

MARIE-CLAUDE GENTÈS

**COMPRÉHENSION DU RÔLE STRUCTURAL
D'EXOPOLYSACHARIDES DE BACTÉRIES
LACTIQUES DANS DES SYSTÈMES LAITIERS
FERMENTÉS ENRICHIS EN AMIDON MODIFIÉ**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Sciences et technologie des aliments
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

Résumé

Au Canada, l'utilisation d'amidon modifié dans le yogourt est usuel afin d'éviter des défauts de qualité comme la synérèse. Malgré cet ajout, les défauts demeurent. Les exopolysaccharides (EPS) produits naturellement par certaines bactéries lactiques suscitent un intérêt technologique dus à leur capacité de rétention d'eau et à moduler la viscosité. La structure des EPS et leurs interactions avec les protéines seraient responsables de ces effets plutôt que de la concentration produite. Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée sur l'utilisation conjointe d'amidon modifié et d'EPS dans les yogourts.

Le but de ce travail était d'étudier le rôle structural des EPS produits *in situ* par certaines bactéries lactiques sur les propriétés rhéologiques/physiques (formation de gel, fermeté, viscosité, synérèse) et la microstructure de systèmes laitiers avec amidon modifié. Quatre ferments constitués chacun d'une souche de *Streptococcus thermophilus* et d'une souche de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, produisant des EPS aux caractéristiques structurales connues, ont été utilisés: HC15/210R (contrôle), HC15/291 (EPS neutre, rigide, peu ramifié), HC15/702074 (EPS neutre, flexible, hautement ramifié), 2104/210R (EPS chargé, rigide, linéaire). Le pH final de 4.6 a été atteint pour tous les ferments après 180-210 minutes à 42 °C. Le processus de formation de gel n'a pas été influencé par la présence d'EPS. La comparaison de plusieurs EPS aux structures connues a permis d'établir que l'EPS chargé du ferment 2104/210R améliorerait la fermeté en plus de contribuer à la viscosité. L'EPS neutre, rigide et peu ramifié du ferment HC15/291 améliorerait significativement la viscosité et la rétention du sérum comparativement à l'EPS neutre, hautement ramifié et flexible du ferment HC15/702074. Malgré que le lissage ait diminué significativement les propriétés rhéologiques/physiques des systèmes laitiers, la fonctionnalité des EPS est maintenue. L'ajout d'amidon modifié a amélioré les propriétés rhéologiques/physiques des systèmes laitiers brassés tandis que peu d'effets ont été observés pour les systèmes laitiers fermes. Finalement, ce travail a démontré qu'il est possible d'améliorer les propriétés rhéologiques/physiques de systèmes laitiers par l'utilisation conjointe d'EPS aux caractéristiques structurales spécifiques et d'amidon modifié.

Abstract

In Canada, modified starch addition in yoghurt is frequent in order to limit technological defects such as syneresis. Despite the addition of modified starch, technological defects still occur. Exopolysaccharides (EPS) produced naturally by some lactic acid bacteria can be used as stabilizers in yoghurt. Literature indicates that their properties to bind water and to modulate viscosity are not correlated to EPS concentration but to their structure and interactions with milk proteins. To our knowledge, this is the first work that has studied the effect of combined use of modified starch and EPS in yoghurt.

The aim of this work was to study the structure-function relationship of EPS produced *in situ* by lactic acid bacteria on the rheological/physical properties (gel formation, viscosity, firmness, stiffness) and the microstructure of fermented dairy systems with modified starch. Four starters composed of one strain of *Streptococcus thermophilus* and one strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and producing EPS with known structure were studied: HC15/210R (control), HC15/291 (neutral, stiff, few branched EPS), HC15/702074 (neutral, flexible, highly branched EPS) and 2104/210R (anionic, stiff, linear, EPS). A final pH of 4.6 was obtained after a fermentation of 180-210 minutes à 42 °C for all starters. The gel formation process was not influenced by the presence of EPS. The comparison of several EPS of known structure has shown that the anionic EPS from 2104/210R starter improved firmness and viscosity. Neutral, stiff and few branched EPS from HC15/291 starter contributed to viscosity and limited syneresis comparatively to the neutral, flexible and highly branched EPS from HC15/702074 starter. Although the smoothing process had a negative impact on the values of all rheological/physical properties of fermented dairy systems, the functionality of EPS remained. The addition of modified starch improved the rheological/physical properties of stirred fermented dairy systems but had no effect on set fermented dairy systems. To conclude, this work has shown that the rheological/physical properties of fermented dairy systems may be improved by the combination of modified starch and EPS with specific structural characteristics.

Avant-propos

Cette thèse est constituée de 6 chapitres. Les expérimentations ont été entièrement réalisées au Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada de Saint-Hyacinthe. J'ai personnellement planifié toutes les expérimentations, effectué toutes les analyses et rédigé les articles en découlant. À ce jour, aucun des articles présentés dans cette thèse n'a été soumis ou publiés dans des journaux scientifiques. Ce projet a été supervisé par Dr. Sylvie Turgeon, directrice et Dr. Daniel St-Gelais (co-directeur). Tous deux ont agi à titre de conseillers selon leur expertise.

Le premier chapitre est un document de référence théorique situant le projet de recherche en fonction des principes fondamentaux et des récents progrès sur le sujet. Les thèmes suivants y sont abordés : procédé de fabrication du yogourt, défauts de qualité du yogourt, amidons modifiés (agents stabilisants), exopolysaccharides (EPS) de bactéries lactiques, interactions protéines-polysaccharides ainsi que les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure du yogourt. Le but et l'hypothèse de recherche ainsi que l'objectif général et les objectifs spécifiques sont également présentés dans ce chapitre.

Le second chapitre présente le premier objectif de la thèse visant à étudier la relation structure-fonction des EPS dans des laits fermentés. Cet article a été soumis au journal «Dairy Science and Technology» en Février 2011. Pierre Ward, assistant de recherche au CRDA, m'a aidé et supporté dans l'élaboration des analyses moléculaires visant à déterminer l'identité des bactéries lactiques utilisées. Dans le cadre de stages, Marie Forquet, étudiante, a participé à une partie des expérimentations présentées dans cet article. Daniel St-Gelais et Sylvie Turgeon sont les co-auteurs de cet article et ont supervisé ce travail de recherche.

Le troisième chapitre avait pour but d'étudier les interactions entre les protéines laitières et les EPS. Cet article sera soumis éventuellement à un journal scientifique. Anthony Jourdan, étudiant stagiaire, m'a aidé à réaliser les manipulations concernant le développement du système laitier modèle. Les co-auteurs de cet article, Daniel St-Gelais et Sylvie Turgeon, ont supervisé et agi à titre de conseillers.

Le quatrième chapitre portait sur l'effet de la concentration en amidon modifié sur la fonctionnalité des EPS dans le système laitier modèle. Cet article fera ultérieurement l'objet d'une soumission dans un journal scientifique. Laureline Zajac, étudiante stagiaire, a participé à l'élaboration d'une partie des expérimentations présentées dans cet article. Cette partie de la thèse a été supervisée par Daniel St-Gelais et Sylvie Turgeon, co-auteurs.

Le cinquième chapitre présente une étude sur de l'utilisation de ferments producteurs d'EPS, de l'ajout d'amidon modifié et de l'effet du lissage sur les propriétés rhéologiques/physiques de yogourts fabriqués à l'échelle pilote. Cet article sera soumis ultérieurement dans un journal scientifique pour publication. J'ai entièrement planifié et réalisé toutes les expérimentations présentées dans cet article. Gaétan Bélanger, assistant de recherche au CRDA, m'a aidé pour la manipulation des équipements à l'usine pilote lors de la fabrication de yogourts. Les co-auteurs de cet article, Daniel St-Gelais et Sylvie Turgeon, ont agi à titre de conseillers.

Le dernier chapitre présente une discussion générale de la relation structure-fonction des EPS englobant tous les résultats obtenus aux chapitres précédents sous forme de tableau intégrateur. J'ai personnellement analysé et préparé le tableau intégrateur ainsi que résumé les éléments importants de ce projet de recherche présentés dans cette section.

Cette thèse se termine par une conclusion générale. Finalement, la section «*Perspectives*» présente les améliorations à apporter pour des futurs travaux, de même que des pistes à étudier pour permettre l'applicabilité de cette technologie à l'industrie laitière canadienne.

Remerciements

Voici maintenant que mon aventure doctorale se termine...ma route a été parsemée de rencontres avec des gens inspirants et dévoués à la science alimentaire.

Cette aventure a été possible grâce à deux personnes que j'apprécie et que je respecte énormément : ma directrice, Sylvie Turgeon et mon co-directeur, Daniel St-Gelais. Je vous remercie chaleureusement pour votre confiance à mon égard, pour vos judicieux conseils ainsi que le temps et l'énergie que vous m'avez consacrés. Vous avez été des mentors extraordinaires. Je garde d'heureux moments de cette aventure doctorale avec vous.

Un remerciement particulier est adressé à la Commission canadienne du lait, Novalait Inc. ainsi que le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies de m'avoir accordé une bourse d'excellence pour effectuer mes études doctorales. Je veux également remercier le Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA) de m'avoir accueilli durant toutes ses années et de m'avoir permis de bénéficier des installations de l'usine pilote, de même que tous les appareils d'analyses.

Je tiens également à remercier les assistantes de recherche : Sophie Turcot et Annie Caron pour leur aide et soutien en laboratoire de même que mes collègues de bureau : Caroline Lapointe et Sabine Ribéreau, pour leur soutien moral et nos jasettes matinales. Je remercie aussi tous mes collègues du CRDA pour leurs judicieux conseils et leur écoute attentive lors de mes pratiques de présentations orales pour des séminaires et/ou congrès. Merci à mes stagiaires : Marie Forquet, Marie-Soleil Lacroix, Anthony Jourdan et Laureline Zajac pour leur aide en laboratoire. Je remercie aussi Pierre Ward, assistant de recherche au CRDA, pour sa précieuse aide et son expertise en biologie moléculaire. Je tiens aussi à remercier Gaétan Bélanger, assistant de recherche au CRDA, pour sa précieuse aide pour la manipulation des équipements à l'usine pilote et son expertise.

*Un énorme **MERCI** à mes parents, mon conjoint, ma sœur et mon frère ! Merci de croire en moi, de m'encourager et de me soutenir dans tout ce que j'entreprends !*

À mes parents, Hélène et René

Most people say that it is intellect which makes a great scientist. They are wrong; it is character (Albert Einstein).

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
REMERCIEMENTS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 DÉFINITION DU YOGOURT	2
1.2 PROCÉDÉ DE FABRICATION DU YOGOURT	2
1.2.1 <i>Composition et standardisation du mélange laitier</i>	3
1.2.2 <i>Homogénéisation</i>	4
1.2.3 <i>Traitement thermique</i>	4
1.2.4 <i>Fermentation lactique</i>	5
1.2.5 <i>Conditionnement et entreposage</i>	7
1.3 PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES/PHYSIQUES ET MICROSTRUCTURE DU YOGOURT.....	9
1.3.1 <i>Comportements du yogourt à faibles déformations</i>	9
1.3.1.1 Changements physico-chimiques résultant de la formation de gel du yogourt.....	9
1.3.1.2 Suivi de la formation de gel du yogourt	10
1.3.1.3 Fermeté du yogourt	11
1.3.2 <i>Comportements du yogourt aux larges déformations</i>	12
1.3.2.1 Texture et évaluation sensorielle du yogourt.....	12
1.3.2.2 Viscosité du yogourt	12
1.3.3 <i>Aptitude à la synérèse du yogourt</i>	13
1.3.4 <i>Microstructure du yogourt</i>	14
1.4 FACTEURS INFLUENÇANT LES PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES/PHYSIQUES ET LA MICROSTRUCTURE DU YOGOURT.....	15
1.4.1 <i>Mélange laitier utilisé pour la fabrication du yogourt</i>	15
1.4.2 <i>Procédés de fabrication du yogourt</i>	16
1.4.3 <i>Agents stabilisants utilisés dans le yogourt</i>	19
1.5 AMIDONS : PROPRIÉTÉS ET UTILISATIONS DANS LES YOGOURTS.....	21
1.5.1 <i>Considérations générales</i>	21
1.5.2 <i>Mode d'action de l'amidon</i>	23
1.5.3 <i>Interactions amidon-autres constituants du yogourt</i>	24
1.6 EXOPOLYSACCHARIDES DE BACTÉRIES LACTIQUES.....	26
1.6.1 <i>Définition des exopolysaccharides</i>	26
1.6.2 <i>Synthèse d'exopolysaccharides</i>	26
1.6.2.1 Rôle physiologique de la production d'exopolysaccharides.....	26
1.6.2.2 Biosynthèse d'exopolysaccharides	27
1.6.2.3 Variabilité de la production d'exopolysaccharides.....	28
1.6.3 <i>Structure moléculaire des exopolysaccharides</i>	28
1.6.4 <i>Facteurs influençant la production d'exopolysaccharides</i>	29
1.6.4.1 Effet de la souche et de l'espèce.....	29
1.6.4.2 Effet du milieu de culture.....	30

1.6.4.3 Effet de la température d'incubation	31
1.6.4.4 Effet du stade de croissance bactérienne	32
1.6.4.5 Effet du temps de fermentation	32
1.6.4.6 Effet de la vitesse d'acidification	33
1.6.4.7 Effet du pH	33
1.6.4.8 Effet de la quantité d'oxygène	33
1.6.5 <i>Extraction des exopolysaccharides</i>	34
1.6.6 <i>Quantification des exopolysaccharides</i>	36
1.6.7 <i>Relation structure-fonction des exopolysaccharides</i>	37
1.6.7.1 Effet du poids moléculaire	37
1.6.7.2 Effet de la conformation de la chaîne	38
1.6.7.3 Effet de la charge	39
1.6.7.4 Interactions dans les gels acides de type yogourts	40
1.7 INTERACTIONS POLYSACCHARIDES-PROTÉINES	43
1.8 BUT	46
1.9 HYPOTHÈSE	46
1.10 OBJECTIF GÉNÉRAL	46
1.11 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	46
CHAPITRE 2 : GEL FORMATION AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF FERMENTED MILK WITH <i>IN SITU</i> EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA	48
RÉSUMÉ	49
ABSTRACT	50
2.1 INTRODUCTION	51
2.2 MATERIAL AND METHODS	53
2.2.1 <i>Bacterial strains, media, growth conditions</i>	53
2.2.2 <i>Growth kinetics</i>	55
2.2.3 <i>EPS production</i>	55
2.2.4 <i>Ropy character of EPS in milk during growth kinetics</i>	56
2.2.5 <i>Gel formation of fermented milk</i>	56
2.2.6 <i>Rheological measurements of fermented milk</i>	57
2.2.7 <i>Evaluation of syneresis</i>	58
2.2.8 <i>Statistical methods</i>	58
2.3 RESULTS	59
2.3.1 <i>Growth kinetics and EPS production</i>	59
2.3.2 <i>Ropy character of EPS in milk during growth kinetics</i>	64
2.3.3 <i>Acidification profile and Gel formation of fermented milk</i>	64
2.3.4 <i>Rheological/physical properties of fermented milk</i>	67
2.4 DISCUSSION	70
2.4.1 <i>EPS production</i>	70
2.4.2 <i>Ropy character of EPS</i>	71
2.4.3 <i>EPS structure-function relationship on gel formation</i>	72
2.4.4 <i>EPS structure-function relationship on rheological/physical properties</i>	74
2.5 CONCLUSIONS	77
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	77
CHAPITRE 3 : EFFECT OF MILK PROTEIN COMPOSITION AND <i>IN SITU</i> EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES AND THE MICROSTRUCTURE OF DAIRY MODEL SYSTEM	78
RÉSUMÉ	79
ABSTRACT	80
3.1 INTRODUCTION	81
3.2 MATERIAL AND METHODS	83
3.2.1 <i>Material</i>	83
3.2.2 <i>Bacterial strains and starter preparation</i>	83
3.2.3 <i>Dairy model system preparation</i>	85
3.2.4 <i>Fermentation of dairy model system</i>	86

3.2.5 Ropy character of EPS	86
3.2.6 Analytical methods	87
3.2.7 Microscopy	87
3.2.8 Rheological properties	88
3.2.9 Statistical methods	89
3.3 RESULTS	89
3.3.1 Effect of casein concentration	89
3.3.1.1 Composition and buffering capacity	89
3.3.1.2 Bacterial growth, lactic acid production, EPS production and ropy character	91
3.3.2 Effect of whey protein concentration	93
3.3.2.1 Composition	93
3.3.2.2 Bacterial growth and EPS production	94
3.3.2.3 Rheological properties	94
3.3.3 Microstructure	96
3.4 DISCUSSION	99
3.4.1 Bacterial growth and EPS production	99
3.4.2 EPS structure-function relationship	101
3.4.3 Microstructure	103
3.5 CONCLUSIONS	105
CHAPITRE 4 : EFFECT OF MODIFIED STARCH CONCENTRATION AND IN SITU EPS PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES AND THE MICROSTRUCTURE OF DAIRY MODEL SYSTEM	106
RÉSUMÉ	107
ABSTRACT	108
4.1 INTRODUCTION	109
4.2 MATERIALS AND METHODS	111
4.2.1 Material	111
4.2.2 Bacterial strains and starter preparation	111
4.2.3 Dairy model system preparation	111
4.2.4 Fermentation process	112
4.2.5 Gel formation, rheological properties and syneresis	112
4.2.6 Analytical methods	112
4.2.7 Microscopy	113
4.2.8 Statistical methods	113
4.3 RESULTS AND DISCUSSION	114
4.3.1 Dairy model system composition	114
4.3.2 Microbiological population and fermentation process	114
4.3.3 Gel formation	115
4.3.4 Rheological properties and syneresis	118
4.3.5 Microstructure	124
4.4 CONCLUSIONS	127
CHAPITRE 5 : EFFECT OF MODIFIED STARCH ADDITION AND <i>IN SITU</i> EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES AND THE MICROSTRUCTURE OF SET AND STIRRED YOGHURTS	128
RÉSUMÉ	129
ABSTRACT	130
5.1 INTRODUCTION	131
5.2 MATERIAL AND METHODS	133
5.2.1 Materials	133
5.2.2 Bacterial strain and starter preparation	133
5.2.3 Manufacture of yoghurt	134
5.2.4 Analytical methods	135
5.2.5 Rheological and physical properties of yoghurt	135

5.2.6 Microscopy.....	135
5.2.7 Statistical methods.....	136
5.3 RESULTS	137
5.3.1 Composition and fermentation	137
5.3.2 Evolution of pH, lactic acid and bacterial population during storage.....	137
5.3.3 Rheological and physical properties of yoghurt during storage	143
5.3.3.1 Apparent viscosities	143
5.3.3.2 Firmness.....	145
5.3.3.3 Elastic modulus	145
5.3.3.4 Syneresis	150
5.3.4 Microstructure of yoghurt	151
5.4 DISCUSSION	153
5.4.1 EPS structure-function relationship in set yoghurt	153
5.4.2 EPS structure-function relationship in stirred yoghurt	158
5.4.3 Effect of storage on EPS structure-function relationship.....	160
5.5 CONCLUSIONS.....	161
5.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	161
CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE	162
6.1 FORMATION DU RÉSEAU CASÉIQUE QU'EST LE YOGOURT	162
6.2 LA COMPOSITION DU SYSTÈME LAITIER FERMENTÉ : UN FACTEUR CLÉ INFLUENÇANT LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DES EXOPOLYSACCHARIDES	165
6.3 LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DES EXOPOLYSACCHARIDES : IMPORTANCE DU SYSTÈME LAITIER FERMENTÉ ÉTUDIÉ	166
6.4 IMPORTANCE DES CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES DES EXOPOLY-SACCHARIDES SUR LEUR FONCTIONNALITÉ.....	166
6.4.1 Charge.....	167
6.4.2 Conformation de la chaîne (flexibilité et ramification)	168
6.4.3 Poids moléculaire.....	169
6.5 CARACTÈRE FILANT DES EXOPOLYSACCHARIDES VERSUS LEUR FONCTIONNALITÉ	170
6.6 INTERACTIONS EXOPOLYSACCHARIDES-AMIDON MODIFIÉ	170
6.6.1 Système laitier fermenté de type ferme.....	170
6.6.2 Système laitier fermenté de type brassé.....	171
CONCLUSION GÉNÉRALE	172
PERSPECTIVES DE RECHERCHE	174
BIBLIOGRAPHIE.....	178
ANNEXE I : TENEUR MOYENNE EN CASÉINES DES SURNAGEANTS APRÈS CENTRIFUGATION (10 MIN, 21 °C, 690 X G) DE SOLUTIONS DE PPCN À DIFFÉRENTES TENEURS EN CASÉINES (0 À 7% (P/P)).....	192
ANNEXE II : DISTRIBUTION DE LA FRACTION CASÉIQUE* ET LA TAILLE DES PARTICULES** DE LA SOLUTION DE PPCN À 7 % ET DANS LE SURNAGEANT APRÈS CENTRIFUGATION (10 MIN À 21 °C ET À 690 X G)	193
ANNEXE III : POUVOIR TAMPON DU PERMÉAT DE LAIT, DE SOLUTIONS DE CASAMINOACIDE (1 ET 2% (P/P)) ET DE SOLUTIONS DE B-GLYCÉROPHOSPHATE DISODIQUE (1 ET 2% (P/P)).....	194
ANNEXE IV : COMPARAISON DE LA POPULATION BACTÉRIENNE ET DE LA PRODUCTION D'EPS DANS UN LAIT ÉCRÉMÉ RECONSTITUÉ À 12 % DE SOLIDES TOTAUX ET DES SYSTÈMES MODÈLES LAITIERS À 0 ET 1 % DE CASÉINES FERMENTÉS À PH 4.6.....	195

