquençage de 264 échantillons d'ADN, un total de 5062231 lectures de haute qualité ont été obtenues pour l'analyse des populations microbiennes. La distribution globale du microbiote, la comparaison entre NW et OO et un changement entre le point de temps 0 h et 24 h sont présentés à la figure 4. Au niveau du phylum, la fermentation a été dominée par les Bacteroidetes, dans lesquels nous avons observé une baisse significative au cours des dernières 24 h, une différence significative entre NW et OO à 24 h, et une différence insignifiante entre NW et OO à 0 h sans traitement (contrôle négatif, panneau inférieur gauche). Une interprétation similaire est possible pour tous les microbiotes des phylums et des genres. Cette analyse rétrécit notre attention sur certains microbiotes, et montre comment nous avons stratifié les situations pour la classe de poids et l'effet de temps à tester. Les résultats pour tous les microbiotes sont résumés aux **(tableaux 11 et 12)**.

Les parcelles d'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) n'ont révélé aucune différence dans les communautés bactériennes entre les traitements au point 0 (figure 5A), mais après 24 heures, une séparation claire a été observée entre les traitements contenant du NC et du FOS ($p < 0,05$) (figure 5B). Les extraits de sorgho à eux seuls n'ont pas eu de répercussions importantes sur les communautés bactériennes comparativement au témoin négatif.

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

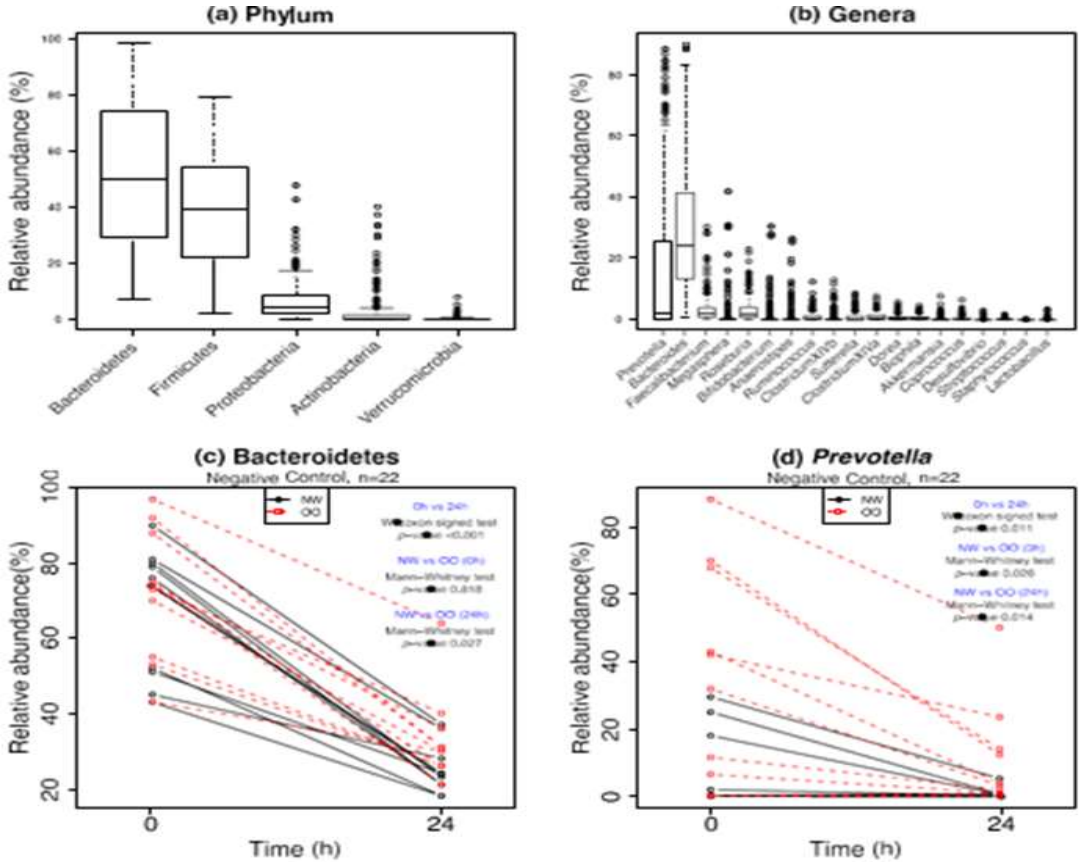


Figure 4 : Dynamique du microbiote (phylum et genres) en fermentation in vitro. Dans (a,b), la distribution du microbiote est illustrée dans le boxplot trié par la plus grande variance. Dans (c,d), l'effet de temps, 0 h vs. 24 h, est montré et testé par un test signé Wilcoxon, et la différence de groupe entre NW et OO est testée par un test Mann-Whitney sous le contrôle négatif (n = 22) pour deux microbiotes sélectionnés

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

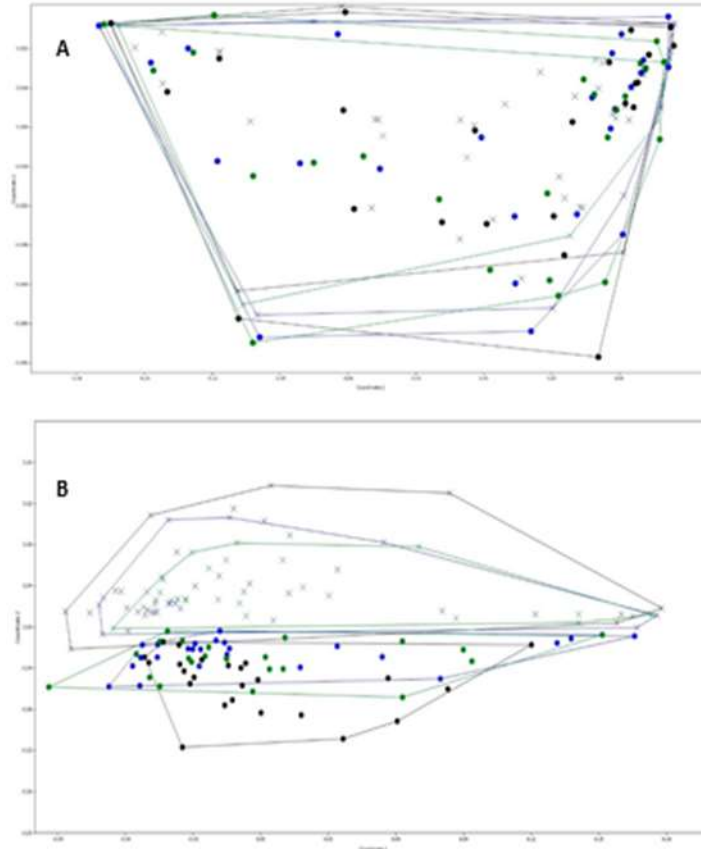


Figure 5 :Graphique d'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) comparant les communautés bactériennes entre les traitements dans les deux groupes combinés ($p < 0,05$). (A) 0 h et (B) 24 h.

• : témoin négatif (NC), x : fructooligosaccharide

1.3. Changements spécifiques dans la population microbienne

Après 24 heures de fermentation in vitro, le groupe OO affichait une abondance plus élevée de Bacteroidetes que le groupe NW (figure 5). Nous avons observé une diminution relative des Bacteroidetes dans tous les traitements. Chez tous les sujets, l'ESB a entraîné une abondance significativement plus élevée de Bacteroidetes à 24 h que la NC et tous les autres traitements ($p < 0,05$) (figure 6).

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

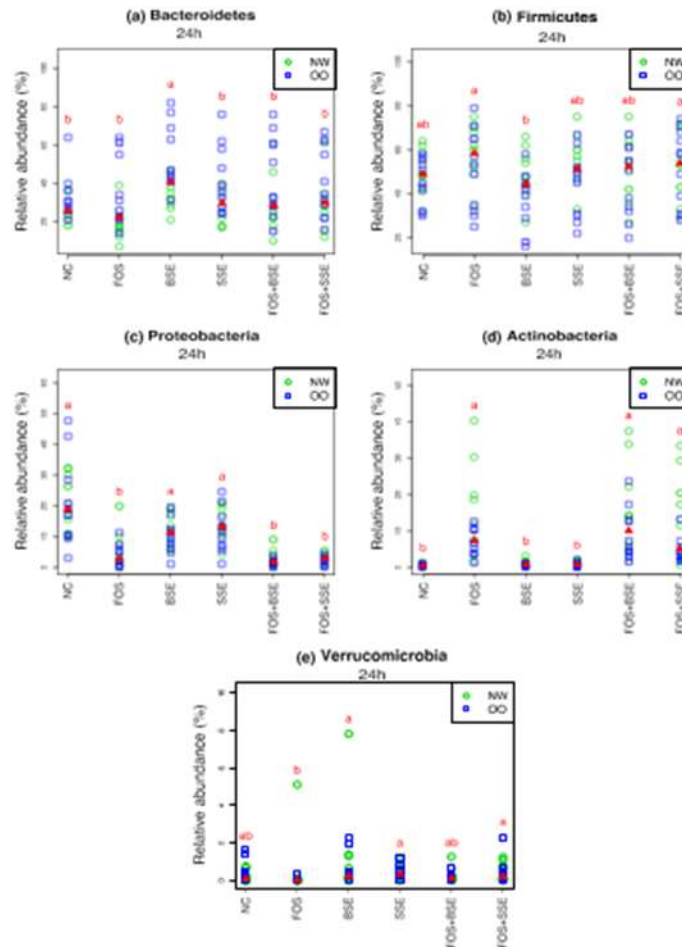


Figure 6 : Abondance relative au niveau du phylum (n = 22). (a) Bactériidés, (b) Firmicutes, (c) Protéobactéries, (d) Actinobactérie, (e) Verrucomicrobie. Les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements à 24 h, obtenues par le test de Friedman et ses comparaisons multiples post hoc au niveau de signification de 0,05. Les médianes sont marquées de triangles rouges. Les classes de poids (NW c. OO) sont marquées de cercles verts et de carrés bleus, respectivement. NC : contrôle négatif, FOS : fructooligosaccharides, ESB : extrait de son de sorgho noir, SSE : extrait de son de sorgho sumac

Le FOS, le FOS + BSE et le FOS + SSE présentaient une abondance significativement plus faible de Proteobacteria après 24 heures comparativement à NC, BSE et SSE ($p < 0,05$) (figure 6).

Par rapport au COT, l'abondance relative de Verrucomicrobia a augmenté dans l'ESB, l'ESS et le FOS + SSE après 24 heures de fermentation in vitro ($p < 0,05$) (figure7).

La prévotella était présente à des niveaux plus élevés en OO que le NW dans tous les traitements après 24 h (figure 7). L'abondance relative de Prevotella a diminué d'environ 15 % dans la NC, mais dans une moindre mesure dans tous les traitements . À 24 h, l'abondance était beaucoup

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

plus élevée que la NC pour l'ESB, l'ESS, le COT + ESB et le COT + PSE ($p < 0,05$), mais pas pour le COT seul (figure 7). De plus, l'ESB et le COT + PSE présentait des niveaux beaucoup plus élevés que le COT ($p < 0,05$) (figure 7).

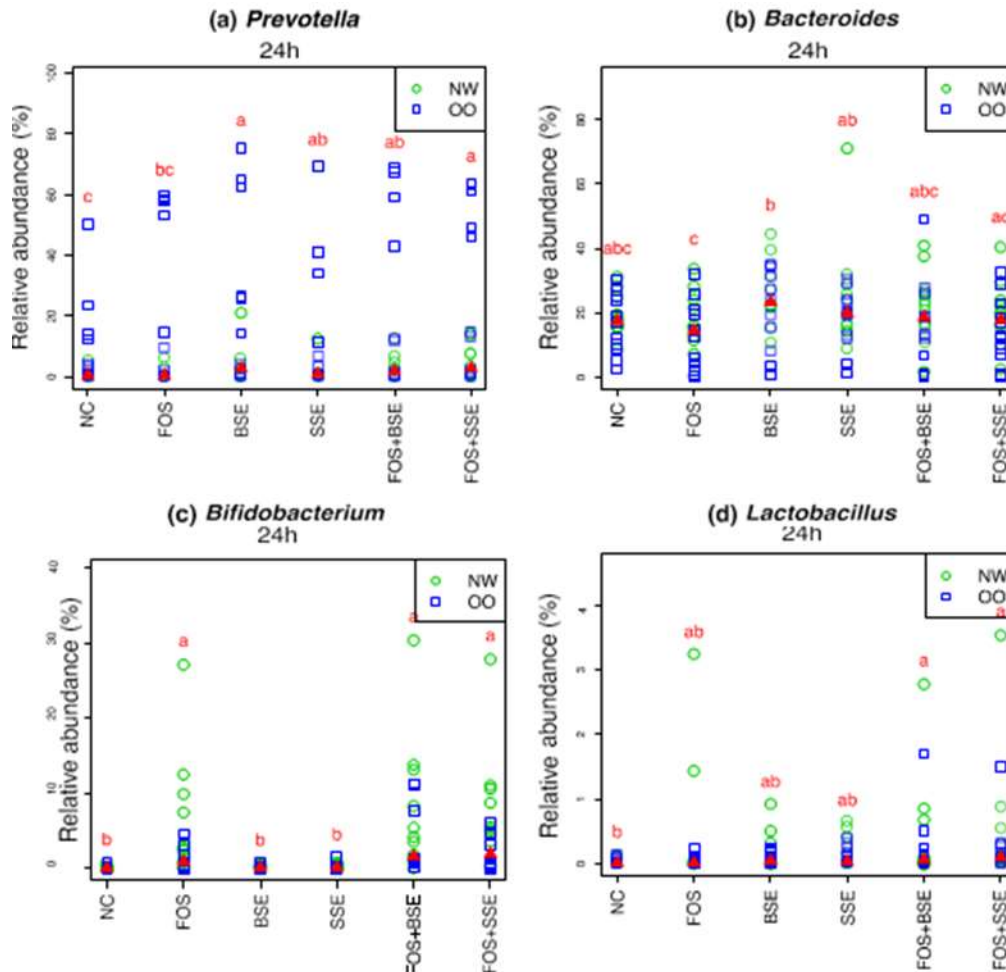


Figure 7: Abondance relative des genres sélectionnés (n = 22). (a) Prevotella, (b) Bacteroides, (c) Bifidobacterium, (e) Lactobacillus. Les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements à 24 h, obtenues par le test de Friedman et ses comparaisons multiples post hoc à un niveau de signification de 0,05. Les médianes sont marquées de triangles rouges. Les classes de poids (NW vs. OO) sont marquées respectivement par des cercles verts et des carrés bleus. NC : contrôle négatif, FOS : fructooligosaccharides, ESB : extrait de son de sorgho noir, SSE : extrait de son de sorgho sumac.

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes de poids. L'abondance relative des anaérobies était plus élevée chez le COT, le COT + ESB et le COT + PSE que

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

chez le NC à 24h ($p < 0,05$) (figure 7).FOS+BSE et FOS+SSE ont augmenté significativement les anaerostipes par rapport à NC , BSE et SSE ($p < 0,05$) (figure 7).

Discussion

Étant donné que les troubles métaboliques comme l'obésité continuent d'accabler une grande partie de la population américaine, le thème de la santé intestinale, et plus particulièrement le microbiote intestinal, a gagné de plus en plus d'attention dans les domaines de la santé et de la nutrition. Pour cette raison, une recherche nutritionnelle récente a ciblé l'identification d'aliments entiers ainsi que de composants bioactifs susceptibles de faire évoluer positivement les populations bactériennes dérégulées vers des profils plus souhaitables (Sheflin et al., 2017). Les polyphénols végétaux sont particulièrement attrayants, car ils sont largement répandus dans la nature et ont été crédités de la capacité à moduler positivement le microbiote intestinal, non seulement le son de sorgho est une source de polyphénols, mais il est également produit de façon rentable et efficiente aux États-Unis, ce qui en fait un candidat attrayant pour les applications nutraceutiques.

Notre étude actuelle a révélé que les sons noirs et les sons de sorgho sumac contiennent diverses classes de polyphénols. Dans l'analyse du son de sorgho, nos résultats de 27,5 1,5 mg/g pour le son noir et de 43,0 2,0 mg/g pour le sumac concordent avec les rapports précédents sur les phénoliques totales variant de 7,6 à 35,6 mg/g et de 22,5 à 88,5 mg/g pour le son noir et le son de sorgho sumac, respectivement (Awika et Rooney., 2005 ; Awika et Rooney., 2004). Les deux variétés présentaient des profils phénoliques remarquablement distincts, avec des concentrations plus élevées de 3-Deoxyanthocyanines (3-DXA) dans le son noir et des concentrations plus élevées de proanthocyanidines dans le son sumac. Ces résultats sont en accord avec de multiples analyses antérieures du sorgho noir et sumac, dans lesquelles le sorgho noir est établi comme enrichi en 3-DXA, et le sumac en proanthocyanidines (Awika et Rooney., 2005 ; Awika et Rooney., 2004 ; Awika et al., 2003 ; Dykes et al., 2005).

Il est bien établi que le son de sorgho à grains a des propriétés antioxydantes importantes (Awika et Rooney., 2005; Awika et Rooney., 2004; Awika et al., 2003; Kil et al., 2009), et nos analyses actuelles ont cherché à comparer les propriétés de récupération radicale des deux variétés différentes d'extrait de son de sorgho. Malgré des niveaux plus faibles de polyphénols

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

totaux dans l'extrait de son de sorgho noir (ESB), l'ESB et l'extrait de son de sorgho de sumac (ESS) présentaient des capacités de récupération radicale semblables.

La fermentation avec les polyphénols vin/raisin et thé noir a entraîné une augmentation significative des concentrations d'acétate par rapport au blanc dans une étude de (**Gross et al., 2010**). Toutefois, dans la présente étude, les concentrations d'acétate et de butyrate n'ont pas changé pendant les fermentations avec l'ESB et l'ESS par rapport à la NC. La production de propionate était plus faible dans l'ESS que dans la NC, ce qui n'est pas conforme au rapport de (**Gross et al., 2010**) ,qui n'a constaté aucun changement de la production de propionate avec les polyphénols vin/raisin et thé. Dans le cadre de cette étude, les traitements contenant du FOS ont augmenté la production de butyrate sur 24 h. *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont connus pour utiliser le FOS pour produire de l'acide lactique (**Kaplan et Hutkins., 2000**) , qui peut être métabolisé en butyrate par des genres comme *Anaerostipes* et *Eubacterium* (**Duncan et al., 2004**). Nous avons constaté une augmentation du nombre de *Bifidobacterium*, de *Lactobacillus* et d'*Anaerostipes* en réponse aux traitements contenant du FOS, de sorte qu'il est plausible que l'augmentation du butyrate soit attribuable à ces voies d'alimentation croisées. Il s'agit de l'une des premières études à examiner l'impact des polyphénols du son du sorgho sur la production de SCFA et d'autres travaux sont nécessaires pour corroborer ces résultats.

Bien que le NMDS n'ait pas révélé d'impact significatif des polyphénols de sorgho sur l'ensemble des communautés microbiennes, les extraits de sorgho ont modulé le microbiote intestinal à la fois aux niveaux phyla et genre, et les polyphénols de sorgho combinés et le FOS ont travaillé pour améliorer les genres bénéfiques spécifiques. Nos données ont montré des changements relatifs dans les deux phyla principaux, Firmicutes augmentant dans l'abondance et Bacteroidetes diminuant. Cela n'est pas surprenant, car de nombreux utilisateurs de glucides, y compris le probiotique *Lactobacillus*, se trouvent dans Firmicutes, et les conditions de l'expérience favorisent l'utilisation de ces substrats, y compris ceux déjà présents dans les échantillons fécaux.

La protéobactérie contient plusieurs bactéries potentiellement pathogènes (**Shin et al., 2015**) .Évitant la prolifération de ce phylum peut être un résultat positif des stratégies nutritionnelles. Une faible abondance de Proteobacteria reflète probablement les augmentations dans les groupes qui utilisent FOS. Bien que non statistiquement significatif, l'ESB et L'ESS a causé une diminution marquée de la protéobactérie par rapport à la NC, ce qui suggère qu'ils

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

peuvent agir de façon antagoniste contre certaines espèces pathogènes. Ces résultats sont semblables à ceux de **(Pham et al., 2017)**, qui ont constaté qu'au cours de la fermentation fécale *in vitro*, les protéobactéries étaient diminuées par le FOS, les arabinoxylans feruloylés (FAXO), les polyphénols de son de riz riches en proanthocyanidine et les polyphénols de son de riz et de FAXO combinés.

Prevotella est souvent associé à des régimes à long terme riches en glucides **(Wu et al., 2011)**. La prévotella a été stimulée, mais il n'y avait aucune différence significative entre les polyphénols du sorgho avec et sans FOS. Une étude portant sur 62 sujets obèses a révélé que les personnes ayant un rapport Prevotella: Bacteroides élevé ont perdu beaucoup plus de poids en réponse à un régime riche en fibres que les personnes ayant des niveaux inférieurs de Prevotella **(Hjorth et al., 2018)**. Bien que d'autres recherches soient nécessaires pour parvenir à une compréhension plus approfondie de cette interaction, l'amélioration du rapport de Prevotella: Bacteroides peut aider dans les stratégies de perte de poids qui sont basées sur l'apport accru de fibres. Dans la présente étude, des échantillons d'OO ont entraîné une augmentation de Prevotella: Bacteroides avec des niveaux plus élevés de Prevotella après 24 h.

Bien que les genres bactériens favorisant la santé dans le côlon ne se limitent pas à Lactobacillus et Bifidobacterium, ils sont les cibles traditionnelles de la supplémentation prébiotique **(Gibson et al., 2017)**. La prolifération des bifidobacterium a été améliorée par des traitements contenant du FOS. Par rapport au NC, le FOS + BSE et le FOS + SSE ont eu tendance à augmenter l'abondance de Bifidobacterium dans OO. Ces données suggèrent que l'utilisation du FOS par Bifidobacterium est modifiée dans OO microbiota, et que les polyphénols de sorgho peuvent améliorer la fermentation du FOS par cette espèce chez les sujets OO. Comme on a déjà observé une diminution des proportions de Bifidobacterium chez des sujets en surpoids/obèses **(Kalliomaki et al., 2008; Santacruz et al., 2010)**, les thérapies nutritionnelles visant à augmenter ce genre peuvent être extrêmement bénéfiques pour les personnes qui luttent contre la prise excessive de poids corporel. Des études de fermentation *in vitro* antérieures ont observé une stimulation de Bifidobacterium par des polyphénols comme l'anthocyanine malvidine-3-glucoside **(Hidalgo et al., 2012)**, les cerises acidulées **(Mayta-Apaza et al., 2018)**, et les polyphénols de raisin et de vin rouge **(Zhou et al., 2016; Dolara et al., 2005)**. Dans notre expérience, cependant, ce genre n'a apparemment pas été affecté par les polyphénols de sorgho seuls. Dans la présente étude, les polyphénols de FOS et de sorgho ont travaillé en synergie pour

Partie 03 : Résultats , discussions et conclusions

améliorer *Lactobacillus*. Comme *Lactobacillus* était présent en faible abondance, d'autres études sont nécessaires pour corroborer ces effets. Le succès de la recherche prébiotique visant à stimuler la croissance de *Lactobacillus* a été nettement inférieur à celui de *Bifidobacterium* (**Gibson et al., 2017**), et la capacité des polyphénols à améliorer l'utilisation des oligosaccharides par *Lactobacillus* offrirait une nouvelle voie de supplémentation prébiotique. Comme les essais cliniques chez l'humain ont attribué plusieurs souches de *Lactobacillus* à des actions anti-obésogènes (**Crovesy et al., 2017**), ce mode de supplémentation peut être particulièrement bénéfique pour le maintien du poids corporel.

