

La fermentation lactique des produits végétaux

I.1. Les aliments végétaux, sources de nutriments

Les aliments végétaux sont classés en différentes catégories : les produits amylacés (céréales et tubercules), les graines et/ou les noix, les légumes et les fruits. Les aliments d'origine végétale constituent une part importante de notre alimentation. Ils sont riches en nutriments essentiels tel que les minéraux, les vitamines, les fibres et les composés phénoliques. Le programme français PNNS (Plan National Nutrition Santé) recommande ainsi la consommation quotidienne d'au moins cinq portions de fruits ou légumes, de céréales et dérivés à chaque repas et de l'eau à volonté, selon la pyramide alimentaire représentée dans la **Figure 1**.

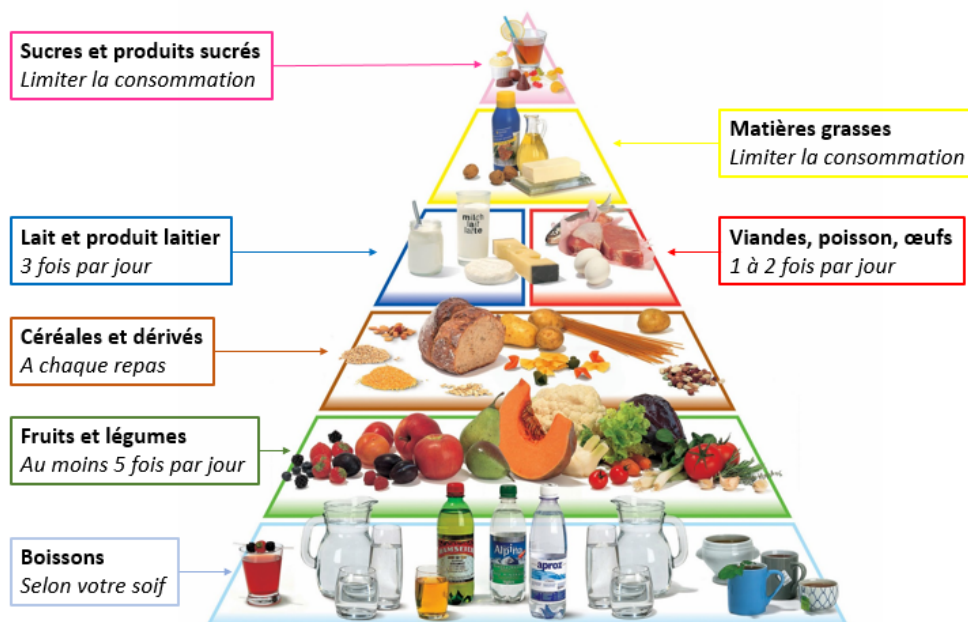


Figure 1 : Les apports alimentaires journaliers recommandés par la pyramide alimentaire [15]

I.1.1. L'eau

L'eau est le composé majoritairement présent dans les végétaux, soit plus de 90 % de la masse totale. L'eau est également le constituant quantitativement le plus important de l'organisme humain. Toutes les réactions métaboliques de notre organisme se déroulent en milieu aqueux. Les molécules d'eau aident également à stabiliser les structures des protéines. Et en tant que principal fluide de notre corps, l'eau sert de transporteur pour les minéraux, les vitamines, les sucres, les acides aminés et autres nutriments [16].

I.1.2. Nutriments essentiels : glucides, lipides et protéines

Les glucides, les lipides et les protéines sont également des nutriments essentiels. Ce sont les sources d'énergie de l'organisme et ils permettent d'assurer l'entretien de la vie cellulaire, la synthèse ou la réparation de certains constituants cellulaires et le fonctionnement de l'organisme (activité cérébrale, respiration, digestion). Ces composés sont principalement apportés par les aliments d'origine animale mais aussi par certains végétaux. Les fruits, les légumes et les céréales sont riches en glucose, fructose, saccharose, amidon et fibres alimentaires. Les acides gras essentiels, tels que l'acide linoléique (oméga 6) et l'acide α -linoléique (oméga 3) sont apportés par des huiles végétales telles que les huiles de noix ou de colza. Les acides gras essentiels sont importants car ils entrent dans la composition des lipides membranaires et jouent un rôle dans la fluidité membranaire. Enfin, certains végétaux sont riches en protéines végétales comme le sarrasin, le quinoa, les noix ou les haricots.

I.1.3. Les minéraux

Les minéraux sont des éléments indispensables au fonctionnement de l'organisme. L'organisme ne pouvant pas les synthétiser, ils doivent être apportés par l'alimentation. Les végétaux apportent à notre organisme des quantités considérables en minéraux. Selon leur importance quantitative dans le corps humain, les minéraux sont classés en trois catégories : les macroéléments, les microéléments et les oligoéléments. Les macroéléments sont ceux retrouvés en plus grande quantité dans l'organisme et regroupent le sodium (Na), le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le phosphore (P), le chlore (Cl) et l'azote (N). Les microéléments sont retrouvés en plus faible quantité et regroupent le fer (Fe), le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), l'iode (I), le fluor (F), le soufre (S) et le sélénium (Se) [17]. Les oligoéléments sont souvent classés avec les microéléments et sont plus retrouvés sous forme de traces dans l'organisme, c'est le cas du Cu, du Se, du Mn et du Co. Les minéraux sont indispensables à l'activité du corps humain, ils sont incorporés dans les membranes cellulaires, participent à la structure osseuse et sont essentiels à l'activité de certaines hormones, protéines et enzymes. Les noix, les bananes, les légumes verts, les herbes, les abricots sont riches en minéraux.

I.1.4. Les fibres alimentaires

Les fibres alimentaires appartiennent à la catégorie des glucides, plus précisément à la classe des polysides (composés de plus de 10 sucres). Ce sont les constituants de la paroi des cellules végétales. Les fibres alimentaires sont classées sous forme de glucides non assimilables car elles ne sont pas digérées par les enzymes du tube digestif et sont hydrolysées uniquement par la microflore du colon [18]. La pectine, la cellulose, l'hémicellulose, les hydrocolloïdes, les β -glucanes et les amidons résistants sont quelques fibres alimentaires consommées par l'Homme [19]. Les céréales, les légumineuses et les fruits sont très riches en fibres alimentaires. Les fibres absorbent les lipides et le cholestérol et facilitent leur élimination dans les selles, permettant de réduire les risques de maladie cardio-vasculaire. Elles permettent également de réguler la glycémie car elles retardent l'absorption des sucres et évitent l'augmentation trop rapide du taux de glucose dans le sang après les repas.