Liste des tableaux

Table 1-1 : Propriétés générales des granules d'amidons selon la source végétale.....	21
Table 1-2: Relation structure-fonction des EPS aux caractéristiques structurales connues et produits par des bactéries lactiques	42
Table 2-1: Structural characteristics of EPS produced by <i>Streptococcus thermophilus</i> (HC15, 0131, 2104) or <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (210R, 11842, 702074, 291)	54
Table 2-2: Ropy character of EPS in milk fermented with <i>Streptococcus thermophilus</i> (HC15, 0131, 2104) and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (210R, 11842, 702074, 291) or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) by measuring the time of 30 mL of milk to pass through a funnel according to pH during fermentation process	65
Table 2-3: Gelation time (T_{gel}), pH of gelation (pH_{gel}), firmness, apparent viscosity and syneresis of milk fermented with <i>Streptococcus thermophilus</i> (HC15, 0131, 2104) and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (210R, 11842, 702074, 291) or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) at pH 4.6.....	68
Table 3-1: Structural characteristics of EPS from LAB	84
Table 3-2: Composition and initial pH of dairy model systems at different casein concentrations	89
Table 3-3: Fermentation parameters (lactobacilli population, fermentation time, lactic acid production), EPS production and ropy character evaluated by the funnel test (flow time) of dairy model systems at different casein concentrations fermented with different starters at pH 4.6	92
Table 3-4: Composition of dairy model systems at 2 % caseins with the addition of 0.5 or 0.75 % whey proteins.....	93
Table 3-5: Fermentation parameters (fermentation time, lactobacilli population, EPS production, gelation time (T_{gel}), pH of gelation (pH_{gel})) and rheological properties (elastic modulus (G') before (42 °C) and after cooling step (4 °C) and apparent viscosity (10 and 100 s ⁻¹)) of dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.5 or 0.75 % whey proteins and fermented with different starters.....	95
Table 4-1: Fermentation parameters (microbiological population, fermentation time, lactic acid production) of dairy model system fermented at pH 4.6 with different starters .	115

Table 4-2: Gelation pH (pH_{gel}) and time (T_{gel}) and elastic modulus (G') after fermentation (42 °C) and after cooling step (4 °C) of dairy model system fermented at pH 4.6 with different starters and modified starch concentrations	116
Table 6-1: Relation structure-fonction des EPS dans des systèmes laitiers fermes et brassés enrichis ou non en amidon modifié (AM)	163

Liste des figures

Figure 1-1 : Schématisation d'un procédé générique de fabrication de yogourt.....	2
Figure 1-2 : Schéma de la microstructure de lait fermenté avec (a) ou sans traitement thermique (b) préalable.....	17
Figure 1-3: Granules d'amidon modifié de solutions aqueuses de 0.75% (p/p) avant chauffage de a) maïs cireux (Thermtex, National Starch) et de c) tapioca (National Frigex, National Starch) et suite un traitement thermique (90°C/2min) et une homogénéisation (55 °C, 2000 PSI); b) maïs cireux et d) tapioca (microscopie optique-1000x) à 21 °C.....	24
Figure 1-4 : Schéma explicatif du phénomène de déplétion-floculation en présence de deux particules sphériques et de polymères.....	44
Figure 2-1: Population, pH, % lactic acid and EPS production of <i>Streptococcus thermophilus</i> HC15 (a), 0131 (b) and 2104 (c) during fermentation at 42 °C. Each data point is the mean of three experiments. Bars indicate standard error of the mean.....	61
Figure 2-2: Population, pH, % lactic acid and EPS production of <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 210R (a), 11842 (b), 702074 (c), 291 (d) during fermentation at 42 °C. Each data point is the mean of three experiments. Bars indicate standard error of the mean.....	63
Figure 2-3: Change of pH upon time of milk fermented with <i>Streptococcus thermophilus</i> HC15, 0131 and 2104 and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 210R, 11842, 702074 and 291 or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) during fermentation at 42 °C. Each data point is the mean of three experiments.....	66
Figure 2-4: Elastic modulus (G') as functions as frequency of milk fermented with <i>Streptococcus thermophilus</i> HC15, 0131 and 2104, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 210R, 11842, 702074 and 291 or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) at pH 4.6. Each data point is the mean of three experiments.....	69
Figure 3-1: Buffering capacity of dairy model systems with different casein concentrations (0 to 3 %) before fermentation.....	90
Figure 3-2: CLSM observations of dairy model systems at 2 % caseins without (a-d) or with the addition of 0.75 % whey proteins (e-h) fermented at pH 4.6 with control (a, e), HC15/291 (b, f), HC15/702074 (c, g) and 2104/210R (d, h) starters.....	96
Figure 3-3: Microstructure of dairy model system with 2 % casein and with the addition of 0.75 % whey proteins with control (a), HC15/291 (b), HC15/702074 (c) and 2104/210R (d) starters at pH 4.6 by scanning electron microscopy (1 K).	97

- Figure 3-4:** Appearance of dairy model system at 0 % casein fermented with HC15/291 starter at pH 4.6 (a, c) and dairy model system with 2 % caseins with the addition of 0.75 % whey proteins acidified with glucono-delta-lactone (1.4 % (wt/wt)) at pH 4.6 (b, d) after freeze-drying process (a, b) and visualized by scanning electron microscopy (0.5 K) (c, d). 98
- Figure 4-1:** Elastic (G') (plain line) and viscous (G'') (dotted line) modulus of dairy model systems fermented at pH 4.6 with control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R starters. Measurements were made at 4 °C. 119
- Figure 4-2:** Viscosity of dairy model systems fermented at pH 4.6 with control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R starters with 0 (a), 0.2 (b), 0.6 (c) and 1 (d) % modified starch. Measurements were made at 4 °C. 120
- Figure 4-3:** Syneresis (%) after centrifugation at 210 x g for 20 min at 4 °C of dairy model systems fermented at pH 4.6 as function of modified starch concentration (a) and starters (b). 123
- Figure 4-4:** Microstructure of dairy model systems at 0 (a-d), 0.2 (e-h), 0.6 (i-l) and 1 (m-p) % modified starches fermented at pH 4.6 with control (a, e, i, m), HC15/291 (b, f, j, n), HC15/702074 (c, g, k, o) and 2104/210R (d, h, l, p) starters. 125
- Figure 5-1:** Evolution of pH of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of storage period. 138
- Figure 5-2:** Evolution of % lactic acid of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of storage period. 140
- Figure 5-3:** Evolution of streptococci population of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of storage period. 141
- Figure 5-4:** Evolution of lactobacilli population of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of storage period at 4 °C. 142
- Figure 5-5:** Apparent viscosity at 10 s^{-1} of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of storage period at 4 °C. 144
- Figure 5-6:** Firmness of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of storage period at 4 °C. 147

- Figure 5-7:** Elastic modulus as functions of frequency of set (a-b) and stirred (c-d) yoghurts with 0 and 0.75 % modified starch and fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R after 2 (a and c) and 8 (b and d) days of storage at 4 °C. Each data point is the mean of three experiments. Bars indicate standard error of the mean..... 149
- Figure 5-8:** Syneresis after centrifugation at 210 x g of set and stirred yoghurts fermented with starters producing EPS: control, HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R as functions of modified starch concentration. Measurements were made at 4 °C..... 150
- Figure 5-9:** Microstructure of set (a-h) and stirred (i-p) yoghurt at 0 % (a-d and i-l) and 0.75 % (e-h and m-p) modified starch fermented with control (a, e, i, m), HC15/291 (b, f, j, n), HC15/702074 (c, g, k, o) and 2104/210R (d, h, l, p) starters producing EPS with different structural characteristics..... 152

Introduction

Au Canada, la croissante popularité de la consommation de yogourts est reliée à son aspect santé. En effet, le yogourt est une bonne source de nutriments (protéines, glucides, minéraux, vitamines) et est peu calorique (McKinley, 2005). De plus, plusieurs yogourts contiennent des bactéries probiotiques bénéfiques pour le système digestif. Toutefois, la fabrication de yogourts peut résulter en certains problèmes technologiques tels qu'une fermeté inadéquate du gel, des variations de viscosité et une expulsion du lactosérum (Lucey, 2004). Pour prévenir ces défauts de qualité, en Amérique du Nord, il est d'usage d'enrichir les yogourts avec des agents texturants et/ou stabilisants tels que les pectines, les gommes xanthane et caroube, les amidons modifiés, les gélatines et les carraghénanes. Les amidons modifiés sont les plus fréquemment utilisés en raison de leur faible coût et de leur diversité. Des souches de streptocoques et de lactobacilles produisant des exopolysaccharides (EPS) sont également de plus en plus étudiées pour la fermentation du lait. Les EPS offrent l'avantage d'être produits naturellement lors du processus de fermentation par certaines bactéries lactiques en plus d'avoir la capacité de moduler les propriétés rhéologiques des yogourts (Behare *et al.*, 2009; Duboc & Mollet, 2001). Par contre, la combinaison non optimisée de polysaccharides commerciaux tels que la pectine et d'EPS peut causer des défauts de qualité (Olsen, 2003). Les mécanismes responsables de ces effets négatifs étant inconnus, la maîtrise de ces systèmes est donc essentielle afin de produire des yogourts répondant aux exigences de qualité des consommateurs canadiens. Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée sur l'impact de l'utilisation conjointe d'EPS aux caractéristiques structurales connues et de polysaccharides commerciaux tels que les amidons modifiés sur les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure de systèmes laitiers fermentés.

Le but de ce travail était donc de développer les outils nécessaires à l'étude et la compréhension du rôle structural des EPS dans divers systèmes laitiers fermentés enrichis en amidon modifié afin d'optimiser leur utilisation. L'expertise et les connaissances acquises permettront de déterminer les conditions favorables pour la production de yogourts de qualités répondant aux attentes des consommateurs canadiens.

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1 Définition du yogourt

Le yogourt est le résultat de la lente fermentation du lactose du lait ou d'un mélange laitier, en acide lactique par l'action synergique de deux bactéries lactiques: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Tamine & Robinson, 1999).

1.2 Procédé de fabrication du yogourt

La fabrication du yogourt comporte plusieurs étapes (Figure 1.1). La production débute par la standardisation du mélange laitier suivie de l'homogénéisation et du traitement thermique. Le mélange laitier est ensuite refroidi à la température d'inoculation puis les ferments lactiques sont ajoutés. La mise en pot est effectuée pour les yogourts fermes. La fermentation lactique se déroule entre 3 à 6 heures à 42-43 °C. La fermentation est arrêtée lorsque le pH atteint 4.6. Les yogourts fermes sont refroidis à 4 °C tandis que les yogourts brassés sont conditionnés. Cette dernière étape comprend le refroidissement, le brassage, le lissage et la mise en pot.

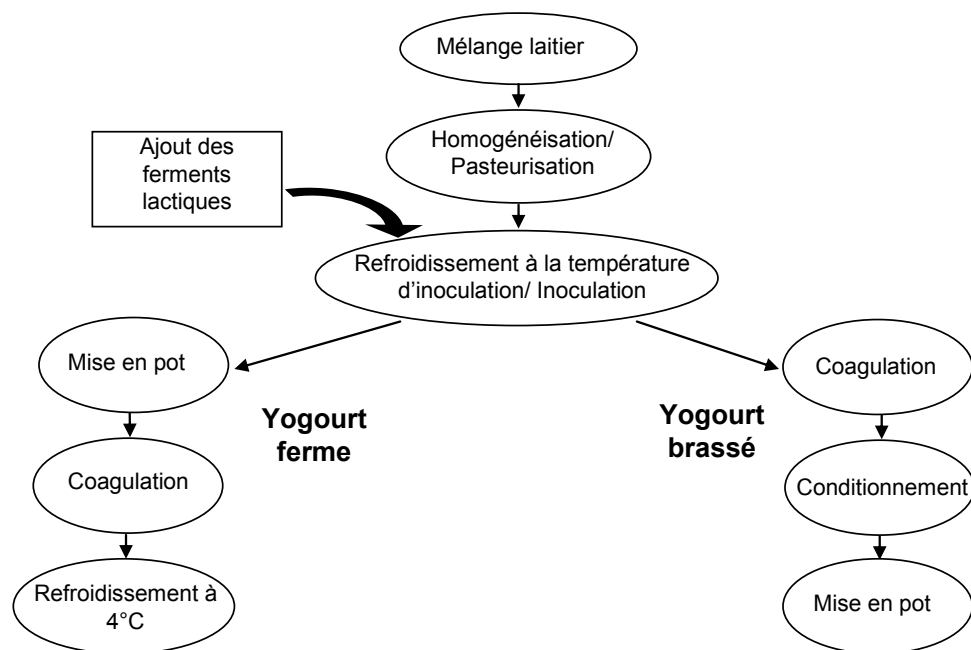


Figure 1-1 : Schématisation d'un procédé générique de fabrication de yogourt.

1.2.1 Composition et standardisation du mélange laitier

Le lait de vache est généralement la matière première pour la fabrication de yogourt. Le lait est composé de 87 % d'eau, 2.6 % de caséines, 0.6 % de protéines sériques, 4.6 % de lactose, 3.7 % de matières grasses, 0.7 % de minéraux et des traces de micronutriments tels que des vitamines (Walstra *et al.*, 2006). La qualité primaire du lait se qualifie par la mesure de son acidité naturelle. Cette valeur se situe entre 0.13 et 0.17 % en équivalent d'acide lactique (Amiot *et al.*, 2002). L'acidité naturelle du lait est causée par les protéines laitières, les acides organiques tels que l'acide citrique et les minéraux comme les phosphates. Une déviation de l'acidité naturelle du lait peut indiquer une contamination microbiologique ou une variation de composition. En effet, la teneur en matières grasses et protéines laitières contenues dans le lait varie en fonction de la race et des saisons.

Outre la qualité primaire du lait, tous les nutriments jouent un rôle sur la qualité finale du yogourt (Lucey, 2004). Les protéines laitières jouent un rôle clé dans la formation du gel en lui conférant une texture unique, de l'élasticité et de la fermeté (Tamine & Robinson, 1999). Donc, les caractéristiques du yogourt sont principalement prédites par le comportement des protéines et de leurs interactions avec les autres constituants. Le lactose, substrat essentiel à la croissance bactérienne, permet l'abaissement du pH contribuant ainsi à la formation du gel. La matière grasse donne de l'onctuosité et une texture agréable en bouche. Les minéraux aident à la stabilisation du réseau protéique et les vitamines sont requises pour la croissance bactérienne (Altan *et al.*, 2008; Tamine & Robinson, 1999).

Lorsque l'on fabrique du yogourt, on utilise un lait enrichi. La composition du mélange laitier est généralement de 4 % de protéines dont 3.2 % de caséines et 0.8 % de protéines sériques avec une teneur en matière grasse de 0 à 3 % selon le type de produit désiré (Tamine & Robinson, 1999). La standardisation du mélange laitier permet non seulement de pallier aux variations de composition du lait mais aussi, à obtenir la composition désirée. Cette standardisation peut s'obtenir par l'ajout de concentrés et d'isolats de protéines sériques, de poudre de lait écrémé ou entier, de lactose et de crème en fonction de la teneur désirée en protéines, solides totaux et matières grasses (Tamine & Robinson, 1999).

1.2.2 Homogénéisation

L'homogénéisation a pour but de fractionner la taille des globules de gras de 4-5 μm à 1 μm par cisaillement (Amiot *et al.*, 2002). La réduction de la taille des particules de matière grasse diminue et ainsi inhibe le risque du phénomène de séparation entre la phase lipidique et la phase aqueuse causé par la gravité (Tamine & Robinson, 1999). En plus de conférer une couleur plus blanchâtre au mélange laitier, cette diminution de diamètre facilite l'insertion des globules de gras dans les pores du réseau caséique du yogourt. Cette étape permet également de mélanger de façon homogène les divers ingrédients laitiers ajoutés lors de l'étape de la standardisation. Une autre des conséquences de l'homogénéisation est la formation de nouvelles gouttelettes de globules de gras entourées par des caséines et des protéines sériques (Lucey *et al.*, 1998a). La résultante est une augmentation du caractère hydrophile des globules de gras. Du point de vue technologique, la capacité de rétention d'eau ainsi que la fermeté du réseau caséique du yogourt sont améliorées (Tamine & Robinson, 1999). L'efficacité du traitement est fonction de la pression et de la température employées. Généralement, pour la fabrication de yogourts, les paramètres de pressions et de températures d'homogénéisation utilisés oscillent entre 500-2500 psi à 55-65°C, respectivement (Lucey, 2004; Lucey & Singh, 1998).

1.2.3 Traitement thermique

Le but premier du traitement thermique est d'assurer l'innocuité du produit suite à la destruction des microorganismes pathogènes et indésirables ainsi qu'à l'inactivation des enzymes telles que la lipase responsable de l'oxydation des lipides (Walstra *et al.*, 2006). L'application de chaleur peut également influencer la coloration (réaction de Maillard) et le goût du produit fini (goût de cuit) en fonction de sa sévérité (temps de retenue et température utilisée). Contrairement au lait de consommation, la fabrication de yogourt requiert un traitement thermique sévère ($> 75\text{ }^\circ\text{C}$) afin de dénaturer irréversiblement plus de 99 % des protéines sériques (Tamine & Robinson, 1999). La dénaturation des protéines sériques engendre un changement de leur conformation initial permettant l'exposition des nouveaux sites réactifs comme un groupement thiol supplémentaire sur la β -lactoglobuline, protéine sérique majeure (80 %) du lait (Lucey & Singh, 1998a).

La résultante est l'association de la κ -caséine et de la β -lactoglobuline via un pont disulfure (Sava *et al.*, 2005). Des liaisons entre les caséines et l' α -lactalbumine sont également engendrés (Corredig & Dalgleish, 1996). En général, le traitement thermique oscille entre 80 et 98 °C pour une durée variable de 20 s à 30 minutes (Lucey, 2004).

1.2.4 Fermentation lactique

La fermentation lactique est l'étape clé permettant la formation du réseau caséique du yogourt. L'abaissement graduel du pH lors de la fermentation lactique par les ferments lactiques engendre plusieurs changements physico-chimiques à l'origine de la formation du gel qu'est le yogourt. Ces mécanismes seront expliqués à la section 1.3.1.1 : Changements physico-chimiques résultant de la formation de gel du yogourt. Cette section sera plutôt axée sur les ferments lactiques et les facteurs influençant leur croissance.

Lors du processus de fermentation, le lactose est principalement métabolisé en acide lactique par les bactéries *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Ces bactéries agissent en synergie. Les streptocoques amorcent la fermentation en procurant aux lactobacilles les composantes requises à leur activité fermentaire telles que l'acide formique et le gaz carbonique. Quant aux lactobacilles, ceux-ci hydrolysent partiellement les caséines libérant ainsi de courts peptides et des acides aminés favorisant la croissance des streptocoques. Près de 40% du contenu en lactose est métabolisé lors de la fermentation lactique (Walstra *et al.*, 2006). Divers métabolites responsables des saveurs caractéristiques du yogourt comme des acides volatils (acétique, formique, butyrique), des acides non volatils (pyruvique, oxalique, succinique, lactique), des composés carbonylés (acétaldéhyde et diacétyl) et d'autres molécules provenant de la dégradation de la matière grasse, du lactose et des protéines sont aussi produits (Tamine & Robinson, 1999).

La coopération entre les bactéries lactiques du yogourt étant le facteur clé de la fermentation lactique, plusieurs facteurs peuvent influencer leur croissance comme la température, le pH et le milieu de croissance. Les températures optimales de croissance des streptocoques et des lactobacilles se situent entre 42-43 °C et 40-45 °C, respectivement (Monnet *et al.*, 2008). Le pH optimal de croissance pour les streptocoques et les lactobacilles se situe entre pH 6.5-6.0 et 6.5-5.5, respectivement (Monnet *et al.*, 2008; Salaün *et al.*, 2005).

Le lait est un milieu riche et adéquat pour permettre la croissance bactérienne de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en culture simple ou mixte (Tamine & Robinson, 1999). La croissance des bactéries lactiques requiert une source de carbone, une source d'azote, des vitamines ainsi que des minéraux. Le lactose contenu dans le lait est en quantité suffisante (Béal *et al.*, 2008). *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ne pouvant synthétiser des acides aminés essentiels à leur croissance, le milieu de culture doit posséder ces éléments nutritifs (Tamine & Robinson, 1999). En terme de besoin azoté, *Streptococcus thermophilus* est la moins exigeante; seulement deux acides aminés sont essentiels à sa croissance (leucine et valine) bien que plusieurs autres acides aminés agissent comme stimulants (Altan *et al.*, 2008). Par contre, la croissance de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* exige entre 11 et 15 acides aminés essentiels tels que l'acide glutamique, l'alanine, la cystéine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la sérine, le tryptophane, la tyrosine et la valine (Altan *et al.*, 2008). Lors de la fermentation, les bactéries lactiques utilisent et synthétisent des vitamines. *Streptococcus thermophilus* a besoin d'acide ascorbique, d'acide pantothénique, de thiamine, de biotine, de niacine, de pyridoxine et de riboflavine pour sa croissance tandis que *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a besoin d'acide folique, d'acide pantothénique, de niacine et de riboflavine (Béal *et al.*, 2008). Les streptocoques et les lactobacilles produisent aussi de l'acide folique et de la niacine (Béal *et al.*, 2008). En terme de sources minérales, *Streptococcus thermophilus* requiert du calcium, du magnésium, du potassium ainsi que du sodium tandis que le fer, le magnésium et le manganèse sont requis par *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Béal *et al.*, 2008).

Le pouvoir tampon du milieu de culture peut influencer la croissance bactérienne car l'acide lactique produit pendant la fermentation lactique est toxique pour les bactéries (Salaün *et al.*, 2005). L'accumulation d'acide lactique ralentit, voire inhibe la croissance bactérienne (Salaün *et al.*, 2005). Le pouvoir tampon se définit par la quantité d'acide requis pour abaisser d'une unité le pH. Plus la quantité d'acide requise est élevée, plus le pouvoir tampon de la solution est élevé. Le pouvoir tampon du lait est maximal à pH 5 correspondant au pKa de dissociation des ponts de phosphate de calcium (Salaün *et al.*, 2005). En effet, le pouvoir tampon du lait est dicté à 60 % par le phosphate de calcium, à 35 % par les caséines et à 5 % par les protéines sériques (Amiot *et al.*, 2002). Lorsque l'on enrichi le lait avec des poudres de lait écrémé et des isolats de protéines laitières, on augmente l'index dB/dpH du pouvoir tampon (Peng *et al.*, 2009). La présence d'antibiotiques, les résidus de lavage et les bactériophages peuvent aussi influencer la croissance bactérienne (Clark & Plotka, 2004; Tamine & Robinson, 1999).