Conclusion

Les sons de sorgho noir et sumac sont des sources importantes de polyphénols ayant divers profils polyphénols. Bien que les extraits de sorgho n'aient pas eu d'influence significative sur la production de SCFA à partir de FOS, ils ont accru la prolifération de *Prevotella* et du genre *Roseburia*, producteur de butyrate. La combinaison des polyphénols de sorgho et du FOS a permis d'améliorer *Bifidobacterium* et surtout *Lactobacillus*, un genre probiotique difficile à stimuler par supplémentation prébiotique. Nous avons observé des réponses différentielles au traitement du NW et de l'OO microbiota pour *Prevotella*, *Bifidobacterium* et *Roseburia*, ce qui étaye la théorie selon laquelle le métabolisme microbien de l'intestin est modifié dans l'OO. Nos résultats indiquent que les polyphénols de son de sorgho peuvent aider à moduler les populations microbiennes intestinales, en particulier de concert avec d'autres substances prébiotiques comme le FOS. D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer quel composé polyphénol individuel est responsable des effets bénéfiques sur le microbiote intestinal et pour comprendre le mécanisme par lequel les souches microbiennes répondent aux polyphénols.

Partie 04 :

Conclusion

Générale

Partie 04: Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail a été consacré à une étude des activités antimicrobiennes des grains de sorgho.

Il est connu que quelques plantes ont une activité antimicrobienne, nous avons tenté par la présente étude de contribuer à la valorisation de la graine de sorghum bicolor (L) moench en Algérie doutée d'une activité antimicrobienne contre des souches microbiennes et de références.

Pour cette étude, nous avons mené trois expériences à travers trois articles de la bibliographie, qui sont :

L'étude du **Ciblage phytochimique et activité antibactérienne des feuilles de sorgho bicolor dérivés de culture *in vitro***, qui a montré que les activités antimicrobiennes exhalées en raison de la présence d'ingrédients bioactifs.

La détermination de cultures microbiennes pour contrôler la croissance des coliformes et des moisissures dans le maltage du sorgho par l'utilisation de *P. pentosaceus* et de *Saccharomyces spp* a permis d'inhiber les moisissures et les coliformes et ne présentait pas de risques pour la santé dans le malt de sorgho

La combinaison des polyphénols de sorgho et du FOS a permis d'améliorer Bifidobacterium et surtout Lactobacillus impliqués dans le microbiote intestinal comme cible potentielle des thérapies nutritionnelles pour prévenir/réduire la prise de poids et l'obésité.

Ces résultats méritent d'être confirmés et approfondies par d'autres études :

- Étudié d'autres recherches sont nécessaires pour déterminer quel composé phénolique individuel est responsable des effets bénéfiques sur le microbiote intestinal et pour comprendre le mécanisme par lequel les souches microbiennes répondent aux polyphénols.

Partie 04: Conclusion générale

- Refaire cette étude mais en faisant la partie pratique qui est la recherche de l'activité antimicrobienne des extraits du sorgho.

Références:

- Abu Assar, A.H., Uptmoor, R., Abdelmula, A.A., Wagner, C., Salih, M., Ali, A. M., Ordon F., Friedt, W. (2009). Assessment of sorghum genetic resources for genetic diversity and drought tolerance using molecular markers and agro-morphological traits. *U. K. J. Agric. Sci.* 17: 1-22p.
- Adenike, A.O and Olalekan, O.C., (2018). Chemical composition of *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) and *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Syn. *Sorghum vulgare* Pers (Poaceae). *Trends Phytochem Res*, 2(4): 235-242p.
- Adetuyi, A.O., Akpambang, V.O.E., Oyetayo, V.O and Aetuyi, F.O., (2007). The nutritive value and antimicrobial property of *Sorghum bicolor* L. stem (POPORO) flour used as food colour and its infusion drink. *Am J Food Technol*, 2(2): 79- 86p.
- Ademiluyi, A.O., Oboh, G., Agbebi, O.J., Boligon, A.A and Athayde, M.L., (2014). Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] leaf sheath dye protects against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *J Med Food*, 17 (12): 1332–1338p.
- Adult Obesity Causes & Consequences. Available online: <https://www.cdc.gov/obesity/adult/causes.html> (accessed on 23 September 2018).
- Agro-alimentaire: composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. Paris.
- Agropedia (2013). Botanical description of Sorghum: Root System - <http://agropedia.iitk.ac.in/content/botanical-description-sorghumroot-system> (accessed: 05 March 2013)
- Akogou, F.U.G., den Besten, H.M.W., Kayodé, A.P.P., Fogliano, V., Linnemann, A.R., (2018). Antimicrobial evaluation of red, phytoalexin-rich sorghum food biocolorant. *PLoS ONE*, 13 (3): e0194657p.
- Am, J., *Clin, Nutr.*, (2004). 79: 727–747p. [CrossRef] [PubMed]
- Andrea, M., Walter Zegada, L., Stefano, A., Adriano, M., Wikus, S., Namera, S., Hannelie, T., Zavala-Garcia, f., Serge, B., (2014). Manuel du sorgho-énergie Une culture énergétique alternative : 5p.
- Anhê, F.F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Matamoros, S.; Varin, T.V.; Garofalo, C.;

Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; Marette, A.A.,(2015). polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 64:872–883p.

- Appl. Environ. Microbiol.,(2000).66:2682–2684p. [CrossRef]
- Arvalis.,(2013-2014).Les conduites de culture. Arvalis, institut du vegetal (en ligne).consulté le 12 aout 2015.
- Awika, J.M., and Rooney, L.W., (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65: 1199–1221p.
- Awika, J.M.; McDonough, C.M.; Rooney, L.W.,(2005). Decorticating Sorghum to Concentrate Healthy Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*53:6230–6234p. [CrossRef] [PubMed]
- Awika, J.M.; Rooney, L.W.,(2004). Properties of 3-deoxyanthocyanins from Sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 5: 4388–4394p. [CrossRef] [PubMed]
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L.,(2003). Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem.* 51:6657–6662p. [CrossRef] [PubMed]
- Ayala-Soto,F.E.,Serna-Saldívar,SO.,García-Lara,S.,Pérez-Carrillo,E.,(2014). Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocoll*, 35:471-475p.
- Bariheau,H.,Lemieux,S.,(2005).Quelques mots sur le blé.*Journal of Cereal Sci* 29 :103-107p.
- Dewar, J., Taylor, J. R. N., Joustra, S. M.,(1995). Accepted methods of sorghum malting and brewing analyses. CSIR Food Science and Technology: Pretoria, South Africa, Methods 1 and 4.
- Bahorun,T.,(1997).Substances Naturelles actives.La flors Mauricienne .Une source d’approvisionnement potentielle Food and Agricultural Researchcouncil Mauritis.83-94p.
- Balole, T.V., Legwaila, G.M., (2006). *Sorghum bicolor*(L) Moench In : Brink M. et Belay G. (Editeurs).PROTA 1 : cereals and pulses/cereales et legumes secs. (CD-Rom).PORTA , wageningen, pays Bas.
- Baskaran P and Jayabalan N., (2005). In vitro plant regeneration and mass propagation system for *Sorghum bicolor* -a valuable major cereal crop. *J Agri Technol.* 1(2): 345-363p.

- Batish, V. K., Grover, S. and Lal, R.,(1989). Screening lactic acid starter cultures for antifungal activity. *Cultured Dairy Product J.*24: 22–25p.
- Batish, V. K., Lal, R., Grover, S., (1997).Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Crit. Rev. Biotech.*17:209–225p.
- Batish, V. K., Lal, R., Grover, S.,(1990). Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R. *Food Microbio.*17:199–206p.
- Ben Abbas,F.,(2011).Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes (phoenix dactylifera L).Mémoire de Magister en Génie des procédés pharmaceutiques.Université Ferhate Abbas-Stif.
- Benson, K.F., Beaman, J.L., Ou, B., Okubena, A., Okubena, O.,Jensen,G.S., (2013). West African Sorghum bicolor leaf sheaths have anti-inflammatory and immune modulating properties in vitro. *J Med Food.* 16 (3): 230–238p.
- Beta,T.,Rooney,L.W.,Marovatsanga,L.T.,Taylor,J.R.N.,(2000).Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum.*J.Cereal Sci.* 31:295,302p.
- Boivin, P., Malanda, M.,(1997). Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*34: 96–101p.
- Boizot,N.,Charpentier,J.P.,(2006).Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère .Le cahier des techniques de l'Inra ;79-82p.
- Borokini ,F.B., (2017). Identification and quantification of polyphenols in Sorghum bicolor (L) Moench leaves extract using reverse-phase HPLC-DAD. *Clin Exp Pharmacol.* 7, 2p.
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V, Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., Bordes, C., (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (quantitative structure–activity relationship) models. *Front Microbiol.* 10, 829p.
- Bourquin, L.D., Titgemeyer, E.C., Fahey, G.C.,(1993). Vegetable Fiber Fermentation by Human Fecal Bacteria: Cell Wall Polysaccharide Disappearance and Short-Chain Fatty Acid Production during In Vitro Fermentation and Water-Holding Capacity of Unfermented Residues. *Nutr. Metab.* 123: 860–869p. [CrossRef]
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.
- Bricas N., (1998). Cadre conceptuel et méthodologique pour l'analyse de la consommation

alimentaire urbaine en Afrique. Série «Urbanisation, alimentation et filières vivrières », N° 1. Montpellier, France, Cirad, FAO. 48 p.

- Briggs, D. E.,(1998). Malts and Malting. London: Blackie Academic. 269–270p.
- Brohan,E.,Gauci,D.,Sartorius,N.,Thornicroft,G.,(2011).Autostigmatisation,autonomisation et discrimination perçue chez les personnes atteintes de trouble bipolaire ou de dépression dans 13 pays européens :les GAMIAN6Europe étude.Journal de Troubles affectifs 129 :56-63p.
- Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Butler L.G., Riedl D.J., Lebryk D.G. & Blytt H.J., 1984. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. J. Am. Oil Chem. Soc., 61:916-920p.
- Canfora, E.E., van der Beek, C.M., Jocken, J.W.E., Goossens, G.H., Holst, J.J., Olde-Damink, S.W.M., Lenaerts, K., Dejong, C.H.C., Blaak, E.E.,(2017). Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: A randomized crossover trial. Sci. Rep. 7: 2360p. [CrossRef]
- Castel,E.Penulas,J.Valentine,DW.,(2005).Effects of plant leachates from four boreal understory species on soil N mineralization , white spruce (*Picea glauca*)germination and seedling growth.
- Cho, M.J.,Howard, L.R., Prior, R.L., Clark, J.R.,(2004).Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Sci. Food Agric. 84: 1771–1782p. [CrossRef]
- Collado, M.C., Isolauri, E.,Laitinen, K., Salminen, S.,(2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women1–3. Am. J. Clin. Nutr. 88: 894–899p. [CrossRef] [PubMed]
- Crovesy, L., Ostrowski, M., Ferreira, D.M.T.P., Rosado, E.L., Soares-Mota, M.,(2017). Effect of Lactobacillus on body weight and body fat in overweight subjects: A systematic review of randomized controlled clinical trials. Int. J. Obes. 41: 1607–1614p. [CrossRef] [PubMed]
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F.,Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B.,Moreno-Arribas, M.V.,(2013). In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: Changes in microbial groups and phenolic

metabolites. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83: 792–805p. [CrossRef]

- Cetkovic, C., Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Savatovic, S., Mandie, A., Tumbas, V., (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109 :340-347p.
- Chambers, E.S.; Viardot, A.; Psichas, A.; Morrison, D.J.; Murphy, K.; Zac-Varghese, S.E.K.; MacDougall, K.; Preston, T.; Tedford, C.; Finlayson, G.S.; et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015, 64, 1744–1754. [CrossRef] [PubMed]
- Chantreau, J., Nicou, R., (1991). *Le sorgho*. Maisonneuve et Larose, France. 159p.
- Chantreau, J., Cruz, J.F., Ratnadass, A., Trouche, G., Fliede, G., (2013). *Presses Agronomiques de Gembloux*, Quae, CTA, Gembloux, 244 p.
- Chantreau, J., Cruz, J.F., Ratnadass, A., Trouche, G., Fliede, G., (2013). *Le sorgho*, Quae Claire parmentier, presses agronomiques de Gembloux, Belgique. 24p
- Collin, N., Kawaguchi, T., Peterson, B.M., Vestergaard, M., (2006). *Astronomie et astrophysique*. 456 (1):75-90p.
- Collin, N., Kawaguchi, T., Peterson, B.M., Vestergaard, M., (2006). *Astronomie et astrophysique*. 456 (1):75-90p.
- Cosette K., Rainer J., Domink R., Delphine L., Gilles T., Philippe O., Bellum R., Pinnamanini N., Basavaraj G., Robert S., Cynthia D., Rafael P., Arndt Z., Raoul B., Nils P., Guido R.,
- Cowan, M.M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Rev.* 12 (4): 564- 582p.
- Cowan, M., (1999). Plant products as antimicrobial agent. *Clinical microbiology reviews*. 12(4) :564-570p.
- Dacosta, Y., (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Editions Yves Dacosta. Paris.P
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Traore, A.S., Voragen, A.G.J., VanBerkel, W.J.H., (2006). Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 : 384-396p.
- Djilani, A., Dicko, A., (2012). The therapeutic benefits of essential oils. In *Nutrition, well-being and health in Technology*, ed Jaouad (Rijeka: InTech). 155–178p.
- D’Mello, J. P. F., McDonald, A. M. C., (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.*, 69:

155–166p.

- Doherty, V.F., Olaniran, O.O., Kanife, U.C., (2010). Antimicrobial activities of *Aframomum melegueta* (Alligator Pepper). *Int J Biol*, 2(2): 126-31p.
- Dolara, P.; Luceri, C.; De Filippo, C.; Femia, A.P.; Giovannelli, L.; Caderni, G.; Cecchini, C.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cresci, A. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats.
- *Mutat. Res.*, (2005). 591: 237–246p. [CrossRef] [PubMed]
- Duke JA and Wain KK. (1981). Medicinal plants of the world: Computer index with more than 85,000 Entries. Vol. 3, Longman Group Ltd., UK.
- Duncan, S.H., Hold, G.L., Barcenilla, A., Stewart, C.S., Flint, H.J., (2002). *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1615–1620p.
- Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., (2004). Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5810–5817p. [CrossRef]
- Duodu, K.G., Awika, J.M., (2019). Chapter 8: Phytochemical-related health-promoting attributes of sorghum and millets. In *sorghum and millets*, Second Edition. 225-258p.
- Dusan, M.V., esna, K., (2006). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reaction. Institute of physical chemistry, faculty of pharmacy, university of belgrad, serbia.
- Dykes, L., Rooney, L.W., Waniska, R.D., Rooney, W.L., (2005). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grain of Varying Phenotypes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6813–6818p. [CrossRef] [PubMed]
- Dykes, L., Rooney, L.W., (2006). Sorghum and millet phenol and antioxidant. *J. Cereal Sci.* 44 :236-251p.
- Dykes, L., Seitz, M., Rooney, W.L., (2009). Flavonoid composition of red sorghum genotypes. *Food Chemistry*, 116, 313-317p.
- El-Adawy, T. A., (2001). Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* DI. *Nahrung/Food*. 45:118–124p.

- Emmambux, N.M., Taylor, J.R.N., (2003). Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 83: 402-407p.
- Esslinger, H.M., Narziss, L., (2005). *Beer*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- FAO.,(1995).Le sorgho et les mils dans la nutrition humaine. Collection FAO, Alimentation et nutrition, N° 27, FAO, Rome, Italie, 198 p.
- FAO., (2012). Database of agricultural production. FAO Statistical Databases (FAOSTAT).
- FAO., (2019). FAO Crop and Food Supply Assessment Mission to the Sudan – Special Report. Rome. 38p.
- FAOSTAT.,(2014). the United Nations, viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy.
- FAOSTAT.,(2012).Crop primary equivalent retrieved on 16 th May,2011 from www.fao.org
- Freidrich,W.,Galensa,R.,(2002).Identification of a new flavanolglucoside from barley (*Hordeumvulgare* L.) and malt *Eur Food Res Technol*, 214,388-393p.
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Raylene, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D.,(2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev.* 14: 491–502p.
- Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G.,(2010). Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci. Technol.* 7: 1–19p. [CrossRef]
- Gourama, H., Bullerman, L. B.,(1995). Antimycotic and antiafla- toxigenic effect of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*58: 1275–1280p.
- Gourama, H., (1997).Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebens. Wiss. Technol.*30: 279–283p.
- Gross, G., Jacobs, D.M., Peters, S., Possemiers, S., van Duynhoven, J., Vaughan, E.E., van de Wiele, T.,(2010). In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J. Agric. Food Chem.* 58: 10236–10246p. [CrossRef]
- Gurira, O. Z., Buys, E. M.,(2005). Characterization and antimicro- bial activity of

- Pediococcus species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiol.* 22: 159–168p.
- Hamaker, B.R., (1995). Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chem.*72: 583-588p.
 - Hamer, H.M., Jonker, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., Brummer, R.J.,(2008). Review Article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Therap.* 27: 104–119p. [CrossRef]
 - Hartnett, D. J., Vaughan, A., Van Sinderen, D., (2002). Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.*108:169–177p.
 - Helander, I.M., Alakomi. H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid ,E.J., Gorris, L.G.M., von Wright ,A., (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agri Food Chem.* 46: 3590-3595p.
 - Hidalgo, M., Oruna-Concha, M.J., Kolida, S., Walton, G.E., Kallithraka, S., Spencer, J.P.E., Gibson, G.R., de Pascual-Teresa, S.,(2012). Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microbiota and Their Influence on Gut Bacterial Growth. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3882–3890p. [CrossRef] [PubMed]
 - Hjorth, M.F., Roager, H.M., Larsen, T.M., Poulsen, S.K., Licht, T.R., Bahl, M.I., Zohar, Y., Astrup, A.,(2018). Pre-treatment microbial Prevotella-to-Bacteroides ratio, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention. *Int. J. Obes.* 42: 580–583p. [CrossRef] [PubMed]
 - Holzapfel, W. F., Geisen, R. and Schillinger, U.,(1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *J. Food Microbiol.*24: 343–362p.
 - House, L.R.,(1987). Manuel de la sélection du sorgho (2e éd.) ICRISAT Patancheru, Inde :229p
 - Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N.,(2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21: 8787–8803p. [CrossRef] [PubMed]
 - Jones, R. W., Prusky, D.,(2002). Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: A new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. *Food Control.*92: 33–37p.
 - Kamath, V.G., Chandrashekar, A., Rajini, P.S.,(2005). Antiradical properties of sorghum

(*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. *J. Cereal Sci.* 40: 283–288p. [CrossRef]

- Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C. (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* 1293: 156–163p.
- Kaplan, H., Hutkins, R.W.,(2000). Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria.
- Kehrer, J.P., Smith, C.V. ,(1994). In natural antioxidants in human health and disease ,Frei, B., Ed ;Academic press San Diego .C.A.25-62p.
- Khadambi, T.N., (2007). Extraction of phenolic compounds and quantification of the total phenol and condensed tannin content of bran fraction of condensed tannin and condensed tannin free sorghum varieties. MSc thesis, University of Pretoria, Pretoria.
- Khan, M.R., Ranjini, R., (2013). Preliminary phytochemical screening of seeds of *Psoralifolia corylifolia*. *Int Res J Pharm.* 4:1-12p.
- Khan, M.J., Gerasimidis, K., Edwards, C.A., Shaikh, M.G.,(2016). Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J. Obes.* 7353642. [CrossRef] [PubMed]
- Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K.,(2009). Chung I-M, Kwon SS, Goh EJ, Heo K, Kim MJ, Lim JD, Lee D and Yu CY. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem,* 115; 1234–1239p.
- Kil, H.W., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, I.M., Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K.,(2009). Kim, M.J.; Lim, J.D.; Lee, D.; et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem.* 115: 1234–1239p. [CrossRef]
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D.,(2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 5112–5120p. [CrossRef]
- Laitila, A., Alakomi, H. L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, J., Haikara, A., (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plan-* tarum strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *J. Appl. Microbiol.* 93: 566–576p.
- Lambert, C., (2011). Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Thèse de doctorat en biologie, faculté SNV., université bordeaux. 2 :202p.

- Laugh, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol.* 42 :1673-1681p.
- Lefyedi, M. L., Taylor, J. R. N., (2006). Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt. *J. Inst. Brew.* 112: 108–116p.
- Lefyedi, M. L., Marais, G. J., Dutton, M. F., Taylor, J. R. N., (2005). The microbiological contamination, toxicity and quality of turned and unturned outdoor floor malted sorghum. *J. Inst. Brew.* 111: 190–196p.
- Liu, G., Gilding, E.K., Godwin, I.D., (2013). Additive effects of three auxins and copper on sorghum in vitro root induction. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 49:191–197p.
- Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic bacteria. *Environ. Microbiol.*
- Lowe, D. P., Arendt, E. K., (2004). The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to anti- fungal activity, mycotoxins and gushing: A review. *J. Inst. Brew.* 110: 163–180p.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Sarni-Manchado, P., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire : composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. Paris.
- Machiels, K., Joosens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijs, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* .63: 1275–1283p. [CrossRef] [PubMed]
- Mamta, S., Jyoti, S., (2012). Phytochemical screening of *Acorus calamus* and *Lantana camara*. *Int Res J Pharm.* 5:324-6p.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphenols : Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 :727-747p.
- Marfak, A., (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat en biologie, faculté SNV, Université de Limoges. 220p.
- Mayta-Apaza, A., Pottgen, E., de Bodt, J., Papp, N., Daya, M., Luke, H., Abranko, L., VandeWiele, T., Lee, S.O., Carbonero, F., (2018). Impact of tart cherry polyphenols on the human gut microbiota and phenolic metabolites in vitro and in vivo. *J. Nutr. Biochem.* 59:

170–172p. (CrossRef)

- Meyer, J., Murray, S.L., Berger, D.K., (2015). Signals that stop the rot: Regulation of secondary metabolite defences in cereals. *Physiol Mol Plant Pathol.* 1-11p.
- Milan, H., (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère peroxydant. Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.
- Mohamed, S.K., Ahmed, A.A., Yagi, S.M., Abd Alla, A.H., (2009). Antioxidant and antibacterial activities of total polyphenols isolated from pigmented sorghum (*Sorghum bicolor*) Lines. *J Genet Eng Biotechnol.* 7(1): 51-58p.
- Mojisola, C.O.C., Anthony, E.A., Alani, D.M., (2009). Antisickling properties of the fermented mixture of *Carica papaya* Linn and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Afr J Pharm Mošovská S., Birošová L and Valik L. (2011). Biological activities of sorghum extract and its effect on antibiotic resistance, Chapter 7, in Pereira, T. D. Sorghum: Cultivation, Varieties and Uses. Nova Science Publishers, New York, 129-140. Pharmacol.* 3(4): 140-143p.
- Mottiar, Y.V., Anholme, R., Boerjen, W., Ralph, J., Mansfield, S.D., (2016). Designer lignins : harnessing the plasticity of lignification . Elsevier : science direct current opinion of biotechnology. 37:190,200p.
- Mshvildadze, V., Favel, A., Delmas, F., Elias, R., Faure, R., Decanosidze, G., Kemertelidze, E Balansard, G., (2000). Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Die Pharmazie.* 55(4): 325-6p.
- Murashige, T., Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473–497p.
- NCCLS., (1999). National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. Wayne, Pensilvania document, 19(1).
- Neyrinck, A.M., Etxeberria, U., Tamini, B., Daube, G., Van Hul, M., Everard, A., (2016). Cani, P.D.; Bindels, L.B.; Delzenne, N.M. Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* 61:1500899p. [CrossRef] [PubMed]
- Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Druart, C., Van de Wiele, T., de Backer, F., Cani, P.D., Larondelle, Y., Delzenne, N.M., (2011). Prebiotic Effects of Wheat Arabinoxylan Related to the Increase in Bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in Diet-Induced Obese

Mice. PLoS ONE .6, e20944p. [CrossRef] [PubMed]

- Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P.D., Delzenne, N.M.,(2012). Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* 23: 51–59p. [CrossRef] [PubMed]
- Niku-Pavoola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, and Haikara, A., (1999).New types of antimicrobial compounds produced by *Lacto- bacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.*86: 29–35p.
- Nip,W.K.,Burns,E.F.,(1969).Pigment characterization in grain sorghum.I.Red varieties.*Cereal Chemistry.* 46:490-495p.
- Njongmeta, N.L.A., (2009). Extractability profiling and antioxidant activity of flavonoids in sorghum grain and non- grain materials. PhD thesis, Texas A&M University.
- Noots, I., Delcour, J. A.,Michiels, C. W.,(1999). From field barley to malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit. Rev. Microbiol.*25: 121–153p.
- Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., (1992).Fermentative preservation of plant foods. *J. Appl. Bacteriol.*73: 1365–1478p.
- Nwinyi, F.C., Kwanashie, H.O.,(2009). Evaluation of aqueous methanolic extract of *Sorghum bicolor* leaf base for antinociceptive and anti-inflammatory activities. *Afr J Biotechnol.* 8 (18):4642-4649p.
- O’Mahony, A., O’Sullivan, T. F., Walsh, Y., Vaughan, A., Maher, M., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D., (2000).Characterisation of antimicrobial producing lactic bacteria from malted barley. *J. Inst. Brew.*106: 403–410p.
- Obesity and Overweight. Available online: <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/obesity-overweight.htm> (accessed on 23 September 2018).
- Oladiji, A.T., Jacob, T.O., Yakubu, M.T., (2007). Anti-anaemic potentials of aqueous extract of *Sorghum bicolor* (L.) Moench stem bark in rats. *J Ethnopharmacol.*111(3): 651-660p.
- Oriola, A.O., Ogundele,O.H., Onawunmi, G.O., Ogundaini ,A.O., (2015). Antimicrobial constituents of *Sorghum bicolor*
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I.,(2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 25: 270–278p. [CrossRef] [PubMed]
- Payne, M.J., Hurst, W.J., Stuart, D.A., Ou, B.,Fan, E., Ji, H., Kou, Y.,(2009). Determination

of Total Procyanidins in Selected Chocolate and Confectionary Products Using DMAC. *J. AOAC Int.* 93: 89–96p.