I.1.5. Les vitamines

Les vitamines sont des molécules organiques indispensables au développement et la croissance de l'être humain. L'organisme ne peut les synthétiser (excepté pour la vitamine D) et elles doivent être apportées en quantité suffisante par l'alimentation. A ce jour, il existe 13 vitamines, le groupe des vitamines B comprenant la vitamine B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B3 (niacine), B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine), B7 (biotine), B9 (acide folique), B12 (cobalamine), la vitamine C (ou acide ascorbique), la vitamine A, la vitamine D, la vitamine E et la vitamine K. Elles sont classées en fonction de leur solubilité dans l'eau, les vitamines hydrosolubles comprennent la vitamine C et le groupe des vitamines B et les vitamines liposolubles comprennent les vitamines A, D, E et K. Les vitamines B sont les précurseurs de plusieurs coenzymes ayant une action bien spécifique et agissent en synergie dans l'organisme pour assurer les fonctions métaboliques [20]. Les vitamines C et E (**Figure 2**), de par leurs propriétés réductrices, sont de puissants antioxydants capables de piéger les espèces réactives. La vitamine C, hydrosoluble, protège les parties aqueuses alors que la vitamine E, liposoluble, protège les lipides membranaires de la peroxydation lipidique. La vitamine C est principalement apportée par les fruits frais (orange, citron pamplemousse, fraise, cassis, ananas). La vitamine E est principalement apportée par les huiles végétales et les noix. La vitamine D peut être apportée par les huiles de foie de poisson ou la chair de poissons gras, mais très rarement par les végétaux. Elle est la seule vitamine que l'organisme est capable de synthétiser. Elle peut être formée au niveau de la peau à partir du 7-

dehydrocholestérol sous l'action des rayons ultraviolets (UV) [21]. Elle est importante dans le processus de minéralisation des os car elle y favorise la fixation du calcium. La vitamine K est apportée par certains légumes verts comme les choux ou les épinards. Elle joue le rôle d'activateur des facteurs impliqués dans la coagulation sanguine. La vitamine A est apportée sous forme de caroténoïdes à l'organisme. Elle est indispensable à la vision et est un agent anti-infectieux.

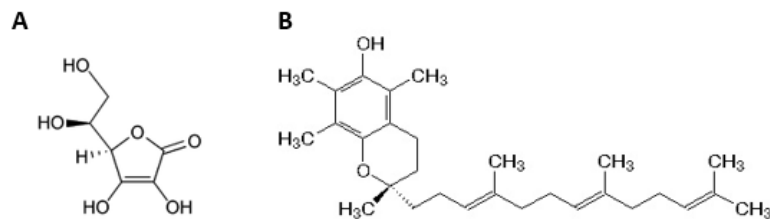


Figure 2 : Molécule de la vitamine C (A) et de la vitamine E (α-tocophérol) (B)

I.1.6. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels responsables de la couleur jaune orangé de certains fruits et légumes. Ce sont de puissants antioxydants capables de piéger les radicaux libres. Les caroténoïdes les plus importants sont le β-carotène, l'α-carotène, le lycopène, la lutéine, la zeaxanthine et la β-cryptoxanthine (**Figure 3**). Le β-carotène, l'α-carotène et la β-cryptoxanthine sont métabolisés au niveau du foie pour donner de la vitamine A. Les carottes, les épinards, les citrouilles, les tomates, les papayes, les mangues, les patates douces et les poivrons rouges sont riches en β-carotène [2].

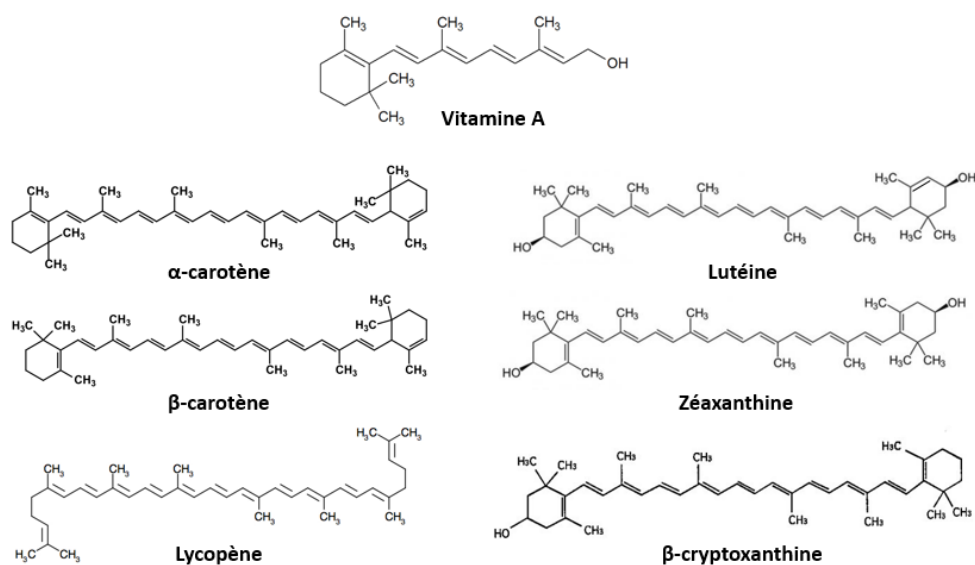


Figure 3 : Molécules de la vitamine A et des principaux caroténoïdes

I.1.7. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un large groupe de molécules classées en tant que métabolites secondaires chez les plantes. Ces molécules sont synthétisées pendant le développement de la plante et sont utilisées en tant que moyens de défense contre certaines conditions de stress comme les UV ou les radiations. Les composés phénoliques sont classés en plusieurs familles selon leurs structures : les acides phénoliques, les tanins, les lignanes, les flavonoïdes, les stilbènes, les coumarines et les curcuminoïdes, montrés en **Figure 4** [22]. Les acides phénoliques sont classés en deux catégories : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique, l'acide sinapique, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique sont soit liés de façon covalente à la membrane cellulaire soit retrouvés sous forme soluble dans le cytoplasme des cellules végétales [23]. Les acides hydroxybenzoïques, tel que l'acide gallique, peuvent être retrouvés sous forme estérifiée avec une molécule de glucose pour former des polymères aux structures complexes, appelés tanins hydrolysables. Les flavonoïdes constituent la plus grande famille de composés phénoliques et certains flavonoïdes peuvent être sous forme de glycosides, comme les quercétines glucosides. Les composés phénoliques sont de puissants antioxydants : ils sont capables de piéger les radicaux libres ou espèces réactives. Cette activité antioxydante dépend du nombre et de la position de leurs groupements hydroxyles (OH) [24]. Les principales sources de composés phénoliques sont les fruits, les légumes, les graines dont les légumineuses et les boissons (thé, café, vin, jus).

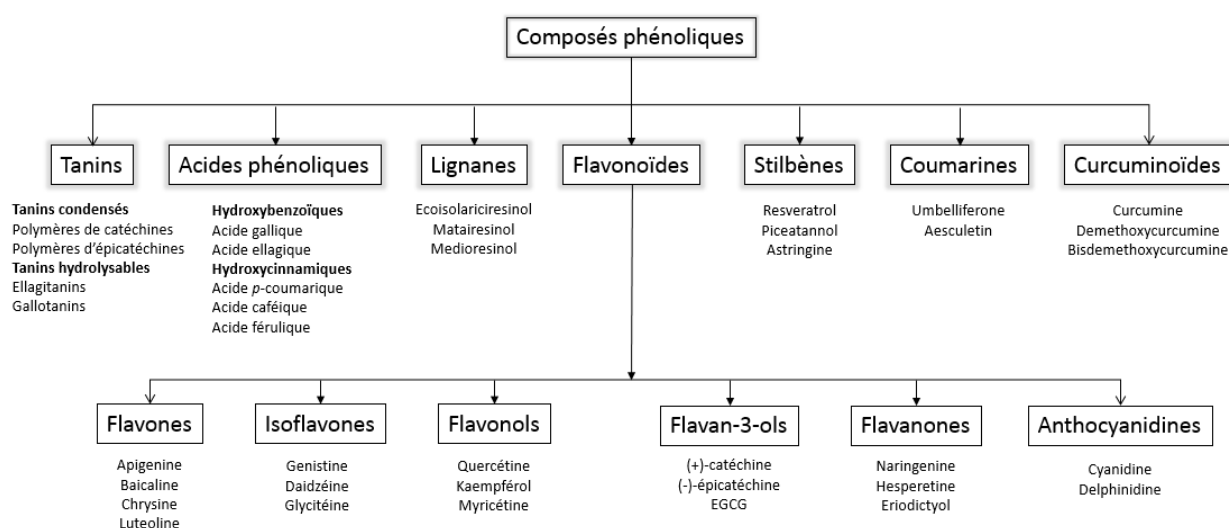


Figure 4 : Les grandes familles de composés phénoliques [22]