En général, les ferments lactiques sont inoculés entre 2 et 5 % dans le mélange laitier afin d'atteindre une population initiale de l'ordre de 10^7 UFC/mL avec un ratio de 1:1 (Clark & Plotka, 2004). La température de fermentation oscille entre 40 et 43 °C. Le temps de fermentation se situe entre 3 et 7 h jusqu'à l'obtention d'un pH de 4.6 et d'une acidité finale de 0.9 à 1.2 % en équivalent d'acide lactique (Clark & Plotka, 2004).

1.2.5 Conditionnement et entreposage

Dans le cas des yogourts fermes, la fermentation lactique se déroule directement dans les pots (Fig. 1.1). L'étape du conditionnement se résume donc au refroidissement du yogourt ferme à la température d'entreposage lorsque le pH cible de 4.6 est atteint. Le refroidissement sert, en partie, à arrêter la fermentation puisque la croissance des bactéries thermophiles est ralentie à moins de 10 °C (Tamine & Robinson, 1999). Les technologies de refroidissement utilisées sont: le transfert immédiat des pots dans une chambre réfrigérée ou par le passage dans un tunnel de refroidissement (Lucey, 2004).

Pour les yogourts brassés, le conditionnement englobe les étapes de refroidissement, de lissage, d'ajout de saveurs/fruits et de mise en pot (Fig. 1.1). Le refroidissement s'amorce par un premier brassage du caillé dans la cuve à fermentation préalable à l'étape du lissage. Concrètement le lissage consiste à pomper le caillé contenu dans la cuve à un échangeur à plaques ou tubulaire pour le refroidir à la température désirée pour ensuite, le faire passer dans une pompe munie d'une vis sans fin et d'un tamis avec des mailles de l'ordre de quelques centaines de micromètres (Tamine & Robinson, 1999). Le réseau caséique initial est brisé en différents morceaux sous l'action mécanique. La résultante est un produit fini avec une texture lisse et homogène. Bien que ce procédé soit largement répandu dans l'industrie laitière, peu de travaux scientifiques ont étudié l'impact du lissage industriel (Bönish *et al.*, 2007; Gentès, 2007; Olsen, 2003). Fréquemment, les yogourts utilisés dans les études scientifiques sont brassés à l'aide d'une cuillère ou d'une tige en verre (Haque, 2001; Marshall & Rawson, 1999; van Marle, 1995). De plus, aucune étude scientifique publiée n'a comparé les propriétés rhéologiques et physiques des yogourts fermes et brassés suite à un lissage industriel.

La température, la longueur du tuyau, le design de l'appareil, le type de pompe, la vitesse ainsi que la pression sont tous des facteurs influençant les propriétés rhéologiques et physiques du yogourt brassé (Lucey, 2004). Olsen (2003) a étudié l'effet de la température au moment du lissage industriel sur la texture de yogourts. Les résultats ont démontré que les températures de 20-25 °C donnait des yogourts visqueux et présentant peu de synérèse tandis qu'à 10-15 °C, les yogourts étaient moins visqueux et présentaient plus de synérèse.

Suite au lissage, les fruits/saveurs sont incorporés. La mise en pot est une étape importante afin d'offrir un produit sécuritaire tout en le protégeant contre les agressions externes comme la poussière et les microorganismes indésirables. En général, le yogourt possède une durée de conservation relativement longue à 4 °C (environ 1-2 mois). Le respect de la chaîne de froid à 4 °C tout au long de sa durée de conservation est essentiel afin d'éviter une post-acidification du produit fini.

1.3 Propriétés rhéologiques/physiques et microstructure du yogourt

L'acidification du lait suite à la production d'acide lactique par les bactéries est le facteur clé permettant la formation du gel caséique. La formation du gel ainsi que les propriétés rhéologiques (viscosité, modules élastiques et visqueux, texture) et physiques (aptitude à la synérèse) résultantes peuvent être caractérisées par plusieurs tests rhéologiques et physiques. En industrie laitière, ces techniques d'analyse permettent non seulement d'évaluer la qualité de yogourts mais de prédire le comportement des produits face aux réalités industrielles en recréant, par exemple, les conditions de cisaillement (pompage) et de traitements thermiques. La microscopie s'avère également utile pour illustrer/visualiser la microstructure des gels et tenter de comprendre les propriétés rhéologiques/physiques résultantes des interactions entre les différents constituants. Pour évaluer et comparer les caractéristiques des gels, il importe d'effectuer plusieurs tests rhéologiques/physiques puisque ces derniers donnent une information complémentaire.

1.3.1 Comportements du yogourt à faibles déformations

1.3.1.1 Changements physico-chimiques résultant de la formation de gel du yogourt

L'acidification du lait lors de la fermentation lactique engendre l'agrégation de micelles de caséines à l'origine de la formation du réseau caséique qu'est le yogourt. Au pH naturel du lait (pH 6.6-6.7), les micelles de caséines sont chargées négativement (potentiel zeta de -15 mV) (Heertje *et al.*, 1985). L'abaissement graduel du pH engendre la neutralisation progressive des micelles de caséines pour une neutralisation complète à pH 4.6 (0 mV) c'est-à-dire au point isoélectrique des caséines (Heertje *et al.*, 1985). Un autre changement physico-chimique s'opère lors de la neutralisation de charge : la diminution du degré d'hydratation des micelles de caséines. En effet, au pH normal du lait, les micelles de caséines sont entourées de molécules d'eau permettant de les protéger et de les stabiliser.

Finalement, les conditions acides déstabilisent l'équilibre salin du lait. Avant fermentation, les minéraux, majoritairement constitués de calcium et de phosphore, se présentent sous deux formes en équilibre : soluble ou colloïdale c'est-à-dire lié aux micelles de caséines via des ponts de phosphate de calcium (Tamine & Robinson, 1999). L'acidification graduelle cause la solubilisation du phosphate de calcium micellaire. Ce changement s'amorce dès l'atteinte du pH 5.5. À pH 4.6, la répulsion électrostatique étant minimale, la déshydratation partielle ainsi que la dissolution des minéraux sous forme colloïdale entraînent la désorganisation des sous-unités micellaires. La résultante est l'agrégation des caséines formant un réseau caséique relié entre elles par des liaisons de faibles énergies : électrostatiques, hydrophobes et van der Waals (van Vliet *et al.*, 1991). Le réseau caséique ainsi formé est faible, difficilement manipulable, perméable et peu contractile. L'enchevêtrement caséique laisse place à des interstices où la phase liquide est piégée (Lucey, 2002). La taille des pores oscille entre 1 et 30 μm (Lucey & Singh, 1998a). La teneur en caséines influence la taille des pores de la matrice caséique. En général, l'ajout de protéines à la formulation de yogourt engendre de plus petits pores (Kalab, 1979).

1.3.1.2 Suivi de la formation de gel du yogourt

La formation de gel peut être étudiée sans en affecter sa structure grâce à la rhéologie dynamique à faible oscillation (Lucey, 2002). La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement de fluides (Ma & Barbosa-Canovas, 1995). Les méthodes basées sur les faibles déformations (ou contraintes) appliquées en mode oscillatoire permettent de caractériser la formation du gel et ses propriétés (Lucey, 2002). La réponse dynamique des fluides viscoélastiques à une stimulation oscillatoire se traduit par deux composantes : module élastique ou de conservation (G') et module visqueux ou de perte (G''). Le module élastique indique le caractère élastique du fluide étudié tandis que le module visqueux exprime le caractère visqueux de ce dernier (Lucey, 2001). Concrètement, le G' est mesuré en fonction du temps afin de mesurer la formation du gel. Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le point de formation du gel mais plusieurs auteurs définissent simplement le point de gel comme le moment auquel le module élastique atteint 1 Pa (van Marle & Zoon, 1995) ou 0.1 Pa (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Girard & Schaffer-Lequart, 2007b).

Il est donc possible suite à la modélisation des courbes de calculer le temps de gélification. Le pH de gélification peut également être calculé si la courbe d'acidification est mesurée simultanément. Lors de la formation de gel, une première diminution du rapport G''/G' appelé la tangente de l'angle de perte ($\tan \delta$) est observée due aux interactions entre les protéines sériques (vers le point isoélectrique de celles-ci : pH 5.3-5.2). Un maximum est par la suite atteint à pH 5.1 possiblement dû à la solubilisation du phosphate de calcium. Finalement, une seconde diminution de la valeur du $\tan \delta$ est observée à pH 5.0 due à l'augmentation des interactions entre les caséines puisque leur charge nette s'approche de 0 (Lucey *et al.*, 1998b).

1.3.1.3 Fermeté du yogourt

Les yogourts sont des gels de type viscoélastique. Dans le cas de gels laitiers, le G' réfère à l'énergie emmagasinée par les cycles de déformation lors du test d'oscillation plus particulièrement indiquant la fermeté du gel en terme d'interactions protéines-protéines (Duboc & Mollet, 2001; Lucey & Singh, 1998a). Plus la valeur est élevée, plus le gel est ferme (Lucey, 2001). Le module visqueux mesure l'énergie dispersée par cycle. La tangente de l'angle de perte ($\tan \delta = G''/G'$) indique le comportement viscoélastique du fluide soit de type liquide ($\tan \delta > 1$) ou solide ($\tan \delta < 1$). La tangente de l'angle de perte est reliée à la relaxation des liaisons durant la déformation du gel. Conséquemment, il s'agit d'un paramètre utile pour la caractérisation des gels. Il est également possible de mesurer le point de fracture du gel c'est-à-dire lorsque le réseau caséique commence à se briser. Il peut s'agir d'une fracture causée par le cisaillement (σ_{Fracture}) ou à la suite d'une contrainte (γ_{Fracture}). Une faible valeur de σ_{Fracture} signifie un gel faible tandis que γ_{Fracture} indique la susceptibilité du réseau caséique à se briser (Hassan *et al.*, 2002a). Ainsi, une faible valeur indique un gel cassant.

1.3.2 Comportements du yogourt aux larges déformations

1.3.2.1 Texture et évaluation sensorielle du yogourt

L'étude du comportement d'un matériau lors d'une déformation plus grande, c'est-à-dire en dehors des zones de viscoélasticité linéaire permet de caractériser la texture. La texture des gels de type yogourt réfère à plusieurs attributs tels la fermeté, l'onctuosité et la sensation en bouche (Clark & Plotka, 2004). La fermeté des gels peut être évaluée par rhéologie dynamique telle qu'expliquée précédemment (section 1.3.1) ou mesurée par des tests de compression ou par pénétrométrie (Hess *et al.*, 1997). La fermeté des gels, par pénétrométrie, est définie comme la force maximale requise pour qu'une sonde pénètre dans le gel selon des conditions précises (vitesse, distance, caractéristiques de la sonde, etc.) (Hess *et al.*, 1997). Ces méthodes entraînent la destruction des gels comparativement aux méthodes étudiant les comportements à faibles déformations. L'onctuosité et la sensation en bouche sont souvent évaluées par évaluation sensorielle (Isleten & Karagulyuceer, 2006). Par exemple, une sensation en bouche râpeuse/sableuse est perceptible lorsque les agrégats protéiques sont de l'ordre de 1 à 5 mm (Lucey & Singh, 1998a).

1.3.2.2 Viscosité du yogourt

La viscosité est la propriété d'un matériau à résister à une contrainte de cisaillement (larges déformations) (Duboc & Mollet, 2001). La viscosité des gels de type yogourts est non-newtonien. Une diminution de la viscosité en fonction de l'augmentation de la vitesse de cisaillement est typique des gels laitiers acides de type yogourts. On appelle ce comportement rhéologique : rhéofluidifiant ou le terme anglais «shear-thinning» (Duboc & Mollet, 2001). Étant donné que la valeur de viscosité dépend de la vitesse de cisaillement, il n'existe pas de viscosité absolue. Deux modèles mathématiques sont fréquemment utilisés pour modéliser le profil de viscosité et déterminer les paramètres d'indice de consistance et d'indice d'écoulement : la loi de puissance et Herschel-Bulkley (Ramchandran & Shah, 2009; Mullineux, 2008). Le yogourt est également de type thixotrope: propriété d'un fluide visqueux tel le yogourt à devenir liquide lors de l'application d'une contrainte mécanique et de redevenir visqueux après un certain temps de repos.

La mesure de la viscosité peut être utilisée pour simuler la sensation en bouche puisque les vitesses de cisaillement appliquées lors de la mastication et de la déglutition du bol alimentaire sont de l'ordre de 30 à 50 s⁻¹ (Duboc & Mollet, 2001). Contrairement à la caractéristique d'élasticité (méthode non destructrice d'évaluation le gel) reliée principalement à la force des liens formant le gel, la viscosité dépend des caractéristiques globales du gel comme la taille des pores, la structuration du réseau caséique et l'état physique du lactosérum dans les pores.

1.3.3 Aptitude à la synérèse du yogourt

Contrairement au fromage, le lactosérum formé suite à la coagulation lactique n'est pas expulsé. Conséquemment, le yogourt est sujet à l'expulsion du lactosérum à la surface du gel. Pour plusieurs consommateurs, la présence de lactosérum signifie un défaut de qualité. La mesure de l'aptitude des gels à retenir le lactosérum peut se mesurer directement à la surface du gel (synérèse spontanée ou endogène) ou suite à l'application d'une force externe comme la force centrifuge (synérèse forcée). La synérèse spontanée est la quantité de lactosérum expulsée par la contraction du gel sans l'application de force externe. Elle réfère à l'instabilité du réseau caséique résultant d'une série de réarrangement dans le temps. Le bris des liens entre les protéines laitières favorise l'expulsion du lactosérum. Deux mécanismes peuvent causer ce bris (van Vliet *et al.*, 1991). Le premier est la relaxation des liaisons intermoléculaires protéines-protéines induite par le mouvement thermal. Le second est provoqué par un stress interne du réseau caséique suite au mouvement Brownien et de la déformation des liaisons entre les protéines laitières favorisant la contraction du gel. La résultante est la création d'une pression endogène sur le lactosérum contenu dans les pores du réseau caséique et donc, possiblement de la synérèse. La mesure de la synérèse spontanée permet donc d'évaluer l'habileté naturelle du gel à piéger le lactosérum (Lucey, 2001; Lucey & Singh, 1998a). La synérèse forcée définit l'habileté du gel à retenir le lactosérum suite à l'application de grandes forces externes. La synérèse forcée est fréquemment mesurée suite à l'application d'une centrifugation.

1.3.4 Microstructure du yogourt

La microscopie est une méthode utile permettant de visualiser le réseau caséique. Les gels de type yogourts ont été largement visualisés par microscopie électronique à balayage (scanning electron microscopy : SEM) (Hassan, 2008; Kalab & Emmonds, 1975; Kalab & Harwalkar, 1973). Cette technique offre l'avantage d'un grand pouvoir de résolution comparativement à la microscopie optique. Le réseau caséique apparaît sous forme d'agrégats homogènes et interliés lorsque visualisé en SEM (Kalab, 1979). Cette méthode implique cependant une déshydratation complète de l'échantillon pouvant causer des artefacts (Hassan *et al.*, 2003a; Kalab, 1993). La cryo-SEM permet de visualiser un échantillon hydraté (Hassan *et al.*, 2003a). Par contre, l'eau contenue dans l'échantillon est sous forme congelée ce qui peut également affecter l'intégrité du gel.

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM; abréviation anglaise) est une autre technique microscopique. Cette méthode offre l'avantage de visualiser l'échantillon dans son environnement naturel c'est-à-dire en présence d'eau et sans préparation préalable susceptible de provoquer des artefacts (non désirables). La CLSM peut être utilisée pour suivre la formation du gel dans le temps et en fonction du pH lors de la fermentation lactique (Dubert-Ferrandon *et al.*, 2006). La CLSM a été également utilisée pour visualiser l'effet, par exemple, du taux d'inoculation des ferments et de la température d'incubation (Lee & Lucey, 2004) ainsi que de la présence d'agents stabilisant comme l'amidon (Oh *et al.*, 2007) sur la microstructure des gels acides de type yogourts.

1.4 Facteurs influençant les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure du yogourt

La fabrication de yogourts peut engendrer certains défauts de qualité comme une texture inadéquate et de la synérèse. Dans le cas du yogourt, le lactosérum formé suite à la formation du réseau caséique n'est pas expulsé comme lors de la fabrication fromagère. La matrice caséique doit donc posséder une bonne capacité de rétention du lactosérum. Lorsqu'une partie du lactosérum s'échappe du réseau gélifié, celui-ci se retrouve à la surface des yogourts (synérèse). Il s'agit d'un défaut de qualité majeur (Lucey, 2004). Les défauts de texture sont principalement un gel trop mou ou trop ferme, un manque d'onctuosité de même qu'une sensation en bouche râpeuse/sableuse (Clark & Plotka, 2004). Pour contrôler et/ou éviter ces défauts, il est possible de 1) standardiser la composition des mélanges laitiers, 2) optimiser le procédé de fabrication ou 3) ajouter des agents stabilisants. Par contre, la dernière option ne peut pas être utilisée dans certains pays d'Europe puisque l'ajout d'agents stabilisants dans le yogourt est interdit.

1.4.1 Mélange laitier utilisé pour la fabrication du yogourt

La qualité primaire du lait et la composition du mélange laitier influencent les propriétés rhéologiques/physiques du yogourt (Lucey, 2004; Sodini *et al.*, 2004; Tamine & Robinson, 1999). Tout d'abord, la qualité de la matière première utilisée est essentielle. Par exemple, une contamination bactérienne dans le mélange laitier peut résulter en des défauts de synérèse puisque les bactéries psychotrophes peuvent hydrolyser les protéines en peptides diminuant ainsi la rétention du lactosérum (Tamine & Robinson, 1999). Tous les nutriments du lait influencent les propriétés rhéologiques et physiques du yogourt. Au départ, le lait contient 9 % de solides non gras (Amiot *et al.*, 2002). L'augmentation de la teneur en solides totaux de 10 à 14 % améliore significativement la viscosité et la rétention du lactosérum (Williams *et al.*, 2003). Le ratio caséines-protéines sériques influence les propriétés rhéologiques/physiques résultantes du yogourt et donc, il doit également être judicieusement choisi (Lucey, 2004). Par exemple, une augmentation de la teneur en protéines sériques améliore la fermeté du gel et la rétention du lactosérum (Puvanenthiran

et al., 2002). Par contre, une concentration excessive entraîne une texture granuleuse. L'ingrédient utilisé pour enrichir en protéines sériques a également une influence sur les propriétés rhéologiques/physiques du yogourt. L'enrichissement à 2 % de solides totaux avec un concentré de protéines sériques a donné un gel plus ferme qu'avec un isolat de protéines sériques (Bhullar *et al.*, 2002; Dave & Shah, 1998). Ce comportement semble être causé par une teneur en protéines sériques plus élevée avec l'isolat de protéines sériques qu'avec le concentré de protéines sériques (Bhullar *et al.*, 2002). L'effet bénéfique des protéines sériques s'explique par leur interaction avec les caséines renforçant ainsi le réseau caséique (Lucey, 2004). La matière grasse joue un rôle sur l'onctuosité et la fermeté (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). La quantité et le type de minéraux influencent aussi les propriétés rhéologiques/physiques (Tamine & Robinson, 1999). Au delà d'une concentration critique, les minéraux entravent l'agrégation des micelles de caséines résultant en une expulsion accrue du lactosérum et une faible fermeté.

1.4.2 Procédés de fabrication du yogourt

L'homogénéisation, le traitement thermique, les ferments lactiques, le couple température-temps d'incubation et de refroidissement, le pH final et les conditions d'entreposage et de manutention sont des facteurs influençant les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts (Lucey, 2004; Tamine & Robinson, 1999).

L'homogénéisation permet d'éviter le phénomène de coalescence de la matière grasse mais aussi, d'augmenter le caractère hydrophile (caséines entourant les globules de gras) du lait résultant en une rétention accrue du lactosérum (Tamine & Robinson, 1999). Les pressions élevées peuvent endommager la structure des protéines et des agents stabilisants (Lucey, 2004). Le traitement thermique est un des facteurs les plus importants à maîtriser puisque ce dernier permet la dénaturation des protéines sériques. La β -lactoglobuline, représentant près de 80 % des protéines sériques, joue un rôle non négligeable dans la formation d'un réseau caséique de fermeté adéquate. Sans traitement thermique, le gel formé est faible (Lucey *et al.*, 1999).

La microstructure du yogourt non traité thermiquement démontre un réseau caséique large et faiblement interconnecté tandis que le mélange préalablement chauffé présente un réseau caséique homogène et interconnecté tel qu'illustré à la figure 1.2 (Kalab *et al.*, 1983). Dans le cas d'un lait fermenté sans traitement thermique préalable, on estime que la taille des particules est deux fois plus élevée qu'avec un traitement thermique. Le traitement thermique a également une influence sur le processus de formation de gel (Famelart *et al.*, 2004). Sans traitement thermique, le pH de gélification passe de pH 5.5-5.2 à pH 4.8-4.6 puisque les protéines sériques ne sont pas dénaturées. Le pH de 4.6 correspond au point isoélectrique des caséines et donc, à une précipitation acide.