- Pham, T., Savary, B.J., Teoh, K., Chen, M.H., McClung, A., Lee, S.O.,(2017). In Vitro Fermentation Patterns of Rice Bran Components by Human Gut Microbiota. *Nutrients* .9: 1237p. [CrossRef] [PubMed]
- *Phytochemistry*(2004).65: 1199–1221p. [CrossRef] [PubMed]
- Piddock, L. J., (1990).Techniques used in the determination of anti- microbial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacte- roil.*68:307–318p.
- Priest, F. G., Campbell, I.,(1996). *Brewing Microbiology*, 2nd ed., Chapman and Hall: London. 114–119p.
- Prosky L., ASP N.G., Furda I., De Vries J.W., Schweizer T.F., Hariand B.F.,(1988).Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study.*J. AOAC*;68:677-679p.
- Rahal-Bouziane H., Mossab K., Khelid M., Kharsi M. & Hamdi S. (2004). Résultats prometteurs chez une céréale d'été des oasis d'Adrar : le sorgho "Sorghum sp". *INRAA, Recherche agronomique*; 14: 57-64p.
- Rakholiya, K.D., Kaneria, M.J., Chanda, S.V.,(2013). Chapter 11: Medicinal plants as alternative sources of therapeutics against multidrug-resistant pathogenic microorganisms based on their antimicrobial potential and synergistic properties. In: *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*, 165-178p.
- Red,M.A.,(1995).Flavonoids : naturally occurring anti-inflammatory agents *Vascular .Am.J.Pathol*,147 (2) :235-237p.
- Riva, A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., Borghi, E.,Berry, D.,(2017). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ. Microbiol.* 19: 95–105p. [CrossRef] [PubMed]
- Rooney, L.W., (1978). Sorghum and pearl millet lipids. *Cereal Chemistry*.55: 584-590p.
- Rooney,L.W.,(2005).Ten myths about tannins in sorghum .*International Sorghum and Millets Newsletter*.46:3-5p.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D.,(2005). Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: A Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6150–6158p.

[CrossRef]

- Roy, U., Batish, V. K., Grover, S., Neelakantan, S., (1996). Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CHD-28.3. *Food Microbiol.* 32:27–34p.
- Salawu, S.O., Salimon, Y.A., (2014). Evaluation of the effect of *Sorghum bicolor* aqueous extract on the haematological, renal and hepatic parameters in rats fed with low and high iron diet. *Eur J Med Plant.* 4(7): 783- 793p.
- Salazar-López, N.J., González-Aguilar, G., Rouzaud-Sández, O., Robles-Sánchez, M., (2018). Technologies applied to sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): changes in phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Sci Technol.* 38(3), 369-382p.
- Sanchez de medina, F., Vera, B., Galvez, J., (2002). Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* 70(26) :3097-3108p
- Santacruz, A., Collado, M.C., García-Valdés, L., Segura, M.T., Martín-Lagos, J.A., Anjos, T., Romero, M., Lopez, R.M., Florido, J., Campoy, C., (2010). Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* 104: 83–92p. [CrossRef]
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.D., Robinson, C.J., (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541p. [CrossRef] [PubMed]
- Sene, M., Gallet, C., Dore, T., (2001). Phenolic compounds in a Sahelian sorghum (*Sorghum bicolor*) genotype (CE145-66) and associated soils. *J Chem Ecol.* 27(1): 81-92p.
- Serna-Saldivar, S., Rooney, L.W., (1995). Structure and chemistry of sorghum and millets. In *sorghum and millet: chemistry and technology*, (D.A.V. Dendy, ed.). American association of cereal chemists, St. paul, USA. 69-124p.
- Sheflin, A.M., Melby, C.L., Carbonero, F., Weir, T.L., (2017). Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. *Gut Microbes* .8: 113–129p. [CrossRef] [PubMed]
- Shin, N.R., Whon, T.W., Bae, J.W., (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota.
- Sikwese, F.E., Duodu, K.G., (2007). Antioxidant effect of crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. *Food Chem.*, 104, 324-331p.

- Singleton, V.L., Rossi, J.A.,(1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158p.
- Smith, E.C., Swain, T.,(1962). Flavonoid compounds in comparative biochemistry. In *Comparative Biochemistry*, eds. H.S. Mason and A.M. Florkin. Academic press. New York, 3, 764p.
- Soetan, K.O., Oyekunle, M.A., Aiyelaagbe, O.O., Fafunso, M.A.,(2006). Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of Sorghum Bicolor L. Moench. *Afr J Biotechnol.* 5(23): 2405-2407.
- Soltani, L., (2014). Culture de nouvelles variétés de sorgho: Emergence de la filière en algérie. Société algérienne agro consulting international (ACI), le Maghreb.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H.,(2000). Food composition and nutrition tables. Wissenschaftsverlags GmbH, Stuttgart. *Varieties, J. agriculture. Food Chemistry.* 48:2837-2842p.
- Stiles, M. E.,(1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 331–345p.
- Sulieman, A.E., Issa, F.M., Elkhailifa, E.A., (2007). Quantitative determination of tannin content in some sorghum cultivars and evaluation of its antimicrobial activity. *Res J Microbiol.* 2(3): 284-288p.
- Suzuki, I., Nomura, M. and Morichi, T.,(1991). Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. *Milchwissenschaft.* 46: 635–639p.
- USDA-ARS United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (2012). National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRAIN). National Germplasm Resources Library, Beltsville, MD, USA. Available Online: <http://www.ars-grain.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon> (14 Oct. 2015).
- Vaughan, A., O’Sullivan, T., Van Sinderen, D.,(2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. *J. Inst. Brew.* 111: 355–370p.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., Zhao, L.,(2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 6: 320–329p. [CrossRef] [PubMed]
- Weichselbaum, E., Buttriss, J.L.,(2010). Polyphenols in the diet. *Nutr. Bull.*, 35 :157-164p.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M.,

Knights, D., Walters, W.A., Knight, R.,(2001). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* 334: 105–108p. [CrossRef] [PubMed]

- Yang, C. S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H. L., (2001).inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of Nutrition*.21:381–406p.
- Yang, J.,Keshavarzian, A., Rose, D.J.,(2013). Impact of dietary fiber fermentation from cereal grains on metabolite production by the fecal microbiota from normal weight and obese individuals. *J. Med. Food* .16: 862–867p. [CrossRef]
- Zhou, L.,Wang, W., Huang, J., Ding, Y., Pan, Z., Zhao, Y.,Zhang, R.,Hu, B.,Zeng, X.,(2016). In vitro extraction and fermentation of polyphenols from grape seeds (*Vitis vinifera*) by human intestinal microbiota. *Food Funct.* 7: 1959–1967p. [CrossRef] [PubMed]

Annexes

Annexes :

Article 1:



Available online at [GSC Online Press Directory](#)

GSC Biological and Pharmaceutical Sciences

e-ISSN: 2581-3250, CODEN (USA): GBPSC2



(RESEARCH ARTICLE)



GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 10(01), 065–072

Phytochemical screening and antibacterial activities of *Sorghum bicolor* leaves derived from *in vitro* culture

Ali Kauther Sir elkhatim ¹, Elsheikh Azza M ², Ahmed Hind M ¹, Osman Huda Abdu Hassan ³, Hamza Nada B ², Osman Magdoleen G ² and Daffalla Hussien M ^{2,*}

¹ College of Applied and Industrial Sciences, University of Bahri, P. O. Box 1660, Khartoum North, Sudan.

² Commission for Biotechnology and Genetic Engineering, National Centre for Research, Mohamed Nageeb St. No. 61, P. O. Box 2404, Khartoum, Sudan, Tel: +249918349142.

³ Faculty of Agriculture, University of Khartoum, Khartoum North, Sudan.

Publication history: Received on 16 December 2019; revised on 08 January 2020; accepted on 18 January

2020 Article DOI: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.10.1.0241>

24 Abstract

Various research works recognized highly biological activities of sorghum vegetative portions which indicated the presence of bioactive compounds in their extracts. Considering environmental effects on the accumulation of secondary metabolites, this work aims to evaluate the antibacterial activity of sorghum using *in vitro* induced leaves as source for extract. *In vitro* shoot explants of sorghum used subcultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 6-Benzyl adenine (BA) or Indole-3-butyric acid (IBA) at different concentrations (0.0–2.0 mg/L). The leaves induced *in vitro* were collected dried then macerated in ethanol for 4 hours. Phytochemical composition of the sorghum leaves extract was assessed using standard procedures. The crude extracts were evaluated for antibacterial activity using the agar well diffusion method. The significantly ($P>0.05$) maximum shoot length (5.7 cm) and the number of leaves (7.9 leaves) were obtained on MS medium supplemented with 2.0 mg/L IBA. The phytochemical composition of the leaves extract showed the presence of bioactive constituents including alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and steroids and triterpenes. All the concentrations of the sorghum leaves extract showed variable antimicrobial activity against the studied bacteria strains with the strongest inhibitory effect reported (19.0 mm) against *B. subtilis* at the concentration of 100 mg/L. Our findings demonstrated that the *in vitro* leaves extract of sorghum possess a remarkable antibacterial activity. More research is needed on the characterization of bioactive ingredients of *in vitro* induced sorghum plants and their biological activities.

Keywords: Antimicrobial; Sorghum; *In vitro* leaves; Phytoconstitutes

1. Introduction

Sorghum bicolor (L.) Moench subsp. *bicolor* (Family: Poaceae) is one of the most important cereal crops which came the fifth after rice, wheat, maize and barley in the world and main food grain production in Africa, Central America, and southern Asia [1]. However, sorghum is more tolerant to diseases, pests, drought and poor soils. Sorghum is the prevalent crop in Sudan covering an area of 9.8 million hectares which represented more than 60% of the total cultivated cereals area, with a production of about 4.9 million tons contributing to 9.1% of total world production in 2018 [2].

Sorghum used mainly for grain production in addition to cultivation for syrup production, feeding, and biofuel production. Other important uses, especially from leaves, sheath, stalks, glumes, and root were also available including

* Corresponding author

E-mail address: hdaffalla@yahoo.com

Copyright © 2020 Author(s) retain the copyright of this article. This article is published under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0.

food additives and folk pharmaceuticals. Red or purple pigments are largely extracted from the sheath and used as food colourants such as cheese and porridges, and dyes for leather, textile, and wood in numerous countries of Africa and Asia [3-5]. Sorghum extracts is reported to have antiabortion, cyanogenic, demulcent, diuretic, emollient, intoxicant, and toxic properties [6]. Various traditional remedies were prepared from sorghum to treat cancer, breast disease, malaria, tubercular swellings, eczema, dysentery, diarrhea, stomach ache, helminths, bone pains, epilepsy, sickle cell disorder, anemia and as a blood builder [6-8].

The therapeutic roles reported on sorghum are results of anti-inflammatory, anti-carcinogenic, antibiotic, antifungal, antiviral, hepatoprotective, anti-ulcer, anti-neoplastic, cholesterol-lowering and digestibility slowing properties [8-11]. Such pharmaceutical functions are allied to the phytochemical contents of the plant such as phytosterols, policosanols, saponins, carotenoids and phenolic compounds, including flavonoids, tannins, and anthocyanins [12]. Different important flavonoids and phenolic acids were identified in the leaves extract of sorghum including gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, rutin, isoquercitrin, quercitrin, quercetin, and kaempferol [13]. The pigmented shell contains a high concentration of phenolic compounds including phenolic acids, 3-deoxyanthocyanins and condensed tannins [11]. Almost all classes of phenolic compounds are found in sorghum in the form of phenolic acids, flavonoids and condensed tannins [14]. The total phenol concentrations estimated to be 1.1–1.5% of root dry weight and 1.1–2.2% of aerial parts dry weight of the sorghum grown in Senegal [15]. The secondary metabolites reported on sorghum are integral cellular structural or components of plant cell walls and the compositions depend on the sorghum genotype and the environmental factors during crop growth [16]. Genetic factors controlling seed colour and feature, and also secondary plant colour which affects the appearance of leaf, stalk, sheath, glume, and kernel [11]. Environmental factors including pests and diseases that induce stress on sorghum trigger phytoalexins such as flavonoids as defense response, and plant sterols and policosanols are constituents of wax [9,17] vital in alleviating evaporation. Regarding the constitutive defense benzoxazinoids, nitrogen-containing metabolites, are the predominant phytoanticipins in allelopathy mechanism, and against insects and microorganisms in sorghum [17]. *In vitro* plant tissue culture technique can be used to produce a plant with valuable secondary products that may not be accumulated in response to environmental conditions.

Due to the extraordinary beneficial phytochemicals content of sorghum vegetative parts, various research on the biological activities was done. Such studies include antimicrobial activity of stem extract [3], *in vitro* anti-inflammatory and immune-modulating properties of leaf sheath [18] and various *in vivo* studies on rats using sorghum leaves, leaf base, and leaf sheath extracts proved antisickling [7], enhance the hematological parameters [19], anti-anaemic stem bark [20], for anti-nociceptive and anti-inflammatory activities [21] and hepatotoxicity and oxidative stress inhibitor [8]. However, more research is needed on biological activities of vegetative parts of sorghum.

To the best of our knowledge, there are no published research work on the antimicrobial activity of *in vitro* derived plant parts of sorghum. Therefore the purpose of this study was to validate the phytochemical and antimicrobial activity of sorghum using *in vitro* induced leaves.

2. Material and methods

2.1. *In vitro* culture of sorghum

In vitro shoot (1.5-2.0 cm long with 2-3 leaves) of *Sorghum bicolor* cultivar Butana used as explants. The shoots were already maintained on Murashige and Skoog (MS) medium [22] fortified with 1.0 mg/L 6-Benzyl adenine (BA). Shoots explants were subcultured on MS medium supplemented with different concentrations (0.0, 1.0, 2.0 mg/L) of BA or Indole-3-butyric acid (IBA). MS media was augmented with 3% sucrose and the pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 121°C (1.1 Kg/cm³) for 15 min. All cultures were incubated at 25 ± 2°C under a photoperiod of 16 h light/8 h dark. Data on shoot induction, shoot length, number of leaves, and rooting per shoot were collected after 4 weeks of culture.

2.2. Plant material and extract preparation

Fully devolved leaves were collected from *in vitro* raised shoots of sorghum culture, air-dried and crunched then

Ali et al. / GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 10(01), 065–
stored in a tight container till use. Powdered leaves (100 g) were extracted successively in ethanol with aid of magnetic stirring apparatus for 4 hours at room temperature. The ethanol extract was filtrated with filter paper (Whatman No. 1) then evaporated and air-dried and the residue, after final weight obtained, was kept at 4 °C until use.

2.3. Phytochemical screening

Phytochemical screening for the active materials was carried out for extracts using the methods described with some modification.

The presence of alkaloids in extracts is tested by using Wagner's reagent [23]. That, 2 mL of Wagner's reagent is added to 2 mL of extracts. The formation of reddish-brown precipitate indicated the presence of alkaloids.

The test for steroids was done according to the method with modifications [24]. Hence, 1 mL of extract was taken in a test tube and dissolved with 10 mL chloroform, then an equal volume of concentrated H₂SO₄ was added to the test tube by sides. The upper layer in the test tube appears red and the sulphuric acid layer showed yellow with green fluorescence, which indicated the presence of steroids.

Test for flavonoids in plant material by taking 2 mL of the extract in a test tube and 2-3 drops of dilute NaOH was added [24]. An intense yellow color has appeared in the test tube. The solution became colorless when a few drops of dilute H₂SO₄ were added confirming the presence of flavonoids.

Saponins were tested by taking 2 g of the powdered sample and boiled in 20 mL of distilled water in a water bath then filtered [25]. To the filtered sample (10 mL), about 5 mL distilled water was added, shaken vigorously and observed for a stable persistent frothing for 25 min.

Test for tannins was done with some modifications [25]. From the dried powdered sample, 0.5 g was boiled in 20 mL water in a test tube and then filtered. One milliliter of 0.1% Ferric Chloride (0.01 Mol/dm³) was added to 2 mL of extract. Brownish green colorations were indicated the presence of tannins distilled water in a water bath and filtered. To the filtered sample (10 mL), about 5 mL distilled water was added, shaken vigorously and observed for a stable persistent frothing for 25 min.

2.4. Antimicrobial activity

Bacterial strains of two gram-positive; *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* and two gram-negative; *Escherichia coli*, *Pseudomonas argenosa* were used to study the antibacterial activity of sorghum leaves extract. The paper disc diffusion method was used for the antibacterial screen and performed by using Mueller Hinton agar. The experiment was carried out according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines [26]. The bacterial suspension was diluted with a sterile physiological solution to 10⁸ CFU/mL (turbidity = McFarland standard 0.5). One hundred microliters of bacterial suspension were swabbed uniformly on the surface of MHA and the inoculum was allowed to dry for 5 min. Sterilized filter paper discs (Whatman No. 1, 6 mm in diameter) were placed on the surface of the MHA and soaked with 20 µL of sorghum extract solution. Extract powder dissolved in DMSO was applied in four concentrations 12.5–100 mg/L. Negative control was also prepared in DMSO. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h in the inverted position. The diameters (mm) of the inhibition zones were measured and compared with reference antibiotic discs.

2.5. Statistical analysis

Every experiment was repeated three times. The obtained data were subjected to analysis of variance (ANOVA). The mean separation was analyzed using Duncan's new multiple range test at P-value <0.05. All the values were expressed as mean ± standard errors.

3. Results and discussion

3.1. *In vitro* culture of sorghum

The presence of IBA 2.0 mg/L enhanced noticeably the growth of the shoots (Table 1) with significantly ($P>0.05$) the longest shoots (5.7 cm) and the highest number of leaves (7.9 leaves). Moreover, some of the shoots were

Ali et al. / GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 10(01), 065–
induced roots affected by the concentration of IBA. Addition of IBA at lower concentration (1.0 mg/L) favorite rooting of shoot compared to other plant growth regulators (PGRs) treatments (Table 1). Improving shoot growth and rooting of *in vitro* sorghum shoots by using IBA or auxins have been identified by several authors [27]. The presence of BA deteriorated shoot length (to 1.9 cm at 2.0 mg/L BA) compared to the control (2.0 cm) considering the initial shoot explant length (average 1.7 cm). A similar negative effect of increasing concentration of BA on shoot length of sorghum has been reported [28].

Table 1 Effect of IBA and BA on shoot length, number of leaves, the presence of multiple shoots and the presence of secondary roots after 4 weeks of culture.

PGRs (mg/L)	Shoot length (cm)	Number of leaves	Multiple shoots*	Rooting*
Control	2.0 ± 0.1c	3.0 ± 0.0d	-	-
IBA 1	3.15 ± 0.3b	5.62 ± 0.5b	-	++
IBA 2	5.69 ± 0.4a	7.85 ± 0.5a	+	+
BA 1	1.73 ± 0.1c	3.62 ± 0.2cd	++	-
BA 2	1.88 ± 0.4c	4.23 ± 0.3c	++	-

PGR: plant growth regulator; IBA: Indole-3-butyric acid; BA: 6-Benzyladenine; *relative frequency index: -, +, ++ = absent, low, high. Values represent means ± standard errors. Different letters indicated statistically significant differences between means according to Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

3.2. Phytochemical screening of sorghum leaves

The results of qualitative phytochemical screening of ethanol extract of sorghum leaves indicated the presence of alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, sterol, and triterpenes (Table 2). Likewise, the presence of alkaloids, flavonoids, saponins, and terpenoids has been detected in different sorghum aerial parts such as aqueous extract of leaves [19], and aqueous extract of stalk/stem in which terpenoids was not detected [29]. In contrast, alkaloid, and steroids were not detected in both methanol and aqueous extracts of sorghum leaves [13].

Table 2 Phytochemical screening of *Sorghum bicolor* *in vitro* leaves extract.

Phytochemical	Presence index
Alkaloids	+
Flavonoids	+
Steroids and triterpenes	+
Tannins	+
Saponins	+

The leaves and sheath of sorghum had higher phenols contents, up to 600 times more than their respective grains, with *in vitro* antioxidant properties than commonly seen in grains [4]. The phenols in sorghums fall under two major categories; phenolic acids (benzoic or cinnamic acid derivatives) and flavonoids (tannins and anthocyanins) [8]. Various flavonoids were identified in sorghum include the flavanones eriodictyol, naringenin, and eriodictyol glucoside, the flavone apigenin, and the 3-deoxyanthocyanins luteolinidin and apigeninidin [11].

3.3. Antimicrobial activity of sorghum leaves

All the concentrations of the sorghum leaves extract showed high antimicrobial activity against the four studied bacteria strains (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *E. coli*) when compared to standard drugs ciprofloxacin (Table 2). Obviously, the inhibitory effect of the extract increased significantly ($P \leq 0.05$) with increasing the concentration. The strongest inhibitory effect reported (19.0 mm) was against *B. subtilis* at 100 mg/L leaves extract. The minimum inhibitory zone recorded (with the concentration 100 mg/L) was 17.5 mm against *P. aeruginosa*.

The crude leaves extract of sorghum was slightly more effective against gram-positive bacteria compared to gram-negative strains. Variations in response of the gram-positive bacteria and gram-negative strains to the

Ali et al. / GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 10(01), 065–
different extracts of sorghum aerial parts have been reported by several authors. For example, the crude extracts of sorghum leaf sheath demonstrated activity against *B. subtilis* [30]. In contrast, sorghum crude stem extract showed high inhibition against *P. aeruginosa* (gram-negative) compared to *B. subtilis* (gram-positive) [3]. On the other hand, extracts of dye sorghum leaf sheaths found have no anti-bacterial properties on *E. coli* tested in a nutrient-rich traditional West African cheese [5].

Table 3 Antibacterial activity of sorghum leaves extract.