I.1.8. Lutte contre les maladies métaboliques liées à un stress oxydant

Le stress oxydatif est provoqué par un déséquilibre dans l'organisme entre les espèces réactives (ou radicaux libres) et les défenses antioxydantes de l'organisme. Les espèces réactives ou radicaux libres peuvent être classées en deux catégories : celles dérivées de l'oxygène que l'on appelle couramment les ROS (« Reactive Oxygen Species ») et celles dérivées de l'azote, appelées RNS (« Reactive Nitrogen Species »). Les espèces réactives peuvent provenir de sources endogènes comme les mitochondries, les microsomes, les péroxysomes, les cytochromes et certaines enzymes cytosoliques telles que la superoxyde dismutase (SOD), la xanthine oxydase et les NADPH oxydases. En effet, la xanthine oxydase et la SOD peuvent former de l' H_2O_2 , qui peut être neutralisé par la catalase ou la peroxydase. Des sources exogènes comme les UV, les radiations, les pesticides et le tabac peuvent être à l'origine de la formation des espèces réactives [25]. En condition physiologique normale, les espèces réactives sont neutralisées par les défenses antioxydantes de l'organisme (SOD, glutathion, catalase, etc). Mais lorsque les espèces réactives deviennent trop nombreuses et que les défenses antioxydantes de l'organisme ne peuvent plus les neutraliser, l'organisme est en situation de stress oxydant [26].

Les radicaux libres présents en trop grande quantité, peuvent causer des dommages au niveau de l'ADN, des protéines ou des lipides et sont responsables de plusieurs maladies dégénératives et chroniques, telles que le diabète, l'obésité, le cancer, les maladies neurodégénératives ou les maladies cardio-vasculaires [1]. Ces troubles métaboliques sont étroitement liés et définis par le syndrome métabolique. Le syndrome métabolique fait référence à la coprésence de facteurs à risque cardio-vasculaire, tels que la résistance à l'insuline, l'obésité, la dyslipidémie athérogène et l'hypertension artérielle [27–29]. Le syndrome métabolique est donc associé à un stress oxydant [30]. Les antioxydants endogènes ou exogènes sont capables de piéger et de neutraliser les espèces réactives, et donc de réduire les risques de ces troubles métaboliques. Les végétaux, plus particulièrement les fruits et légumes, étant très riches en antioxydants, sont indispensables pour lutter contre ces maladies. Afin de répondre aux attentes des consommateurs, désireux de nouveaux produits sains aux bénéfices nutritionnels améliorés, la recherche d'aliments ou de compléments alimentaires riches en antioxydants s'est intensifiée ces dernières années.

I.2. La fermentation lactique des aliments végétaux

Le consommateur est à la recherche de nouveaux aliments et boissons à haute valeur nutritionnelle, faciles et rapides à consommer. Pour répondre à ces attentes, la fermentation lactique de végétaux, plus précisément de fruits et légumes est en pleine voie d'expansion, bien que très ancienne. Les effets bénéfiques sur la santé des aliments fermentés sont de plus en plus étudiés ; une partie de ces effets résulte de l'action des microorganismes responsables de la fermentation sur notre organisme, l'autre partie résulte des métabolites produits pendant la fermentation.

I.2.1. La fermentation lactique à travers le temps et l'espace

La fermentation lactique est utilisée par l'Homme depuis l'Antiquité dans le but de conserver les aliments facilement périssables mais aussi d'apporter de nouveaux goûts, des arômes et de la texture. A cette époque, les seuls moyens de conservation des aliments étaient le séchage, le fumage, le salage et la fermentation. Les premiers aliments végétaux fermentés étaient à base de céréales et de fruits. La fermentation alcoolique de l'orge en bière et des raisins en vin remonterait entre 6000 et 1700 ans avant Jésus-Christ en Mésopotamie et en Egypte [6]. D'autre part, d'autres boissons alcooliques à base de riz, de miel et de fruits étaient produites en Chine 7000 ans av. J.-C. [31]. Les concombres fermentés sont apparus 2000 av. J.-C. au Moyen-Orient [32]. Les légumes fermentés (chou, radis, navets, concombres, betteraves) sont apparus en Chine 300 ans av. J.-C., et servaient de repas aux ouvriers surtout pour survivre aux périodes hivernales lors de la construction de la Muraille de Chine [33]. Il semblerait que la choucroute européenne proviendrait de Chine, et que la « recette » fut emmenée lors de l'invasion de l'Europe centrale par les Mongols au XIII^{ème} siècle [32].

A l'époque, les aliments fermentaient naturellement, sans aucune maîtrise du processus de fermentation. La connaissance des microorganismes impliqués dans le processus de fermentation est apparue bien plus tard avec la découverte de Von Leeuwenhoek et Hooke en 1665 [34]. Puis, John Lister démontra, en 1877, le rôle d'une bactérie *Bacterium lactis* (aujourd'hui *Lactococcus lactis*) dans les laits fermentés. Par la suite, la fermentation sera définie par Louis Pasteur comme « La vie sans l'air ». Avec la connaissance des microorganismes, la révolution industrielle et la concentration de fortes populations dans les grandes villes, la production et la commercialisation d'aliments fermentés ont connu une croissance exponentielle. Ainsi, différents types d'aliments fermentés à base de viande, légumes, fruits, lait, poissons, céréales ont vu le jour et restent aujourd'hui encore, largement

consommés et très appréciés partout dans le monde. Les légumes fermentés les plus consommés en Europe et aux Etats-Unis sont les cornichons, les olives et la choucroute. La choucroute a été importée aux Etats-Unis par les immigrants venant d'Allemagne et d'autres pays de l'Europe. Plusieurs aliments à base de fruits ou de légumes fermentés sont consommés également en Asie, comme le kimchi.