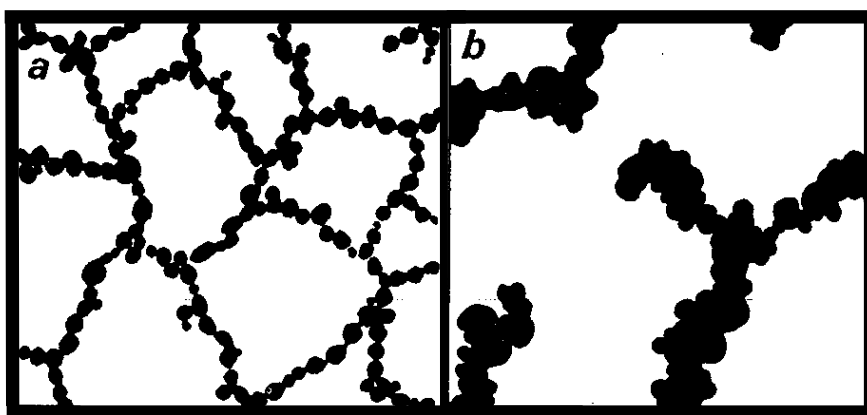


Figure 1-2 : Schéma de la microstructure de lait fermenté avec (a) ou sans traitement thermique (b) préalable (Kalab *et al.*, 1983).

Les paramètres de fermentation doivent être contrôlés (Lucey, 2004). La température influence la croissance bactérienne selon la souche et l'espèce (Monnet *et al.*, 2008). La production d'EPS par certaines bactéries lactiques peut aussi influencer les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts (Sodini *et al.*, 2004). Leur effet sera présenté ultérieurement à la section 1.6. La température d'incubation influence aussi le processus de formation de gel (Heertje *et al.*, 1985). Les liens hydrophobes étant impliqués dans la formation de gel, une température élevée favorise les liens hydrophobes et donc, entraîne la formation d'un gel plus rapide avec un réseau caséique plus compact (Laligant *et al.*, 2003; Haque *et al.*, 2001). Cet effet peut aussi être attribuable à une vitesse d'acidification plus rapide causant aussi une agrégation caséique plus rapide.

La vitesse d'acidification et le pH final influencent également la formation du gel acide. La souche et l'espèce choisies ainsi que le ratio streptocoque-lactobacille influencent la vitesse d'acidification. Une vitesse d'acidification lente engendre la formation d'un gel lisse et homogène. À l'opposé, une vitesse d'acidification rapide donne généralement un caillé moins homogène et donc, plus faible (Haque *et al.*, 2001). Le respect du pH final est primordial puisque les propriétés sensorielles (acidité, flaveur, texture) du produit fini en dépendent (Sodini *et al.*, 2004). Un pH final trop élevé ($> \text{pH } 4.6$) ne permet pas la formation d'un réseau caséique adéquat. Au contraire, un pH trop acide donne un problème d'ordre gustatif : le yogourt a un goût plus acidulé.

La vitesse et la température de refroidissement influencent la qualité du produit fini. Ces facteurs influencent la croissance bactérienne et la post-acidification. La température de remplissage des pots influence aussi les qualités du yogourt. À 10°C , le réseau caséique sera moins serré (tendance accrue à la synérèse) et aura une faible sensation en bouche tandis qu'à 20°C , la sensation en bouche sera plus prononcée, la viscosité plus élevée et la rétention du sérum accrue (Olsen, 2003). Le refroidissement augmente également la fermeté du gel (Bikker *et al.*, 2000; Lucey *et al.*, 1997). Lors du refroidissement, les liens hydrophobes entre les caséines sont progressivement remplacés par des liens non-covalent de type hydrogène, dipolaire et électrostatique responsables de l'augmentation de la fermeté des gels (Haque *et al.*, 2001). La température et la durée de l'entreposage et du transport sont aussi des paramètres influençant les qualités du yogourt (Lucey, 2004). Pendant les premières 48 heures, d'importants réarrangements sont engendrés dus à l'hydratation et/ou la stabilisation des micelles de caséines (Tamine & Robinson, 1999). Cette période est cruciale pour la délivrance d'un produit acceptable. Durant le transport réfrigéré, les chocs doivent être limités afin d'éviter une perte de viscosité et une synérèse accrue.

1.4.3 Agents stabilisants utilisés dans le yogourt

En Amérique du Nord, il est d'usage d'ajouter au mélange laitier des agents stabilisants. Le rôle principal des agents stabilisants est d'obtenir un yogourt aux propriétés rhéologiques/physiques stables et désirées (Tamine & Robinson, 1999). Il s'agit de polysaccharides ayant la capacité de gélifier ou d'accroître la viscosité et la rétention d'eau du gel.

Les agents stabilisants fréquemment utilisés sont la pectine, la gélatine, la carraghénane, la gomme xanthane, l'amidon et la gomme de caroube (Clark & Plotka, 2004; Sodini *et al.*, 2004). Ils peuvent être ajoutés séparément ou en mélange (synergie). Par exemple, des travaux ont démontré qu'un mélange de gomme xanthane et de gomme de caroube augmente la capacité de rétention d'eau du réseau caséique du yogourt (Keogh & O'Kennedy, 1998). Le type de polysaccharides en mélange influence également les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts. Par exemple, Hess et ses collaborateurs (1997) ont étudié la fermeté, la viscosité et la résistance à la synérèse de yogourts produits avec deux mélanges commerciaux. Le premier mélange composé de gélatine, carraghénane, gomme de caroube et dextrose a donné une fermeté et une sensation en bouche désirables pour des yogourts à boire. Un autre mélange contenant de la pectine et de l'amidon modifié a produit un yogourt de meilleure fermeté que le premier mélange.

La teneur en agents stabilisants influence les propriétés rhéologiques/physiques finales du yogourt (Clark & Plotka, 2004; Olsen, 2003). Par exemple, une quantité excessive de pectine ($> 0.2\%$) donne un yogourt à texture granuleuse avec une faible capacité de rétention d'eau (Olsen, 2003). La viscosité peut également être affectée par une concentration excessive de pectine (Everett & McLeod, 2005).

Un autre facteur influençant l'utilisation d'agents stabilisants dépend des propriétés rhéologiques/physiques finales désirées. Par exemple, la demande des consommateurs pour des yogourts allégés en matière grasse requiert l'ajout d'agents stabilisants afin de recréer l'onctuosité due à l'absence de la matière grasse (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004).

La gélatine, protéine d'origine animale, est un agent stabilisant de choix pour remplacer la matière grasse en raison de sa température de fusion similaire à celle de la cavité buccale donnant ainsi une perception en bouche similaire à la matière grasse (Salvador & Fiszman, 1998). Par contre, son utilisation est limitée en raison de certains consommateurs appartenant à certains groupes religieux ainsi qu'aux végétariens qui désirent éviter cet additif. La synérèse est un défaut technologique majeur pour le yogourt. L'ajout d'agents stabilisants comme l'amidon permet de prévenir la synérèse en limitant la mobilité de l'eau dans les pores de la matrice due à sa forte capacité de rétention d'eau (Ares *et al.*, 2007). La limitation de diffusion d'eau par des polysaccharides permet également d'augmenter localement le volume des pores de même que l'hydratation des caséines causant une amélioration de la viscosité (Duboc & Mollet, 2001). Pour améliorer la caractéristique de fermeté du yogourt, l'utilisation d'un polysaccharide chargé négativement comme agent stabilisant est requis (Everett & McLeod, 2005). En effet, les polysaccharides anioniques peuvent interagir avec les caséines chargées positivement à pH acide renforçant ainsi la fermeté des gels (Syrbe *et al.*, 1998). À l'opposé, les polysaccharides neutres ne peuvent former de liaisons électrostatiques. Conséquemment, leurs propriétés fonctionnelles sont plutôt reliées à l'augmentation de la viscosité de la phase continue et à la rétention accrue du lactosérum (Everett & McLeod, 2005; Syrbe *et al.*, 1998).

En Amérique du Nord, l'ajout d'amidon modifié comme agent stabilisant dans la formulation des yogourts est fréquent. C'est pour cette raison que l'amidon modifié a été choisi pour effectuer cette étude. La section suivante lui sera consacrée (section 1.5).

Les EPS produits naturellement par certaines bactéries lactiques suscitent également un intérêt technologique comme agents stabilisants naturels en raison de leur capacité de rétention du lactosérum et à moduler la viscosité des yogourts. De plus, les EPS permettent d'améliorer les caractéristiques sensorielles des yogourts comme l'onctuosité (Folkenberg *et al.*, 2005). Une section complète est consacrée aux EPS afin d'approfondir les connaissances sur ce sujet (section 1.6).

1.5 Amidons : propriétés et utilisations dans les yogourts

1.5.1 Considérations générales

En Amérique du Nord, il est d'usage d'utiliser des amidons pour la stabilisation des yogourts afin de prévenir les défauts de fabrication tels que la synérèse. Ce polysaccharide neutre peut provenir de diverses sources végétales telles que le maïs, le tapioca, le riz, la pomme de terre et le blé (Eliasson, 2004; Thomas & Atwell, 1999). Le granule d'amidon est constitué de deux macromolécules dont le glucose est l'unique monomère (Eliasson, 2004). L'amylose se présente sous une longue chaîne linéaire de glucose (liaison α 1-4) tandis que l'amylopectine est ramifiée (liaison α 1-6). Il est possible de visualiser la structure des amidons par microscopie optique en utilisant de l'iode. L'amylose est ainsi coloré en bleu et l'amylopectine en brun-rouge (Thomas & Atwell, 1999).

Selon de la source végétale, la forme, la teneur en amylose et amylopectine, le diamètre des granules et la température de gélatinisation des amidons diffèrent (Tab. 1.1). Par exemple, les granules d'amidon de maïs, de maïs cireux et de blé sont ronds tandis que les autres possèdent une structure ovale. Le contenu en amylose oscille entre 17 et 28 % sauf pour l'amidon de maïs cireux qui en est exempt. Les granules ont un diamètre de 2 à 55 μm sauf pour l'amidon de pomme de terre qui peut atteindre jusqu'à 100 μm . Le processus de gélatinisation s'amorce à des températures variables (52 à 63 °C) selon la source végétale.

Table 1-1 : Propriétés générales des granules d'amidons selon la source végétale

Source botanique	Forme	Contenu en amylose (%)	Diamètre des granules (μm)	Température de gélatinisation (°C)
Maïs	Ronde et polygonale ^c	28 ^a	2-30 ^a	62-80 ^a
Maïs cireux	Ronde et polygonale ^c	<1 ^c	5-30 ^c	63-72 ^b
Tapioca	Ovale et tronquée ^c	17 ^c	4-35 ^c	52-65 ^a
Pomme de terre	Ovale et sphérique ^b	21 ^a	5-100 ^a	58-65 ^a
Blé	Ronde et lenticulaire ^b	28 ^a	2-55 ^a	52-85 ^a

Sources: ^a(Whistler & BeMiller, 1997), ^b(Appelqvist & Debet, 1997), ^c(Thomas & Atwell, 1999).

En formulation alimentaire, l'emploi d'amidons natifs est limité en raison de leur sensibilité à la chaleur, aux pH acides et aux contraintes mécaniques provoquant des bris du granule d'amidon et donc, la perte de propriétés fonctionnelles (Eliasson, 2004). La modification chimique ou biochimique des amidons permet d'augmenter leur résistance aux traitements thermiques et mécaniques ainsi qu'aux pH acides. Les modifications chimiques ou biochimiques sont: la réticulation, l'hydrolyse chimique ou enzymatique, la stabilisation, l'oxydation et la substitution. Par contre, seuls les procédés de réticulation et de stabilisation seront décrits puisque ce sont ces types d'amidon modifié qui sont fréquemment employés dans la formulation de yogourt (Thomas & Atwell, 1999).

La réticulation consiste à remplacer les liaisons de type hydrogène entre les chaînes d'amidons par des liens covalents (Eliasson, 2004). Cette transformation permet de renforcer la structure de l'amidon vis-à-vis des hautes températures et des contraintes mécaniques. La stabilisation des chaînes d'amylose vise à réduire la rétrogradation en substituant, par estérification ou phosphorylation, certains groupements hydroxyyles par des groupements fonctionnels tels que les acétyles, les hydroxyéthyles, les hydroxypropyles et les phosphates (Eliasson, 2004).

Le choix de l'amidon modifié pour une application alimentaire est donc principalement relié au procédé de fabrication. Par exemple, dans la fabrication de yogourt, plusieurs paramètres peuvent endommager l'intégrité du granule d'amidon tels que l'homogénéisation, le traitement thermique, le pompage du lait et du yogourt dans les procédés en continu, le brassage, le lissage et le remplissage. Ainsi, il importe de choisir un amidon modifié qui résistera aux traitements thermiques et mécaniques intenses en plus tolérant au pH acide. Il est également important de considérer une possible dégradation enzymatique de l'amidon. Dans le cas du yogourt, les streptocoques et les lactobacilles utilisés ne produisent pas d'amylase pour hydrolyser les amidons (Satoh *et al.*, 1997). Le dernier élément à considérer est que le type d'amidon modifié choisi n'apporte pas de saveur au produit. Les amidons de tapioca et de maïs cireux sont reconnus pour ne pas apporter de saveurs externes aux produits alimentaires (Thomas & Atwell, 1999).

La concentration optimale en amidon modifié requise pour la fabrication de yogourts est directement reliée à la teneur en solides totaux du mélange laitier (Duboc & Mollet, 2001; Tamine & Robinson, 1999). La littérature rapporte une quantité idéale entre 0.1 à 0.7 % (Clark & Plotka, 2004).

1.5.2 Mode d'action de l'amidon

Contrairement aux autres polysaccharides utilisés comme agents stabilisants, le mode d'action expliquant les propriétés fonctionnelles de l'amidon est différent. L'habileté des polysaccharides autres que l'amidon à améliorer la viscosité et la rétention d'eau est associée au volume occupé en solution (Whistler & BeMiller, 1997). Ce volume est fonction de la forme et de la conformation (ramification, rigidité) de la chaîne du polysaccharide (Whistler & BeMiller, 1997). La structure hautement organisée en granules des amidons ne permet pas de relier leurs propriétés fonctionnelles au volume occupé en solution. C'est plutôt le processus de gélatinisation qui en est à l'origine (Oh *et al.*, 2007).

L'amidon natif est insoluble dans l'eau froide (Appelqvist & Debet, 1997). L'amylose et l'amylopectine qui le constituent se trouvent sous forme cristalline dans le granule. Un traitement thermique est essentiel afin d'hydrater le granule et permettre aux amidons d'augmenter la viscosité de la solution ou de l'aliment. Le mode d'action de l'amidon passe par deux phénomènes : la gélatinisation et la rétrogradation. La gélatinisation est l'ensemble des changements physiques des granules d'amidon en milieux aqueux et en présence de chaleur (Eliasson, 2004). Lorsque que la température s'élève, les liaisons hydrogène assurant la cohésion entre les molécules d'amidon s'affaiblissent. Les granules d'amidon sont peu à peu dispersés dans l'environnement permettant leur hydratation. Les groupements hydroxyles libres sur les molécules de glucose composant l'amylose et l'amylopectine permettent l'absorption d'une grande quantité d'eau résultant en un gonflement du granule d'amidon (Fig. 1.3) et conséquemment, une augmentation de viscosité. La rétrogradation s'entame au refroidissement des solutions d'amidon, (Eliasson, 2004). Lors de la gélatinisation, les molécules d'amylose diffusent hors du granule.

L'abaissement de température cause l'association des chaînes d'amylose par des liens hydrogène. Cet effet est accompagné d'une augmentation significative de la viscosité des solutions. Éventuellement, la formation d'un précipité (à faible concentration) ou d'un gel (à forte concentration) est possible. Les gels d'amidon ont tendance à présenter de la synérèse, après quelques jours, en raison de la contraction du gel causée par les liaisons hydrogène.

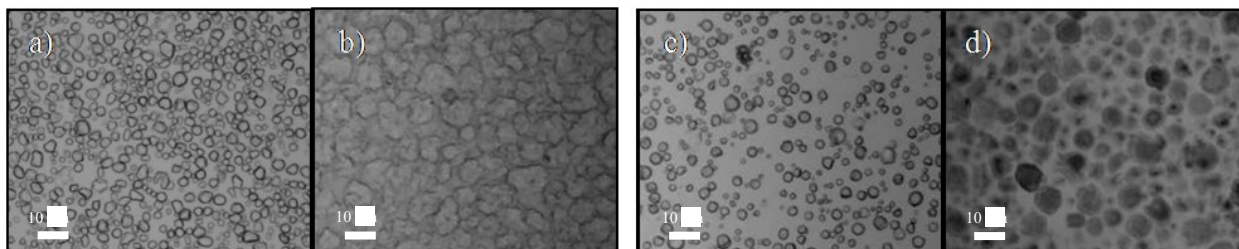


Figure 1-3: Granules d'amidon modifié de solutions aqueuses de 0.75% (p/p) avant chauffage de a) maïs cireux (Thermtext, National Starch) et de c) tapioca (National Frigex, National Starch) et suite un traitement thermique (90°C/2min) et une homogénéisation (55 °C, 2000 PSI); b) maïs cireux et d) tapioca (microscopie optique-1000x) à 21 °C.

1.5.3 Interactions amidon-autres constituants du yogourt

Les protéines lactières, les minéraux et les polysaccharides peuvent être en compétition avec l'amidon pour les molécules d'eau (Appelqvist & Debet, 1997; Colonna & Thibault, 1986). La rivalité peut entraver l'hydratation adéquate des granules d'amidon lors du processus de gélatinisation. La résultante est une perte de fonctionnalité en plus d'un possible goût indésirable d'amidon (Eliasson, 2004). Cette section présente l'effet connu de divers constituants du lait et du yogourt sur la fonctionnalité de l'amidon.

L'ajout de sucrose à une solution amidonnée favorise le gonflement jusqu'à une concentration critique menant à une diminution de la taille des granules et donc, en une perte de fonctionnalité (Cheer & Lelievre, 1983). L'ajout de caséinate de sodium dans une solution d'amidon au delà d'une concentration critique engendre également à une diminution du gonflement du granule d'amidon (Lelievre & Husbands, 1989).

La présence de minéraux peut influencer la fonctionnalité des amidons en présence de chaleur. Un eutectique tel le sel dans l'eau peut ralentir ou emmagasiner l'énergie pouvant causer un sur-chauffage des amidons et donc, un possible éclatement du granule d'amidon (Eliasson, 2004). La présence de lipides peut entraver l'hydratation des amidons (Eliasson, 2004). Les lipides entourent les molécules d'amidon changeant ainsi leur caractère hydrophile en hydrophobe. L'amylose est connu pour former des complexes avec les acides gras libres, lysophospholipides et monoglycérides (Colonna & Thibault, 1986). Dans sa structure, l'amylose possède des poches internes lipophiles. Les petites molécules lipidiques peuvent s'y insérer et former un complexe insoluble via des liaisons hydrophobes.

Des interactions synergiques ont été observées lors de la présence de polysaccharides dans des solutions amidonnées (Abdulmola *et al.*, 1996; Alloncle & Doublier, 1991). Ces effets ne seraient pas dus à des interactions spécifiques entre ces deux polysaccharides mais plutôt à une séparation de phases ségrégative causée par une incompatibilité thermodynamique (Alloncle & Doublier, 1991). L'association entre les granules d'amidon causée par le mécanisme de déplétion-floculation a également été proposée pour expliquer la synergie entre les polysaccharides et l'amidon (Abdulmola *et al.*, 1996).

Dans le yogourt, l'amidon, molécule neutre, ne semble pas interagir avec la matrice caséique, mais plutôt se comporter comme une molécule active liant l'eau et piégée dans les pores du réseau caséique. Kalab et Emmons (1975) ont observé qu'un amidon de maïs cireux pré-gélatinisée à 2% dans un yogourt ferme ne participait que faiblement à des liaisons avec les caséines. De plus, Oh et ses collaborateurs (2007) ont démontré que l'utilisation d'amidon de pomme de terre dans la formulation de laits fermentés n'avait aucune incidence sur le processus de formation de gel et sur la fermeté de ces derniers. De plus, ces auteurs ont clairement observé une séparation de phases entre la matrice caséique et l'amidon. Plus la concentration en amidon était élevée, plus le réseau caséique était compact entraînant ainsi une amélioration de la viscosité des laits fermentés.

1.6 Exopolysaccharides de bactéries lactiques

1.6.1 Définition des exopolysaccharides

Les EPS sont des polysaccharides d'origine microbienne constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et/ou de dérivés de glucides plus ou moins ramifiées (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a). Les EPS produits par les bactéries lactiques peuvent être attachés à la membrane bactérienne (EPS capsulaires) ou sécrétés directement dans le milieu (EPS libres) (Bouzar *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 1997). Certaines bactéries peuvent produire à la fois des EPS libres et capsulaires (Hassan, 2008). Les EPS ont l'avantage d'être «naturels», requis en faible concentration (de l'ordre de mg/L) et de pouvoir remplacer les agents stabilisants par leurs propriétés de modifier positivement la texture, la viscosité et la sensation en bouche des laits fermentés (Marshall & Rawson, 1999).

1.6.2 Synthèse d'exopolysaccharides

1.6.2.1 Rôle physiologique de la production d'exopolysaccharides

Bien que le rôle physiologique de la production des EPS demeure inconnu, plusieurs hypothèses ont été émises. Les EPS contribueraient à protéger les bactéries contre les environnements hostiles et/ou toxiques, la séquestration de certains cations essentiels et la reconnaissance cellulaire (Broadbent *et al.*, 2003). Les EPS pourraient également aider à la compétition contre les colonies envahissantes. Les EPS capsulaires possèderaient également une autre fonction; soit de protéger les bactéries lactiques contre l'attaque des bactériophages (Broadbent *et al.*, 2003).

L'effet protecteur des EPS produits par *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a été étudié en présence de divers facteurs antimicrobiens tels les bactériophages, les températures extrêmes (40, 50, 60 et 70 °C), la congélation (-40 °C), la lyophilisation, les antibiotiques (pénicilline et vancomycine), le lysozyme, la nisine (bactériocine), un métal toxique (cuivre) et le passage dans le tractus gastro-intestinal (Looijesteijn *et al.*, 2001).