Antibiotic	Dose (mg/L)	Inhibition zone (mm)			
		Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
		<i>B. s</i>	<i>S. a</i>	<i>P. a</i>	<i>E. c</i>
Sorghum extract	0	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^e
	12.5	10.2 ± 0.1 ^e	11.0 ± 1.0 ^d	10.0 ± 0.1 ^e	11.1 ± 1.0 ^d
	25	14.1 ± 0.1 ^d	12.1 ± 1.0 ^d	13.2 ± 1.2 ^d	14.0 ± 0.1 ^c
	50	16.0 ± 0.1 ^c	16.0 ± 0.1 ^c	15.0 ± 0.1 ^c	17.0 ± 1.0 ^b
	100	19.0 ± 1.0 ^b	18.0 ± 1.0 ^b	17.5 ± 0.1 ^b	18.0 ± 1.0 ^b
Ciprofloxacin	100	31.0 ± 0.01 ^a	30.0 ± 1.0 ^a	29.0 ± 1.0 ^a	30.0 ± 0.1 ^a

B. s: *Bacillus subtilis*; *S. a*: *Staphylococcus aureus*; *P. a*: *Pseudomonas aeruginosa*; *E. c*: *Escherichia coli*. Values represent mean ± standard errors.

Different letters indicated statistically significant differences between means according to Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

However, similar trends of exerting higher activity against gram-positive bacteria compared to gram-negative strains have been also reported on seed extracts of sorghum. Sorghum seeds extract exhibited moderate to high activity against

B. subtilis and *S. aureus* compared to the studied gram-negative bacteria [31]. Also, the condensed tannin-free sorghum crude phenolic extract was found effective only against *B. cereus* (gram-positive), while none of the tested types of bran sorghum phenolic extracts had inhibitory effects on *E. coli* (gram-negative) [32]. Moreover, Saponins extract of sorghum seed inhibited the growth of the *S. aureus* indicated that the extract has an inhibitory effect on gram-positive organisms but not on gram-negative organisms [10]. Also, tannin extract of sorghum seed showed an inhibition effect on *S. aureus* growth higher than that on *E. coli* [33]. In contrast, all sorghum seed extracts and fractions showed a strong inhibitory effect against *E. coli*, and among all the studied four cultivars only one showed an inhibitory effect against *B. subtilis* [34]. Likewise, none of the methanolic extracts from pigmented grains of ten sorghum lines showed antibacterial activity against *B. subtilis* while nine of them strongly inhibited the growth of *E. coli* [35].

These variations in antibacterial activity between gram-positive and gram-negative bacteria are mainly due to variances in cell wall structures of the bacteria gram-type. There is a general rule that secondary metabolites present in plant extracts can inhibit gram-positive bacteria more than gram-negative bacteria [36]. For instance, the cell wall of gram-negative bacteria is surrounded by an outer additional lipopolysaccharide membrane, which functions as a hydrophilic surface that prevents permeability of hydrophobic compounds such as tannins and other many plant extracts [31, 36, 37].

The observed dissimilarity in the antimicrobial activities of sorghum extracts might be attributed to the plant genotype or type of solvent used for extraction which produces different bioactive substances and composition, among others. For example, various studies showed that flavonoid levels and composition were affected by the sorghum genotype [11]. Likewise, great variation in tannin content was found between three Sudanese sorghum cultivars [33]. Different solvent types produced different phytochemical compounds that exert different antimicrobial activity through different mechanisms. That, phytochemical analysis of sorghum leaves indicated the absence of saponin and tannin aqueous extract while were found in the methanol extract [13]. The phenolic compounds are toxic to bacterial cells and can inhibit bacteria growth by several actions such as modifying the permeability of cell membranes, changes in various intracellular functions induced by hydrogen binding to enzymes or by the modification of the cell wall rigidity with integrity losses due to different interactions with the cell membrane [38]. In the case of gram-positive bacteria, phenolic compounds intracellular pH modification, as well as interference with the energy (ATP) generating system, were reported [39]. The other secondary metabolites such as saponins are also contributed to the antimicrobial activity of sorghum and may act by damaging cell membranes causing leakage of cellular materials, ultimately leading to cell death [40].

4. Conclusion

Plant tissue cultures are an attractive alternative technique to the whole plant for the production of the high value of active substances. The results of this study pointed out that antimicrobial activities exhaled by *in vitro* leaves of *Sorghum bicolor* due to the presence of the bioactive ingredients. Further research is necessary to determine the identity of the therapeutic compound within this crude extract of the plant also to determine their full spectrums of efficiency.

25 Compliance with ethical standards

25.1 Acknowledgments

The authors are grateful to the Agricultural Plant Genetic Resources Conservation and Research Centre (APGRC), Wadmadani – Sudan, for providing the seed material used in this study.

25.2 Disclosure of conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

26 References

- [1] FAO. (2012). Database of agricultural production. FAO Statistical Databases (FAOSTAT).
- [2] FAO. (2019). FAO Crop and Food Supply Assessment Mission to the Sudan – Special Report. Rome. 38.
- [3] Adetuyi AO, Akpambang VOE, Oyetayo VO and Aetuyi FO. (2007). The nutritive value and antimicrobial property of Sorghum bicolor L. stem (POPORO) flour used as food colour and its infusion drink. *Am J Food Technol*, 2(2), 79-86.
- [4] Njongmeta NLA. (2009). Extractability profiling and antioxidant activity of flavonoids in sorghum grain and non- grain materials. PhD thesis, Texas A&M University.
- [5] Akogou FUG, den Besten HMW, Kayodé APP, Fogliano V and Linnemann AR. (2018). Antimicrobial evaluation of red, phytoalexin-rich sorghum food biocolorant. *PLoS ONE*, 13 (3), e0194657.
- [6] Duke JA and Wain KK. (1981). Medicinal plants of the world: Computer index with more than 85,000 Entries. Vol. 3, Longman Group Ltd., UK.
- [7] Mojisola C-O C, Anthony EA and Alani DM. (2009). Antisickling properties of the fermented mixture of Carica papaya Linn and Sorghum bicolor (L.) Moench. *Afr J Pharm Pharmacol*, 3(4), 140-143.
- [8] Ademiluyi AO, Oboh G, Agbebi OJ, Boligon AA and Athayde ML. (2014). Sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench] leaf sheath dye protects against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *J Med Food*, 17 (12), 1332–1338.
- [9] Awika JM and Rooney LW. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65, 1199–1221.
- [10] Soetan KO, Oyekunle MA, Aiyelaagbe OO and Fafunso MA. (2006). Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of Sorghum Bicolor L. Moench. *Afr J Biotechnol*, 5(23), 2405-2407.
- [11] Dykes L, Seitz L, Rooney WL and Rooney LW. (2009). Flavonoid composition of red sorghum genotypes. *Food Chem*, 116, 313–317.
- [12] Salazar-López NJ, González-Aguilar G, Rouzaud-Sández O and Robles-Sánchez M. (2018). Technologies applied to sorghum (Sorghum bicolor L. Moench): changes in phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Sci Technol*, 38(3), 369-382.
- [13] Borokini FB. (2017). Identification and quantification of polyphenols in Sorghum bicolor (L) Moench leaves extract using reverse-phase HPLC-DAD. *Clin Exp Pharmacol*, 7, 2.
- [14] Ayala-Soto FE, Serna-Saldívar SO, García-Lara S and Pérez-Carrillo E. (2014). Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocoll*, 35, 471-475.
- [15] Sene M, Gallet C and Dore T. (2001). Phenolic compounds in a Sahelian sorghum (Sorghum bicolor) genotype (CE145-66) and associated soils. *J Chem Ecol*, 27(1), 81-92.
- [16] Duodu KG and Awika JM. (2019). Chapter 8: Phytochemical-related health-promoting attributes of sorghum and millets. In *sorghum and millets*, Second Edition, 225-258.
- [17] Meyer J, Murray SL and Berger DK. (2015). Signals that stop the rot: Regulation of secondary metabolite defences in

- [18] Benson KF, Beaman JL, Ou B, Okubena A, Okubena O and Jensen GS. (2013). West African Sorghum bicolor leaf sheaths have anti-inflammatory and immune modulating properties *in vitro*. *J Med Food*, 16 (3), 230–238.
- [19] Salawu SO and Salimon YA. (2014). Evaluation of the effect of Sorghum bicolor aqueous extract on the haematological, renal and hepatic parameters in rats fed with low and high iron diet. *Eur J Med Plant*, 4(7), 783- 793.
- [20] Oladiji AT, Jacob TO and Yakubu MT. (2007). Anti-anaemic potentials of aqueous extract of Sorghum bicolor (L.) Moench stem bark in rats. *J Ethnopharmacol*, 111(3), 651-660.
- [21] Nwinyi FC and Kwanashie HO. (2009). Evaluation of aqueous methanolic extract of Sorghum bicolor leaf base for antinociceptive and anti-inflammatory activities. *Afr J Biotechnol*, 8 (18),4642-4649.
- [22] Murashige, T and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473–497.
- [23] Mamta S and Jyoti S. (2012). Phytochemical screening of Acorus calamus and Lantana camara. *Int Res J Pharm*, 5, 324-6.
- [24] Khan MR and Ranjini R. (2013). Preliminary phytochemical screening of seeds of Psoralifolia corylifolia. *Int Res J Pharm*, 4, 1-12.
- [25] Doherty VF, Olaniran OO and Kanife UC. (2010). Antimicrobial activities of Aframomum melegueta (Alligator Pepper). *Int J Biol*, 2(2), 126-31.
- [26] NCCLS. (1999). National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. Wayne, Pensilvania document, 19(1).
- [27] Liu G, Gilding EK and Godwin ID. (2013). Additive effects of three auxins and copper on sorghum *in vitro* root induction. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 49, 191–197.
- [28] Baskaran P and Jayabalan N. (2005). *In vitro* plant regeneration and mass propagation system for Sorghum bicolor -a valuable major cereal crop. *J Agri Technol*, 1(2), 345-363.
- [29] Adenike AO and Olalekan OC. (2018). Chemical composition of Theobroma cacao L. (Sterculiaceae) and Sorghum bicolor (L.) Moench, Syn. Sorghum vulgare Pers (Poaceae). *Trends Phytochem Res*, 2(4), 235-242.
- [30] Oriola AO, Ogundele OH, Onawunmi GO and Ogundaini AO. (2015). Antimicrobial constituents of Sorghum bicolor (L) Moench leaf sheath. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 12(S), 1-44.
- [31] Mošovská S., Birošová L and Valik L. (2011). Biological activities of sorghum extract and its effect on antibiotic resistance, Chapter 7, in Pereira, T. D. *Sorghum: Cultivation, Varieties and Uses*. Nova Science Publishers, New York, 129-140.
- [32] Khadambi TN. (2007). Extraction of phenolic compounds and quantification of the total phenol and condensed tannin content of bran fraction of condensed tannin and condensed tannin free sorghum varieties. MSc thesis, University of Pretoria, Pretoria.
- [33] Sulieman AE, Issa FM and Elkhalfa EA. (2007). Quantitative determination of tannin content in some sorghum cultivars and evaluation of its antimicrobial activity. *Res J Microbiol*, 2(3), 284-288.
- [34] Kil HY, Seong ES, Ghimire BK, Chung I-M, Kwon SS, Goh EJ, Heo K, Kim MJ, Lim JD, Lee D and Yu CY. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem*, 115, 1234–1239.
- [35] Mohamed SK, Ahmed AA, Yagi SM and Abd Alla AH. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of total polyphenols isolated from pigmented sorghum (Sorghum bicolor) Lines. *J Genet Eng Biotechnol*, 7(1), 51-58.
- [36] Rakholiya KD, Kaneria MJ and Chanda SV. (2013). Chapter 11: Medicinal plants as alternative sources of therapeutics against multidrug-resistant pathogenic microorganisms based on their antimicrobial potential and synergistic properties. In: *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*, 165-178.
- [37] Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM and von Wright A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agri Food Chem*, 46, 3590-3595.
- [38] Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lantéri P, Clément Y, Léonard-Akkari L, Oulahal N, Degraeve P and Bordes C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (quantitative structure–activity relationship) models. *Front Microbiol*, 10, 829.

- [39] Djilani A and Dicko A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. In Nutrition, well-being and health in Technology, ed Jaouad (Rijeka: InTech), 155–178.
- [40] Mshvildadze V, Favel A, Delmas F, Elias R, Faure R, Decanosidze G, Kemertelidze E and Balansard G. (2000). Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Die Pharmazie*, 55(4), 325-6.

27 How to cite this article

Ali KS, Elsheikh AM, Ahmed HM, Hassan HA, Hamza NB, Osman MG and Daffalla HM. (2020). Phytochemical screening and antibacterial activities of *Sorghum bicolor* leaves derived from *in vitro* culture. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 65-72.

Article 2:

Control of the Growth of Coliforms and Moulds in Sorghum Malting by Bacterial and Yeast Cultures

Mathoto L. Lefyedi^{1,2} and John R.N. Taylor^{1,3}

ABSTRACT

J. Inst. Brew. 113(2), 123–129, 2007

Traditional outdoor floor malted sorghum can be contaminated with high levels of coliform bacteria and moulds that can potentially produce mycotoxins. The effect of steeping with the addition of bacterial and yeast starter cultures on microbial contamination, toxicity and diastatic power (DP) of sorghum malt was investigated. *Lactobacillus plantarum*, *Pedococcus pentosaceus* and *Saccharomyces* species were selected on the basis of inhibition of fungal species using the disc diffusion assay. Steeping the sorghum with the addition of these cultures at 10^7 – 10^8 cfu/mL reduced the level of moulds by one to two log cycles, with the *Saccharomyces* culture appearing to be the more effective and

L. plantarum the least effective. Coliforms, where present in significant numbers, were reduced to levels of $<10^1$ – 10^2 by steeping with the cultures, with the *P. pentosaceus* culture appearing to be the most effective and *Saccharomyces* the least effective. There were no detectable amounts of mycotoxins and no significant cytotoxicity in the malts in either the controls or the culture-steeped malts. Steeping with the cultures did not affect malt DP. The use of such *P. pentosaceus* and *Saccharomyces* sp. cultures could be an alternative to chemical

treatment for the control of microbial contamination in sorghum malt.

Key words: bacteria, moulds, *Pedococcus*, *Saccharomyces*, sorghum malting.

28 INTRODUCTION

Traditional outdoor floor malted sorghum can be contaminated with high levels of coliform bacteria and moulds that can potentially produce mycotoxins¹⁷. Recently we have shown that these undesirable sorghum malt microflora can be controlled by steeping in dilute NaOH¹⁶. However, a recent development aims to inhibit the growth of unwanted bacteria and moulds by the addition of desirable microbial cultures as natural biocontrol agents in steep¹⁸. Lactic acid bacteria (LAB)¹⁵ and the yeast *Geotrichum candidum*⁴ have been shown to be effective at inhibiting unwanted microorganisms in barley malting.

¹Department of Food Science, University of Pretoria, 0002, Pretoria, South Africa.

² Current address: South African Agency for Science and Technology Development, P.O. Box 1758, Pretoria 0001, South Africa.

³ Corresponding author. E-mail: jtaylor@postino.up.ac.za

Publication no. G-2007-0626-488

© 2007 The Institute of Brewing & Distilling

The inhibition of coliforms and moulds by LAB is attributed mainly to the low pH, resulting from the production of lactic and other acids^{21,28}. Synthesis of bacteriocins^{3,10,22} and antifungal compounds²⁸ and depletion of nutrients can also play a role²⁰. Of significance with respect to sorghum malting is that many anti-microbial-producing lactic acid bacteria have been isolated from samples of raw sorghum¹². Two of these, which were identified as *Escherichia* species, were found to be bacteriocin producers. With regard to the antifungal activity of LAB, the precise mechanism by which it takes place is apparently difficult to define as it may often be due to a complex interaction between different compounds and the targeted fungus²⁸. Concerning the mechanism of anti-microbial activities by yeast, Boivin and Malanda⁴ reported that when the yeast *G. candidum* was added during steeping of barley grain it inhibited other microorganisms through competition. This mode of inhibition has also been observed when yeasts were used as biocontrol agents of postharvest diseases¹⁴, as the yeasts were able to colonize and survive on fruit surfaces for long periods of time under different conditions and they also used available nutrients to proliferate rapidly, limiting nutrient availability to the pathogens.

In addition to offering the potential to improve the safety and quality of malt, the use of microbial cultures in steeping is claimed to be easy to use, nature-friendly, inexpensive and not lead to the formation of toxic compounds, nor alter the nutritional and palatability properties of the grain product¹⁸.

The objective of this study was to determine whether the addition of microbial cultures could control the growth of coliforms and moulds in sorghum malting.

29 MATERIALS AND METHODS

29.1 Sorghum grain

Two condensed tannin-free red sorghum cultivars, NK 283 and PAN 8546 were used as described in our previous work^{16,17}.

29.2 Microorganisms

Initially several different types of microorganisms (two LAB, five *Bacillus* spp. and two *Saccharomyces* spp.) were screened for their antimicrobial properties. The LAB cultures (*Lactobacillus plantarum*, and *Pediococcus pentosaceus*) were selected based on the fact that they or their

Ali et al. / GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 10(01), 065-072

related strains have been previously shown by other researchers to inhibit the growth and survival of some fungi^{2,10,25,27}. The *Saccharomyces* spp. and *Bacillus* spp. cultures were selected because of their antifungal activities found during preliminary work in this study. Details of those microorganism, which were found to be effective at controlling microbial growth in laboratory-scale sorghum malting, are given in Table I.

Eight moulds (*Aspergillus flavus*, *Phoma sorghina*, *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* sp., *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria alternata*) were used. These were selected as they were the most dominant moulds identified in sorghum malt¹⁷.

The LAB cultures were grown on De Man, Rogosa and Sharp (MRS) agar at 30°C and stored on MRS plates at 5°C. Liquid suspensions of the cultures were grown in MRS broth at 30°C. The *Saccharomyces* spp. cultures were grown and stored on malt extract broth and/or agar. The *Bacillus* spp. cultures were grown on nutrient agar at 35°C and stored on nutrient agar and/or broth. The mould cultures were cultivated and maintained on potato dextrose agar (PDA) slants in McCartney bottles at 5°C until required. The cultures were sub-cultured at monthly intervals.

29.3 Disc diffusion assay

To select cultures that inhibit the growth of moulds and coliforms during sorghum malting, the antifungal activities of the LAB and *Saccharomyces* sp. listed in Table I were determined against the eight moulds by the disc diffusion method^{19,23}. Moulds were incubated for 5 days at 25°C. Mould growth on slants was harvested into sterile saline (9%) containing 0.1% Tween-80 by brushing the slant surface with a sterile loop. The mould suspension was subjected to vigorous agitation using a vortex mixer to break the clumps. The spore count was then determined with the aid of a haemocytometer and the suspension standardised to a final concentration of 10⁷ spores per mL. A 100 µl aliquot of mould spore suspension was transferred to PDA plates and spread uniformly over the agar surface with a sterile bent glass rod. Sterilized filter paper discs (Whatman No. 1, 5 mm diameter) were saturated with 100

µL of each of the test cultures. The discs were allowed to air-dry. The dry discs were placed on inoculated PDA plates. Each culture was tested in duplicate. Each plate also contained one disc with cycloheximide (1 mg/mL in sterile distilled water) as a positive control and another disc with a sterile uninoculated LAB or PDA broth as a negative control. The plates were incubated at 25°C for 24 h. Zones of inhibition indicating antifungal activity

formed around each disc, if present, and were measured in mm. Clear zones of more than 0.5 mm were considered as positive for inhibition⁸.

29.4 Laboratory scale malting

Samples (150 g) of the two sorghum cultivars were rinsed and then steeped at 25°C for 8 h in 300 mL still tap water (control). The test cultures, including cells and spent media, were added into the 300 mL steep water to make a final concentration of cultures of about 10^7 – 10^8 cfu /mL. Mixed cultures were also investigated using different proportions of the *P. pentosaceus* (L5) and *Saccharomyces* sp. (Y1) cultures. The inoculated grain was steeped as above. After steeping, the grain was rinsed and then germinated at 28°C for 6 days, and then dried at 50°C as described¹⁶.

29.5 Analyses

pH. The pH of the steep water, which was drained after the first 8 h of steeping, was determined.

Other analyses. The sorghum grain at 0 h, at 8 h before rinsing, at 8 h after rinsing, on the second and fourth day during malting (green malt) and after six days (dried malt) were assayed for the following as described in our previous work^{16,17}. Microbial population: total aerobic plate counts (APC), LAB, yeasts, moulds and coliforms by standard plating methods, mould identification and enumeration by the direct plating method. Diastatic Power (DP), according the South African Bureau of Standards method, except that water was used as the enzyme

extractant instead of peptone solution⁷, aflatoxins by thin layer chromatography (TLC), fumonisins by the VICAM FumonitestTM, deoxynivalenol (DON) and zearalenone by a multi-toxin TLC screening method, cytotoxicity by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) cell proliferation assay.

Statistical analysis. Duplicate samples were evaluated during each analysis and the experiments were repeated three times to obtain a total of six observations for each analysis. The data were analysed using the STAT- GRAPHICS 5.0 program (Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used at the 0.05 level of significance. Differences between means were determined by the least significant difference method.

30 RESULTS AND DISCUSSION

30.1 Microbial growth inhibition

It was found that of the microorganisms investigated, the two LAB *P. pentosaceus* (L5) and *L. plantarum* (L9) and one *Saccharomyces* sp. (Y1) exhibited antifungal activity and controlled microbial growth during laboratory malting. Table II shows that with the disc diffusion assay *P. pentosaceus* (L5) showed inhibition against five mould species. The *Saccharomyces* sp. (Y1) inhibited four moulds and the *L. plantarum* (L9) three moulds. The inhi-

Table I. Details of those microorganisms found to be effective at controlling microbial growth in laboratory-scale sorghum malting.

Cultures (Code number)	Original culture numbers	Source
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (L5)	Culture no. 13	Cottage cheese, University of Pretoria, South Africa
<i>Lactobacillus plantarum</i> (L9)	B 845	Sorghum, CSIR culture collection, Pretoria, South Africa
<i>Saccharomyces</i> sp. (Y1)	Not available	Sorghum malt, University of Pretoria, South Africa

Table II. Antifungal activity (inhibition zones in mm) of the *P. pentosaceus* (L5), *Lactobacillus plantarum* (L9) and the *Saccharomyces* sp. (Y1) cultures tested against different mould cultures using the disc diffusion assay.

	<i>A. flavus</i>	<i>P. sorghina</i>	<i>Curvularia a</i>	<i>F. oxysporu</i>	<i>F. chlamydo- sporum</i>	<i>F. verticil- lioides</i>	<i>Penicilliu m</i>	<i>A. alter-</i>	<i>A. fumi-</i>
Positive control	4.0	5.5	5.0	5.0	4.5	4.8	4.0	4.2	4.5
Negative control ¹
L5	...	2.4	1.0	1.4	2.0	2.4
L9	...	1.2	1.5	2.1
Y1	1.7	...	2.0	...	2.9	...	1.9

¹ 1 mg/mL cycloheximide.

Ellipsis points indicate no inhibition.

Table III. Effect of steeping NK 283 and PAN 8546 sorghum grains in different microbial cultures on the total aerobic plate count (APC) during the malting process.