I.2.2. Intérêt de la fermentation lactique

La valeur nutritionnelle des végétaux, en particulier celle des fruits et des légumes, dépend de plusieurs facteurs : du type de végétal, du cultivar, des conditions climatiques, du stade de maturité, des conditions de récolte, de la façon dont on le prépare (frais, surgelé, cuisiné, transformé, etc) et des conditions de stockage après transformation. Après récolte, les fruits et les légumes se décomposent très rapidement, ils perdent ainsi plusieurs de leurs propriétés (couleur, odeur, apparence, texture). Pendant et après récolte, les végétaux peuvent subir différents types d'altération : physique, chimique, biochimique et microbiologique [28]. Après récolte, certains fruits continuent à mûrir. Au cours de la maturation, différentes réactions conduisent à la destruction de la paroi cellulaire, qui provoque une déstructuration des tissus et des cellules et donc un ramollissement du fruit. D'autres processus biochimiques sont à l'origine de la détérioration des végétaux, comme le brunissement enzymatique. Ce phénomène se traduit par l'apparition de pigments bruns ou noirs et correspond à l'oxydation des composés phénoliques en quinones par la polyphénol oxydase, en présence d'oxygène. Le brunissement enzymatique n'est pas une réaction spontanée, le végétal doit avoir subi un stress ou un processus de détérioration (déchirure de la peau). Les fruits et les légumes présentent à leur surface différents types de microorganismes. Avec des conditions favorables, ces derniers, en particulier les moisissures et les champignons se développent et conduisent ainsi à un pourrissement du végétal. Les fruits et légumes sont aussi sensibles à des attaques d'insectes et les pertes sont augmentées lorsque les fruits ou légumes subissent des chocs mécaniques. Ainsi, les fruits et légumes récoltés avec une forte saisonnalité sont souvent associés à de grosses pertes de production. A cause de leur faible durée de conservation, les fruits et les légumes sont, dans la plupart des cas, transformés afin de réduire les pertes de production. Les fruits et les légumes peuvent être transformés sous forme de jus, de confiture, de purée, de concentré, de soupe, de salade, préparés en morceaux, hachés, en conserves ou séchés. Ces procédés ont pour but d'allonger la durée de conservation des fruits et des légumes et de les rendre disponibles à la consommation sur une période étendue.

Cependant, les procédés de transformation peuvent affecter la valeur nutritionnelle des végétaux, de façon positive ou négative, que ce soient les procédés thermiques (blanchiment, pasteurisation, stérilisation, séchage) ou non (fermentation, ultrasons, ultraviolet, haute pression, champ électrique pulsé), de préparation (lavage, épluchage, cuisson) ou de conservation (conservation, séchage) [35]. Les composés hydrosolubles (vitamines C et B et certains composés phénoliques) sont fortement affectés lors des traitements thermiques. Ainsi, une diminution de l'activité antioxydante est souvent observée après transformation. De la purée de fraise traitée à 70°C pendant 2 min a perdu 22,6 % de sa teneur en vitamine C et 25 % de son activité antioxydante, mais aucune perte n'a été observée pour les composés phénoliques [4]. La cuisson de fleurs de brocoli au microondes pendant 300 s a montré des pertes de 71,9 % en composés phénoliques, 65,9 % en vitamine C et 22,9 % en caroténoïdes [5]. En revanche, une augmentation de l'activité antioxydante et de la teneur en lycopène a été observée pour des tomates traitées à 88°C pendant 30 min [36]. Ces effets peuvent varier en fonction du processus de transformation mais aussi en fonction du végétal.

Pour réduire les pertes nutritionnelles lors de la transformation des végétaux, de nouvelles technologies sont développées, comme les traitements à haute pression, les radiations par ionisation et les champs électriques pulsés, qui conduisent à une diminution moins marquée des composés nutritionnels en comparaison avec les traitements thermiques [4,9].

Parmi les autres procédés de transformation permettant de réduire les pertes nutritionnelles, la fermentation lactique, un procédé non thermique, mérite d'être exploité pour l'obtention d'aliments végétaux à haute valeur nutritionnelle. La fermentation lactique est un processus métabolique réalisé par les bactéries lactiques permettant de convertir les glucides de l'aliment en acide lactique ou un mélange d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et de CO₂. La production de ces composés permet d'allonger la durée de conservation en limitant la croissance des microorganismes contaminants et pathogènes. La fermentation lactique permet de mieux préserver les minéraux, les vitamines et les composés phénoliques, préservant ainsi les propriétés antioxydantes de l'aliment. Elle permet de dégrader les composés antinutritionnels ou les composés difficilement assimilables par l'organisme, comme l'acide phytique ou les tanins. Il a été démontré que la fermentation lactique d'une légumineuse (*Vigna sinensis*) permettait d'augmenter la concentration de plusieurs composés phénoliques (acide gallique, acide vanillique, quercétine, acide férulique, acide hydroxybenzoïque) [37]. La fermentation lactique permet de mieux préserver la teneur en vitamine C, en glutathion, en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante de smoothies et de jus de tomate

[7,38]. La fermentation lactique a permis également d'augmenter la teneur en vitamine C, en composés phénoliques et l'activité antioxydante de jus de grenade [39], de jus de carotte, d'haricot et de courgette [40] et de lait de soja [41]. La fermentation lactique est donc un procédé technologique pour l'obtention d'aliments végétaux riches en antioxydants, et entre parfaitement dans le concept de la lutte contre le diabète et l'obésité, constituant également une voie alternative pour la transformation des végétaux.

I.2.3. Quelques produits végétaux fermentés à travers le monde

Les aliments fermentés à base de végétaux sont consommés partout dans le monde, d'une part grâce à leur saveur et goûts uniques et d'autre part grâce à leurs effets bénéfiques pour notre organisme. Ils peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur composition :

- Les produits à base de fruits et légumes (olives, chou, chou-fleur, radis, concombre)
- Les produits à base de céréales (maïs, riz, millet)
- Les produits à base de légumineuses (soja, haricots)
- Les produits à base de racines et tubercules (manioc, patate douces)
- Les boissons (thé, riz, céréales)

Quelques exemples de ces aliments les plus connus sont présentés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Exemples de produits végétaux fermentés consommés dans le Monde

Produit fermenté	Pays	Fruit/Légume/Légumineuse/Végétal
Almagro	Espagne	Aubergine
Choucroute	Monde entier	Chou
Concombres	Europe, Etats-Unis	Concombre
Dhamuoi	Vietnam	Chou et autres légumes
Fu-tsai	Taiwan	Moutarde
Fufu	Nigéria	Manioc
Gari	Afrique de l'Ouest	Manioc
Gundruk	Népal, Inde	Chou, radis, moutarde, chou-fleur
Jiang-gua	Taiwan	Concombre
Khalpi	Népal	Concombre
Kimchi	Corée	Chou chinois, radis, gingembre, autres légumes
Kanji (boisson)	Inde	Racines de betterave et carotte
Kombucha (boisson)	Chine	Thé
Kocho	Ethiopie	False banana
Lafun	Nigéria	Manioc
Olive	Monde entier	Olives
Ogi	Nigéria	Mais, sorgo, millet

Sinki	Inde, Népal	Radis
Suan-tsai	Taiwan	Chou chinois, chou, feuilles de moutarde
Tempoyak	Malaisie	Durian
Yan-taozih	Chine, Taiwan	Pêches
Yan-tsai-chin	Taiwan	Brocoli
Tursu	Turquie	Concombre, chou, tomates vertes, poivrons verts et autres légumes

La choucroute

La choucroute est obtenue par fermentation lactique de chou blanc (*Brassica oleracea var. capitata* L. f. *alba*). Le chou blanc émincé est mélangé avec du sel puis le tout est pressé dans une cuve appropriée. Le mélange peut être couvert par un film alimentaire sur lequel de l'eau est versée pour empêcher l'air d'entrer dans la cuve. La choucroute est obtenue de façon naturelle en laissant le chou fermenter spontanément en anaérobiose. Le jus issu de la pression du chou et du sel sert de substrat pour la croissance de bactéries lactiques présentes naturellement à la surface du chou. Les espèces *Lc. mesenteroides*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* et *Pc. cerevisiae* sont responsables de la fermentation de la choucroute. Cette fermentation conduit à une rapide diminution du pH et conduit ainsi aux propriétés sensorielles caractéristiques de la choucroute. La quantité de bactéries lactiques présentes initialement à la surface du chou doit être suffisamment importante pour permettre une croissance rapide des bactéries et une rapide diminution du pH.