Une souche productrice d'EPS a été comparée à une souche non productrice. Afin de différencier l'effet bénéfique des EPS capsulaires par rapport aux EPS libérés dans l'environnement, le lactocoque non producteur d'EPS a été additionné d'EPS libres (contrôle). Les EPS ont protégé les cellules bactériennes contre les bactériophages, le cuivre, la nisine et le lysozyme. Pour certains de ces facteurs, la présence de la couche superficielle formée par les EPS capsulaires a contribué à la protection de la bactérie lactique. Par contre, aucune protection n'a été observée contre les températures extrêmes et la congélation. La lyophilisation n'a pas influencée le développement bactérien. Les EPS n'ont pas affecté la survie microbienne pendant le passage dans un modèle simulant le tractus gastro-intestinal. Il est à noter que les EPS n'ont pas été dégradés pendant la digestion.

1.6.2.2 Biosynthèse d'exopolysaccharides

La production d'EPS est régulée par plusieurs gènes au niveau chromosomique dans le cas des deux bactéries du yogourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Cerning *et al.*, 1995; Cerning, 1990). La biosynthèse des EPS est effectuée par deux mécanismes distincts selon qu'elle est extracellulaire ou intracellulaire (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; Ricciardi & Clementi, 2000). La production extracellulaire d'EPS tels que les dextrans et les levans, se réalise à l'extérieur de la cellule impliquant des enzymes lipoprotéiques soit dextran-sucrase et levan-sucrase, respectivement (Duboc & Mollet, 2001; Monsan *et al.*, 2001). Le sucrose extracellulaire fournit les monosaccharides. Les sous-unités glucidiques non phosphoryées sont les premières à être formées. L'énergie requise, pour leur fabrication, provient de la catalyse du lien osidique du sucrose (Duboc & Mollet, 2001; Monsan *et al.*, 2001). Par contre, les polysaccharides synthétisés à l'intérieur de la cellule (intracellulaire) sont fabriqués à partir des molécules d'uridine diphosphate (nucléotides) contenant des sucres simples. Ces composés biologiques fournissent à la cellule bactérienne un moyen de convertir les monosaccharides du nucléotide en d'autres sucres simples via des réactions d'épimérisation, de déshydrogénation et de décarboxylation.

La synthèse intracellulaire comporte quatre étapes (Sutherland, 2001). Le premier stade est l'activation des monosaccharides par la formation des nucléotides dans le cytoplasme. Par la suite, les unités répétitives sont assemblées. Les monosaccharides sont additionnés séquentiellement sur un transporteur lipidique. Le transfert est effectué par des enzymes spécifiques : les transférases. S'il y a un groupement acétyle, il est ajouté à ce stade. Ensuite, les macromolécules sont transférées, à l'aide du véhicule lipidique, vers la membrane extérieure de la cellule. Finalement, les sous-unités répétitives seront rattachées formant ainsi le squelette du polysaccharide.

1.6.2.3 Variabilité de la production d'exopolysaccharides

Généralement pour les bactéries thermophiles, la production d'EPS est associée à la croissance bactérienne (Petry *et al.*, 2003; Degeest & De Vuyst, 1999; De Vuyst *et al.*, 1998). Plusieurs auteurs ont noté une instabilité dans la production d'EPS (Degeest & De Vuyst, 1999; Cerning *et al.*, 1992; Cerning *et al.*, 1988; Macura & Townsley, 1984). Cette production instable d'EPS pourrait s'expliquer par des repiquages successifs de souches (Cerning *et al.*, 1990), la dégradation possible des EPS durant l'entreposage par des glycohydrolases extracellulaires (Petry *et al.*, 2003; Degeest & De Vuyst, 1999; Cerning *et al.*, 1988; Macura & Townsley, 1984) ou une instabilité génétique comme la perte du gène de production d'EPS (Jolly & Stingele, 2001).

1.6.3 Structure moléculaire des exopolysaccharides

Les EPS produits par les bactéries lactiques sont divisés en deux groupes : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; De Vuyst *et al.*, 2001). Pour le premier groupe, l'EPS est constitué d'un seul type de monosaccharides tandis que les EPS du second contiennent une séquence répétée de deux ou plusieurs sucres simples (Vaningelgem *et al.*, 2004a; Duboc & Mollet, 2001; De Vuyst *et al.*, 2001;;). Les homopolysaccharides sont composés soit de glucose (α -D-glucans ou β -D-glucans), soit de fructose (fructans) ou soit de polygalactane sous forme pyranose ou furanose (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005; Monsan *et al.*, 2001).

Les deux positions (alpha ou beta) du groupement hydroxyle sur l'hexose sont possibles (De Vuyst *et al.*, 2001). Les homopolysaccharides possèdent un poids moléculaire élevé soit de 2.7 à 21.6 X 10⁶ Dalton (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a).

La composition chimique des hétéropolysaccharides est plus variée comparativement aux homopolysaccharides. Ce groupe est fréquemment constitué d'une combinaison de D-glucose, D-galactose et de L-rhamnose (De Vuyst *et al.*, 2001; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a). Des molécules comme la *N*-acétylglucosamine, la *N*-acétylgalactosamine et l'acide galacturonique peuvent également se retrouver dans la structure des EPS. Aussi, il est possible de retrouver des dérivés de sucres phosphatés, des composés acétylés et du glycérol. Le poids moléculaire des hétéropolysaccharides se situe entre 10⁴ et 10⁶ Dalton (Behare *et al.*, 2009; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b). Les glucides présents sur la chaîne constituant les EPS sont liés par des liaisons glycosidiques dont deux positions sont possibles : alpha et beta. Les hétéropolysaccharides aux caractéristiques structurales connues sont principalement neutres ou de charge négative (De Vuyst & Degeest, 1999).

1.6.4 Facteurs influençant la production d'exopolysaccharides

La production d'EPS oscille entre 40 et 400 mg/L (Amatayakul, 2005). La quantité d'EPS produits et leurs caractéristiques structurales dépendent de la souche et de l'espèce ainsi que des conditions environnementales utilisées telles que le milieu de culture, la température et la durée d'incubation, la vitesse d'acidification, le pH et la quantité d'oxygène (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; De Vuyst & Degeest, 1999).

1.6.4.1 Effet de la souche et de l'espèce

La souche et l'espèce utilisées influencent la quantité et la structure des EPS (Ricciardi & Clementi, 2000). Une étude portant sur la comparaison de cent quatre-vingt-deux souches de *Lactobacillus*, seulement soixante ont produit plus de 100 mg/L d'EPS (van Geel-Schutten *et al.*, 1998).

Vingt-six souches de *Streptococcus thermophilus* ont été utilisées afin de déterminer la diversité des EPS produits ainsi que la quantité d'EPS produits dans le lait (Vaningelgem *et al.*, 2004a). Seulement quatre souches ont fabriqué plus de 100 mg/L d'EPS tandis que douze en ont synthétisé entre 20 et 100 mg/L. Certaines bactéries peuvent synthétiser plus d'un EPS (Degeest & De Vuyst, 1999; Ricciardi & Clementi, 2000; Shene *et al.*, 2008; Ariga *et al.*, 1992; Vaningelgem *et al.*, 2004b). Par contre, la production de plusieurs EPS observée par certains auteurs pourrait être due à une dégradation de ces derniers suite à une incubation prolongée (Degeest & De Vuyst, 1999).

1.6.4.2 Effet du milieu de culture

La composition du milieu de culture influence la production d'EPS. Les sources nutritives souvent utilisées sont : le lait écrémé, le lactosérum enrichi ou non, un lait standardisé dans les cas de fabrication de yogourt ou de fromage, un milieu semi-défini, un milieu chimiquement défini et le BMM du terme anglais : «basal minimal medium» (Behare *et al.*, 2009; Ruas-Madiedo *et al.*, 2005; Morishita *et al.*, 1981). La source de carbone et le ratio carbone sur azote influence la production d'EPS ainsi que certaines caractéristiques structurales comme le poids moléculaire. Une solution de 1 % de lactose permet la production d'EPS (Macy, 1923). Cette production est stimulée en présence de caséines. Par contre, une absence de source carbonée freine la croissance bactérienne, voire l'inhibe. Par exemple, Looijesteijn et ses collaborateurs (2000) ont étudié l'impact d'une limitation en nutriments (glucose, phosphate et leucine) sur la quantité, la composition et le poids moléculaire des EPS produits par *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Aucune des restrictions nutritives n'a influencé la structure des EPS produits. Une limitation de la teneur en glucose n'a pas influencé la quantité d'EPS produits tandis que le poids moléculaire était plus faible. Ces résultats indiquent que les bactéries lactiques utiliseraient prioritairement le glucose pour la fabrication d'EPS au détriment des sous-produits de fermentation. En présence d'une quantité limitée de leucine et de phosphate, la quantité d'EPS produits a diminué de plus de la moitié tandis que leur poids moléculaire n'a pas varié.

Van Geel-Schutten et ses collaborateurs (1998) ont testé l'influence du milieu de culture sur la quantité d'EPS produits et la composition en sucres simples des EPS synthétisés par des lactobacilles. Le milieu synthétique: de Man, Rosoga et Sharpe (MRS) a été enrichi (100 g/L) avec divers glucides (glucose, fructose, maltose, raffinose, sucrose, galactose ou lactose). Un rendement supérieur a été mesuré dans le milieu MRS enrichi avec du sucrose. Par contre, le MRS de base n'était pas un milieu idéal pour la production d'EPS (Cerning *et al.*, 1990). Les matières azotées, malgré qu'elles ne participent pas directement au mécanisme de biosynthèse des EPS, sont essentielles à la croissance bactérienne. Un environnement riche en carbone et pauvre en azote (ratio carbone : azote élevé) favorise la production d'EPS (Shene *et al.*, 2008). Par contre, un faible ratio carbone sur azote favorise la production d'EPS à faible poids moléculaire (Degeest & De Vuyst, 1999; Shene *et al.*, 2008). Les autres caractéristiques structurales (conformation et composition en sucres) n'ont pas été affectées. Des travaux ont porté sur la quantité d'EPS produits par diverses souches de *Streptococcus thermophilus* dans du lait enrichi ou non de peptone et d'extraits de levures (van Geel-Schutten *et al.*, 1998). Pour tous les microorganismes étudiés, le rendement le plus élevé a été observé dans le lait enrichi. De plus, ces auteurs ont noté que la présence de matière azotée influence positivement le poids moléculaire des EPS. La source de carbone n'a aucune influence sur la composition en sucres des EPS (Looijesteijn *et al.*, 2000; Degeest & De Vuyst, 1999).

1.6.4.3 Effet de la température d'incubation

La température d'incubation a un impact sur la production d'EPS (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005; Looijesteijn *et al.*, 2001). Certaines études rapportent des effets contradictoires. La production d'EPS serait favorisée à une température à la limite inférieure de la zone de température optimale de croissance (Ricciardi & Clementi, 2000). La croissance bactérienne étant ralentie, la production de composés pour le développement des cellules aussi. Conséquemment, les transporteurs lipidiques sont moins sollicités et plus disponibles pour la synthèse d'EPS (Cerning, 1995). Par contre, d'autres auteurs ont observé une production accrue d'EPS aux températures optimales de croissance (Looijesteijn *et al.*, 2001; De Vuyst *et al.*, 1998).

L'impact de la température d'incubation dépend largement de la souche et de l'espèce utilisées. Par exemple, dans un lait écrémé supplémenté avec de l'extrait de levures et/ou de casitone, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B35 a produit une quantité supérieure d'EPS à 20°C qu'à 30°C tandis que la souche *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891 a produit une quantité similaire d'EPS aux deux températures (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005).

1.6.4.4 Effet du stade de croissance bactérienne

La production d'EPS dépend du développement bactérien. Certaines bactéries synthétisent des EPS durant toutes les étapes de croissance tandis que d'autres ne les produisent qu'en fin de phase exponentielle ou au stade stationnaire (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005; Sutherland, 2001). La relation entre la croissance bactérienne et la production d'EPS est complexe et dépend du flux de carbone intracellulaire de la glycolyse, des conditions de culture ainsi que des espèces et des souches.

1.6.4.5 Effet du temps de fermentation

Le temps de fermentation influence la quantité et le poids moléculaire des EPS (Lin & Chang Chien, 2007). Selon l'étude menée par Lin et Chang Chien (2007) sur deux souches de *Lactobacillus helveticus*, une longue durée de fermentation (environ 60 h) permet une synthèse accrue d'EPS. Parallèlement, une diminution de la population totale a été observée. Ces résultats concordent avec les études démontrant que des conditions environnementales défavorables peuvent entraîner une production accrue d'EPS afin de protéger les microorganismes contre cet environnement hostile. Lin et Chang Chien (2007) ont également observé une augmentation du poids moléculaire des EPS après une durée d'incubation de 32 à 60 h comparativement à 12 à 24 h. Par contre, une autre étude a démontré qu'une fermentation de 12 h entraîne une diminution de la production d'EPS (Vaningelgem *et al.*, 2004). Certains auteurs ont également remarqué une diminution de la quantité d'EPS en fonction du temps possiblement attribuable à la dégradation des EPS par des enzymes glycohydrolases (α -et β -glucosidase, β -glucuronidase) (Petry *et al.*, 2003; Degeest & De Vust, 1999).

1.6.4.6 Effet de la vitesse d'acidification

La production d'EPS est influencée par la vitesse d'acidification (Vaningelgem *et al.*, 2004b; Looijesteijn *et al.*, 2000). Dans un milieu synthétique, une vitesse d'acidification rapide résulte en une diminution de la production d'EPS par *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en fermentation continue (Looijesteijn *et al.*, 2000). De plus, le même milieu de culture limité en glucose et jumelé avec une lente vitesse d'acidification a favorisé la production d'EPS.

1.6.4.7 Effet du pH

Peu de travaux ont porté sur l'effet du pH sur la production d'EPS ou l'information est fragmentaire (Ricciardi & Clementi, 2000). Souvent les études sont réalisées sans contrôle de pH ou à un pH fixe de fermentation (Lin & Chang Chien, 2007; Looijesteijn *et al.*, 2001). En général, le pH idéal pour favoriser la production d'EPS est celui associé à la phase optimale de croissance pour les bactéries thermophiles. Dans une étude portant sur la biodiversité des EPS produits par des souches de *Streptococcus thermophilus*, trois streptocoques sur quatre ont produit une quantité maximale d'EPS à pH 5.2 dans du lait fermenté pendant 24 h à 42 °C comparativement à une fermentation sans contrôle de pH (Vaningelgem *et al.*, 2004a).

1.6.4.8 Effet de la quantité d'oxygène

Les études portant sur la quantité d'oxygène requis dans le milieu de culture sont contradictoires. Certains auteurs ont observé une production accrue d'EPS lorsque le taux d'oxygène diminuait (De Vuyst *et al.*, 1998) tandis que d'autres affirment que la présence d'oxygène stimule la production d'EPS (Cerning *et al.*, 1990).

1.6.5 Extraction des exopolysaccharides

La sélection du milieu de croissance dépend des tests subséquents. La raison étant que certains nutriments ne peuvent pas être extraits du milieu de croissance et donc, peuvent causer des interférences. Par exemple, les glucomannanes contenus dans les extraits de levures et la peptone (composés glucidiques ajoutés aux milieux de culture complexes) interfèrent lors de l'analyse des monomères par chromatographie liquide haute performance (HPLC) puisque ceux-ci ne peuvent être extraits du milieu de culture (Vaningelgem *et al.*, 2004a). Dans le cas de la production d'EPS dans le lait, une étape d'extraction et de purification s'impose afin d'éviter les interférences lors de la quantification et de la caractérisation des EPS. Par exemple, il importe d'éliminer les protéines laitières. En effet, les matières azotées interfèrent dans plusieurs méthodes de dosage des sucres comme la méthode de Dubois (Dubois *et al.*, 1956). De plus, lors de la production d'EPS, les bactéries lactiques produisent également des sous-produits indésirables (Welman & Maddox, 2003). L'avantage des milieux de culture synthétiques comparés au lait ou aux solutions de lactosérum (milieu complexe) est qu'il est plus facile d'en faire l'isolement des EPS (Ricciardi & Clementi, 2000).

Le choix des méthodes d'extraction et de purification est tributaire des analyses subséquentes soit un dosage quantitatif ou une élucidation de structure en résonance magnétique nucléaire. Par conséquent, le niveau de pureté requis n'est pas le même. Il importe donc de différencier les méthodes d'extraction des méthodes de purification. La première est idéale lorsque l'on veut quantifier la production d'EPS en raison de sa rapidité et de sa simplicité. Lorsque l'on extrait les EPS, on parle généralement d'EPS brut (terme anglais «crude EPS»). La seconde est essentielle lorsque l'on veut élucider les caractéristiques structurales des EPS puisque la pureté de l'ingrédient est primordiale. Étant donné que le but de ce travail n'est pas d'élucider la structure des EPS, les méthodes de purification ne seront pas présentées.

Les méthodes d'extraction comprennent les étapes suivantes : précipitation protéique par acide trichloroacétique (TCA) ou enzyme (pronase) suivi de centrifugation et de dialyse (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005; van den Berg *et al.*, 1995). Les concentrations en TCA sont variables de 4 à 14% (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005). La centrifugation est employée pour éliminer les protéines précipitées (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005). Il n'existe pas de règle générale pour la force de centrifugation (Cerning *et al.*, 1990). Comparativement à l'utilisation de la pronase, le TCA offre l'avantage de précipiter les protéines rapidement. Par contre, la précipitation des protéines peut entraîner une quantité considérable d'EPS dans le précipité. Les pertes peuvent être grandement diminuées par le lavage des culots au moins une fois pour permettre une récupération accrue des EPS (Cerning, 1995). Par la suite, la dialyse peut être utilisée pour permettre d'éliminer les composés de faibles poids moléculaires comme les sucres résiduels (galactose, lactose) pouvant interférer avec les méthodes de quantification (Rimada & Abraham, 2003). Avant le test du dosage des EPS, les matières azotées résiduelles sont quantifiées soit par la méthode officielle (Kjeldahl), soit par colorimétrie (Bradford) ou soit par LECO (Vaningelgem *et al.*, 2004b; van Geel-Schutten *et al.*, 1998; Bradford, 1976) afin d'évaluer la qualité de l'extraction protéique et d'éviter les interférences avec les méthodes de quantification des EPS.

Les méthodes d'analyse permettant d'élucider les caractéristiques structurales des EPS ne seront pas présentées dans ce travail puisque la structure des EPS n'a pas été déterminée. La sélection des souches productrices d'EPS, utilisées dans ce travail, a plutôt été basée sur les caractéristiques structurales déjà publiées dans la littérature.

1.6.6 Quantification des exopolysaccharides

Plusieurs méthodes de quantification des EPS existent. Conséquemment, le choix de la méthode dépend du milieu de culture dans lequel les EPS se trouvent et du degré de pureté obtenu après extraction ou purification (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005). La quantification des glucides peut se faire par des méthodes colorimétriques (Amatayakul *et al.*, 2006b; Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilan, 2005; Dubois *et al.*, 1956) ou des méthodes de chromatographie d'exclusion moléculaire permettant la séparation des biopolymères selon la taille (Looijesteijn *et al.*, 2000). Les méthodes colorimétriques sont largement employées en raison de leur rapidité, simplicité et faible coût.

La production spécifique en EPS est définie comme étant la quantité d'EPS produits par unité de densité optique. L'efficacité de la production des EPS est décrite comme la quantité d'EPS produits par la quantité de glucose consommée. L'unité permettant d'exprimer la quantité d'EPS synthétisés est en équivalent de milligramme de dextran par millilitre. Il s'agit de la quantité de biopolymères donnant la même turbidité à 720 nm qu'un milligramme de dextran (2×10^6 Da) (Garcia-Garibay & Marshall, 1991). Il est à noter que les valeurs obtenues par spectroscopie sont largement influencées par le degré de pureté de l'échantillon soit des traces de protéines et des glucides. Ces derniers sont également quantifiés lors de l'analyse. Ainsi, la valeur de densité optique est surestimée.

Toutes les méthodes de quantification des EPS requièrent un témoin sans ensemencement bactérien ou acidifié avec du glucono-delta-lactone au même pH que le milieu de culture. Ce témoin permettra de soustraire la valeur résiduelle et inhérente en sucres du milieu de culture choisi. En règle générale, pour obtenir des résultats reproductibles, il faut un maximum de 5% de coefficient de variation entre les valeurs (Goh *et al.*, 2005a).

1.6.7 Relation structure-fonction des exopolysaccharides

Plusieurs études portant sur l'effet des EPS sur les propriétés rhéologiques/physiques de produits laitiers fermentés de type yogourts tendent à démontrer que la concentration en EPS ne serait pas le facteur déterminant pour moduler les propriétés rhéologiques/physiques de ces produits laitiers fermentés (Doleyres *et al.*, 2005; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; De Vuyst *et al.*, 2003; Marshall & Rawson, 1999). La fonctionnalité des EPS serait plutôt reliée aux caractéristiques structurales des EPS ainsi qu'à leurs interactions avec les autres constituants du milieu comme les protéines. Le poids moléculaire (Petry *et al.*, 2003; Faber *et al.*, 1998), la conformation (flexibilité et ramification) de la chaîne (Tuinier *et al.*, 2001) et la charge (Hayala-Hernández *et al.*, 2009; Turgeon & Plesca, 2009; Girard & Schaffer-Lequart, 2007a) des EPS influenceraient les propriétés rhéologiques/physiques des produits laitiers fermentés de type yogourts. La relation structure-fonction des EPS produits par des bactéries lactiques est présentée au tableau 1.2.