		0 h	8 h before rinse	8 h after rinse	2 days	4 days	Dry malt
NK 283	Control	3.1×10^5 a ¹	4.9×10^7 a	1.8×10^4 d	1.1×10^5 cd	2.7×10^6 f	1.4×10^4 cd
	L5	2.6×10^7 bc	1.1×10^9 f	4.6×10^4 e	1.4×10^5 de	5.4×10^5 d	2.8×10^4 e
	L9	3.9×10^7 cd	5.8×10^8 de	2.8×10^4 d	6.8×10^4 bc	3.5×10^5 bcd	1.6×10^4 d
	Y1	6.1×10^5 a	7.1×10^7 ab	1.3×10^4 bc	7.4×10^3 a	1.9×10^4 a	7.3×10^3 abc
PAN 8546	Control	4.2×10^4 a	9.8×10^5 a	9.0×10^2 a	5.5×10^3 a	1.3×10^4 a	4.4×10^2 a
	L5	2.5×10^7 bc	5.4×10^8 de	2.7×10^3 a	4.9×10^4 ab	2.2×10^5 abc	4.3×10^3 ab
	L9	2.0×10^7 b	2.6×10^8 abc	1.6×10^3 a	2.6×10^4 ab	1.1×10^5 ab	1.9×10^3 ab
	Y1	1.6×10^7 ab	3.3×10^8 cbd	1.4×10^3 a	4.2×10^3 a	3.1×10^4 a	4.6×10^3 ab

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).**Table IV.** Effect of steeping NK 283 and PAN 8546 sorghum grains in different microbial cultures on the growth of LAB during the malting process.

		0 h	8 h before rinse	8 h after rinse	2 days	4 days	Dry malt
NK 283	Control	2.2×10^3 a ¹	5.2×10^5 a	5.0×10^2 a	1.2×10^3 a	8.3×10^3 a	3.9×10^2 a
	L5	4.5×10^7 c	7.5×10^8 d	8.3×10^3 a	1.9×10^4 a	4.9×10^5 a	2.6×10^4 a
	L9	2.7×10^7 b	3.0×10^8 c	5.9×10^3 a	8.3×10^4 a	1.7×10^6 a	7.8×10^4 a
	Y1	5.9×10^3 a	2.8×10^7 a	1.4×10^6 b	4.5×10^7 b	9.0×10^7 b	3.7×10^6 b
PAN 8546	Control	1.5×10^3 a	1.4×10^5 a	1.4×10^2 a	4.3×10^3 a	4.7×10^4 a	1.4×10^3 a
	L5	4.1×10^7 b	9.2×10^7 b	9.3×10^3 a	4.4×10^4 a	7.3×10^5 a	1.8×10^4 a
	L9	3.4×10^7 b	8.6×10^7 b	7.4×10^3 a	4.3×10^4 a	6.9×10^5 a	1.4×10^4 a
	Y1	1.9×10^3 a	8.6×10^4 a	1.9×10^2 a	6.0×10^3 a	1.5×10^4 a	6.9×10^5 a

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).**Table V.** Effect of steeping NK 283 and PAN 8546 sorghum grains in different microbial cultures on the growth of yeasts during the malting process.

		0 h	8 h before rinse	8 h after rinse	2 days	4 days	Dry malt
NK 283	Control	8.9×10^3 a ¹	9.9×10^4 a	5.5×10^3 d	1.7×10^4 d	5.1×10^4 de	2.1×10^3 a
	L5	4.3×10^3 a	3.1×10^4 a	1.9×10^2 a	9.0×10^2 a	1.3×10^4 ab	5.2×10^2 a
	L9	1.5×10^4 a	5.7×10^4 a	7.0×10^2 ab	2.1×10^3 b	3.6×10^4 bcd	1.7×10^3 a
	Y1	1.9×10^7 b	2.0×10^8 c	6.5×10^3 e	3.1×10^4 d	1.6×10^5 f	2.9×10^4 d
PAN 8546	Control	5.4×10^3 a	2.5×10^5 a	2.8×10^2 b	7.4×10^2 a	2.6×10^3 a	3.0×10^2 a
	L5	1.8×10^3 a	7.1×10^4 a	4.1×10^2 a	1.0×10^3 b	8.0×10^3 ab	4.2×10^2 a
	L9	2.7×10^3 a	4.8×10^4 a	3.3×10^2 a	1.6×10^3 b	2.5×10^4 abcd	9.1×10^2 a
	Y1	7.4×10^7 a	3.8×10^7 b	3.2×10^3 c	3.3×10^3 bc	8.0×10^4 e	7.7×10^2 a

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).

bition of moulds observed with this assay can be attributed to the production lactic acid^{21,28} and to extracellular antimicrobial compounds, as it has been found that some strains of *L. plantarum* and *P. pentosaceus*^{1,9,10,25,27} produce antifungal proteins. However, such activity in *Saccharomyces* is not

documented.

The cultures (L5, L9 and Y1) were then tested for their ability to inhibit the growth of moulds and coliforms during malting. Sorghum cultivar NK 283 represented a very poor grain quality, having only 40% germinability and a

higher level of microbial contamination than PAN 8546, which represented a better quality grain with 88% germinability. Steeping conditions were ideal for microbial growth on the sorghum grain as the APC increased from 10^4 - 10^7 cfu/g at the beginning of steeping, to 10^7 - 10^9 cfu/g at the end of the 8 h of steeping, before rinse (Table III). This increase was probably due to the fact that during steeping, nutrients leach from the grains into the steep water and become available for microorganisms²⁴. At the end of steeping, discarding the steep water reduced the

Table VI. Effect of steeping NK 283 and PAN 8546 sorghum grains in different microbial cultures on the growth of moulds during the malting process.

		0 h	8 h before rinse	8 h after rinse	2 days	4 days	Dry malt
NK 283	Control	3.2×10^4 a ¹	3.8×10^5 d	1.4×10^4 bc	5.2×10^4 b	2.1×10^5 d	5.7×10^4 c
	L5	3.6×10^4 a	9.3×10^4 cd	1.8×10^4 bc	9.3×10^3 ab	3.2×10^3 b	9.7×10^2 a
	L9	3.5×10^4 a	1.5×10^5 b	3.0×10^4 c	3.2×10^4 b	1.1×10^4 bc	4.0×10^3 b
	Y1	3.1×10^4 a	7.3×10^5 de	7.2×10^3 b	1.7×10^4 b	5.1×10^3 b	6.8×10^2 a
PAN 8546	Control	2.9×10^3 b	7.2×10^4 bc	1.1×10^3 ab	3.2×10^3 a	1.1×10^4 a	2.7×10^3 b
	L5	1.8×10^3 b	4.5×10^2 a	5.4×10^2 a	2.1×10^3 a	4.0×10^2 ab	8.6×10^2 a
	L9	1.9×10^3 b	1.5×10^3 a	1.1×10^3 ab	3.8×10^3 a	1.9×10^3 ab	8.8×10^2 ab
	Y1	2.6×10^3 b	1.2×10^2 a	3.4×10^2 a	1.7×10^4 b	3.4×10^2 a	1.3×10^2 a

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).

Table VII. Effect of steeping NK 283 and PAN 8546 sorghum grains in different microbial cultures on the growth of coliforms during the malting process.

		0 h	8 h before rinse	8 h after rinse	2 days	4 days	Dry malt
NK 283	Control	8.7×10^3 ba ¹	1.3×10^5 b	1.9×10^2 bc	6.5×10^2 bc	8.2×10^4 d	1.7×10^4 c
	L5	1.3×10^2 a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a
	L9	2.7×10^3 ab	2.0×10^2 a	2.4×10^1 ab	2.0×10^2 ab	1.2×10^1 a	2.6×10^1 a
	Y1	2.6×10^3 ab	3.1×10^3 a	2.5×10^2 cd	6.0×10^2 bc	1.8×10^2 b	5.2×10^2 b
PAN 8546	Control	2.6×10^2 a	8.9×10^3 a	7.2×10^1 abc	2.5×10^2 abc	7.2×10^2 bc	6.3×10^1 ab
	L5	2.1×10^2 a	$<10^1$	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a
	L9	1.7×10^2 a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a	$<10^1$ a
	Y1	1.7×10^2 a	1.4×10^2 a	5.0×10^1 ab	1.6×10^2 ab	1.0×10^2 b	8.7×10^1 ab

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).

Table VIII. Incidence of mould species (% grains infected) and diastatic power (SDU /g) of the NK 283 and PAN 8546 malt samples made with L5 and Y1 steeped grains.

		<i>Penicil- -lium</i>	<i>Eurotium sp.</i>	<i>F. chlamydo- sporium</i>	<i>A. alter-</i>	<i>P. sor- ghina</i>	<i>F. verticil- lioides</i>	<i>R.</i>	<i>Mucor</i>	Diastatic power
NK 283	Control	36 c ¹ ± 6 ²	37 d ± 7	56 d ± 6	70 d ± 10	62 d ± 9	88 c ±	100 d ±	100 e ±	8.5 a ± 0
	L5	14 b ± 4	22 c ± 3	28 c ± 4	23 c ± 4	30 c ± 4	40 b ±	32 c ± 4	36 d ±	9.0 a ± 0
	Y1	9 a ± 3	7 ab ± 1	23 bc ± 2	19 bc ± 2	25 bc ± 4	35 b ±	26 bc ± 2	25 c ± 2	8.6 a ± 9
PAN 8546	Control	15 b ± 3	18 bc ±	25 bc ± 1	6 ab ± 2	18 abc ± 2	33 b ±	22 b ±	21 c ± 2	18.5 b ±
	L5	6 a ± 2	10 ab ±	14 ab ± 1	0 a ± 0	8 ab ± 2	14 a ±	10 a ± 3	8 b ± 1	20.0 b ±
	Y1	4 a ± 1	7 a ± 1	4 a ± 2	0 a ± 0	0 a ± 0	6 a ± 1	4 a ± 1	0 a ± 0	19.3 b ±

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).

² ± = Standard deviation.

number of microorganisms, as the microorganisms were washed out. The numbers increased again during the four days of germination and then drying the malt reduced the numbers. All the cultures added increased APC, with the exception of the APC in the Y1 inoculated sample of NK 283, which was lower throughout the malting process. A possible reason for this is that the APC were outgrown by the inoculated yeast. None of the cultures inhibited LAB (Table IV) or yeasts (Table V). In fact the LAB numbers in the L5 and L9 samples were higher than in the Y1 samples at 0 h and throughout the malting process (Table IV). This was because the inoculation was carried out with *L. plantarum* (L5) and *P. pentosaceus* (L9), which are themselves LAB. Similarly inoculation with *Saccharomyces* sp. (Y1) resulted in elevated numbers of yeasts throughout the malting process (Table V). Generally, the cultures

caused a significant reduction in moulds of one to two log cycles (Table VI).

Steeping with cultures L5, L9 and Y1 also inhibited coliforms (Table VII). In the NK 283 malt, where the coliforms were present in significant numbers, they were inhibited by three log cycles by the *Lactobacillus* and *Pedio-*

coccus cultures and two log cycles by the *Saccharomyces*

culture.

With both sorghum cultivars, addition of the L5 and L9 cultures reduced the pH of the steep water from 6.0–6.4 at the beginning of steeping to 3.9–4.0 at the end, whereas the pHs of the controls were only reduced to pH 4.5–4.8 (Fig. 1). In contrast, the pHs of the controls were also reduced to a small extent, from around 6.0 at the beginning of steeping to 4.5–4.8 at the end of steeping, whereas the pH of the yeast cultures (Y1) were not reduced substantially. The low pH observed with the LAB cultures was due to the production of lactic acid by the cultures and this was probably responsible for the inhibition of the coliforms. Low pH inhibits coliforms and other food-borne contaminants by dissociating their cell membranes²⁶. A study of the *P. pentosaceus* strain used in this investigation showed that it produced the bacteriocin pediocin, and that the pediocin was responsible for its antimicrobial activities against other bacteria, including *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*¹¹. However, pediocins are not active against Gram-negative pathogens¹³ and might therefore not have

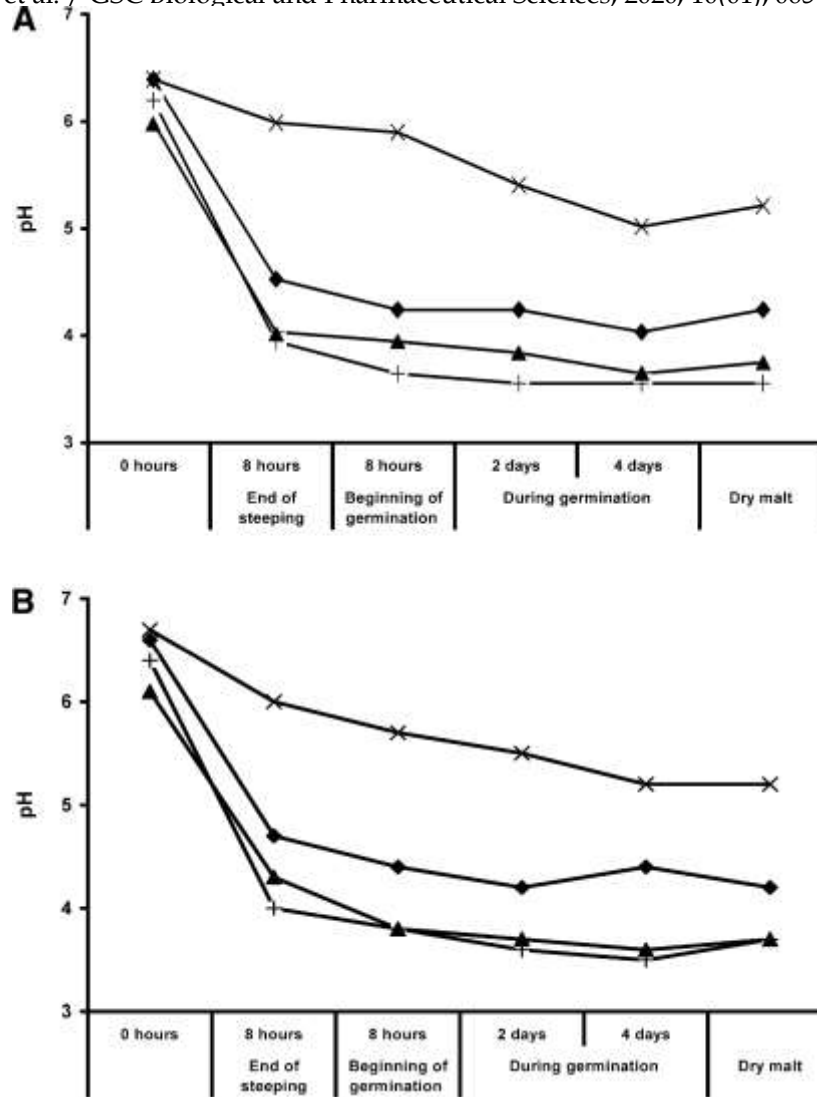


Fig. 1. Effect of steeping the NK 283 (A) and PAN 8546 (B) sorghum grain in different microbial cultures on the pH during the malting process. * = Control; + = L5;

^ = L9; x = Y1.

Table IX. Effect of steeping the NK 283 and PAN 8546 sorghum grains in the combined microbial cultures on the growth of moulds during the malting process.

		0 h	8 h		2 days	4 days	Dry malt
			before rinse	after rinse			
NK 283	Control	2.0×10^3 b ¹	1.0×10^5 bc	1.3×10^3 b	5.0×10^3 b	2.0×10^3 c	6.3×10^2 a
	50% L5 + 50% Y1	3.2×10^3 b	7.9×10^4 b	4.3×10^3 b	4.0×10^3 b	1.3×10^3 b	4.0×10^2 a
	65% L5 + 35% Y1	3.2×10^3 b	7.9×10^4 b	2.0×10^3 b	3.2×10^3 b	2.0×10^3 b	3.2×10^2 a
	35% L5 + 65% Y1	2.5×10^3 b	1×10^5 bc	6.3×10^3 b	3.2×10^3 b	1.6×10^3 b	3.2×10^2 a
PAN 8546	Control	3.4×10^2 a	1.0×10^4 b	6.0×10^2 a	1.8×10^2 a	7.9×10^2 ab	1.2×10^2 a
	50% L5 + 50% Y1	3.6×10^2 a	5.7×10^3 a	3.4×10^2 a	1.6×10^2 a	1.0×10^3 b	1.0×10^2 a
	65% L5 + 35% Y1	4.0×10^2 a	3.2×10^3 a	4.3×10^2 a	4.5×10^2 a	3.0×10^2 a	1.6×10^2 a
	35% L5 + 65% Y1	3.8×10^2 a	1.5×10^3 a	5.0×10^2 a	3.8×10^2 a	2.5×10^2 a	1.5×10^2 a

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).

been responsible for the inhibition of the coliforms. The production by LAB of low molecular weight

compounds (benzoic acid, 5-methyl-2,4-imidazolidinedione, tetra-hydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one and 3-(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedione) that are active against

Gram-negative bacteria has been reported¹⁹. It is possible that the *P. pentosaceus* strain used in this study produced such antimicrobial compounds. It is also possible that the *P. pentosaceus* strain produced antifungal compounds, as it has been shown that numerous LAB exhibit antifungal

Table X. Effect of steeping the NK 283 (A) and PAN 8546 (B) sorghum grains in the combined microbial cultures on the growth of coliforms during the malting process.

		0 h	8 h before rinse	8 h before rinse	2 days	4 days	Dry malt
NK 283	Control	1.0×10^4 b ¹	9.5×10^4 b	6.3×10^2 ab	1.6×10^3 b	1.9×10^2 b	2.2×10^2 b
	50% L5 + 50% Y1	3.2×10^2 a	6.3×10^3 a	2.3×10^2 a	1.2×10^3 b	1×10^3 c	1.6×10^2 b
	65% L5 + 35% Y1	4.0×10^2 a	3.2×10^3 a	1.5×10^3	6.0×10^2 a	3.2×10^2 a	1.8×10^2 b
	35% L5 + 65% Y1	2.9×10^2 a	1.3×10^3 a	5.2×10^2 a	4.0×10^2 a	2.5×10^2 b	1.5×10^2 b
PAN 8546	Control	6.3×10^2 a	1.0×10^4 b	1×10^3 b	6.3×10^3 b	2.0×10^3 c	2.4×10^2 b
	50% L5 + 50% Y1	3.8×10^2 a	5.9×10^3 a	5.0×10^2 a	2.5×10^2 a	1×10^2 a	6.0×10^1 ab
	65% L5 + 35% Y1	3.7×10^2 a	1.7×10^3 a	1.0×10^2 a	1.0×10^2 a	2.5×10^1 a	7.0×10^1 ab
	35% L5 + 65% Y1	4.0×10^2 a	3.2×10^3 a	2.0×10^3 b	1.0×10^3 b	1.0×10^3 c	8.7×10^1 ab

¹ Mean values in the same column are significantly different from each other ($p < 0.05$).

Table XI. The IC₅₀ levels and concentration of aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂), fumonisins (B₁ and B₂), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) in the NK 283 and PAN 8546 sorghum malts made with L5 and Y1 steeped grains.

	NK 283 and PAN 8546					
	IC ₅₀ (mg/kg)		Aflatoxins ⁴ (µg/kg)	Fumonisin ³ (µg/g)	DON ⁴ (µg/kg)	ZEA ⁴ (µg/kg)
	NK 283	PAN 8546				
Control	125–250	500 ²	<0.25 ⁵	<3 ¹	<3	<3
L5	250–500	>500	<0.25	<3	<3	<3
Y1	250–500	>500	<0.25	<3	<3	<3

¹ Inhibitory concentration = concentration resulting in 50% inhibition of cells with the MTT assay.

² Maximum concentration.

³ Determined using the VICAM FumonitestTM.

⁴ Determined using TLC.

⁵ Minimum detection limit.

activities and the active factors have been identified¹⁸. The inhibition of coliforms by other bacteria can also be attributable to competition for nutrients¹³.

As stated, production of mould-inhibitory compounds by *Saccharomyces* spp. is not documented. Therefore the antimicrobial effect of the Y1 culture against moulds (Table VI) and coliforms (Table VII) might be attributable to microbial competition, as is the case with *G. candidum* during barley malting⁴. Yeasts are good biocontrol agents because they are capable of utilizing available nutrients to proliferate rapidly, colonize and survive for long periods of time under different conditions and therefore limit nutrient availability to bacteria and moulds¹⁴. The detection of yeasts in higher numbers (Table V) than the moulds (Table VI) and coliforms (Table VII) in the Y1 treatment is an indication that it was able to outcompete these other microorganisms and inhibit their growth.

The malts where the greatest mould inhibition had taken place, i.e. malts made with L5 and Y1 steeped grain, were further analysed to evaluate the

extent to which individual mould species were inhibited (Table VIII). It is notable that PAN 8546 was less contaminated with moulds than NK 283. This is again probably related to the fact that PAN 8546 was of a better quality than NK 283 with respect to germinability. Poor quality grain is more susceptible to fungal infections, due to the fact that the available oxygen is not utilised fully by the grain and therefore the fungi utilize it for their own growth⁵. All the mould species (*Penicillium* sp., *Eurotium* sp., *F. chlamydosporum*, *A. alternata*, *P. sorghina*, *F. verticillioides*, *R. oryzae* and *Mucor* sp.) were significantly reduced by steeping with L5 and Y1. The reduction of most of the moulds (*P. sorghina*, *R. oryzae*, *Mucor* sp., *Eurotium* sp.,

A. alternata and *Penicillium* sp.) was significantly greater with the Y1 steeped malt than in the L5 steeped malt. In fact, with the Y1 treatment, mould contamination of the PAN 8546 malt was negligible. Table VIII also shows that the addition of L5 and Y1 cultures did not increase the DP of the malts, unlike when steeping with dilute alkali¹⁶. However, neither did the cultures inhibit malt amylase activity.

As shown in Table VIII, the Y1 *Saccharomyces* culture was able to eliminate more mould species than the L5 *Pediococcus* culture. However, the L5 culture was able to inhibit coliforms to a greater extent than the Y1 culture (Table VII). Therefore, the two cultures were combined in various ratios and added during steeping with the aim of obtaining synergistic antimicrobial activity. However, there was no inhibition of moulds (Table IX) or coliforms (Table X). The lack of inhibition was probably the result of competition between the combined cultures for nutrients, leading to them not growing optimally, contrary to the situation when they were inoculated individually.

30.2 Cytotoxicity and mycotoxins

The malt made from NK 283 had slightly higher cytotoxicity than that from PAN 8546 (Table XI). This could have been the result of toxic products from dead grains, since only 40% of the NK 283 was germinable. Steeping the NK283 grain in the L5 and Y1 cultures slightly reduced the cytotoxicity of the malt. However, the very high IC₅₀ values indicated that all the malts were relatively non-toxic.

Mycotoxins (aflatoxins, fumonisin, DON and ZEA) were not found in the controls or malts steeped with the L5 and Y1 cultures. This is in apparent contradiction with

Ali et al. / GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020, 10(01), 065–
our earlier work which showed mycotoxins to be present in untreated sorghum malt¹⁷. This difference was probably due to the fact in that the germination temperature was not controlled and the excess water after spraying was not removed from the grain. Moulds produce mycotoxins at elevated moisture content and under stressful environmental conditions, such as fluctuations in temperature or extreme (very cold or very hot) temperatures⁶.

31 CONCLUSIONS

The use of the *P. pentosaceus* and *Saccharomyces* spp. cultures during steeping has potential as a natural microbial biocontrol method in sorghum malting. These cultures inhibit moulds and coliforms to low levels that should not pose health hazards in the sorghum malt. The use of such cultures could therefore be an alternative to the alkali treatment described previously¹⁶. However, due to the complexity of maintaining and growing up pure cultures, it is probable that this technology would not be appropriate for sorghum maltings with poor scientific infrastructure.

REFERENCES

1. Batish, V. K., Grover, S. and Lal, R., Screening lactic acid starter cultures for antifungal activity. *Cultured Dairy Product J.*, 1989, **24**, 22–25.
2. Batish, V. K., Lal, R. and Grover, S., Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R. *Food Microbiol.*, 1990, **7**, 199–206.
3. Batish, V. K., Lal, R. and Grover, S., Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Crit. Rev. Biotech.*, 1997, **17**, 209–225.
4. Boivin, P. and Malanda, M., Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 1997, **34**, 96–101.
5. Briggs, D. E., 1998. Malts and Malting. London: Blackie Academic, 1998, pp. 269–270.
6. D’Mello, J. P. F and McDonald, A. M. C., Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.*, 1997, **69**, 155–166.
7. Dewar, J., Taylor, J. R. N. and Joustra, S. M., Accepted methods of sorghum malting and brewing analyses. CSIR Food Science and Technology: Pretoria, South Africa, 1995, Methods 1 and 4.
8. El-Adawy, T. A., Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* DI. *Nahrung/Food*, 2001, **45**, 118–124.
9. Gourama, H., Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebens. Wiss. Technol.*, 1997, **30**, 279–283.
10. Gourama, H. and Bullerman, L. B., Antimycotic and anti-aflatoxigenic effect of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 1995, **58**, 1275–1280.