Le kimchi

Le kimchi est un des aliments fermentés à base de légumes les plus consommés en Corée et autres pays asiatiques, comme la Chine et le Japon. Le kimchi est un aliment traditionnel coréen obtenu par la fermentation de légumes comme du chou chinois (*Brassica rapa subsp. pekinensis*), du radis, des concombres avec plusieurs autres ingrédients comme du sel, de la poudre de poivron rouge, du gingembre, de l'ail et des poireaux. La fermentation du kimchi est conduite par des bactéries lactiques qui produisent divers composés comme des acides organiques, du CO₂, de l'éthanol, des vitamines, des composés antimicrobiens et des composés aromatiques [42]. Le kimchi est fermenté par plusieurs espèces des genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, mais les espèces *Lc. mesenteroides* et *Lb. plantarum* sont dominantes. Le kimchi est également connu pour ses propriétés antioxydantes, antidiabétiques et ses effets contre l'obésité, le cancer et l'athérosclérose [43].

Le kombucha

Le kombucha est une boisson rafraichissante originaire de Chine, obtenue par fermentation du thé (*Camelia sinensis*) et du sucre par un mélange de bactéries acétiques et de levures. Les espèces présentes appartiennent aux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* pour les bactéries acétiques et *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula* et *Mycoderma* pour les levures [44]. Les feuilles de thé sont plongées dans de l'eau bouillante et sont laissées infuser pendant 10 min. Les feuilles sont ensuite enlevées et du saccharose est ajouté. Le mélange est refroidi puis introduit dans un grand récipient, du vinaigre ou du Kombucha déjà préparé est ajouté au mélange. Le mélange est incubé à température ambiante (entre 20°C et 30°C) pendant une à huit semaines. Pendant cette période de fermentation, les champignons se développent à la surface. Après fermentation, l'amas de champignon est enlevé et la boisson est stockée à 4°C [45].

I.3. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes de microorganismes le plus largement utilisé dans la production de divers types d'aliments fermentés. Le groupe des bactéries lactiques est un groupe de microorganismes très diversifiés caractérisés par la formation d'acide lactique en tant que métabolite primaire du métabolisme des sucres.

I.3.1. Principales caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes capables de fermenter les sucres (principalement le glucose) en acide. Le principal produit de la réaction est l'acide lactique. Elles sont à Gram positif, ne forment pas de spores, se présentent sous forme de coques, de bacilles ou de bacilles arrondis (**Figure 5**) et possèdent dans leur ADN une faible proportion de bases guanine – cytosine (GC % < 50). Les bactéries lactiques sont généralement catalase négative, mais certaines possèdent une pseudo-catalase. Elles sont anaérobies mais aérotolérantes. Elles requièrent la présence d'acides aminés, d'acides gras, de vitamines et de minéraux pour leur croissance. Elles fermentent différents types de substrats : lait, fruits, légumes, céréales, poisson, viandes etc. Elles peuvent être retrouvées dans l'estomac et les intestins d'animaux et des êtres humains ou dans l'environnement. Leur capacité d'adaptation et de survie à une grande variété d'environnement est sans doute à l'origine de leur grande

diversité de métabolismes. Elles sont classées en deux catégories selon leur voie de métabolisation des glucides : homo-fermentaire (ou homolactique) ou hétéro-fermentaire (ou hétéro-lactique).

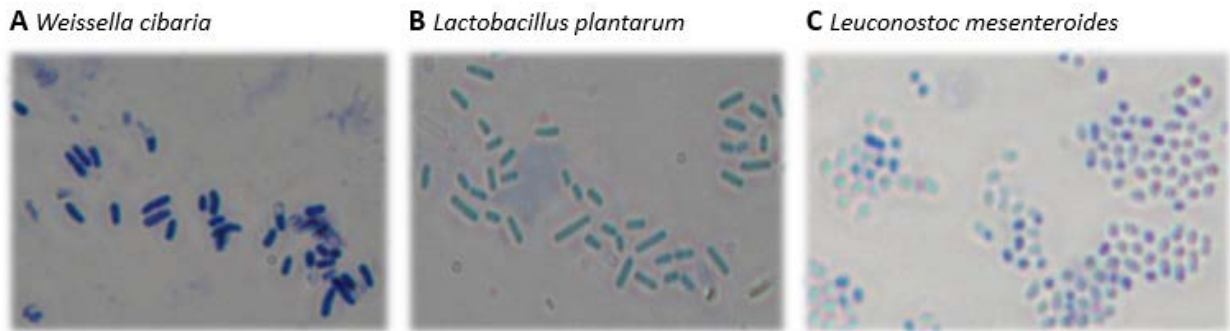
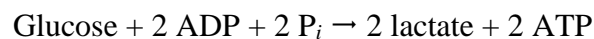


Figure 5 : Bactéries lactiques sous forme de bacilles arrondies (A), de bacilles (B) ou de coques (C), colorées au bleu de méthylène

La voie homo-fermentaire

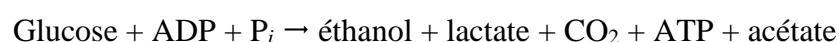
Dans la voie homo-fermentaire, le principal produit final est le lactate. La voie homo-fermentaire emprunte la voie de la glycolyse ou voie de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Lors de cette étape, le glucose est converti en deux molécules de pyruvate, avec phosphorylation de deux molécules d'ADP en ATP. Le pyruvate est ensuite converti en lactate par la lactate déshydrogénase, ce qui permet la réoxydation des cofacteurs. La réaction bilan est la suivante :



Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Pediococcus* constituent quelques genres de bactéries lactique homo-fermentaires [46,47]. Selon l'espèce, les *Lactobacillus* peuvent être soit homo-fermentaires soit hétéro-fermentaires. Par exemple, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus* sont quelques espèces *Lactobacillus* homo-fermentaires.

La voie hétéro-fermentaire

Dans la voie hétéro-fermentaire, en plus de l'acide lactique, du dioxyde de carbone (CO₂), de l'éthanol ou de l'acétate peuvent être également produits. La voie hétéro-fermentaire emprunte la voie des pentoses phosphate pour convertir le glucose. Le bilan de la réaction est le suivant :



Parmi les bactéries hétéro-fermentaires, on retrouve les genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus*. *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* sont parmi les espèces *Lactobacillus* hétéro-fermentaires. *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* et *Lb. pentosus* sont hétéro-fermentaires facultatives. L'éthanol est le composé le plus important pour l'obtention de boissons alcoolisées, telles que le vin ou la bière. La production de dioxyde de carbone apporte des caractéristiques sensorielles particulières au produit, comme un effet pétillant ou rafraichissant. Le CO₂ participe également à la levée de la pâte à pain pendant la fermentation et permet d'obtenir une texture aérée. Certaines bactéries lactiques sont capables de produire une part d'acide acétique également.

I.3.2. Taxonomie

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum XIII des *Firmicutes*, la classe I des *Bacilli* et l'ordre II des *Lactobacillales*. Il existe plus de 500 espèces de bactéries lactiques classées sous forme de genres répartis en six grande familles [48] :

- ***Lactobacillaceae*** qui comprend les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.
- ***Aerococcaceae*** qui comprend les genres *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* et *Ignavigranum*.
- ***Carnobacteriaceae*** qui comprend les genres *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granlucateella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus* et *Trichococcus*.
- ***Enterococcaceae*** qui comprend les genres *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.
- ***Leuconostocaceae*** qui comprend les genres *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- ***Streptococcaceae*** qui comprend les genres *Lactococcus*, *Lactovum* et *Streptococcus*.