1.6.7.1 Effet du poids moléculaire

La propriété des polysaccharides d'affecter la viscosité des solutions est fonction du volume occupé dans la solution. Ce volume est fonction du poids moléculaire et de la conformation de la chaîne (rigidité et ramification) du polysaccharide (Whistler & BeMiller, 1997). Plus le volume occupé par le polysaccharide est grand, plus la viscosité est élevée. L'habileté des EPS à conférer une certaine viscosité aux solutions peut se mesurer par la viscosité intrinsèque. Il s'agit d'un paramètre-clé pour décrire l'habileté des EPS à rendre leur environnement visqueux puisque la viscosité intrinsèque tient compte du rayon de gyration, du poids moléculaire et de la conformation de la chaîne (rigidité et ramification) (Tuinier *et al.*, 2001). Le rayon de gyration mesure la taille du biopolymère référant à la rigidité et la ramification de la chaîne tandis que le poids moléculaire est une indication de sa longueur. Tuinier et ses collaborateurs (2001) ont étudié l'effet du poids moléculaire, de la rigidité et de la ramification d'EPS purifiés produits par *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. La valeur de viscosité intrinsèque était plus faible dans le cas de l'EPS de plus faible poids moléculaire.

Dans une autre étude, la viscosité des laits fermentés semblait également être positivement corrélée avec une augmentation du poids moléculaire de l'EPS (Faber *et al.*, 1998). Ces auteurs ont étudié deux souches de *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS aux caractéristiques structurales identiques sauf pour le poids moléculaire. Des différences significatives de viscosité ont été remarquées : des valeurs plus élevées ont été mesurées avec l'EPS de haut poids moléculaire comparativement à l'EPS de plus faible poids moléculaire. Petry et ses collaborateurs (2003) ont également observé des viscosités plus élevées avec des EPS de hauts poids moléculaires produits *in situ* dans du lait par *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

1.6.7.2 Effet de la conformation de la chaîne

Une structure spécifique d'EPS n'est pas nécessairement reliée à des valeurs absolues de texture et de viscosité. La longueur et le degré de ramification de la chaîne affectent les propriétés rhéologiques/physiques des produits laitiers fermentés. Pour un poids moléculaire donné, les molécules linéaires vont occuper un plus large volume en solution puisqu'elles vont s'étendre au lieu de se compacter comme les molécules ramifiées et donc, vont contribuer à augmenter la viscosité des solutions (Whistler & BeMiller, 1997).

La rigidité de la chaîne influence les propriétés rhéologiques/physiques des produits laitiers fermentés (Laws & Marshall, 2001). Certains types de liens résultent en une mobilité réduite des chaînes autour de cette liaison et sont considérés rigides. Ainsi les liens β (1→4) sont plus rigides que les liaisons β (1→2) et β (1→3) (Whistler & BeMiller, 1997). Les liaisons glycosidiques α sont plus flexibles que les liens β . La rigidité de la chaîne peut réduire la possibilité d'interactions entre les unités de la chaîne et les autres constituants présents dans le milieu. Les polysaccharides rigides auront tendance à s'étendre en solution tandis que la flexibilité permet aux molécules de se compacter et donc, d'occuper un volume moins grand (Whistler & BeMiller, 1997). Tuinier et ses collaborateurs (2001) ont étudié l'effet de la rigidité de la chaîne sur la viscosité intrinsèque d'EPS purifiés provenant de *Lactococcus lactis ssp. cremoris*. Les résultats ont démontré une corrélation positive entre la rigidité et la viscosité intrinsèque.

1.6.7.3 Effet de la charge

La charge des EPS influencerait également les propriétés rhéologiques/physiques des produits laitiers fermentés (van den Berg *et al.*, 1995; Ayala-Hernández *et al.*, 2009; Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Turgeon & Plesca, 2009). Un polysaccharide anionique peut former des liaisons électrostatiques avec les caséines chargées positivement à pH acide et ainsi, augmenter la fermeté du gel tandis qu'un polysaccharide neutre aura tendance à se dissoudre plus facilement dans le lactosérum (Robijn *et al.*, 1996; Robijn *et al.*, 1995; van den Berg *et al.*, 1995). Une étude comparative a été réalisée sur l'effet d'un EPS anionique produit *in situ* par *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* dans un perméat de lait avec des protéines sériques comparativement à une souche non productrice d'EPS (Ayala-Hernández *et al.*, 2009). Les résultats ont démontré une amélioration de la viscosité et du module élastique du lait fermenté avec l'EPS anionique. Turgeon et Plesca (2009) ont aussi étudié l'effet d'un EPS anionique purifié sur la formation de gel, le module élastique et la synérèse de lait acidifié avec de la glucono-delta-lactone. Un pH de gélification supérieur a été observé avec l'EPS anionique comparativement au témoin. De plus, le module élastique a été amélioré avec l'EPS anionique. Ces auteurs attribuent ces effets aux interactions électrostatiques entre l'EPS et les caséines. La synérèse a été améliorée lorsqu'une faible concentration en EPS a été ajoutée. Par contre, la synérèse a augmenté à forte concentration. Cet effet pourrait être relié aux interactions électrostatiques entre l'EPS et les caséines menant à une diminution des interactions caséines-caséines et donc, à diminuer la capacité du réseau caséique à retenir le lactosérum. Girard et Schaffer-Lequart (2007a) ont étudié la relation structure-fonction de trois EPS aux caractéristiques structurales connues et produits *in situ* sur la formation de gel et la résistance aux cisaillements des laits fermentés. Un pH de gélification supérieur avec les trois EPS a été observé bien qu'un des trois EPS possédait une charge négative. La présence d'EPS pourrait provoquer une incompatibilité thermodynamique par un phénomène de déplétion-floculation causant un pH de gélification supérieur tel qu'observé par Tuinier et ses collaborateurs (2001). Une résistance au cisaillement accrue a été observée avec l'EPS anionique comparativement aux deux EPS neutres et serait probablement due aux interactions électrostatiques entre les caséines et l'EPS anionique. Une viscosité supérieure a aussi été observée pour un EPS anionique comparativement à une solution de gomme xanthane (van den Berg *et al.*, 1995).

1.6.7.4 Interactions dans les gels acides de type yogourts

Certains auteurs ont observé que les EPS seraient localisés dans les pores plutôt qu'impliqués dans la formation du réseau caséique (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; Hassan *et al.*, 2003b) tandis que d'autres ont remarqué des interactions entre les EPS et la matrice caséique selon le ferment utilisé (Folkenberg *et al.*, 2005). Par contre, les caractéristiques structurales des EPS produits par les ferments de toutes ces études étaient inconnues. Il est donc difficile d'établir un modèle de relation structure-fonction. Récemment, Girard et Schaffer-Lequart (2007a) ont observé une séparation de phases entre le réseau caséique et les EPS dans des laits fermentés fermes et brassés. Dans les laits fermentés fermes, les EPS se retrouvaient dans les pores du réseau caséique indépendamment de la structure de l'EPS tandis qu'après brassage, les EPS neutres n'étaient pas mélangés aux protéines (séparation de phases). Avec l'EPS chargé négativement, le réseau caséique était homogène supposant des interactions électrostatiques entre l'EPS et les protéines laitières. Cette étude souligne également les changements apportés par le brassage. Finalement, la connaissance de la structure de l'EPS est importante afin de prédire ses interactions avec les protéines laitières et donc, son pouvoir de moduler les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts.

Quelques études ont démontré que la fonctionnalité des EPS diffère s'ils sont produits *in situ* ou ajoutés comme bio-ingrédient (forme purifiée et lyophilisée) (Doleyres *et al.*, 2005). Pendant la formation du réseau caséique, les EPS produits *in situ* peuvent interagir avec les divers constituants en cours d'acidification. Par contre, les EPS ajoutés comme bio-ingrédient peuvent être difficiles à disperser et à solubiliser causant ainsi des pertes de fonctionnalité. De plus, selon le degré de purification des EPS, la présence d'impuretés résiduelles peut modifier la fonctionnalité. Certains auteurs ont observé une perte du caractère filant d'un EPS purifié et lyophilisé lors de sa réhydratation (Girard & Schaffer-Lequart, 2007b). Cette observation démontre que la purification et la lyophilisation peuvent modifier la fonctionnalité des EPS.

En résumé, les études ont démontré que les connaissances sur la relation structure-fonction des EPS étaient limitées et fragmentaires. Les études ayant porté sur la relation structure-fonction des EPS comparaient de 1 à 3 EPS (Tab. 1.2). De plus, les propriétés rhéologiques/physiques mesurées étaient souvent limitées à la viscosité lorsque plusieurs EPS étaient comparés. Afin d'avoir un schéma global de la relation structure-fonction des EPS, il importe de mesurer plusieurs propriétés rhéologiques/physiques puisque ces dernières ne donnent pas toutes les mêmes informations concernant les caractéristiques du yogourt. De plus, les conditions et les milieux de culture utilisés dans les études sur la relation structure-fonction des EPS produits par les bactéries du yogourt n'étaient pas représentatifs des conditions (composition du milieu, temps de fermentation) de fabrication du yogourt.

Un des principaux objectifs de ce projet de recherche est de contribuer à la compréhension de la relation structure-fonction des EPS en réalisant une étude comparative de l'effet de plusieurs EPS aux structures connues sur les propriétés rhéologiques/physiques (suivi de la formation de gel, viscosité apparente, module élastique, fermeté, synérèse) des yogourts.

Table 1-2: Relation structure-fonction des EPS aux caractéristiques structurales connues et produits par des bactéries lactiques

Souches ^A	État des EPS ^B	Milieu et condition de culture	Propriété rhéologique ou physique	Caractéristique structurale ^C			Référence
				Rigidité et ramification	Poids moléculaire	Charge	
<i>L. rhamnosus</i> (1)	Purifié	Lait écrémé (10 %) 10 h, 30°C	Formation de gel	n.d.	n.d.	+	Turgeon et Plesca, 2009
			Module élastique	n.d.	n.d.	+	
			Synérèse	n.d.	n.d.	+/-	
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (2)	Purifié	Perméat de lactosérum enrichi, 20 h, 30°C	Viscosité intrinsèque	+	+	n.d.	Tuinier et <i>al.</i> , 2001
<i>L. saké</i> (1)	Purifié	Milieu semi-défini 48 h, 20°C	Viscosité	n.d.	=	+	van den Berg et <i>al.</i> , 1995
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (3)	<i>In situ</i>	Lait écrémé (11 %) 10 h, 25 ou 40°C	Formation de gel	n.d.	n.d.	+	Girard et Schaffer-Lequart, 2007a
			Résistance aux cisaillements	=	n.d.	+	
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (3)	<i>In situ</i>	Lait écrémé (10 %) 25 h, 42°C	Viscosité	n.d.	+	n.d.	Petry et <i>al.</i> , 2003
<i>S. thermophilus</i> (2)	<i>In situ</i>	Lait écrémé (12 %) 16 h, 32°C	Viscosité	=	+	=	Farber et <i>al.</i> , 1998
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (1)	<i>In situ</i>	Perméat de lait enrichi 12 h, 30°C	Module élastique	n.d.	n.d.	+	Ayala-Hernandez et <i>al.</i> , 2009
			Viscosité	n.d.	n.d.	+	

^A S = *Sreptococcus*, L = *Lactobacillus*, Lc = *Lactococcus* et le chiffre entre parenthèse correspond au nombre d'EPS qui ont été comparés.

^B L'état des EPS réfère à leur utilisation dans le milieu soit sous forme purifiée ou produit *in situ*.

^C Les abréviations signifient : effet positif (+), effet négatif (-), pas d'effet (=) ou effet non mesuré (n.d.) sur les propriétés rhéologiques/physiques.

1.7 Interactions polysaccharides-protéines

Des interactions de nature attractive ou répulsive sont possibles entre les polysaccharides et les protéines. Les interactions associatives sont observées entre des polysaccharides anioniques et des protéines portant des charges positives alors qu'avec les polysaccharides neutres, les interactions seront de nature ségrégatives (Turgeon *et al.*, 2003). Deux types de solution peuvent être observés en conditions de compatibilité thermodynamique : la co-solubilité (une phase stable) et la séparation de phases associative où les deux biopolymères se retrouvent majoritairement dans une des deux phases (Turgeon *et al.*, 2003). La première situation se produit lorsque la concentration en soluté est très faible. La seconde exige des conditions de pH et de force ionique précises. Les interactions polysaccharides-protéines sont fonction du pH, de la force ionique, de la densité de charge, de la conformation et de la concentration (Tolstoguzov, 1997). Par contre, la séparation de phases ségrégative induite dans le cas d'une incompatibilité thermodynamique favorise les interactions entre les molécules de même type causant la formation de deux phases distinctes où chacune est riche en un seul biopolymère (Turgeon *et al.*, 2003).

L'étude des interactions EPS-protéines laitières est plutôt complexe. La principale raison étant que contrairement aux agents stabilisants conventionnels (pectine, amidon et autres) qui sont ajoutés directement au début du procédé de fabrication du yogourt, les EPS sont produits progressivement dans le milieu au cours de la fermentation. La cinétique de production d'EPS et leurs caractéristiques structurales peuvent influencer le processus de formation de gel du yogourt en fonction du pH. En effet, l'évolution de la charge et de l'hydrophobicité des protéines ainsi que d'autres changements physico-chimiques tels que la solubilisation du phosphate de calcium durant la fermentation peuvent influencer les interactions des EPS avec les protéines laitières et donc, leur fonctionnalité (Hassan, 2008). Conséquemment, les interactions entre les EPS et les protéines laitières peuvent changer en fonction du pH. Une autre différence entre les agents stabilisants conventionnels et les EPS est que la concentration en polysaccharides est connue et est maintenue fixe tout au long du processus de fermentation ce qui n'est pas le cas des EPS produits *in situ*. Ces différences majeures contribuent à la difficulté d'étudier les interactions EPS-protéines laitières.

Néanmoins, les interactions EPS-protéines laitières semblent être gouvernées par l'incompatibilité thermodynamique causée par le phénomène de déplétion-floculation (Tuinier *et al.*, 2000). Le modèle de déplétion-floculation donne une explication thermodynamique de la séparation de phases causée par la présence conjointe de larges particules colloïdales et de polymères neutres en solution sur la base du volume d'exclusion (de Kruif & Tuinier, 2001; Tuinier *et al.*, 2001). Ce phénomène est présenté à la figure 1.4. Les micelles de caséines représentent les particules colloïdales et les polymères sont les EPS. Autour des particules colloïdales, une zone de déplétion est présente (ligne en pointillé). Il s'agit d'une zone où les polymères sont exclus. Cette expulsion est causée par une perte de la conformation entropique du polymère en présence de cette paroi. Par contre, lorsque deux particules colloïdales se rapprochent suite au mouvement brownien, une partie de la zone de déplétion de chacune des deux particules colloïdales vont se chevaucher pour partager un espace commun ou «overlap volume» tel que décrit à la figure 1.4. Les polymères demeurent exclus de ce volume de chevauchement. La résultante est une différence de pression osmotique entre le volume de chevauchement et la phase continue résultant en une attraction des particules colloïdales. Ainsi, l'espace disponible pour les polymères augmente résultant en une diminution de l'énergie libre du système.

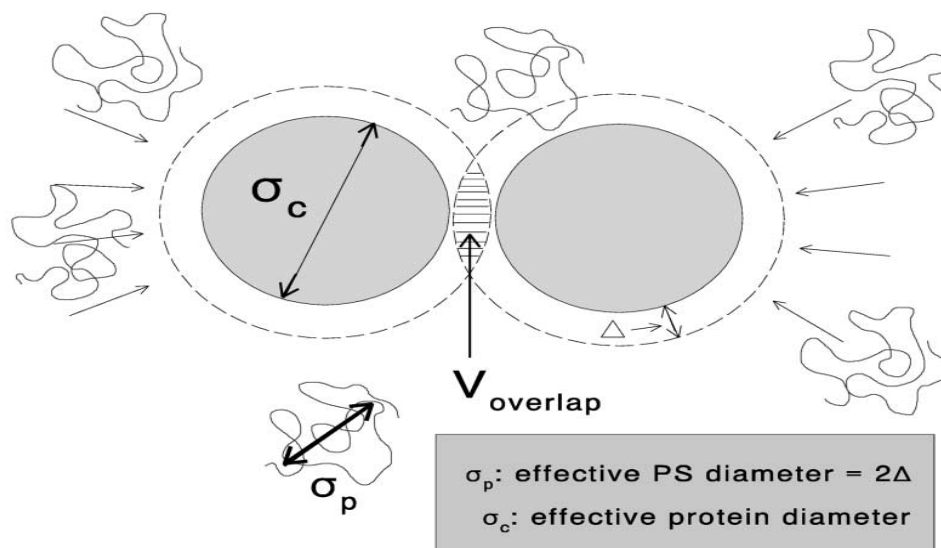


Figure 1-4 : Schéma explicatif du phénomène de déplétion-floculation en présence de deux particules sphériques et de polymères (de Kruif & Tuinier, 2001).

Finalement, le lait est le milieu de culture fréquemment utilisé pour la croissance bactérienne et la production d'EPS. La complexité du lait (protéines laitières, sucres, matières grasses, sels minéraux) rend difficile l'étude des interactions entre les EPS et les protéines laitières. Le développement d'un système modèle simplifié simulant le lait permettrait de contrôler le type et la concentration en protéines laitières et ainsi, faciliter l'étude des interactions EPS-protéines laitières. Dans la littérature, une seule équipe de chercheurs a étudié les interactions entre les protéines sériques et un EPS produit *in situ* et à structure connue dans du perméat de lait (Ayala-Hernandez *et al.*, 2009; Ayala-Hernández *et al.*, 2008). La visualisation par SEM a démontré des interactions entre l'EPS de charge négative et les protéines sériques. Par contre, l'effet des caséines n'a pas été étudié. De plus, le perméat de lait seul ne permettait pas la croissance bactérienne de même que la production d'EPS. Il n'était donc pas possible d'étudier la relation structure-fonction des EPS produits *in situ* dans un milieu modèle sans protéines. Le développement d'un système modèle laitier simplifié permettant l'étude des interactions entre les protéines laitières (type et concentration) et les EPS produits *in situ* est donc requis. De plus, jusqu'à présent, aucun travail n'a étudié l'effet de l'utilisation conjointe d'EPS produits *in situ* et d'amidon modifié sur les propriétés rhéologiques et la microstructure de systèmes laitiers fermentés de type yogourts.

1.8 But

Le but de ce travail est de déterminer le rôle structural d'exopolysaccharides produits *in situ* par certaines bactéries lactiques en présence d'amidon modifié sur les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure de systèmes laitiers fermentés de type yogourts afin d'optimiser leur utilisation.

1.9 Hypothèse

L'étude comparative de plusieurs exopolysaccharides aux caractéristiques structurales connues dans divers systèmes laitiers fermentés avec ou sans amidon modifié permettra de déterminer quelles caractéristiques structurales influencent le plus une propriété rhéologique ou physique donnée.

1.10 Objectif général

Déterminer le rôle structural d'exopolysaccharides produits *in situ* par diverses bactéries lactiques en présence d'amidon modifié dans divers systèmes laitiers fermentés à l'aide de la microstructure et de la mesure de propriétés rhéologiques/physiques (suivi de la formation du gel, synérèse, viscosité apparente, fermeté, module élastique).

1.11 Objectifs spécifiques

Objectif 1-Caractériser les bactéries lactiques produisant des exopolysaccharides aux caractéristiques structurales connues :

- a) Valider la pureté et l'identité des bactéries lactiques choisies;
- b) Déterminer les conditions optimales de croissance bactérienne et de production d'exopolysaccharides;

- c) Étudier le rôle structural des exopolysaccharides sur la formation du gel et les propriétés rhéologiques/physiques de laits fermentés.

Objectif 2-Déterminer l'effet de la composition du milieu (type et concentration en protéines laitières et concentration en amidon modifié) et de ferments lactiques producteurs d'exopolysaccharides sur les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure de système modèle laitier:

- a) Développer le système modèle laitier permettant d'ajuster la composition en protéines laitières ainsi que de permettre la croissance bactérienne et la production *in situ* d'exopolysaccharides;
- b) Étudier l'effet de la composition et de la concentration en protéines laitières en présence de ferments lactiques producteurs d'exopolysaccharides sur la formation du gel, les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure de système modèle laitier;
- c) Étudier l'effet de la concentration en amidon modifié en présence de ferments lactiques producteurs d'exopolysaccharides sur la formation du gel, les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure de système modèle laitier.

Objectif 3- Évaluer l'impact de la composition du mélange laitier (avec ou sans amidon modifié) et du procédé de fabrication (effet du lissage) en présence de ferments lactiques producteurs d'exopolysaccharides sur les propriétés rhéologiques/physiques et la microstructure de yogourts fabriqués en usine pilote.

Chapitre 2 : Gel formation and rheological properties of fermented milk with *in situ* exopolysaccharide production by lactic acid bacteria

Le but de ce travail était d'étudier la relation structure-fonction des EPS dans des laits fermentés. La comparaison de cinq EPS aux structures connues a permis d'établir quelles caractéristiques structurales influencent une propriété rhéologique/physique donnée. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait comparé autant d'EPS avec des caractéristiques structurales connues et avec les mêmes conditions de fermentation. Ce travail a aussi permis d'éliminer deux EPS sur cinq en raison de caractéristiques structurales et de fonctionnalités similaires pour l'étude de l'effet de la composition en protéines laitières sur la fonctionnalité des EPS (Chapitre 3).

Résumé

Le but de ce travail était d'évaluer le rôle structural d'exopolysaccharides (EPS) de bactéries lactiques sur la formation de gel et les propriétés rhéologiques (fermeté, viscosité apparente et module élastique) et physiques (aptitude à la synérèse) de laits fermentés. Trois *Streptococcus thermophilus*: HC15 (contrôle), 0131 (EPS neutre, flexible, ramifié), 2104 (EPS chargé, rigide, linéaire) et quatre *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: 210R (contrôle), 11842 (EPS neutre, flexible, ramifié), 702074 (EPS neutre, flexible, ramifié), 291 (EPS neutre, rigide, ramifié) ont été comparés. Le glucono-delta-lactone (GDL) a été utilisé comme contrôle sans EPS. La fermentation des souches a été réalisée à 42 °C dans du lait écrémé jusqu'à l'obtention du pH 4.6. Durant la fermentation, chaque souche a produit des EPS incluant les souches contrôle HC15 et 210R. Par contre, les EPS de HC15 et 210R n'ont pas affecté la formation de gel ni les propriétés rhéologiques/physiques des laits fermentés. En effet, les résultats obtenus avec ces deux souches contrôles n'étaient pas significativement différents du témoin GDL. La formation de gel ainsi que le module élastique des laits fermentés ont été modifiés par la présence de l'EPS chargé et linéaire de la souche 2104 comparativement aux autres souches (EPS neutres et ramifiés). La viscosité, la fermeté et la rétention d'eau ont été plus élevées pour les EPS des souches 0131, 2104 et 291. Ces souches produisent des EPS avec une chaîne linéaire ou peu ramifiée et un poids moléculaire élevé. Ce travail a démontré que le processus d'agrégation caséique lors de la formation du gel ainsi que les propriétés rhéologiques et physiques des laits fermentés sont influencés par les caractéristiques structurales des EPS plus particulièrement par la charge, la flexibilité, la ramification et le poids moléculaire.