11. Gurira, O. Z. and Buys, E. M., Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiol.*, 2005, **22**, 159–168.
12. Hartnett, D. J., Vaughan, A. and Van Sinderen, D., Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.*, 2002, **108**, 169–177.
13. Holzapfel, W. F., Geisen, R. and Schillinger, U., Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *J. Food Microbiol.*, 1995, **24**, 343–362.
14. Jones, R. W. and Prusky, D., Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: A new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. *Food Control*, 2002, **92**, 33–37.
15. Laitila, A., Alakomi, H. L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, J. and Haikara, A., Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **93**, 566–576.
16. Lefyedi, M. L. and Taylor, J. R. N., Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt. *J. Inst. Brew.*, 2006, **112**, 108–116.
17. Lefyedi, M. L., Marais, G. J., Dutton, M. F. and Taylor, J. R. N., The microbiological contamination, toxicity and quality of turned and unturned outdoor floor malted sorghum. *J. Inst. Brew.*, 2005, **111**, 190–196.
18. Lowe, D. P. and Arendt, E. K., The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: A review. *J. Inst. Brew.*, 2004, **110**, 163–180.
19. Niku-Pavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, and Haikara, A., New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1999, **86**, 29–35.
20. Noots, I., Delcour, J. A. and Michiels, C. W., From field barley to malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1999, **25**, 121–153.
21. Nout, M. J. R. and Rombouts, F. M., Fermentative preservation of plant foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, **73**, 1365–1478.
22. O'Mahony, A., O'Sullivan, T. F., Walsh, Y., Vaughan, A., Maher, M., Fitzgerald, G. F. and Van Sinderen, D., Characterisation of antimicrobial producing lactic bacteria from malted barley. *J. Inst. Brew.*, 2000, **106**, 403–410.
23. Piddock, L. J., Techniques used in the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, **68**, 307–318.
24. Priest, F. G. and Campbell, I., *Brewing Microbiology*, 2nd ed., Chapman and Hall: London, pp. 114–119.
25. Roy, U., Batish, V. K., Grover, S. and Neelakantan, S., Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CHD-28.3. *Food Microbiol.*, 1996, **32**, 27–34.
26. Stiles, M. E., Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, **70**, 331–345.
27. Suzuki, I., Nomura, M. and Morichi, T., Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. *Milchwissenschaft*, 1991, **46**, 635–639.
28. Vaughan, A., O'Sullivan, T. and Van Sinderen, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. *J. Inst. Brew.*, 2005, **111**, 355–370.

(Manuscript accepted for publication May 2007)

Article 3:



nutrients



Article

Impact of Grain Sorghum Polyphenols on Microbiota of Normal Weight and Overweight/Obese Subjects during In Vitro Fecal Fermentation

32 Danielle Ashley ¹, Daya Marasini ¹, Cindi Brownmiller ¹, Jung Ae Lee ², Franck Carbonero ¹

and Sun-Ok Lee ^{1,*}

¹ Department of Food Science, Division of Agriculture, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72704, USA; dmbenedi@email.uark.edu (D.A.); marasini@uark.edu (D.M.); cbrownm@uark.edu (C.B.); fgcarbon@uark.edu (F.C.)

² Agricultural Statistics Laboratory, Division of Agriculture, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72704, USA; julee@uark.edu

* Correspondence: sunok@uark.edu; Tel.: +1-479-575-6921

Abstract: The human gut microbiota is considered as a crucial mediator between diet and gut homeostasis and body weight. The unique polyphenolic profile of sorghum bran may promote gastrointestinal health by modulating the microbiota. This study evaluated gut microbiota and modulation of short-chain fatty acids (SCFA) by sorghum bran polyphenols in in vitro batch fermentation derived from normal weight (NW, $n = 11$) and overweight/obese (OO, $n = 11$) subjects' fecal samples. Six separate treatments were applied on each batch fermentation: negative control (NC), fructooligosaccharides (FOS), black sorghum bran extract (BSE), sumac sorghum bran extract (SSE), FOS + BSE, or FOS + SSE; and samples were collected before and after 24 h. No significant differences in total and individual SCFA production were observed between NW and OO subjects. Differential responses to treatment according to weight class were observed in both phyla and genera. Sorghum bran polyphenols worked with FOS to enhance *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, and independently stimulated *Roseburia* and *Prevotella* ($p < 0.05$). Our results indicate that sorghum bran polyphenols have differential effects on gut health and may positively impact gut ecology, with responses varying depending on weight class.

Keywords: sorghum bran polyphenols; gut microbiota; sumac sorghum bran; black sorghum bran; short-chain fatty acids

1. Introduction

In the past decades, the human colon has come to light as a hub for microbial activities that impact many aspects of human health. The gut microbiota is composed of hundreds to thousands of species with biological activities including nutrient metabolism, vitamin synthesis, immune modulation, pro- and anti-microbial activities, and modulation of gut homeostasis [1]. Dysbiosis, or microbial imbalance, has been implicated in a number of chronic progressive conditions, one of which is obesity. More than 70% of adults in the United States are classified as overweight or obese; not only do these conditions threaten quality of life, but they also increase the risk of chronic diseases such as type 2 diabetes, heart disease, and stroke [2,3]. Evidence from animal and human studies indicates a role of the gut microbiota in body weight maintenance and development of obesity, although exact mechanisms remain unclear [4]. Marked differences in bacterial population have been seen in the microbiota of overweight/obese individuals when compared to normal weight individuals [5–8]. These findings

implicate the gut microbiota as a potential target of nutritional therapies to prevent/reduce weight gain and obesity.

While most food consumed is digested and absorbed in the stomach and small intestine, complex carbohydrates such as resistant starch and fiber reach the colon where they are utilized by the gut microbiota [9]. These compounds are fermented by certain species to produce short-chain fatty acids (SCFA) which have numerous health implications including body weight maintenance [8,10–12]. Prebiotics were previously defined as “selectively fermented ingredient(s) that result in specific changes in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota, thus conferring benefit(s) upon host health” and the compounds that fit these criteria were limited to mainly inulin, galactooligosaccharides (GOS), and fructooligosaccharides (FOS) [13]. In 2017 however, prebiotics were redefined as “a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit” [14]. This new definition may allow for inclusion of non-carbohydrate foods that do not undergo fermentation but are utilized by beneficial species in the gut, thus enhancing their expansion and positive health benefits. Such compounds include polyphenols.

Polyphenols are biologically active compounds produced by metabolic pathways in plants, with numerous roles including pathogen protection, antimicrobial, and antioxidant activities [15]. Most polyphenols consumed by humans are polymerized and/or glycosylate. These high molecular weight compounds reach the colon where they are broken down by the gut microbiota to smaller, absorbable compounds [16]. Grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) commonly called sorghum, is the world’s fifth highly produced cereal crop, far behind the top four (rice, corn, wheat, and barley) but commonly grown in specific areas. Sorghum contains various classes of polyphenols, which are in the bran fraction [17]. The polyphenol composition of sorghum bran varies with its color, with sumac varieties rich in proanthocyanidins and black varieties rich in 3-deoxyanthocyanins, which include luteolinidin and apigeninidin [18]. Though previous studies have identified positive modulatory effects of polyphenols from polyphenol-rich foods on the human gut microbiota [19–24], to our knowledge no research has been conducted with sorghum polyphenol extracts. The objectives of this research were to characterize the major polyphenol components of two sorghum brans, and to evaluate the change of gut microbiota composition and the effect on SCFA production in response to sorghum bran polyphenols in fecal samples from normal weight (NW) and overweight/obese (OO) subjects.

2. Materials and Methods

2.1. Sorghum Brans, Standards, and Reagents

Black and sumac sorghum brans were purchased from local market and Nu Life Market (Scott City, KS, USA) and fructooligosaccharides (FOS) from Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland). Folin-Ciocalteu’s reagent, 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), butyric acid, propionic acid, and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Luteolinidin and apigeninidin were from Chromadex (Irvine, CA, USA).

2.2. Preparation of Polyphenols from Sorghum Bran Samples

Polyphenol extractions were performed according to Awika et al. [18] with modifications. Defatted sorghum bran samples (5 g) and extracting solvent (1% HCl in 70% methanol) were mixed at a ratio of 1:60. Mixtures were stirred at room temperature for 2 h and filtered through Whatman No. 42 filter paper (GE Healthcare, Amersham, UK). Solvent was removed using rotary evaporation at 30 °C and the aqueous filtrate applied to a pre-activated C-18 solid phase extraction (SPE) column (Grace Davidson Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA). Sugars were eluted with 100 mL of water and discarded; then the remaining polyphenols were eluted with 100 mL of methanol. After elution of polyphenols, 50 mL of deionized water were then added to methanolic extract and methanol was removed through rotary evaporation at 30 °C. The concentrated aqueous extract was then frozen and

subsequently lyophilized in a VirTis Benchtop SLC freeze dryer (SP Industries, Warminster, PA, USA). Resulting powdered polyphenol extracts, black sorghum bran extract (BSE), and sumac sorghum bran extract (SSE), were then pooled and stored in a desiccator at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis. Dried polyphenol extracts were used as substrates in the *in vitro* fecal fermentation experiment.

2.3. Analysis of Polyphenol Content and Antioxidant Activity

Total polyphenol content of sorghum bran extracts (BSE and SSE) was determined using the Folin–Ciocalteu assay according to Singleton and Rossi [25] with minor modifications. Standards were prepared using gallic acid in concentrations of 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/g}$. BSE and SSE were dissolved for a dilution of 8000-fold. In a 48-well plate, 0.1 mL sample or standard, 0.5 mL of 0.2 N Folin–Ciocalteu's reagent, and 0.4 mL of 7.5% Na_2CO_3 were combined. The plate was incubated at room temperature for 2 h and the absorbance at 760 nm was determined in a Synergy TT microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). All samples and standards were measured in triplicate. Concentration was determined by plotting against a gallic acid standard curve and results were thus expressed in gallic acid equivalents (GAE).

Total proanthocyanidin content was determined using the 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) assay [26]. Standards were prepared using catechin and ethanol (95%) at concentrations of 0.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/g}$. In a 48-well plate, 0.15 mL of sample (BSE and SSE in ethanol for a dilution of 8000-fold) or standard and 0.75 mL of 5.7 N DMAC solution were combined, all in at least triplicate. Plates were read immediately at 640 nm in microplate reader. Concentration was determined by plotting against a catechin standard curve and expressed in catechin equivalents.

For quantitative analysis of 3-deoxyanthocyanins (3-DXA) a Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) System Gold HPLC system was used. The system was equipped with a 126 pump, a 168 Detector, and a 508 autosampler. The software used for data collection and integration was 32 Karat 8. A 250×4.6 mm i.d. C18 column (YMC America Inc, Allentown, PA, USA) was used for separation of 3-DXA in sorghum and standards. The mobile phase consisted of A: 5% formic acid in water, and B: 100% methanol. Flow rate was 1 mL min^{-1} and injection volume was 30 μL . The mobile phase gradient of Cho et al. [27] was used, with minor modifications: 0–60 min: 2–60% B, 60–61 min: 60–2% B, 61–66 min: 2% B, 66–75 min: 2–0% B. Wavelengths monitored were 280, 340, and 480 nm. Apigeninidin and luteolinidin were identified and quantified using standard curves.

Antioxidant properties were determined using the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay according to Brand-Williams et al. [28]. DPPH solution was prepared by dissolving in methanol (0.15 mM) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ between uses. Serial dilutions of BSE and SSE (1–140 ppm) were prepared in methanol. DPPH solution (0.95 mL) was added to 0.05 mL extracts of varying concentrations and shaken. Plates were read in microplate reader at 30 min at 517 nm. Effective concentration to reduce the radical by 50% (EC_{50}) was determined for both bran extracts and reported as μg gallic acid equivalents per gram. All samples and standards were plated in at least triplicate.

2.4. Human Fecal Fermentation

After approval of the study by the International Review Board (University of Arkansas; IRB #17-02-433), 22 subjects were recruited from the North West Arkansas area: 11 normal weight (NW, body mass index (BMI) < 25) and 11 overweight/obese (OO, BMI ≥ 25) subjects. Exclusion criteria included tobacco use, digestive disease, fasting blood glucose (FBG $\geq 100\text{ mg/dL}$), current medications, and antibiotic use within the past six months. Consent and screening forms as well as food frequency questionnaires were filled out during screening sessions. FFQ (Food Frequency Questionnaire) responses were analyzed using Axxya System Nutritionist Pro™ software version 4.3.0 (Stafford, TX, USA) based on USDA References. No significant differences in macro- and micro-nutrient intake were observed between weight class groups or genders. Participant characteristics are provided in Table 1. Selected participants were given a stool collection kit and delivered samples within an hour of defecation. Fecal samples were transferred to anaerobic chamber immediately for fermentation experiment.

Fecal fermentation medium was prepared according to Yang et al. [29]. One liter of anaerobic fermentation medium was composed of yeast extract (2 g; Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA), peptone (2 g; Fisher Scientific, Waltham, WA, USA), bile salts (0.5 g; Oxoid, Hampshire, UK), NaHCO₃ (2 g), NaCl (0.1 g), K₂HPO₄ (0.08 g), MgSO₄·7H₂O (0.01 g), CaCl₂·6H₂O (0.01 g), L-cysteine hydrochloride (0.5 g; Sigma, St. Louis, MO, USA), vitamin K (10 µL; Sigma, St. Louis, MO, USA), bovine hemin (50 mg; Sigma, St. Louis, MO, USA), Tween 80 (2 mL), and 0.025% (*w/v*) resazurin solution. To prepare fecal slurry, 2 g fecal sample was added to 20 mL phosphate-buffered saline, vortexed to homogenization, and filtered through four layers of cotton gauze. After the analyses of total polyphenol content, the amount of BSE and SSE was calculated taking into account the grape extract and black tea extract (0.6–1 g/L). Within an anaerobic chamber, 14 mL of sterile fermentation medium were inoculated with 1 mL of fecal slurry and treated with either no substrate (negative control, NC), FOS, BSE, SSE, FOS + BSE, and FOS + SSE. The final concentration of FOS and grain sorghum bran extract (BSE and SSE) was 5 g/L and 1 g/L, respectively. Test tubes were incubated at 37 °C and aliquots (~3 mL) taken at the time points 0, 6, 12, 18, and 24 h. Aliquots were added to 0.2 mL of 2 M KOH stop solution and stored at –80 °C until further analysis.

Table 1. Subject characteristics

	All (n = 22)	Normal Weight		Overweight/Obese	
		Male (n = 5)	Female (n = 6)	Male (n = 5)	Female (n = 6)
Age (years)	29.0 ± 6.7	29.4 ± 4.8	24.2 ± 2.1	28.2 ± 3.5	34.2 ± 9.7
BMI (kg/m ²)	27.1 ± 5.5	23.0 ± 0.7	22.2 ± 1.2	30.9 ± 2.9	32.2 ± 5.4
FBG (mg/dL)	92.1 ± 4.9	92.9 ± 3.1	90.6 ± 5.0	92.6 ± 6.9	96.3 ± 3.3

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). BMI: body mass index, FBG: fasting blood glucose.

2.5. Short-Chain Fatty Acid (SCFA) Analysis

Short-chain fatty acids (SCFA) content was determined for all samples at all time point using the method of Bourquin et al. [30] with modification. After thawing at room temperature, 450 µL of samples were combined with 50 µL of a prepared solution containing 50 g meta-phosphoric acid and 1.6 g CuSO₄/L, and 314.6 µL 4-methyl valeric acid (internal standard). After incubation at room temperature for 10 min, the mixture was centrifuged at 11,500 rpm for 5 min and the supernatant collected for analysis. SCFA analysis was performed using a Varian CP-3800 GC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) with a CP-8400 autosampler and a HP-FFAP (High Polarity for the analysis of Free Fatty Acids and Phenols) modified polyethylene glycol (25 m × 32 mm) column. One µL of sample was injected with a split of 30:1 and a flow rate of 1.3 mL/min. The gradient used was 3 °C/min from 65 °C to 110 °C and 8 °C/min until 150 °C. Total and individual SCFA were quantified against reference standards for butyric acid (BA), propionic acid (PA), and acetic acid (AA).

2.6. Microbial Analysis

Changes of microbiota profiles in response to treatments were determined by analyzing bacterial DNA of samples from time point 0 and 24 h following protocols previously described [31]. DNA was extracted using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA). The V4 region of the bacterial 16S-rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in Eppendorf Mastercycler Pro S (Eppendorf, Hamburg, Germany) using AccuPrime Pfx SuperMix and V4-Hindex primers [32]. After confirming the amplification through agarose gel electrophoresis, DNA samples were normalized with SequalPrep Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA). The concentration of final pooled library of the V4 region of 16S-rRNA gene of bacteria was sequenced utilizing the Illumina MiSeq platform [32]. Fastq files generated through Illumina were

demultiplexed and quality filtered, operational taxonomic units (OTUs) assigned using SILVA database, *Nutrients* 2019, 11, 217 and the data processed through Mothur 1.40.1 [33].

2.7. Experimental Design and Statistical Analysis

Each of the 22 subjects received all six treatments (NC, FOS, BSE, SSE, FOS + BSE, FOS + SSE). Therefore, the statistical analysis was performed for the randomized complete block design (RCB), in which the effect of six treatments was tested with subjects as blocks. We note that the analysis of variance (ANOVA) approach for RCB seriously violated the assumptions of normality and equal variance in our diagnostic procedures. Alternatively, Friedman test was used, known as a distribution-free rank sum test for RCB, followed by pairwise comparisons among six treatments at different time points: 6, 12, 18, 24 h for SCFA data and 0, 24 h for microbiota data, respectively. The time effect (0 vs. 24 h) was tested using a Wilcoxon signed rank sum test, as an alternative to a paired *t*-test, if there was a significant increase/decrease in relative abundance among 22 subjects. The effect of weight class (NW vs. OO with 11 subjects each) was tested using a Mann–Whitney test, as an alternative to two-sample *t*-test, under different treatments. All tests were nonparametric to avoid any controversial assumption for small sample size. The false discovery rate adjustment for the *p*-value was conducted as appropriate. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was utilized to analyze similarities in bacterial communities between treatments. PAST 3.15 was used for NMDS and analysis of similarities (ANOSIM) according to the Bray–Curtis index. The statistical results were reported at 0.05 or 0.01 levels of significance. All data analyses were conducted using statistical software SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) and R version 3.3.3 (R core Team, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Polyphenol Profile and Antioxidant Properties of Sorghum Bran Extracts

Total polyphenols and proanthocyanidins were significantly higher in sumac sorghum bran extract (SSE), and 3-deoxyanthocyanins in black sorghum bran extract ($p < 0.01$) (Table 2). Radical scavenging capability was assessed using the DPPH radical, and both black (BSE, $274.0 \pm 20.3 \mu\text{g}$ gallic acid equivalent (GAE)/g) and sumac (SSE, $269.5 \pm 21.0 \mu\text{g}$ GAE/g) sorghum bran extracts demonstrated antioxidant capabilities with no significant differences between the two.

Table 2. Major polyphenol profile of black and sumac sorghum bran extracts.

	BSE	SSE
Polyphenols (mg gallic acid equiv/g extract)	321.5 ± 2.7	$571.7 \pm 6.0^*$
Proanthocyanidins (mg catechin equiv/g extract)	8.4 ± 1.4	$86.9 \pm 1.1^*$
3-Deoxyanthocyanins (mg/g extract)	$10.1 \pm 0.3^*$	2.0 ± 0.4
Luteolinidin	$9.3 \pm 0.4^*$	2.0 ± 0.4
Apigeninidin \pm	$0.9 \pm 0.1^*$	ND

Data are expressed as mean standard deviation (SD). * Indicates significant difference between black and suman bran extracts. $p < 0.01$. $n = 8$. BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract, ND: not detected.

3.2. Short-Chain Fatty Acid Production

No significant differences in total and individual SCFA production was observed between NW and OO. Total SCFA concentration was significantly increased by FOS and FOS + SSE compared to the NC, BSE, and SSE at 6 h ($p < 0.05$) (Figure 1). SSE resulted in lower levels of total SCFA from time points 12 h to 24 h (Figure 1).

FOS alone increased acetic acid (AA) compared to NC, BSE, SSE, and FOS + BSE at 6 h, and SSE displayed lower concentrations compared to FOS at 12 h ($p < 0.05$) (Figure 1). BSE increased AA concentration compared to SSE and FOS + SSE at time points of 18 h and 24 h ($p < 0.05$).

Incremental propionic acid (PA) concentration was generally higher in NW than OO, though not

significantly. SSE caused lower concentrations of PA at 12, 18, and 24 h compared to NC ($p < 0.05$) (Figure 1).

Incremental butyric acid (BA) concentrations in FOS and FOS + SSE treatments were significantly higher than NC, BSE, and SSE at 6 h and 12 h ($p < 0.05$) (Figure 1). FOS increased BA compared to NC, BSE, and SSE at all time points ($p < 0.05$). Sorghum extracts alone did not alter BA concentrations.

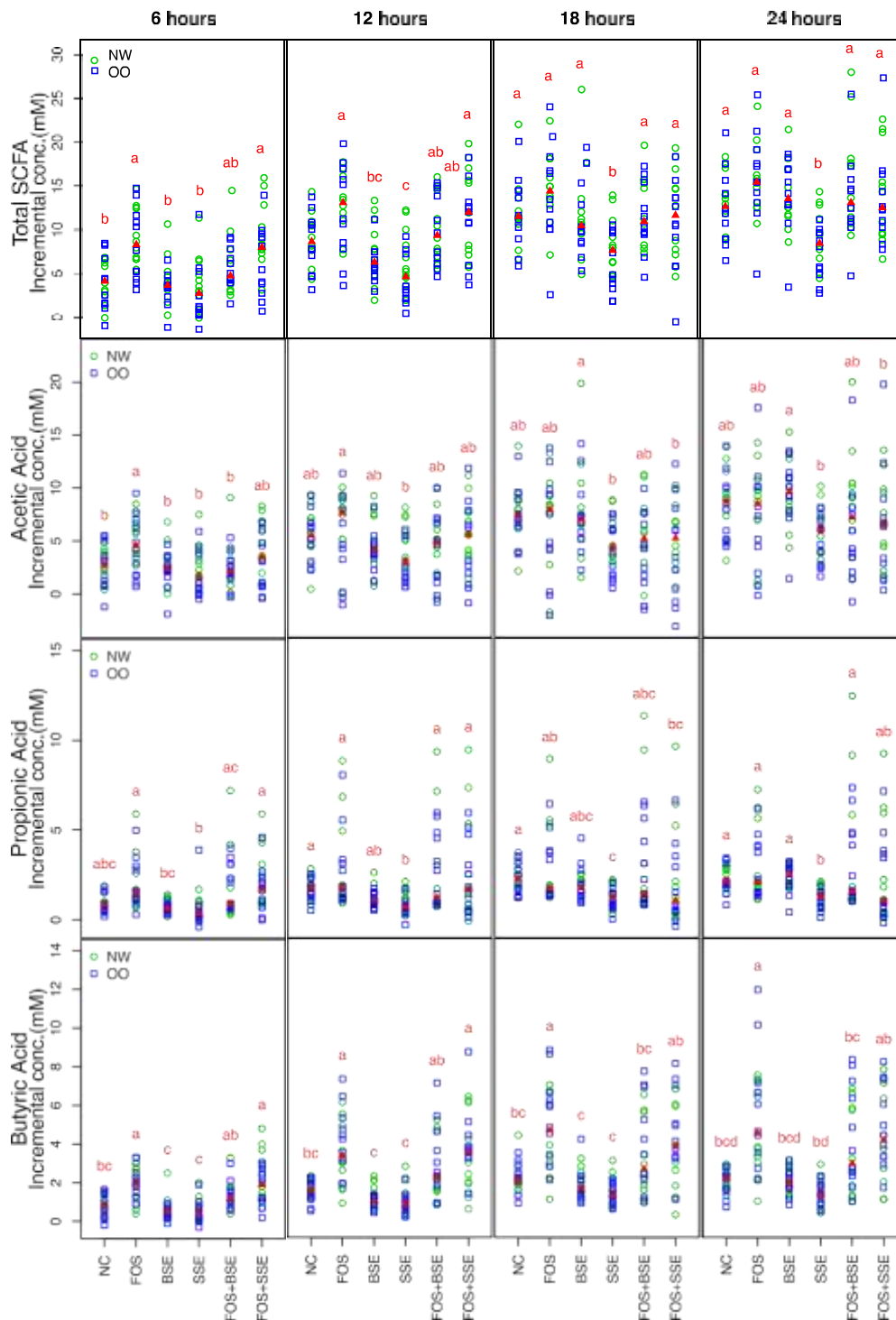


Figure 1. Total and individual SCFA during fermentation by treatment in both normal weight (NW, $n = 11$) and overweight/obese (OO, $n = 11$) samples. Different letters indicate significant differences between treatments, achieved by the Friedman test and its post hoc multiple comparisons at 0.05 level of significance. The medians are marked with red triangles. The weight classes (NW vs. OO) are labeled by green circles and blue squares, respectively. NC: negative control, FOS: fructooligosaccharides, BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract; SCFA: short-chain fatty acids.