I.3.3. Les molécules d'intérêt

Pendant la fermentation, les bactéries lactiques synthétisent un certain nombre de composés qui permettent d'allonger la durée de conservation de l'aliment et d'améliorer les propriétés sanitaires, sensorielles et nutritionnelles.

1.3.3.1. L'acide lactique

L'acide lactique, de formule chimique $C_3H_6O_3$, devient en solution aqueuse l'ion lactate $CH_3CH(OH)COO^-$, son pKa est de 3,86. Deux isomères d'acide lactique peuvent être produits pendant la fermentation, l'isomère D(-) ou l'isomère L(+) (**Figure 6**). L'isomère L(+) est assimilé par les cellules intestinales et utilisé pendant les activités métaboliques chez l'humain. Au contraire, l'isomère D(-) n'est pas assimilé et est éliminé par les reins sous forme de sels [48]. Les acides organiques ont un effet antimicrobien et assurent une sécurité sanitaire des produits fermentés. Sous forme non ionisée, ils entrent dans les cellules par diffusion simple. Aux pH intracellulaires, ils sont ionisés et ne peuvent plus sortir de la cellule par diffusion. Ils interfèrent avec le maintien du potentiel de la membrane cellulaire, en inhibant le transport actif, en réduisant le pH intracellulaire et en inhibant certaines fonctions métaboliques [49].

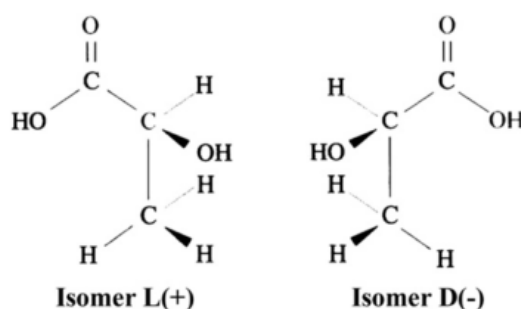


Figure 6 : Stéréoisomères L(+) et D(-) de l'acide lactique

1.3.3.2. Les *exo-polysaccharides*

Pendant la fermentation, les bactéries lactiques peuvent synthétiser des polysaccharides de surface. Ces polysaccharides sont soit excrétés dans leur milieu environnant, et sont appelés *exo-polysaccharides* (EPS). Soit, ils restent attachés à la surface de la cellule sous forme de capsules et sont appelés *polysaccharides capsulaires* (PSC) [50]. Ce sont des polymères de sucres classés en deux catégories : les *hétéro-polysaccharides* (HePS) et les *homo-polysaccharides* (HoPS). Les HePS sont composés de plusieurs types de sucres comme du glucose, du galactose, du rhamnose, du mannose, du *N*-acétylglucosamine ou de l'acide glucuronique. Les HoPS sont composés d'un seul type de monosaccharide et sont classés en quatre catégories : les α -D-glucanes, les β -D-glucanes, les fructanes et les polygalactanes [51]. Les espèces *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus* et *Streptococcus* sont connues pour synthétiser des EPS.

Les EPS dans l'industrie alimentaire

Dans l'industrie alimentaire les bactéries lactiques productrices d'EPS sont utilisées pour augmenter la viscosité et améliorer la texture. Les EPS produits agissent en tant qu'agent gélifiant, épaississant, émulsifiant et stabilisant. Ils sont utilisés pour améliorer la texture des produits laitiers tels que les yaourts, les fromages, les crèmes etc. [52]. Un dextrane (autre nom de glucane) produit par *Leuconostoc mesenteroides* a bénéficié d'un avis positif de l'EFSA (European Food Safety Authority – Autorité européenne de sécurité des aliments) mais n'est pas encore inscrit dans la liste positive des additifs alimentaires autorisés en France.

Bénéfices nutritionnels des EPS

Le rôle des EPS pour les bactéries lactiques n'est pas encore clairement compris mais ils serviraient de moyens de défense contre des conditions de stress (stress osmotique, antibiotiques, molécules toxiques) [53]. Plusieurs études ont montré l'effet antioxydant des EPS, capables de neutraliser les ROS [54–56]. De plus, les EPS ont montré plusieurs effets bénéfiques pour l'Homme, au niveau du système immunitaire, de l'estomac, du sang et de l'intestin, schématisés en **Figure 7**.

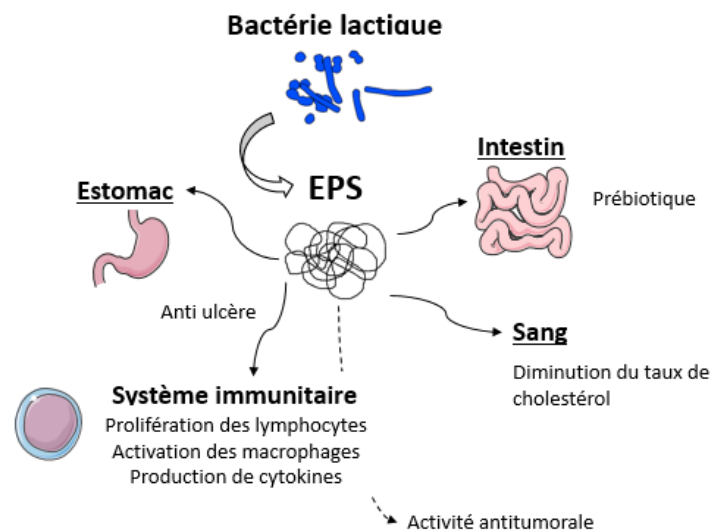


Figure 7 : Représentation schématique des possibles effets bénéfiques des EPS au niveau de l'organisme humain, d'après [51]

1.3.3.3. Les bactériocines

Les bactériocines sont des protéines ou peptides antibactériens produites par certaines bactéries lactiques qui inhibent la croissance de certaines bactéries à Gram (+) ou (-). Elles

peuvent être également actives contre les bactéries lactiques. Les bactériocines sont classées en trois classes en fonction de leur composition et de leur structure [57,58] :

- Classe I : Les lantibiotiques. Ce sont de petits peptides (< 5 kDa) stables à la chaleur contenant des acides aminés tels que la lanthionine ou la méthyllanthionine. La nisine (E234), qui est actuellement la seule bactériocine autorisée comme additif dans l'industrie alimentaire appartient à cette classe.
- Classe II : Les non-lantibiotiques. Les bactériocines de classe II sont de petits peptides (< 10 kDa), relativement stables à la chaleur ne contenant pas de lanthionine. Elles sont divisées en quatre sous-classes : IIa, IIb, IIc et IId. La classe IIa comprend de petits peptides thermiquement stables, synthétisés sous forme de précurseurs et actifs contre *Listeria*. La classe IIb comprend les bactériocines composées de deux différents peptides. La classe IIc comprend les bactériocines formant une structure circulaire, les deux extrémités N et C-terminales étant liées de façon covalente. La classe IId inclut les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être incluses dans les précédentes sous-classes, les bactériocines ne possédant pas de peptides signales et les bactériocines *sec*-dépendantes. Celles-ci possèdent le peptide signal *sec* qui leur permet de traverser la membrane cytoplasmique par la voie *sec*-dépendante.
- Classe III : Grosses molécules sensibles à la chaleur (> 30 kDa).