Mots-clé: exopolysaccharide, formation de gel, propriétés rhéologiques/physiques, lait fermenté

Abstract

The aim of this work was to evaluate the structural role of exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria on the gel formation and the rheological (firmness, apparent viscosity, elastic modulus) and physical (whey retention) properties of fermented milk. Three *Streptococcus thermophilus*: HC15 (control), 0131 (neutral, flexible and branched EPS), 2104 (anionic, stiff and linear EPS) and four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: 210R (control), 11842 (neutral, flexible and branched EPS), 702074 (neutral, flexible and branched EPS), 291 (neutral, stiff and branched EPS) were compared. Glucono-delta-lactone (GDL) was used as EPS-free control. Strains were grown at 42 °C in skim milk until pH reached 4.6. Each strain produced EPS including HC15 and 210R control strains. However, the EPS of HC15 and 210R control strains did not influence the gel formation and the rheological/physical properties of fermented milk. Results obtained with control strains were not significantly different from those of GDL. Gel formation and elastic modulus of fermented milk were modified by the anionic and linear EPS from 2104 strain as compared to the other strains (neutral and branched EPS) and GDL. Higher values of apparent viscosity, firmness and whey retention were obtained with the EPS of 0131, 2104 and 291 strains. These strains produced EPS with linear chain or slight branching and with high molecular weight. This work showed that casein aggregation during gel formation and rheological/physical properties of fermented milk are modified by the structure of EPS produced by lactic acid bacteria, especially by negative charge, flexibility, degree of branching and molecular weight.

Key words: exopolysaccharide, gel formation, rheological/physical properties, fermented milk

2.1 Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) can produce a wide range of exopolysaccharides (EPS) during milk fermentation. Due to their ability to bind water and to modulate viscosity, EPS have been intensely studied for their potential as natural stabilizers in fermented milk. No clear correlation between the EPS concentration and their positive effect on the rheological properties of fermented milk has been found (Cerning *et al.*, 1986; Petry *et al.*, 2003; van Marle & Zoon, 1995). It has been postulated that it is rather the EPS structure (monosaccharide composition, charge, molecular weight, degree of branching, rigidity of backbone) and their interactions with milk components, especially with milk proteins, that could be responsible for the several rheological properties reported (Hassan, 2008; Folkenberg *et al.*, 2006b; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a). In order to produce fermented milk with desirable rheological properties, it is essential to understand EPS structure-function relationship. Some research was done regarding EPS produced *in situ* by LAB in fermented milk. Faber and co-workers (1998) have compared two EPS from *Streptococcus thermophilus* with an identical structure (monosaccharide composition, degree of branching, charge, rigidity of backbone) but different molecular weight. They have found a positive correlation between high molecular weight and viscosity. Petry and co-workers (2003) have partially characterized the EPS produced by four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A strong correlation was also observed between high molar mass, glucose monomer as the main constituent of backbone and viscosity. Girard and Schaffer-Lequart (2007a) have compared three EPS from mesophilic and thermophilic LAB on the gelation process and the resistance to shearing of fermented milk. Negative charge seemed to be the most important structural characteristic to increase the resistance to shearing of fermented milk. All these studies were limited to the effect of EPS structure on the viscosity of fermented milk.

In order to give a complete scheme of EPS structure-function relationship, it is important to measure the rheological properties (viscosity, firmness, elastic modulus) and syneresis of fermented milk in addition to classical viscosity measurements. This information should allow determining which structural characteristics are important to modulate a given rheological property. Furthermore, comparing several EPS with well-known structures produced in situ by LAB in the same study under the same fermentation conditions has never been carried out. The aim of this work was to study the effect of EPS structures from five thermophilic EPS-producing LAB on the gel formation, the rheological (apparent viscosity, firmness, elastic modulus) and physical (syneresis) properties of fermented milk. Strains were selected based on their known EPS structural characteristics (charge, stiffness, degree of branching). Growth kinetics and EPS production were also determined during the fermentation process.

2.2 Material and Methods

2.2.1 Bacterial strains, media, growth conditions

Three *Streptococcus thermophilus*: HC15 purchased from Chr. Hansen (Mississauga, Ontario, Canada), 0131 (**0131**) and 2104 (**2104**) obtained from NIZO Food Research (B.V., Ede, Netherlands) and four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: 210R purchased from Waterford (Gist Brocades, Millville, UT, USA), 11842 (**11842**) purchased from ATCC (Manassas, VA, USA), 702074 (**702074**) obtained from NCIMB (Aberdeen, Scotland, United Kingdom) and 291 (**291**) obtained from Danisco (Buxière, Orsay, France) were used in this study. Structural characteristics of EPS produced by these strains are presented in Table 2.1. The HC15 and 210R strains were chosen for their potential as non-EPS-producer. Genotype was confirmed (> 97 % of identification) by biomolecular techniques (PCR) (Tabasco *et al.*, 2007). Reconstituted skim milk (RSM) from low heat skim milk powder (34.4 % total protein and 98 % dry matter) was used as media culture (Crino, Agropur, Granby, Québec, Canada). Strains were stored at -80 °C in 20 % (wt/wt) RSM from skim milk powder rehydrated in distilled water supplemented with 5 % (wt/wt) sucrose (Fisher scientific, Nepean, Ontario, Canada) and 0.35 % (wt/wt) ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Toronto, Ontario, Canada) and sterilized at 110 °C for 10 min.

A 12 % (wt/wt) RSM was prepared by dissolving a skim milk powder in distilled water and stirred during 2 h at room temperature. RSM was sterilized at 110 °C for 10 min in autoclave and after stored at 4 °C until use. Activate strains were prepared by the inoculation of culture stock at 10 % (vol/vol) in RSM. The incubation was made at 37 °C for 16 h to obtain a population of 1×10^8 CFU·mL⁻¹. For 0131 and 2104 strains, a 3 % (vol/vol) subcultivation (42 °C for 6 h) was also necessarily to reach a population of 1×10^8 CFU·mL⁻¹. All active strains were stored overnight at 4 °C before use. Milk acidified with 1.4 % (wt/wt) of glucono-delta-lactone (GDL) (Sigma-Aldrich, Toronto, Ontario, Canada) was used as EPS-free control.

Table 2-1: Structural characteristics of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* (HC15, 0131, 2104) or *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (210R, 11842, 702074, 291)

Strain	Structural Characteristics						References
	Sugar composition	Sugar ratio	Charge	Molecular weight (g·mol ⁻¹)	Branching ¹	Flexibility	
HC15	-----Control strain-----						(Lamboley <i>et al.</i> , 2003)
0131	Galactose: Rhamnose	2 : 1	Neutral	5.9 x 10 ⁶	+	Flexible	(Faber <i>et al.</i> , 2001b)
2104	Galactose: Ribose: Glucose: <i>N</i> -acetyl ²	2 : 1 : 1: 1	Negative	NA ³	-	Stiff	(Faber <i>et al.</i> , 2002)
210R	-----Control strain-----						(Robitaille <i>et al.</i> , 2009)
11842	Galactose: Glucose:	3 : 1	Neutral	1.7 x 10 ⁶	+	+/- Flexible	(Van Calsteren <i>et al.</i> , 2008)
702074	Galactose: Glucose	4 : 3	Neutral	1.8 x 10 ⁶	++	Flexible	(Harding <i>et al.</i> , 2005)
291	Galactose: Glucose	2 : 3	Neutral	1.4 x 10 ⁶	+	Stiff	(Faber <i>et al.</i> , 2001a)

¹Branching = Linear (-), one branching (+), more than two branching (++).

²*N*-acetyl = *N*-acetyl-galactosamine plus another monomer: 6-*O*-(3',9'-dideoxy-D-*threo*-D-*altro*-nononic acid-2'-yl)- α -D-glucopyranose.

³NA = Information not available.

2.2.2 Growth kinetics

Pre-warmed (42 °C) RSM was inoculated at 3 % (vol/vol) with active strains. Fermentation at 42 °C was stopped by the immersion in an icy bath at pH 5.2 and 4.8 for streptococci and for lactobacilli, respectively. During fermentation, pH, titratable acidity (% lactic acid), bacterial counts and EPS quantification were determined twice at specific times. For HC15 and 291 strains, milk samples were taken after 0h, 3h30, 4h and 4h30 and 0h, 3h30, 4h and 5h for 210R and 702074 strains. Milk samples for 0131, 2104 and 11842 strains were taken at 0h, 3h30, 4h, 5h, 5h30 and 6h. Titratable acidity and pH were measured by the official standard methods (AOAC, 2000). Lactobacilli and streptococci were enumerated on acidified MRS and M17 agar medium, respectively (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated under anaerobic condition for 48 h at 37 °C. For EPS quantification, 10 mL of fermented milk were frozen at -20°C until use.

2.2.3 EPS production

EPS production was quantified during the growth kinetics as described by Robitaille and co-workers (2009) with slight modifications. Milk chemically acidified at pH 5.2 or 4.8 with 10 % (vol/vol) lactic acid (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada) was used as controls for the EPS quantification. To remove protein an equal volume of 40 % (wt/vol) trichloroacetic acid (Laboratoire Mat, Québec, Québec, Canada) was added to milk samples at room temperature and boiled for 5 min. Samples were centrifuged for 10 min at 3,700 x g (21 °C). Supernatant was removed and the pellet was washed with 10 mL of 20 % (wt/vol) trichloroacetic acid and then, centrifuged as previously described. Supernatants were pooled and 10 g were dialysed in 1 L distilled water for 72 h at 4 °C (membrane MWCO 6,000-8,000 Da, Spectra/Por). Water was changed twice a day. Samples were weighted after dialysis to evaluate dilution. Total sugar content (milligram of glucose per liter of fermented milk) was quantified by phenol-sulphuric acid method using glucose as standard (Dubois *et al.*, 1956). Total sugar in chemically acidified milk and in EPS-free control milk was 10 mg·L⁻¹. This value was subtracted to all data. Protein content of each dialyzed samples was quantified as described by Bradford (Bradford, 1976).

2.2.4 Ropy character of EPS in milk during growth kinetics

Ropy character of EPS in milk during growth kinetics according to pH (pH 5.7, 5.5 and 5.3 \pm 0.05) was evaluated by measuring the time (s) for 30 mL of fermented milk (in duplicate) to pass through a plastic funnel (reservoir 33 cc: #WAT011390, Waters, Mississauga, Ontario, Canada) at room temperature. RSM acidified at pH 5.7, 5.5 and 5.3 with 0.4, 0.5 and 0.8 % (vol/vol) of GDL were used as controls. During growth kinetic experiments, samples at the desirable pH were rapidly immersed in ice to stop fermentation (30 min) then, left at room temperature (30 min) before to start the experiment. The pH 5.7 was reached in 2 h for lactobacilli, 3 h for HC15 strain and 4 h for 0131 and 2104 strains. The pH 5.5 was reached in 2 h 30 for lactobacilli, 3 h 30 for HC15 strain and 4 h 30 for 0131 and 2104 strains while pH 5.3 was obtained after 3 h for lactobacilli, 4 h for HC15 strain and 5 h 30 for 0131 and 2104 strains. Ropy character of EPS was also confirmed by the formation of filaments between fermented milk (pH 5.7, 5.5 and 5.3) and a sterile inoculating loop as described by Hess et al. (Hess *et al.*, 1997).

2.2.5 Gel formation of fermented milk

Gel formation of each strain was recorded by monitoring the elastic modulus (G') in time using dynamic rheometer AR1000 (TA Instruments, New Castle, DE). Rugged plate geometry (4 cm) was used to minimise the effect of slippery due to syneresis. To avoid contamination, plates were disinfected with ethanol (70 %) prior each experiment. Pre-warmed RSM (100 mL) at 42 °C were inoculated at 3 % (vol/vol) with every strain. Three milliliters of the inoculated RSM were used to follow the evolution of G' during 8-10 h as described by Girard and Schaffer-Lequart (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a). To limit dehydration of the samples, a solvent trap was used. The remaining volume of the inoculated RSM was used to follow pH changes with time by using a glass electrode and a standard pH meter (model 140, Corning, Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Gel point was defined as the time (T_{gel}) and the pH (pH_{gel}) when $G' > 1$ Pa (van Marle & Zoon, 1995). Raw data to obtain T_{gel} and pH_{gel} were analysed by modelling curves (pH or G' as function of time) with a four parameters logistic equation as described by Spinnler and Corrieu (Spinnler & Corrieu, 1989):

$$y = \frac{(A - D)}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^3} + D,$$

where y is G' or pH, x is time, A is initial pH or initial G' ; B is a coefficient of slope; C is a coefficient of acidification rate or coefficient of G' rate and D is final G' or final pH. The T_{gel} at a G' of 1 Pa (y) was calculated by the isolation of x in the equation 1. The pH_{gel} was calculated by using the equation 1 where y is pH_{gel} and x is T_{gel} .

2.2.6 Rheological measurements of fermented milk

Pre-warmed (42 °C) RSM (1.2 L) were inoculated at 3 % (vol/vol) with every strain. Inoculated RSM (90 mL) was transferred into 100 mL plastic cups (#14-375-148, Fisher scientific, Nepean, Ontario, Canada) and fermentation was carried out at 42 °C. Fermented milk at $\text{pH } 4.6 \pm 0.05$ (to simulate the pH value of yoghurt) was stored at 4 °C overnight before the rheological measurements. The hardness was measured with a TA-XT2 texture analyser (Texture Technology Corp., Scarsdale, NY, USA) as described by Hess *et al.* (Hess *et al.*, 1997). Analyses were made with 5 different plastic cups at 4 °C with a cylindrical geometry with a flat base (25 mm diameter). Maximum peak force (N) at a displacement of 20 mm was recorded as firmness ($\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$). To evaluate viscosity, a steady stress sweep test with a shear stress of 1.0-100 Pa was made with a dynamic stress rheometer using a bob and a cup (Rheometric, Model SR-2000, TA Instrument, New Castle, DE, USA). Apparent viscosity at 10 and 100 s^{-1} was calculated according to the power law model (Everett & McLeod, 2005). Dynamic stress sweep test was used to determine the linear region of viscoelasticity of yoghurt under an oscillatory of 1 Hz and at an increasing strain from 0.02 to 30 Pa (Everett & McLeod, 2005). Viscoelastic properties were measured at 1 Pa (linear viscoelastic region) between 0.1 and 10 Hz with the dynamic stress rheometer using a bob and a cup, too. New sample was used for each rheological test and was taken with the stainless cylinder. Measurements were performed at 4 °C in duplicate.

2.2.7 Evaluation of syneresis

The susceptibility to syneresis was quantified by centrifugation technique (Everett & McLeod, 2005). Samples (25 g), in duplicate, were directly taken from the plastic cups with a homemade stainless cylinder to minimise disruption of gel and were centrifuged at 210 x *g* for 20 min at 4 °C. The clear supernatant was poured off, weighed and recorded as syneresis (%).

2.2.8 Statistical methods

A completely randomized design was applied to compare the growth kinetic and the EPS production for each strain and to determine the role of the EPS structures on the gel formation and the rheological properties of fermented milk. Significant differences were tested at $P < 0.05$. Statistical analysis was carried out with ANOVA using the general linear models procedure of SAS (Version 9.1.3, Cary, NC, USA). All experiments were performed in triplicate.

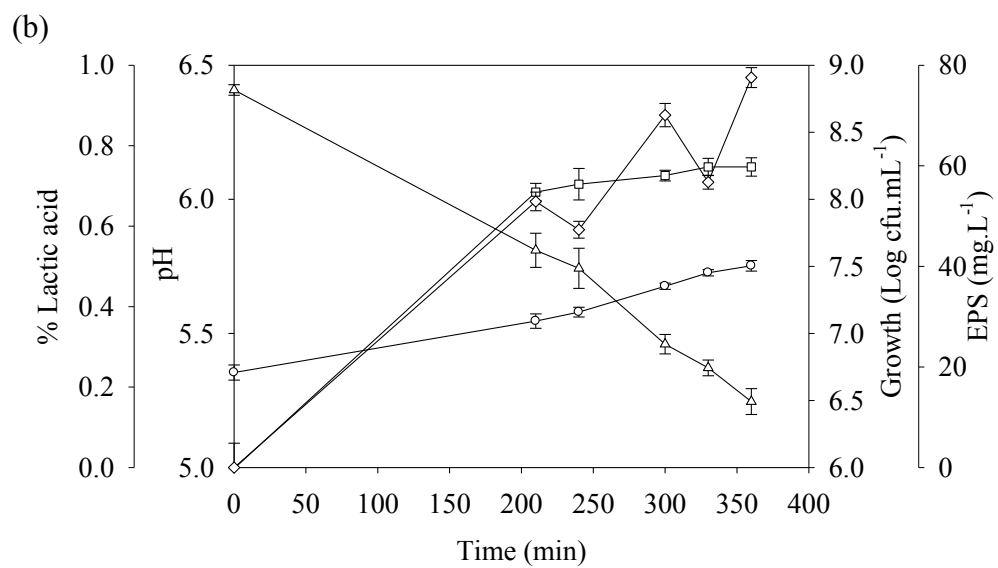
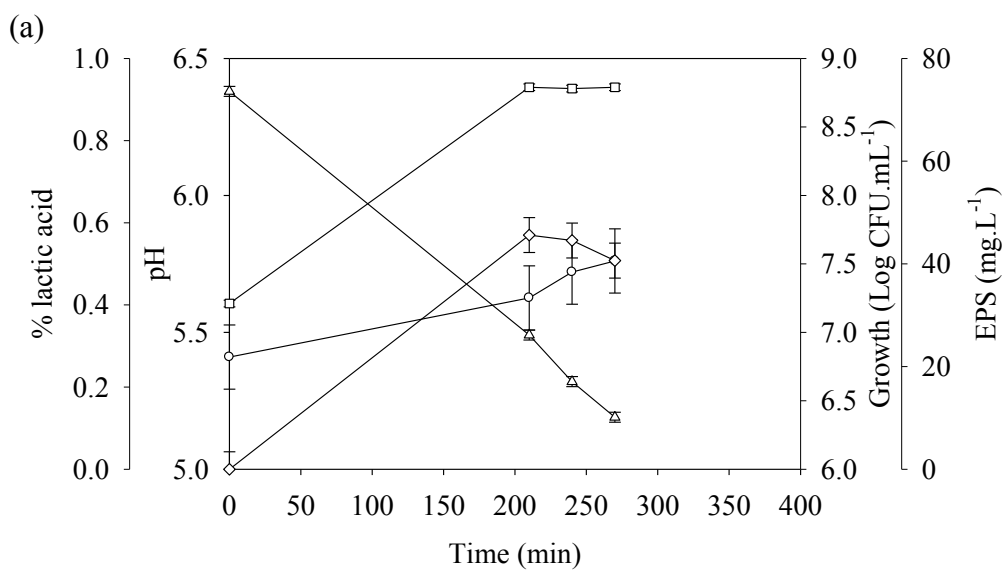
2.3 Results

2.3.1 Growth kinetics and EPS production

Growth kinetic is significantly different for each strain (Figs. 2.1 and 2.2). A plateau was observed after 200 min of fermentation for streptococci whereas lactobacilli population increased continually during fermentation until pH 4.8. Streptococci population increased by 1.6 Log for HC15 control strain and 2104 strain and 2.3 Log for the strain 0131 (Figs. 2.1a-c). Lactobacilli population was significantly lower than streptococci and increased by 1.4 Log (Figs. 2.2a-d). Time needed to reach pH value of 5.2 for streptococci varied. Fermentation of milk with HC15 control strain was significantly faster (4 h 30) than with 0131 and 2104 strains (6 h). Among lactobacilli, the 11842 strain had significant longer fermentation time (6 h) than the other strains (4 h 30-5 h) to reach pH 4.8. Lactic acid production (initial titrable acidity subtracted from final titrable acidity) was significantly higher for lactobacilli (0.40 %) than for streptococci (0.29 %), except for lactobacilli 291 (0.29 %). This is likely explained by the lower fermentation pH of lactobacilli (pH 4.8) as compared to streptococci (pH 5.2).

Immediately after inoculation, no EPS were quantified for all strains. By the end of fermentation, EPS ranged between 40-100 mg·L⁻¹. EPS production was growth associated for all strains except for the 11842 strain. For this strain, EPS production started after 240 min of fermentation (Fig. 2.2b). No EPS was quantified in GDL milk neither in the chemically acidified milk at pH 4.8 and 5.2 with lactic acid (data not shown). For all strains and for all milk samples taken at different times during fermentation, the protein content in dialyzed fermented milk samples was very low (< 0.9 mg·L⁻¹). The extraction with TCA succeeded to remove most of the initial protein content. Consequently, the protein was considered to not interfere in the phenol-sulphuric acid method. No further corrections were applied to data.