Table 3. The effects of time and weight class in dominant phyla.

Microbiota	Treatment	Relative Abundance (%) Change in 24 h	(0 h vs. 24 h) Wilcoxon Signed Test q-Value †	Mann-Whitney Test (NW vs. OO) at 24 h q-Value †
Bacteroidetes	NC	−41.10	<0.001	0.136
Bacteroidetes	FOS	−43.50	<0.001	0.085
Bacteroidetes	BSE	−23.60	<0.001	0.085
Bacteroidetes	SSE	−31.00	<0.001	0.085
Bacteroidetes	FOS + BSE	−35.10	<0.001	0.177
Bacteroidetes	FOS + SSE	−32.10	<0.001	0.246
Firmicutes	NC	22.40	0.001	0.491
Firmicutes	FOS	32.00	<0.001	0.489
Firmicutes	BSE	14.00	0.006	0.107
Firmicutes	SSE	19.70	<0.001	0.180
Firmicutes	FOS + BSE	24.10	<0.001	0.491
Firmicutes	FOS + SSE	23.80	0.002	0.974
Proteobacteria	NC	17.40	<0.001	0.640
Proteobacteria	FOS	1.00	1.000	0.489
Proteobacteria	BSE	7.70	<0.001	0.491
Proteobacteria	SSE	10.00	<0.001	0.491
Proteobacteria	FOS + BSE	−1.40	0.034	0.180
Proteobacteria	FOS + SSE	−1.20	0.058	0.190
Actinobacteria	NC	0.30	0.003	0.825
Actinobacteria	FOS	10.30	<0.001	0.491
Actinobacteria	BSE	0.70	<0.001	0.061
Actinobacteria	SSE	0.60	<0.001	0.180
Actinobacteria	FOS + BSE	11.80	<0.001	0.280
Actinobacteria	FOS + SSE	9.20	<0.001	0.180
Verrucomicrobia	NC	−0.10	0.867	0.926
Verrucomicrobia	FOS	−0.10	0.076	0.636
Verrucomicrobia	BSE	0.60	0.079	0.489
Verrucomicrobia	SSE	0.00	0.463	0.926
Verrucomicrobia	FOS + BSE	−0.10	0.949	0.378
Verrucomicrobia	FOS + SSE	0.10	0.215	0.491

† adjusted *p*-value by false discovery rate. A change in relative abundance over 24 h was tested using a Wilcoxon signed test. A Mann–Whitney test was used to test the difference between NW (normal weight) vs. OO (overweight/obesity) at 24 h under each treatment. NC: negative control, FOS: fructooligosaccharides, BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract.

Table 4. The effects of time and weight class at the genus level.

Microbiota	Treatment	Relative Abundance (%) Change in 24 h	(0 h vs. 24 h) Wilcoxon Signed Test q-Value †	Mann-Whitney Test (NW vs. OO) at 24 h q-Value †
<i>Prevotella</i>	NC	−14.50	0.022	0.557
<i>Prevotella</i>	FOS	−8.00	0.010	0.557
<i>Prevotella</i>	BSE	−7.10	0.145	0.557
<i>Prevotella</i>	SSE	−11.90	0.017	0.557
<i>Prevotella</i>	FOS + BSE	−7.60	0.087	0.639
<i>Prevotella</i>	FOS + SSE	−7.00	0.057	0.639
<i>Bacteroides</i>	NC	−23.90	0.001	0.779
<i>Bacteroides</i>	FOS	−27.90	<0.001	0.727
<i>Bacteroides</i>	BSE	−14.60	0.019	0.800
<i>Bacteroides</i>	SSE	−14.40	0.028	0.755
<i>Bacteroides</i>	FOS + BSE	−22.50	0.001	0.721
<i>Bacteroides</i>	FOS + SSE	−21.40	0.003	0.719
<i>Bifidobacterium</i>	NC	0.10	0.059	0.875
<i>Bifidobacterium</i>	FOS	3.50	0.001	0.579
<i>Bifidobacterium</i>	BSE	0.10	0.018	0.755
<i>Bifidobacterium</i>	SSE	0.20	0.016	0.589
<i>Bifidobacterium</i>	FOS + BSE	5.30	<0.001	0.638
<i>Bifidobacterium</i>	FOS + SSE	4.30	<0.001	0.557
<i>Lactobacillus</i>	NC	0.00	0.919	0.721
<i>Lactobacillus</i>	FOS	0.20	0.300	0.957
<i>Lactobacillus</i>	BSE	0.10	0.059	0.782
<i>Lactobacillus</i>	SSE	0.10	0.025	0.721
<i>Lactobacillus</i>	FOS + BSE	0.30	0.011	0.755
<i>Lactobacillus</i>	FOS + SSE	0.30	0.004	1

Table 4. Cont.

Microbiota	Treatment	Relative Abundance (%) Change in 24 h	(0 h vs. 24 h) Wilcoxon Signed Test q-Value †	Mann-Whitney Test (NW vs. OO) at 24 h q-Value †
<i>Faecalibacterium</i>	NC	−0.40	0.314	0.579
<i>Faecalibacterium</i>	FOS	−2.10	0.007	0.721
<i>Faecalibacterium</i>	BSE	−3.90	0.001	0.579
<i>Faecalibacterium</i>	SSE	−3.10	0.017	0.684
<i>Faecalibacterium</i>	FOS + BSE	−3.50	<0.001	0.557
<i>Faecalibacterium</i>	FOS + SSE	−2.90	0.145	0.651
<i>Roseburia</i>	NC	−0.40	0.251	0.876
<i>Roseburia</i>	FOS	1.00	0.991	0.930
<i>Roseburia</i>	BSE	0.10	0.893	0.755
<i>Roseburia</i>	SSE	1.20	0.278	0.649
<i>Roseburia</i>	FOS + BSE	1.40	0.341	0.972
<i>Roseburia</i>	FOS + SSE	2.10	0.327	0.800
<i>Anaerostipes</i>	NC	0.30	0.047	0.755
<i>Anaerostipes</i>	FOS	3.80	0.001	0.972
<i>Anaerostipes</i>	BSE	0.40	0.077	0.755
<i>Anaerostipes</i>	SSE	0.70	0.057	0.779
<i>Anaerostipes</i>	FOS + BSE	3.40	<0.001	0.957
<i>Anaerostipes</i>	FOS + SSE	4.10	<0.001	1

† adjusted p-value by false discovery rate. A change in relative abundance over 24 h was tested using a Wilcoxon signed test. A Mann–Whitney test was used to test the difference between NW (normal weight) vs. OO (overweight/obesity) at 24 h under each treatment. NC: negative control, FOS: fructooligosaccharides, BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract.

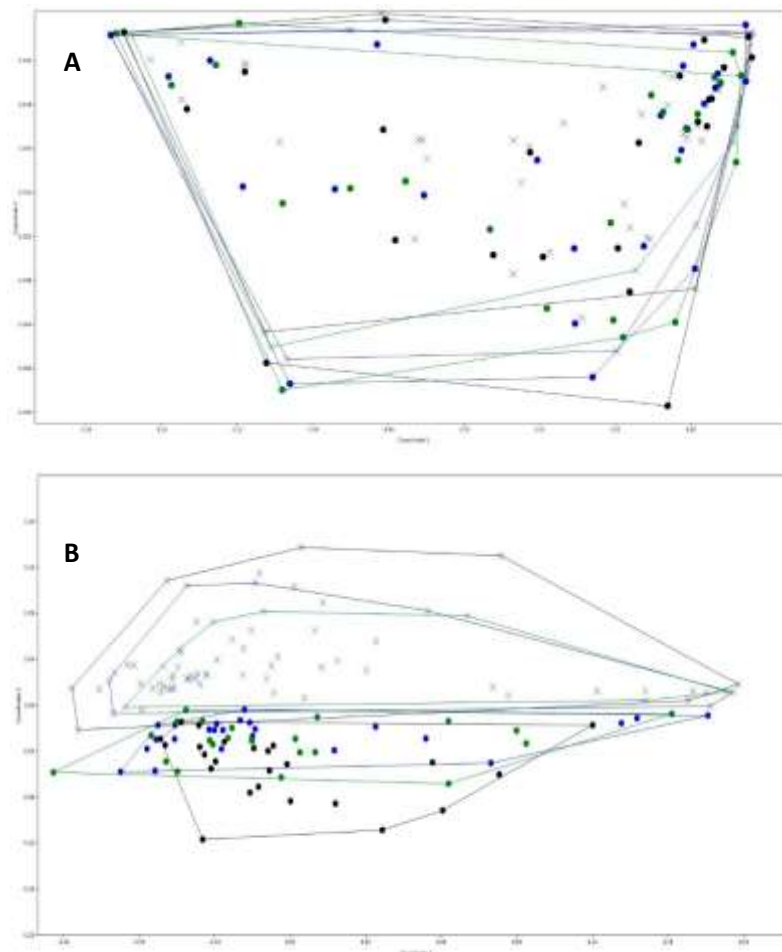


Figure 3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot comparing bacterial communities between treatments in both groups combined ($p < 0.05$). (A) 0 h and (B) 24 h. •: negative control (NC), x: fructooligosaccharides (FOS), •: black sorghum bran extract (BSE), •: sumac sorghum bran extract (SSE), x: FOS + BSE, x: FOS + SSE.

3.4. Specific Changes in Microbial Population

After 24 h of in vitro fermentation, the OO group displayed higher abundance of Bacteroidetes than the NW group (Figure 4). We observed relative decrease in Bacteroidetes in all treatments (Table 3). In all subjects BSE resulted in significantly higher abundance of Bacteroidetes at 24 h than NC and all other treatments ($p < 0.05$) (Figure 4).

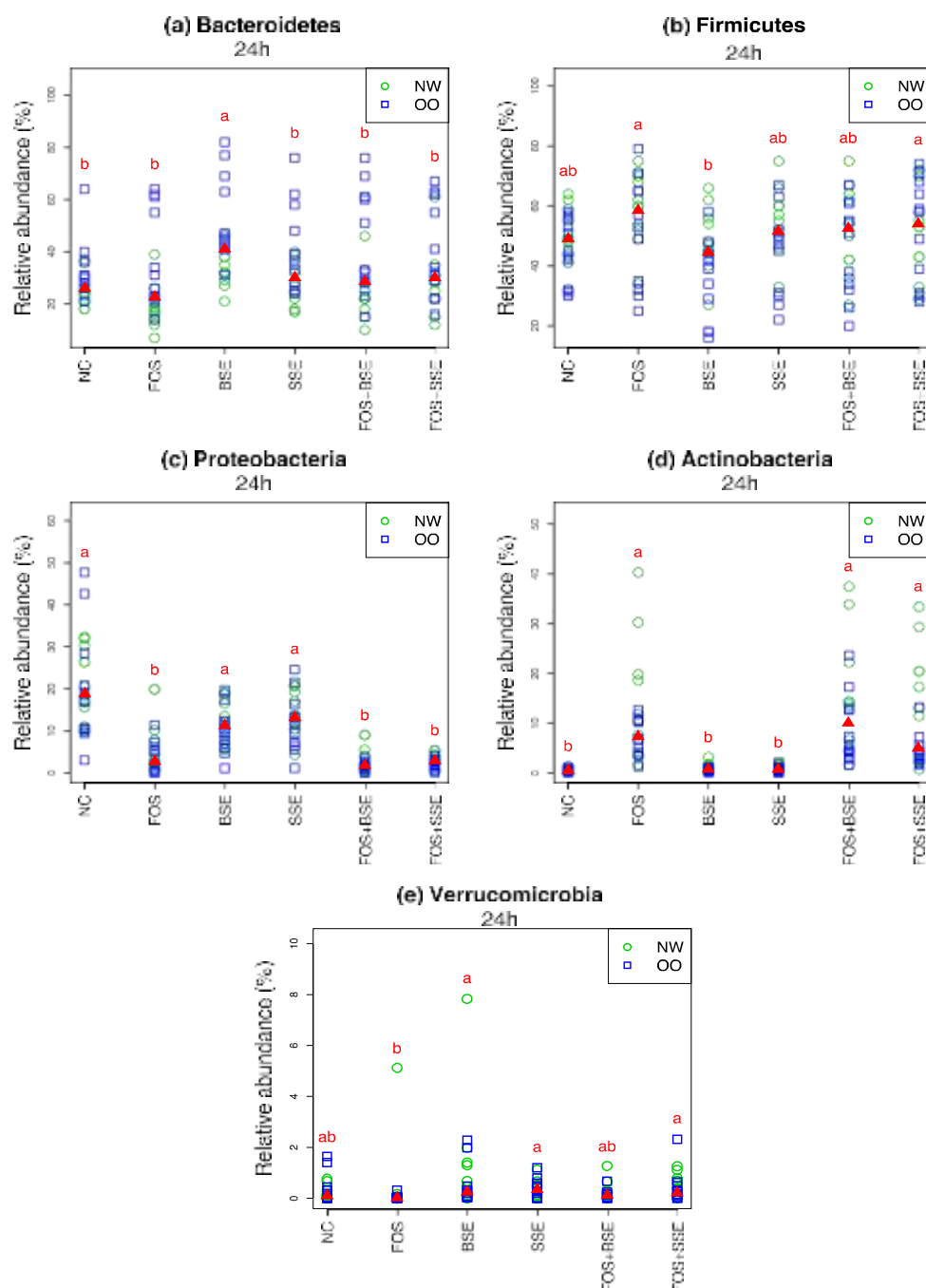


Figure 4. Relative abundance at phylum level ($n = 22$). (a) Bacteroidetes, (b) Firmicutes,

(c) Proteobacteria, (d) Actinobacteria, (e) Verrucomicrobia. Letters indicate significant differences between treatments at 24 h, achieved by the Friedman test and its post hoc multiple comparisons at the 0.05 level of significance. The medians are marked with red triangles. The weight classes (NW vs. OO) are labeled by green circles and blue squares, respectively. NC: negative control, FOS: fructooligosaccharides, BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract.

As relative abundance of Bacteroidetes decreased there was a corresponding increase in Firmicutes (Table 3). BSE had significantly lower abundance of Firmicutes at 24 h compared to FOS and FOS + SSE ($p < 0.05$) (Figure 4).

FOS, FOS + BSE, and FOS + SSE had significantly lower abundance of Proteobacteria after 24 h compared to NC, BSE, and SSE ($p < 0.05$) (Figure 4).

NW tended to display a greater response of Actinobacteria than OO in FOS, FOS + BSE and FOS + SSE (Figure 4). While NC, BSE, and SSE showed negligible increases of Actinobacteria after 24 h, FOS, FOS + BSE and FOS + SSE increased at significantly higher magnitudes of 10%, 12%, and 9%, respectively ($p < 0.05$) (Table 3).

Compared to FOS, relative abundance of Verrucomicrobia increased in BSE, SSE and FOS + SSE after 24 h of in vitro fermentation ($p < 0.05$) (Figure 4).

Prevotella was present at higher levels in OO than NW in all treatments after 24 h (Figure 5). Relative abundance of *Prevotella* decreased about 15% in the NC but to a lesser extent in all treatments (Table 4). At 24 h, abundance was significantly higher than the NC for BSE, SSE, FOS + BSE and FOS + SSE ($p < 0.05$) but not for FOS alone (Figure 5). Additionally, BSE and FOS + SSE had significant higher levels than FOS ($p < 0.05$) (Figure 5).

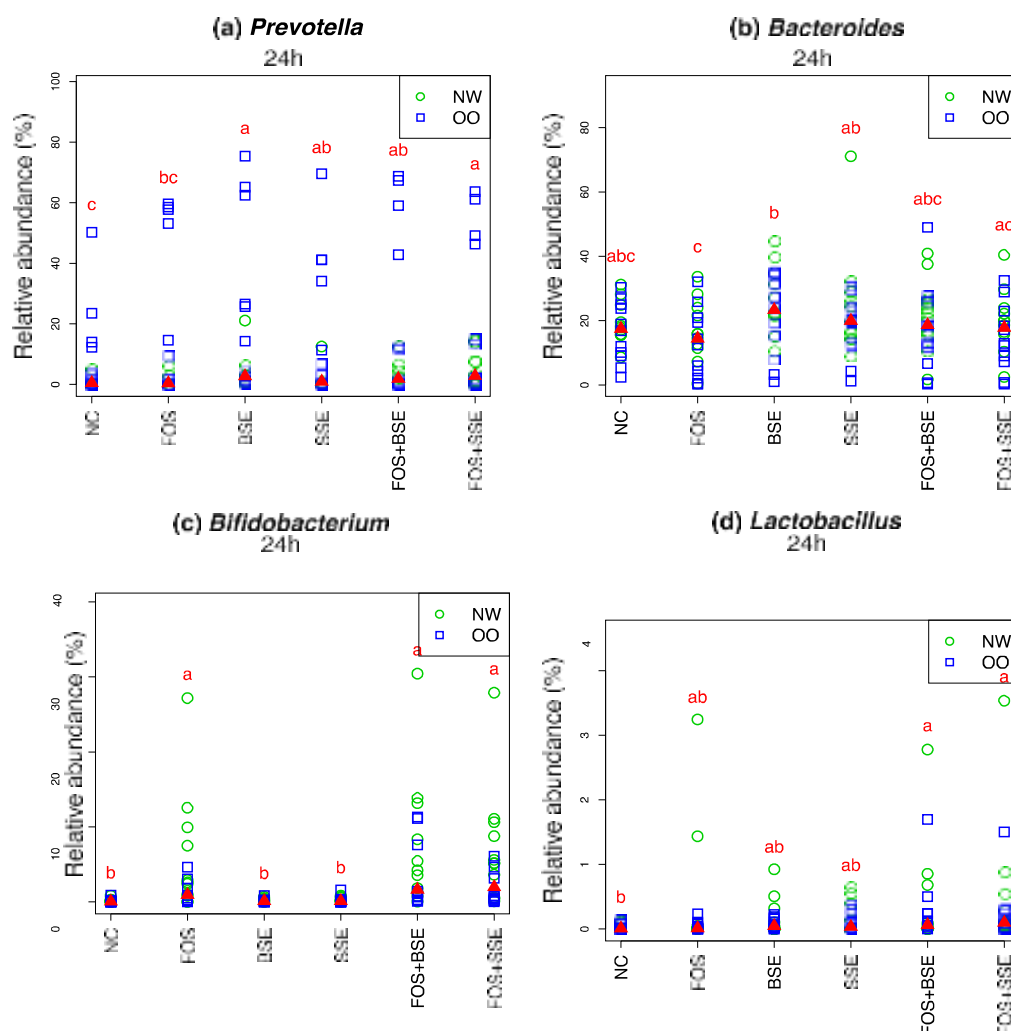


Figure 5. Relative abundance of select genera ($n = 22$). (a) *Prevotella*, (b) *Bacteroides*, (c) *Bifidobacterium*,

(d) *Lactobacillus*. Letters indicate significant differences between treatments at 24 h, achieved by the Friedman test and its post hoc multiple comparisons at 0.05 level of significance. The medians are marked with red triangles. The weight classes (NW vs. OO) are labeled by green circles and blue squares, respectively. NC: negative control, FOS: fructooligosaccharides, BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract.

Though *Bacteroides* tended to be higher in NW samples, no significant differences were observed between the two groups after 24 h of in vitro fermentation. Both BSE and SSE resulted in higher abundance of *Bacteroides* than FOS ($p < 0.05$) (Figure 5).

Samples from NW subjects tended to have higher levels of *Bifidobacterium* after 24 h than OO samples when treated with FOS and FOS plus sorghum polyphenols (Figure 5). *Bifidobacterium* relative abundance in FOS, FOS + BSE, and FOS + SSE was significantly higher than the NC, BSE, and SSE after 24 h ($p < 0.05$) (Figure 5). Sorghum polyphenols alone had no effect.

There were no significant differences between weight class groups for *Lactobacillus*. While *Lactobacillus* relative abundance was stable in the NC after 24 h, increases of this genus, though small, were seen in all treatments (Table 4). While FOS alone did not significantly increase abundance at 24 h compared to the NC, FOS + BSE and FOS + SSE had significantly higher levels compared to the NC ($p < 0.05$) (Figure 5). Sorghum polyphenols alone did not significantly affect *Lactobacillus*.

Abundance of *Faecalibacterium* tended to be higher at 24 h in NW than OO (Figure 6). There was little change in *Faecalibacterium* over 24 h in the NC (Table 4), however abundance decreased in response to all treatments and was significantly lower in FOS, BSE, and FOS + BSE at 24 h compared to NC, SSE, and FOS + SSE ($p < 0.05$) (Figure 6).

Roseburia was stimulated by sumac sorghum polyphenols, with SSE resulting in higher abundance than NC and FOS at 24 h ($p < 0.05$) (Figure 6).