Les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella* sont connues pour produire des bactériocines. Les bactériocines sont généralement nommées en fonction de l'espèce. Par exemple, les leucocines, les pédiocines, les entérocoques et les weissellicines sont les bactériocines produites par les genres *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*, respectivement.

1.3.3.4. Autres substances antimicrobiennes

Pendant le processus de fermentation, les bactéries lactiques produisent d'autres composés antimicrobiens qui inhibent la croissance d'autres microorganismes potentiellement pathogènes ou contaminants, comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le CO₂, le diacétyl. Les acides organiques, tels que l'acide lactique ou l'acide acétique possèdent une action antimicrobienne contre les levures et les bactéries à gram positif ou négatif [59]. Le cofacteur NAD peut réagir avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [60]. Le peroxyde d'hydrogène est toxique pour les bactéries à Gram positif y compris pour les bactéries lactiques, elles-mêmes. La peroxydation des lipides

membranaires et l'oxydation des acides nucléiques bactériens peuvent être à l'origine de la toxicité du H₂O₂. Le diacétyl contribue aux propriétés sensorielles caractéristiques du beurre et des fromages. Il possède une action antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif et les levures, et plus faiblement contre les bactéries à Gram positif [61]. En revanche, le diacétyl possède un seuil de perception très bas et n'est pas désirable dans certains aliments, comme la bière [61].

I.4. Bénéfices nutritionnels et effets santé des aliments végétaux fermentés

I.4.1. La préservation et la durée de conservation

La durée de conservation d'un aliment est définie comme la période pendant laquelle l'aliment reste consommable, sûr pour la santé, sans aucun risque pathogène (innocuité) et gardant l'ensemble de ses propriétés sensorielles et nutritionnelles (salubrité). Plusieurs facteurs peuvent affecter la durée de conservation d'un aliment comme le pH, l'activité de l'eau, la quantité d'oxygène disponible et la microflore de l'aliment. D'autre part, les fruits et les légumes frais sont associés à plusieurs dangers pathogènes, tels que les salmonelles ou *E. coli*.

L'augmentation de la durée de conservation est le principal objectif de la fermentation lactique. La production d'acide pendant la fermentation diminue le pH et crée un environnement acide non propice à la croissance des autres microorganismes contaminants et pathogènes. Une étude réalisée sur de la purée de poire fermentée par *Lc. mesenteroides* a montré que la purée fermentée se conservait à 4°C pendant 21 jours. Contrairement à la purée fermentée, la purée témoin (non fermentée) a été caractérisée par un développement important de levures et d'entérobactéries [62]. Les mêmes résultats ont été observés pour un smoothie à base de fruits et/ou légumes fermentés par *W. cibaria* et des souches *Lactobacillus* après 30 jours de conservation à 4°C [7]. De plus, la production de bactériocines par certaines bactéries lactiques joue un rôle considérable dans la préservation du produit. La biopréservation, aussi appelée bioconservation, est une méthode de préservation des aliments par des microorganismes, appelés cultures protectrices [63]. Cette méthode consiste à inoculer l'aliment avec un microorganisme non pathogène, capable d'inhiber la croissance des microorganismes indésirables tout en préservant les caractéristiques sensorielles du produit. De par leurs propriétés antibactériennes (bactériocines et autres composés antimicrobiens) et leurs effets bénéfiques pour la santé, les bactéries lactiques sont de potentiels candidats pour la biopréservation des aliments [64].

I.4.2. L'élimination des composés antinutritionnels

Les végétaux peuvent contenir plusieurs facteurs antinutritionnels comme les saponines, les tanins, les inhibiteurs enzymatiques (anti-protéase, anti-amylase, anti-invertase, anti-trypsine), les oxalates, l'acide phytique, les lectines ou les glucosides cyanogéniques [65]. Ils sont appelés antinutritionnels car ils interfèrent avec l'absorption des nutriments. L'acide phytique est présent dans les céréales et les graines oléagineuses et constitue, chez les plantes, la forme de stockage principale de phosphore. Avec ses six groupements phosphate, l'acide phytique peut former des complexes avec les ions métaux (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) (**Figure 8**), diminuant ainsi la biodisponibilité de ces minéraux. Par cette caractéristique, l'acide phytique est considéré comme un facteur antinutritionnel [66,67].

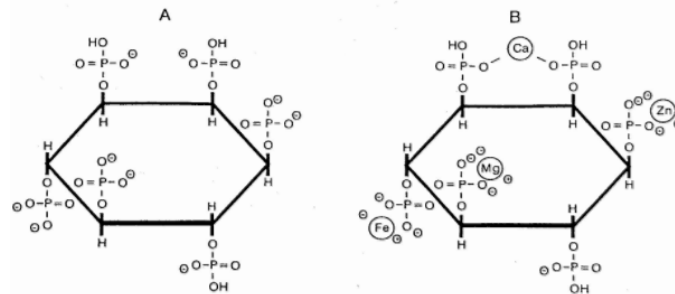


Figure 8 : Molécule d'acide phytique (A) et complexe formé entre l'acide phytique et les métaux (B)

La teneur en acide phytique est passée de $11,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$, $14,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $12,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $0,2 \mu\text{mol.g}^{-1}$, $0,1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $7,2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ dans des graines de seigle, de blé et d'avoine, respectivement, après 24 h de fermentation lactique [66]. La fermentation a permis d'éliminer 85,5 % en inhibiteur anti-trypsine présent dans les flocons de soja [68]. Une diminution de 80 à 90 % en acide phytique a été observée après fermentation d'une pâte à pain par des bactéries lactiques (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* et *Lb. curvatus*) [69].

Les glucosides cyanogéniques (GC) (linamarine et lotaustraline), présents naturellement dans le manioc, sont considérés comme des facteurs antinutritionnels. Le manioc est consommé en Afrique, en Amérique latine et en Asie comme aliment de base. Il est transformé avant consommation à cause de la forte toxicité des cyanogènes [70,71]. Plusieurs aliments obtenus par fermentation du manioc, comme le Gari, le Fufu ou le Lafun sont consommés en Afrique. Une réduction de 77,53 % en GC a été observée après fermentation lactique de manioc [72]. Au bout de 29 h de fermentation de manioc par une souche de *Lb. plantarum*, tous les GC étaient dégradés [73]. La dégradation des GC est possible grâce à une enzyme, la linamarase (ou β -glucosidase). Cette enzyme dégrade la linamarine en cyanhydrine, qui une fois

des alcanes et des terpènes [38]. Une fermentation lactique avec des souches *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*, productrices d'EPS, a augmenté la viscosité de purée de carotte de 80 % à 280 %, la rendant ainsi plus épaisse et plus élastique [76].

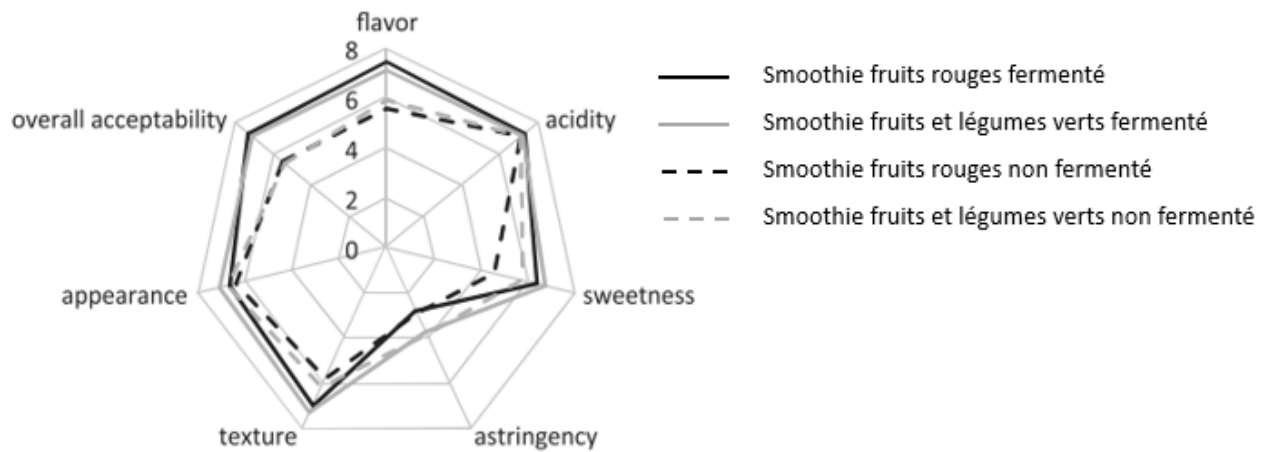


Figure 10 : Profil sensoriel comparatif de smoothies fermentés et non fermentés [7]

I.4.4. La préservation des minéraux et des vitamines

En dégradant l'acide phytique, la fermentation lactique conduit ainsi à une meilleure biodisponibilité des minéraux. Une souche de *Lc. mesenteroides* a été utilisée pour fermenter un milieu contenant de la farine de blé entier et de l'eau. Au cours de la fermentation, les concentrations en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} solubles augmentaient, corrélées à une nette diminution de la teneur en acide phytique [77]. La fermentation de lait de soja par des souches de *Lactobacillus* a conduit à une meilleure biodisponibilité du calcium, du magnésium et du zinc. De plus, la concentration en vitamines B, riboflavine et niacine augmentait au cours de la fermentation [78]. Les effets de différents processus de transformation de maïs sur la biodisponibilité du fer ont été étudiés. Le maïs a été chauffé pour obtenir du porridge, décortiqué pour obtenir des galettes (arepa), fermenté pour obtenir un produit appelé ogi et nixtamalisé (cuisson dans une solution alcaline) pour obtenir des tortillas. La fermentation est le seul procédé où l'augmentation de la biodisponibilité du fer a été significative (12 %) [79]. Les bactéries lactiques sont également capables de synthétiser des vitamines (essentiellement du groupe des vitamines B), et l'utilisation de cette capacité est une voie intéressante pour obtenir des aliments aux propriétés nutritionnelles améliorées [20,80].

I.4.5. L'amélioration de la digestibilité

Certaines bactéries lactiques possèdent plusieurs enzymes intracellulaires et extracellulaires permettant de mieux digérer les aliments comme les α -amylases, les pectinases, les phytases et les protéinases. Ces bactéries lactiques utilisent l' α -amylase pour hydrolyser l'amidon, et transforment les molécules de glucose ainsi libérées en acide lactique au cours de la fermentation [81]. Les protéases permettent d'hydrolyser les protéines végétales pendant la fermentation et certains composés indigestes comme les composés sulfurés.

I.4.6. Les probiotiques

Ces dernières années, la recherche d'aliments bénéfiques pour la santé s'est intensifiée. Les fibres alimentaires intéressent de plus en plus les scientifiques. Les fibres alimentaires sont fermentées par la microflore intestinale et constituent donc une source d'énergie pour ces bactéries. De récentes études ont montré que la composition et la croissance des bactéries intestinales pouvaient être influencées par la quantité et le type de fibre alimentaire ingérée par l'organisme [82]. De par ces observations, le terme prébiotique a été créé. Un prébiotique est défini comme un ingrédient qui modifie la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal en apportant des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte. Parmi les ingrédients utilisés en tant que prébiotiques, on retrouve les galacto-oligosaccharides ou les fructo-oligosaccharides [83]. Les travaux portant sur l'étude du microbiote intestinal se sont multipliés et certains aliments fermentés, comme le yaourt, ont été associés à des effets bénéfiques pour le transit intestinal. Ces effets bénéfiques sont associés plus précisément aux bactéries lactiques présentes dans ces aliments et le terme probiotique leur a été attribué. Un probiotique est un organisme vivant qui, une fois ingéré en quantité suffisante, exerce plusieurs activités bénéfiques pour l'hôte, en particulier sur le transit intestinal [84]. Plusieurs espèces de bactéries lactiques sont considérées comme des probiotiques telles que : *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bb. longum*, *Bb. infantis* ou encore *Lactococcus lactis*. Ces espèces sont souvent retrouvées dans les aliments fermentés, mais un aliment fermenté ne contient pas forcément des probiotiques. Les propriétés bénéfiques des probiotiques incluent : une action antimicrobienne contre les agents pathogènes, ne pas être reconnu comme un corps étranger par le système immunitaire de l'hôte, posséder des propriétés antimutagène et anticarcinogène et améliorer le transit intestinal.

I.4.7. Augmentation des capacités antioxydantes

L'augmentation de l'activité antioxydante observée pendant la fermentation lactique est principalement due à la dépolymérisation de composés phénoliques [8]. Pendant la fermentation lactique des végétaux, les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser les composés phénoliques présents sous forme de polymères, libérant ainsi des molécules bioactives en augmentant leur biodisponibilité. Plusieurs enzymes impliquées dans ces mécanismes d'hydrolyses ont été caractérisées, telles que la féruloyl estérase, la β -glucosidase, la tanase et la phenolic acid decarboxylase (PAD) [85]. Les β -glucosidases hydrolysent les liaisons β -glucosidiques des oligosaccharides, des pigments, des glucosides cyanogéniques. La tanase hydrolyse les liaisons ester présentes dans les gallotanins, les polymères de tanins et les esters d'acide gallique [86]. Les féruloyl estérases hydrolysent les liaisons esters présentes dans les polymères d'acides hydroxycinnamiques, libérant ainsi de l'acide férulique, de l'acide caféique ou de l'acide ρ -coumarique [87]. La PAD catalyse la décarboxylation des acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide ρ -coumarique, acide férulique) en leur dérivés vinyl (vinylcatéchol, ρ -vinylphénol, vinylguaiacol, respectivement) [88].

Une métabolisation des composés phénoliques corrélée à une augmentation de l'activité antioxydante a été observée pendant la fermentation lactique du thé [89]. La métabolisation des acides protocatechique, caféique et ρ -coumarique en catéchol, vinyl catechol, acide dihydrocaféique et ρ -vinylphénol par des espèces *Lactobacillus* a été démontrée [90]. L'activité feruloyl estérase a été détectée chez certaines bactéries lactiques, essentiellement des *Lactobacillus* : *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* et *Lb. fermentum* [23,91]. Après fermentation lactique du niébé (ou cornille, espèce végétale originaire d'Afrique), plusieurs nouveaux composés phénoliques qui n'étaient pas présent à l'origine dans le produit frais, sont apparus tels que le tyrosol et la quercétine. De plus, la teneur de certains glycosides de quercétine a diminué [37].