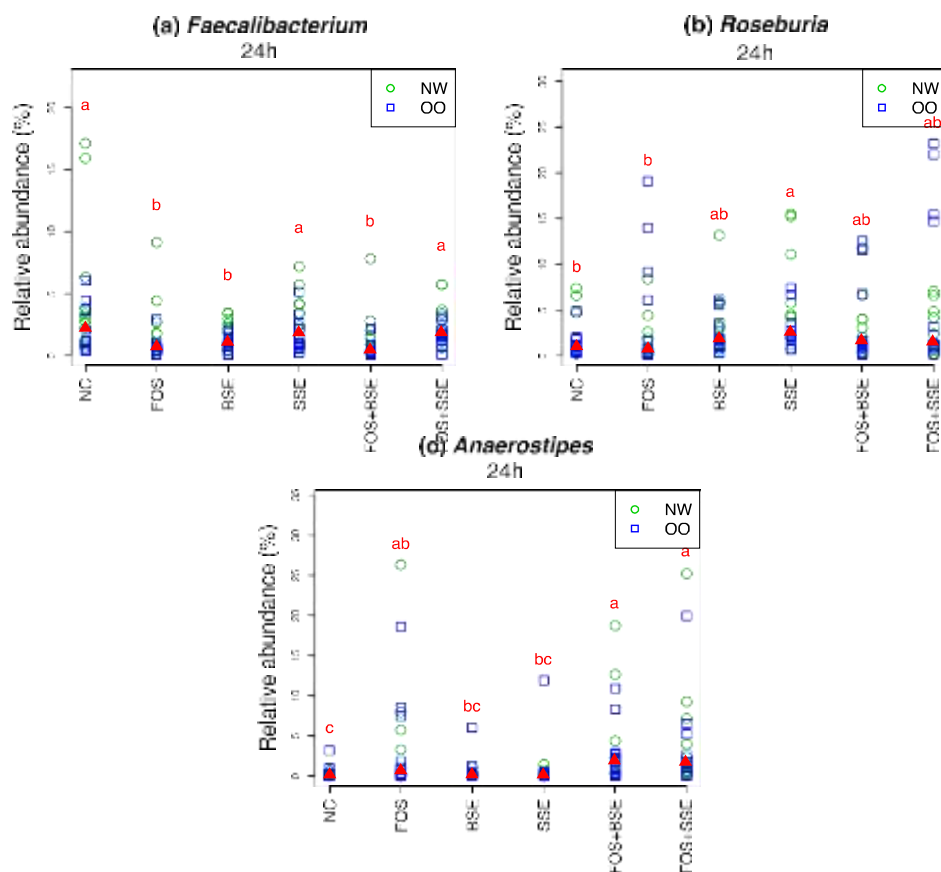


Figure 6. Relative abundance of butyric acid-producing bacteria ($n = 22$). (a) *Faecalibacterium*,

(b) *Roseburia*, (c) *Anaerostipes*. Letters indicate significant differences between treatments at 24 h, achieved by the Friedman test and its post hoc multiple comparisons at the 0.05 level of significance. The medians are marked with red triangles. The weight classes (NW vs. OO) are labeled by green circles and blue squares, respectively. NC: negative control, FOS: fructooligosaccharides, BSE: black sorghum bran extract, SSE: sumac sorghum bran extract.

No significant differences were seen in *Anaerostipes* between the two weight groups. Relative abundance of *Anaerostipes* was higher in FOS, FOS + BSE, and FOS + SSE compared to NC at 24 h ($p < 0.05$) (Figure 6). FOS + BSE and FOS + SSE significantly increased *Anaerostipes* compared to NC, BSE and SSE ($p < 0.05$) (Figure 6).

4. Discussion

As metabolic conditions such as obesity continue to burden large proportions of the U.S. population, the topic of gut health, and more specifically the gut microbiota, has gained increasing attention in the realms of health and nutrition. For this reason, a recent focus of nutrition research has been identifying whole foods as well as bioactive components with the potential to positively shift dysregulated bacterial populations towards more desirable profiles [34]. Of particular allure are plant polyphenols, as they are widely spread in nature and have been credited with the ability to positively modulate the gut microbiota. Not only is grain sorghum bran a source of polyphenols, but it is also cost effectively and efficiently produced in the United States, making it an attractive candidate for nutraceutical applications.

Our current study found both black and sumac sorghum brans to contain various classes of polyphenols. In sorghum bran analysis, our findings of 27.5 ± 1.5 mg/g for black and 43.0 ± 2.0 mg/g for sumac are consistent with previous reports of total phenolics ranging from 7.6–35.6 mg/g and 22.5–88.5 mg/g for black and sumac sorghum bran, respectively [17,18,35]. The two varieties had strikingly distinct phenolic profiles, with higher concentrations of 3-Deoxyanthocyanins (3-DXA) in black bran, and higher concentrations of proanthocyanidins in sumac bran. These results are in agreement with multiple previous analyses of black and sumac sorghum, in which black sorghum is established as enriched in 3-DXA, and sumac in proanthocyanidins [17,18,36,37].

It has been well established that grain sorghum bran has significant antioxidant capabilities [17,18,36–39], and our current analyses sought to compare the radical scavenging properties of the two different varieties of sorghum bran extract. Despite lower levels of total polyphenols in black sorghum bran extract (BSE), both BSE and sumac sorghum bran extract (SSE) showed similar radical scavenging capabilities.

Fermentation with the wine/grape and black tea polyphenols resulted in significantly increased acetate concentrations compared to blank in a study by Gross et al. [40]. However, in the present study, the levels of acetate and butyrate did not change during the fermentations with BSE and SSE compared to NC. Propionate production was lower in SSE compared to the NC, which is not in agreement with the report of Gross et al. [40] who found no change of propionate production with the wine/grape and tea polyphenols. FOS-containing treatments in this study increased butyrate production over 24 h. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are both known to utilize FOS to produce lactic acid [41], which can be further metabolized to butyrate by genera such as *Anaerostipes* and *Eubacterium* [42]. We found increases in *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Anaerostipes* in response to FOS-containing treatments, so it is plausible that the increases in butyrate were due to these cross-feeding pathways. This is one of the first studies to examine the impact of sorghum bran polyphenols on SCFA production and further work is needed to corroborate these findings.

Although NMDS did not reveal a significant impact of sorghum polyphenols on the overall microbial communities, the sorghum extracts modulated the gut microbiota at both phyla and genus levels, and combined sorghum polyphenols and FOS worked to enhance specific beneficial genera. Our data showed relative shifts in the two major phyla, Firmicutes increasing in abundance and Bacteroidetes decreasing. This is not surprising, as many carbohydrate utilizers, including the probiotic *Lactobacillus*, are within Firmicutes, and the conditions of the experiment promote utilization of these substrates, including those already present in the fecal samples.

Proteobacteria contains several potentially pathogenic bacteria [43] avoiding the overgrowth of this phylum may be a positive outcome of nutrition strategies. Lower abundance of Proteobacteria likely reflect the increases in groups that utilize FOS. Though not statistically significant, BSE and

SSE caused a marked decrease in Proteobacteria compared to the NC, suggesting they may act antagonistically against some pathogenic species. These results are similar to those of Pham et al. [44], who found that during in vitro fecal fermentation Proteobacteria was decreased by FOS, feruloylated arabinoxylans (FAXO), proanthocyanidin-rich rice bran polyphenols, and FAXO and rice bran polyphenols combined.

Prevotella is often associated with long-term high carbohydrate diets [45]. *Prevotella* was stimulated but there were no significant differences between sorghum polyphenols with and without FOS. A study with 62 obese subjects found that individuals with a high *Prevotella:Bacteroides* ratio lost significantly more weight in response to a high-fiber diet than individuals with lower levels of *Prevotella* [46]. Although further research is required to reach a deeper understanding of this interaction, enhancing the ratio of *Prevotella:Bacteroides* may assist in weight-loss strategies that are based on increased fiber intake. In the present study, OO samples resulted in increased *Prevotella:Bacteroides* with higher levels of *Prevotella* after 24 h.

Though health-promoting bacterial genera in the colon are not limited to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, they are the traditional targets of prebiotic supplementation [14]. *Bifidobacterium* proliferation was enhanced by FOS-containing treatments. Compared to the NC, FOS + BSE and FOS + SSE tended to increase abundance of *Bifidobacterium* in OO. This data suggests utilization of FOS by *Bifidobacterium* is altered in OO microbiota, and that sorghum polyphenols may enhance fermentation of FOS by this species in OO subjects. As decreased proportions of *Bifidobacterium* have been seen previously in overweight/obese subjects [6,7], nutritional therapies to increase this genus may be extremely beneficial to individuals combatting excessive body weight gain. Past in vitro fermentation studies have observed stimulation of *Bifidobacterium* by polyphenols such as the anthocyanin malvidin-3-glucoside [47], tart cherries [31], and grape and red wine polyphenols [23,48]. In our experiment, however, this genus was not apparently impacted by sorghum polyphenols alone. In the present study, FOS and sorghum polyphenols worked synergistically to enhance *Lactobacillus*. As *Lactobacillus* was present at low abundance, further studies are needed to corroborate these effects.

Success of prebiotic research in stimulating growth of *Lactobacillus* has been markedly lower than with *Bifidobacterium* [14], and the ability of polyphenols to enhance oligosaccharide utilization by *Lactobacillus* would provide a new avenue of prebiotic supplementation. As human clinical trials have attributed several strains of *Lactobacillus* with anti-obesogenic actions [49], this mode of supplementation may be especially beneficial in body weight maintenance. In addition, previous studies have observed stimulation of *Lactobacillus* by red wine polyphenols, grape seed extract monomers, and anthocyanin malvidin-3-glucoside [19,47,48].

Additional targets of prebiotic supplementation include butyrate-producing bacteria. Butyrate is not only the main energy source of colonocytes, but research has purported numerous roles in colon-cancer antagonism, inflammation suppression, and colonic barrier function [50]. In our study, FOS-containing treatments increased butyrate production and this trend was paralleled by increased abundance of *Anaerostipes*. *Anaerostipes* produces butyrate by metabolizing lactate produced by other species or utilizing acetate through the butyryl CoA: acetate CoA transferase pathway [51], and our results suggest that this genus was responsible for much of the butyrate production during this in vitro fermentation.

Roseburia is a genus with the ability to produce butyrate through the butyryl CoA: acetate CoA transferase pathway [52]. Though little research has been done with this genus, reduced abundance of *Roseburia* has been a marker of dysbiosis in both ulcerative colitis [53] and colorectal cancer [54]. Previous studies have identified stimulation of *Roseburia* by various carbohydrate sources [55,56], but this was not significantly impacted by FOS-containing treatments in the present study. SSE, on the other hand, caused significant increases compared to both NC and FOS, indicating utilization of sumac sorghum polyphenols by *Roseburia*. This is not the first report of *Roseburia* stimulation by polyphenols, as this genus also increased in response to red rice bran polyphenols [44].

5. Conclusions

Black and sumac sorghum brans are significant sources of polyphenols with diverse polyphenol profiles. Although sorghum extracts did not significantly influence SCFA production from FOS, they enhanced proliferation of *Prevotella* and the butyrate-producing genus *Roseburia*. Combined sorghum polyphenols and FOS worked to enhance *Bifidobacterium* and especially *Lactobacillus*, a probiotic genus that has been difficult to stimulate through prebiotic supplementation. We observed differential responses to treatment in NW and OO microbiota for *Prevotella*, *Bifidobacterium*, and *Roseburia*, supporting the theory that gut microbial metabolism is altered in OO. Our results indicate that sorghum bran polyphenols may help modulate gut microbial populations, especially in concert with other prebiotic substances such as FOS. Further research is needed to determine which individual polyphenol compound is responsible for beneficial effects on the gut microbiota and to understand the mechanism by which the microbial strains respond to polyphenols.

Author Contributions: S.-O.L. conceived the research project and designed the study; D.A. performed the data collection, laboratory analysis, and wrote manuscript; D.M. and C.B. analyzed the data; J.A.L. and F.C. participated in data analysis and validation. All authors reviewed and edited the manuscript.

Funding: This research was supported by Arkansas Corn and Grain Sorghum Board.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

33 References

- Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D.N. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8787–8803. [CrossRef] [PubMed]
- Obesity and Overweight. Available online: <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/obesity-overweight.htm> (accessed on 23 September 2018).
- Adult Obesity Causes & Consequences. Available online: <https://www.cdc.gov/obesity/adult/causes.html> (accessed on 23 September 2018).
- Khan, M.J.; Gerasimidis, K.; Edwards, C.A.; Shaikh, M.G. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J. Obes.* **2016**, *2016*, 7353642. [CrossRef] [PubMed]
- Collado, M.C.; Isolauri, E.; Laitinen, K.; Salminen, S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women 1–3. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 894–899. [CrossRef] [PubMed]
- Kalliomaki, M.; Collado, M.C.; Salminen, S.; Isolauri, E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 534–538. [CrossRef] [PubMed]
- Santacruz, A.; Collado, M.C.; García-Valdés, L.; Segura, M.T.; Martín-Lagos, J.A.; Anjos, T.; Romero, M.; Lopez, R.M.; Florido, J.; Campoy, C.; et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 83–92. [CrossRef]
- Riva, A.; Borgo, F.; Lassandro, C.; Verduci, E.; Morace, G.; Borghi, E.; Berry, D. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in *Firmicutes* populations. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 95–105. [CrossRef] [PubMed]
- Ríos-Covián, D.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Salazar, N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 185. [CrossRef] [PubMed]
- Canfora, E.E.; van der Beek, C.M.; Jocken, J.W.E.; Goossens, G.H.; Holst, J.J.; Olde-Damink, S.W.M.; Lenaerts, K.; Dejong, C.H.C.; Blaak, E.E. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: A randomized crossover trial. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2360. [CrossRef]
- Chambers, E.S.; Viardot, A.; Psychas, A.; Morrison, D.J.; Murphy, K.; Zac-Varghese, S.E.K.; MacDougall, K.; Preston, T.; Tedford, C.; Finlayson, G.S.; et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* **2015**, *64*, 1744–1754. [CrossRef] [PubMed]

12. Rossi, M.; Corradini, C.; Amaretti, A.; Nicolini, M.; Pompei, A.; Zanoni, S.; Matteuzzi, D. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: A Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6150–6158. [[CrossRef](#)]
13. Gibson, G.R.; Scott, K.P.; Rastall, R.A.; Tuohy, K.M.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E.F.; Saulnier, D.; Loh, G.; et al. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci. Technol.* **2010**, *7*, 1–19. [[CrossRef](#)]
14. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Raylene, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev.* **2017**, *14*, 491–502.
15. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, *25*, 270–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Awika, J.M.; McDonough, C.M.; Rooney, L.W. Decorticating Sorghum to Concentrate Healthy Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6230–6234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Awika, J.M.; Rooney, L.W. Properties of 3-deoxyanthocyanins from Sorghum. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4388–4394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cueva, C.; Sánchez-Patán, F.; Monagas, M.; Walton, G.E.; Gibson, G.R.; Martín-Álvarez, P.J.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: Changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2013**, *83*, 792–805. [[CrossRef](#)]
20. Anhê, F.F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Matamoros, S.; Varin, T.V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; Marette, A. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **2015**, *64*, 872–883.
21. Roopchand, D.E.; Carmody, R.N.; Kuhn, P.; Moskal, K.; Rojas-Silva, P.; Turnbaugh, P.J.; Raskin, I. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes* **2015**, *64*, 2847–2858. [[CrossRef](#)]
22. Song, H.; Chu, Q.; Yan, F.; Yang, Y.; Han, W.; Zheng, X. Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *31*, 1462–1469. [[CrossRef](#)]
23. Zhou, L.; Wang, W.; Huang, J.; Ding, Y.; Pan, Z.; Zhao, Y.; Zhang, R.; Hu, B.; Zeng, X. In vitro extraction and fermentation of polyphenols from grape seeds (*Vitis vinifera*) by human intestinal microbiota. *Food Funct.* **2016**, *7*, 1959–1967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Neyrinck, A.M.; Etxeberria, U.; Taminiau, B.; Daube, G.; Van Hul, M.; Everard, A.; Cani, P.D.; Bindels, L.B.; Delzenne, N.M. Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *61*, 1500899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
26. Payne, M.J.; Hurst, W.J.; Stuart, D.A.; Ou, B.; Fan, E.; Ji, H.; Kou, Y. Determination of Total Procyanidins in Selected Chocolate and Confectionary Products Using DMAC. *J. AOAC Int.* **2009**, *93*, 89–96.
27. Cho, M.J.; Howard, L.R.; Prior, R.L.; Clark, J.R. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1771–1782. [[CrossRef](#)]
28. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
29. Yang, J.; Keshavarzian, A.; Rose, D.J. Impact of dietary fiber fermentation from cereal grains on metabolite production by the fecal microbiota from normal weight and obese individuals. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 862–867. [[CrossRef](#)]
30. Bourquin, L.D.; Titgemeyer, E.C.; Fahey, G.C. Vegetable Fiber Fermentation by Human Fecal Bacteria: Cell Wall Polysaccharide Disappearance and Short-Chain Fatty Acid Production during In Vitro Fermentation and Water-Holding Capacity of Unfermented Residues. *Nutr. Metab.* **1993**, *123*, 860–869. [[CrossRef](#)]

31. Mayta-Apaza, A.; Pottgen, E.; de Bodt, J.; Papp, N.; Daya, M.; Luke, H.; Abranko, L.; VandeWiele, T.; Lee, S.O.; Carbonero, F. Impact of tart cherry polyphenols on the human gut microbiota and phenolic metabolites in vitro and in vivo. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *59*, 170–172. [[CrossRef](#)]
32. Kozich, J.J.; Westcott, S.L.; Baxter, N.T.; Highlander, S.K.; Schloss, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5112–5120. [[CrossRef](#)]
33. Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.D.; Robinson, C.J.; et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sheflin, A.M.; Melby, C.L.; Carbonero, F.; Weir, T.L. Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. *Gut Microbes* **2017**, *8*, 113–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Awika, J.M.; Rooney, L.W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1199–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Awika, J.M.; Rooney, L.W.; Wu, X.; Prior, R.L.; Cisneros-Zevallos, L. Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6657–6662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dykes, L.; Rooney, L.W.; Waniska, R.D.; Rooney, W.L. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grain of Varying Phenotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6813–6818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kamath, V.G.; Chandrashekar, A.; Rajini, P.S. Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. *J. Cereal Sci.* **2005**, *40*, 283–288. [[CrossRef](#)]
39. Kil, H.W.; Seong, E.S.; Ghimire, B.K.; Chung, I.M.; Kwon, S.S.; Goh, E.J.; Heo, K.; Kim, M.J.; Lim, J.D.; Lee, D.; et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1234–1239. [[CrossRef](#)]
40. Gross, G.; Jacobs, D.M.; Peters, S.; Possemiers, S.; van Duynhoven, J.; Vaughan, E.E.; van de Wiele, T. In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10236–10246. [[CrossRef](#)]
41. Kaplan, H.; Hutkins, R.W. Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2682–2684. [[CrossRef](#)]
42. Duncan, S.H.; Louis, P.; Flint, H.J. Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5810–5817. [[CrossRef](#)]
43. Shin, N.R.; Whon, T.W.; Bae, J.W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Microbiol.* **2015**, *33*, 496–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pham, T.; Savary, B.J.; Teoh, K.; Chen, M.H.; McClung, A.; Lee, S.O. In Vitro Fermentation Patterns of Rice Bran Components by Human Gut Microbiota. *Nutrients* **2017**, *9*, 1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.Y.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W.A.; Knight, R.; et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **2011**, *334*, 105–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hjorth, M.F.; Roager, H.M.; Larsen, T.M.; Poulsen, S.K.; Licht, T.R.; Bahl, M.I.; Zohar, Y.; Astrup, A. Pre-treatment microbial *Prevotella-to-Bacteroides* ration, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 580–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hidalgo, M.; Oruna-Concha, M.J.; Kolida, S.; Walton, G.E.; Kallithraka, S.; Spencer, J.P.E.; Gibson, G.R.; de Pascual-Teresa, S. Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microbiota and Their Influence on Gut Bacterial Growth. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3882–3890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Dolara, P.; Luceri, C.; De Filippo, C.; Femia, A.P.; Giovannelli, L.; Caderni, G.; Cecchini, C.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cresci, A. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res.* **2005**, *591*, 237–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Crovesy, L.; Ostrowski, M.; Ferreira, D.M.T.P.; Rosado, E.L.; Soares-Mota, M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int. J. Obes.* **2017**, *41*, 1607–1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hamer, H.M.; Jonker, D.; Venema, K.; Vanhoutvin, S.; Troost, F.J.; Brummer, R.J. Review Article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Therap.* **2008**, *27*, 104–119. [[CrossRef](#)]

51. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic bacteria. *Environ. Microbiol.* **2016**, *19*, 29–41. [[CrossRef](#)]
52. Duncan, S.H.; Hold, G.L.; Barcenilla, A.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52*, 1615–1620.
53. Machiels, K.; Joosens, M.; Sabino, J.; De Preter, V.; Arijis, I.; Eeckhaut, V.; Ballet, V.; Claes, K.; Van Immerseel, F.; Verbeke, K.; et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **2014**, *63*, 1275–1283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, T.; Cai, G.; Qiu, Y.; Fei, N.; Zhang, M.; Pang, X.; Jia, W.; Cai, S.; Zhao, L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* **2012**, *6*, 320–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Neyrinck, A.M.; Possemiers, S.; Verstraete, W.; De Backer, F.; Cani, P.D.; Delzenne, N.M. Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Neyrinck, A.M.; Possemiers, S.; Druart, C.; Van de Wiele, T.; de Backer, F.; Cani, P.D.; Larondelle, Y.; Delzenne, N.M. Prebiotic Effects of Wheat Arabinoxylan Related to the Increase in Bifidobacteria, *Roseburia* and *Bacteroides/Prevotella* in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ملخص

تعتبر الذرة الرفيعة واحدة من أقدم النباتات المزروعة التي نشأت في إفريقيا. تحتوي الذرة الرفيعة المزروعة على مجموعة متنوعة جدا من الأشكال التي تأتي في خمسة أجناس و هذا التباين الوراثي و الظاهري يترجم إلى تنوع كبير في المظهر و الاستخدام .

تعتبر الذرة الرفيعة واحدة من أقدم النباتات المزروعة التي نشأت في إفريقيا. تحتوي الذرة الرفيعة المزروعة على مجموعة متنوعة جدا من الأشكال التي تأتي في خمسة أجناس ، وهذا التباين الوراثي والظاهري يترجم إلى تنوع كبير في المظهر والاستخدام .

يعتمد عملنا على دراسة تهدف إلى تقدير النشاط المضاد للميكروبات لحبوب الذرة الرفيعة بناءً على خصائصها المورفولوجية والكيميائية النباتية من خلال تحليل المقالة.

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها من تحليل المقالات في العمل الأول وجود نشاط مضاد للميكروبات في المختبر يتم استنتاجه بواسطة أوراق الذرة الرفيعة ثنائية اللون لوجود مكونات نشطة بيولوجيًا. وكشف العمل الثاني أن بوليفينول نخالة الذرة الرفيعة يمكن أن يساعد في تعديل التجمعات الميكروبية في الأمعاء. أظهرت نتائج المقال الأخير حول التحكم في نمو القولونيات وبلح البحر في تخمير الذرة الرفيعة بواسطة البكتيريا وزرع الخميرة ، تثبيط الفئات والقولون .

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للميكروبات ، القولونيات ، العفن ، البوليفينول ، الذرة الرفيعة

Résumé

Le sorgho est une des plus anciennes plantes cultivées, qu'il est originaire d'Afrique. Le sorgho cultivé présente une très grande diversité de formes qui se déclinent en cinq races, cette variabilité génétique et phénotypique se traduit par une grande variabilité d'aspect et d'utilisation.

Notre travail est basé sur une étude qui vise à estimer l'activité antimicrobienne des grains de sorgho en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et phytochimiques par une analyse d'article.

Les résultats obtenus de l'analyse des articles affirment dans le premier travail la présence de l'activité antimicrobienne in vitro exhalées par les feuilles de *Sorghum bicolor*.L en raison de la présence d'ingrédients bioactifs. Le second travail a révélé que les polyphénols de son de sorgho peuvent aider à moduler les populations microbiennes intestinales. Les résultats du dernier article sur le contrôle de la croissance de coliforme et moules dans le maltage du sorgho par les bactéries et culture de levure, ont montré une inhibition de moisissures et des coliforms.

Mots clés: activité antimicrobienne, coliforme , moisissures, polyphénols, sorgho.

Abstract

Sorghum is one of the oldest cultivated plants, originating in Africa. Cultivated sorghum has a very wide variety of forms that come in five races, this genetic and phenotypic variability translates into a great variability in appearance and use.

Our work is based on a study that aims to estimate the antimicrobial activity of sorghum grains based on their morphological and phytochemical characteristics by article analysis.

The results obtained from the analysis of the articles affirm in the first work the presence of the in vitro antimicrobial activity exhaled by the leaves of *Sorghum bicolor*.L due to the presence of bioactive ingredients. The second work revealed that sorghum bran polyphenols can help modulate gut microbial populations. The results of the last article on the control of coliform and mussel growth in sorghum malting by bacteria and yeast culture, showed inhibition of crumbs and coliforms.

Key words: antimicrobial activity, coliform, molds, polyphenols, sorghum.