Fig. 2.1



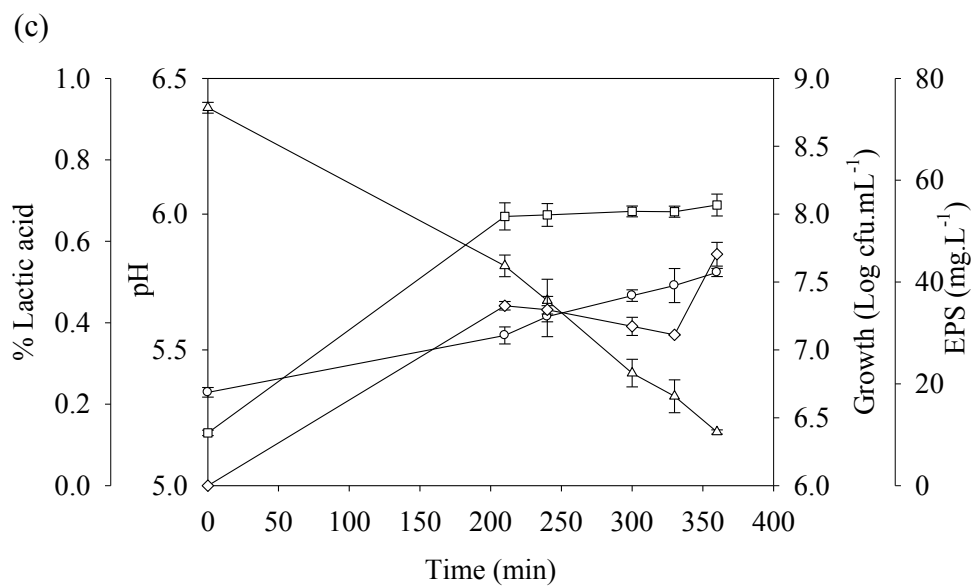
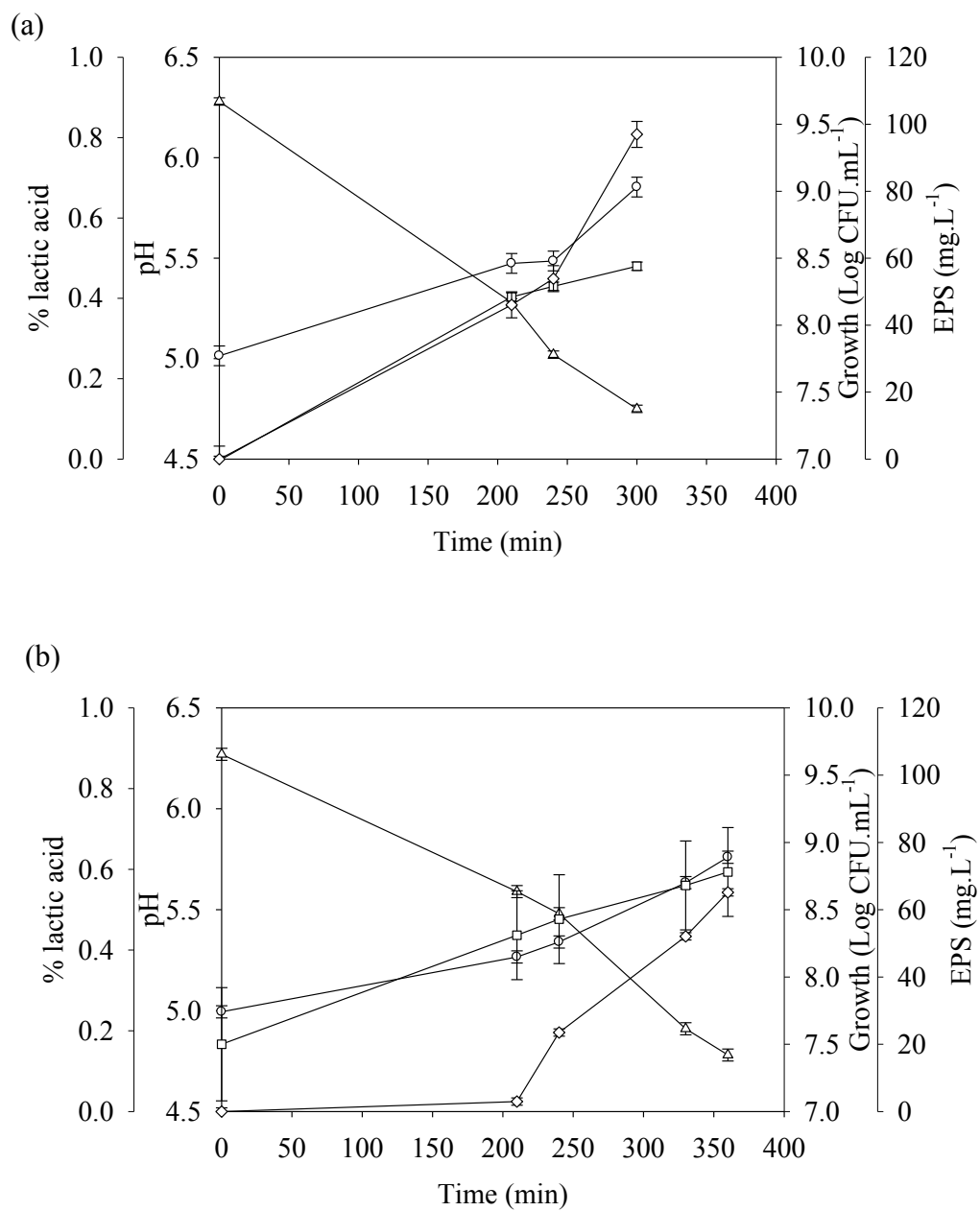


Figure 2-1: Population (□), pH (Δ), % lactic acid (○) and EPS production (◇) of *Streptococcus thermophilus* HC15 (a), 0131 (b) and 2104 (c) during fermentation at 42 °C. Each data point is the mean of three experiments. Bars indicate standard error of the mean.

Fig. 2.2

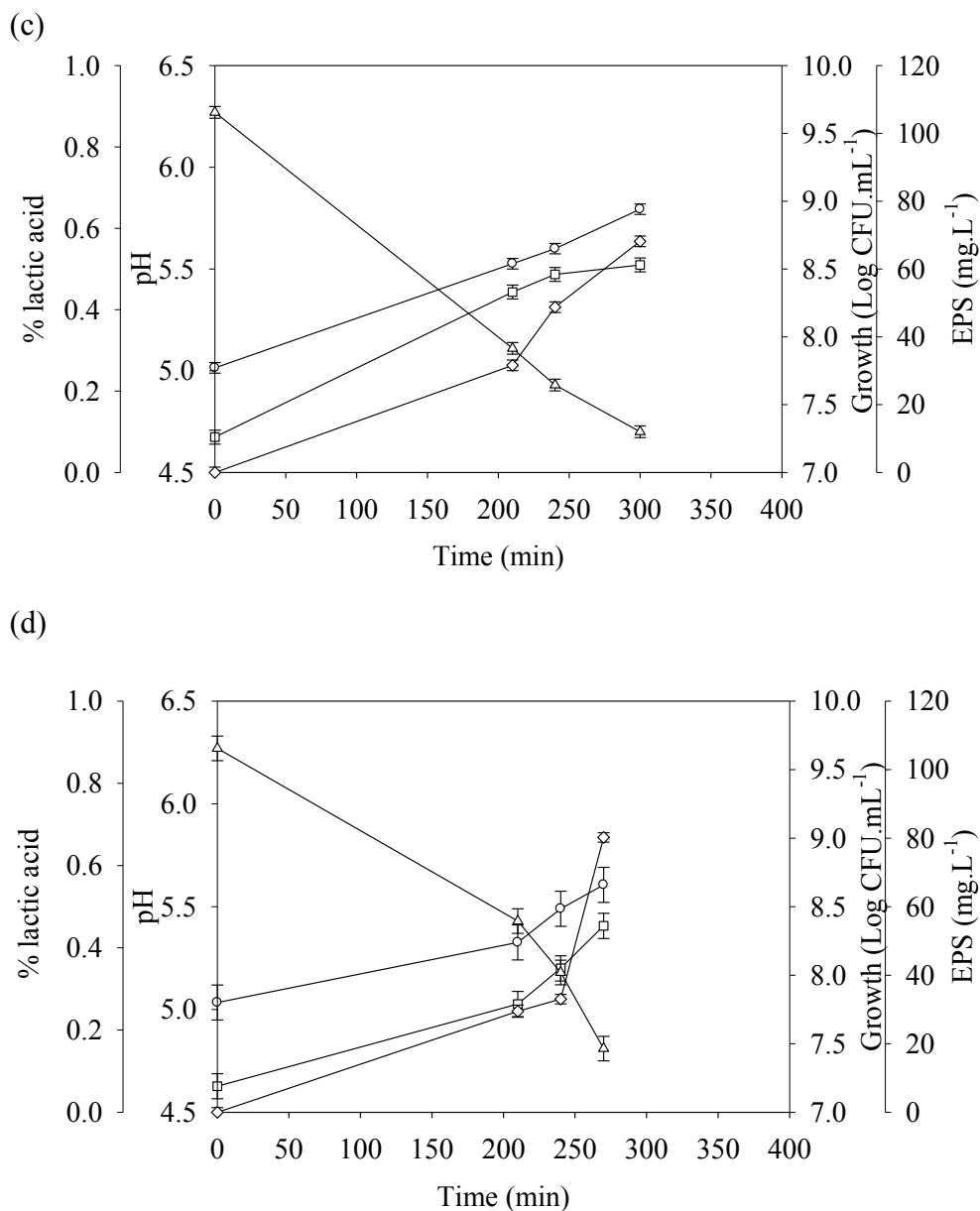


Figure 2-2: Population (□), pH (Δ), % lactic acid (○) and EPS production (◇) of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 210R (a), 11842 (b), 702074 (c), 291 (d) during fermentation at 42 °C. Each data point is the mean of three experiments. Bars indicate standard error of the mean.

2.3.2 Ropy character of EPS in milk during growth kinetics

Evaluation of the ropy character of EPS in milk is presented in Table 2.2. A significant interaction between strains and pH was observed for flow times ($P < 0.05$). Milk fermented with control (HC15 and 210R), 11842 and 702074 strains took 12-15 s to pass through the funnel whatever the pH. In addition, no filaments were observed (Tab. 2.2). These strains were considered as non-ropy. For milk fermented with 0131 and 291 strains, the time to pass through the funnel increased significantly with pH reduction. The formation of filaments was observed with these strains for each pH. The time to pass through the funnel was significantly longer for the 291 strain especially at pH value below 5.5. The 2104 strain had a different profile than the other ropy strains. At pH 5.7, no filament was visible comparatively to pH 5.5 and 5.3 where visible filaments were obtained. However, the time to pass through the funnel was not affected by the presence of these filaments. At pH 4.6, the ropy character of EPS was no longer observable in milk fermented with 2104 strain whereas with 0131 and 291 strains, the ropy character was still observable (data not shown). No significant difference between control strains (HC15 and 210R) and GDL was observed at pH 5.7 and 5.5. However, at pH 5.3 a gel was formed in GDL milk.

2.3.3 Acidification profile and Gel formation of fermented milk

Acidification profile of milk among strains and GDL was different (Fig. 2.3). Initial pH ($\text{pH } 6.38 \pm 0.03$) was not significantly different among strains and GDL. After an overnight storage at 4 °C, the pH of all fermented milk did not vary significantly ($\text{pH } 4.63 \pm 0.03$) as compared to the pH obtained directly at the end of fermentation ($\text{pH } 4.64 \pm 0.01$). Acidification was faster in the GDL milk (255 min). Streptococci had significantly longer fermentation time than lactobacilli. Milk fermented with HC15 control strain (630 min) had significantly faster fermentation time than 0131 strain (740 min) and 2104 strain (805 min). Milk fermented with lactobacilli 702074 strain (205 min) had significantly shorter fermentation time than in milk fermented with 210R control strain (340 min), 11842 strain (350 min) and 291 strain (340 min).

Table 2-2: Ropy character of EPS in milk fermented with *Streptococcus thermophilus* (HC15, 0131, 2104) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (210R, 11842, 702074, 291) or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) by measuring the time of 30 mL of milk to pass through a funnel according to pH during fermentation process

Strain	pH	Flow time (s)	Ropy character ¹ in milk
HC15	5.7	13 ^e	-
	5.5	13 ^e	-
	5.3	12 ^e	-
0131	5.7	52 ^d	+
	5.5	58 ^d	+
	5.3	97 ^b	+
2104	5.7	13 ^e	-
	5.5	13 ^e	+
	5.3	17 ^e	+
210R	5.7	13 ^e	-
	5.5	12 ^e	-
	5.3	11 ^e	-
11842	5.7	13 ^e	-
	5.5	13 ^e	-
	5.3	13 ^e	-
702074	5.7	12 ^e	-
	5.5	14 ^e	-
	5.3	14 ^e	-
291	5.7	53 ^d	+
	5.5	82 ^c	+
	5.3	153 ^a	+
GDL	5.7	12 ^e	-
	5.5	13 ^e	-
	5.3	Gel ²	-

^{a-e}Means within a line with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹(+) = visible filament formation determined by touching the milk with a sterile inoculating loop (ropy) ; (-) = no visible filament (non-ropy).

²Gel = visible gel formed at this pH.

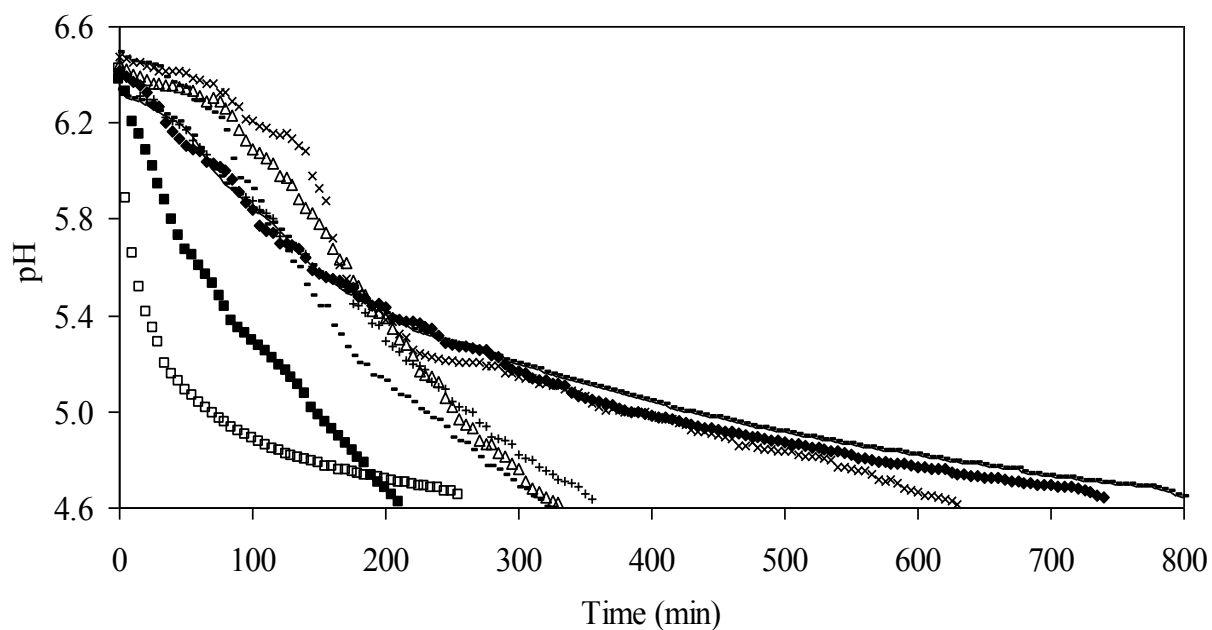


Figure 2-3: Change of pH upon time of milk fermented with *Streptococcus thermophilus* HC15 (×), 0131 (◆) and 2104 (—) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 210R (-), 11842 (+), 702074 (■) and 291 (Δ) or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) (□) during fermentation at 42 °C. Each data point is the mean of three experiments.

Gelation time (T_{gel}) and pH of gelation (pH_{gel}) are presented in Table 2.3. The T_{gel} was significantly affected by strains and GDL. The T_{gel} was significantly shorter for lactobacilli than for streptococci. Milk fermented with 2104 strain had significantly the longest T_{gel} (488 min) whereas milk acidified with GDL had significantly the shortest T_{gel} (30 min). The pH_{gel} was not significantly different between strains (pH 5.41-5.54) except for 2104 strain (pH 5.01) and GDL (pH 5.28).

2.3.4 Rheological/physical properties of fermented milk

Apparent viscosity was significantly affected by strains and GDL (Tab. 2.3). Milk fermented with 0131, 2104 and 291 strains, especially with 2104 strain had the highest apparent viscosity values at 10 s^{-1} . Milk acidified with GDL had an intermediate value. For milk fermented with control strains (HC15 and 210R), the apparent viscosity was not significantly different (2.88 Pa·s) while milk fermented with 11842 and 702074 strains had the lowest values (2.41 Pa·s and 2.67 Pa·s). Apparent viscosity at 100 s^{-1} decreased for all strains and GDL as compared to 10 s^{-1} . Milk fermented with 0131 and 2104 strains still had the highest apparent viscosities. On the other hand, the apparent viscosity of 291 at high shear rate decreased significantly. Values of apparent viscosity for milk fermented with HC15 and 210R strains and acidified with GDL were not significantly different (2.20-2.33 Pa·s). Milk fermented with 11842 and 702074 strains had the lowest apparent viscosities.

Firmness of fermented milk was significantly affected by strains and GDL (Tab. 2.3). Firmness values assessed for 0131, 2104 and 291 strains were significantly higher than for the other strains and GDL. Similar firmness values were observed for milk fermented with control strains (HC15 and 210R) and acidified with GDL. Milk fermented with 11842 and 702074 strains had the lower firmness values.

Table 2-3: Gelation time (T_{gel}), pH of gelation (pH_{gel}), firmness, apparent viscosity and syneresis of milk fermented with *Streptococcus thermophilus* (HC15, 0131, 2104) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (210R, 11842, 702074, 291) or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) at pH 4.6

Parameter	Strain							GDL	SEM ¹
	HC15	0131	2104	210R	11842	702074	291		
T_{gel} (min)	169 ^d	363 ^b	488 ^a	122 ^e	203 ^c	121 ^e	141 ^{de}	30 ^f	12.1
pH_{gel}	5.54 ^a	5.41 ^{ab}	5.01 ^c	5.52 ^a	5.54 ^a	5.53 ^a	5.54 ^a	5.28 ^b	0.075
Firmness ($N \cdot m^{-2}$)	1,185 ^{bc}	1,314 ^{ab}	1,253 ^b	1,023 ^{cd}	932 ^d	892 ^d	1,435 ^a	1,189 ^c	60.1
Apparent viscosity at 10 s^{-1} ($Pa \cdot s$)	2.88 ^d	4.03 ^b	4.65 ^a	2.88 ^d	2.41 ^e	2.67 ^{de}	3.45 ^c	3.16 ^c	0.11
Apparent viscosity at 100 s^{-1} ($Pa \cdot s$)	2.22 ^{cd}	2.36 ^b	2.60 ^a	2.20 ^{cd}	2.01 ^{ef}	2.15 ^{ed}	1.93 ^f	2.33 ^{bc}	0.05
Syneresis (%) at 210 x g	23.67 ^a	7.13 ^d	11.26 ^{cd}	14.72 ^{bc}	17.96 ^b	13.26 ^{bc}	1.43 ^e	16.25 ^{bc}	1.93

^{a-f}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹SEM = standard error of the mean.

The ability of strains and GDL to limit syneresis in fermented milk is presented in Table 2.3. Milk fermented with 0131, 2104 and 291 strains, especially with 291 strain had the higher ability to decrease syneresis under milder centrifugation conditions (210 x g). The whey expelled from fermented milk with 0131 and 291 strains after centrifugation at 210 x g was ropy (data not shown).

Elastic modulus (G') of fermented milk is presented in Figure 2.4. Linear relation between G' and frequencies was observed. Viscous modulus (G'') was not presented because of G'' values had similar profile than G' except that values were lower for all strains and GDL. Higher G' value than G'' indicated the elastic or solid-like character of gel. Between 0.1 and 10 Hz, the G' were not significantly different between milk acidified with GDL and fermented with HC15, 2104 and 210R strains. G' values for fermented milk with 0131, 11842, 702074 and 291 strains were similar but lower than the G' obtained for the other strains and GDL.

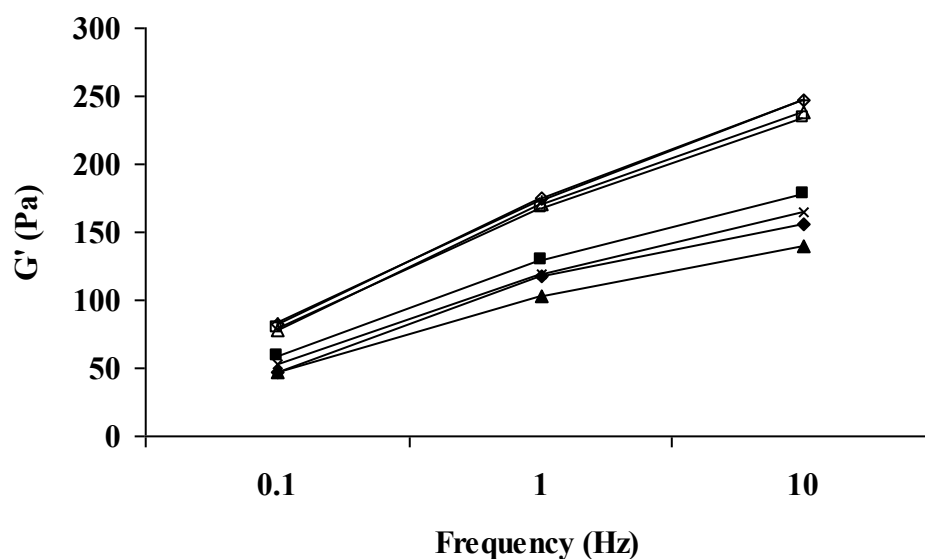


Figure 2-4: Elastic modulus (G') as functions as frequency of milk fermented with *Streptococcus thermophilus* HC15 (○), 0131 (×) and 2104 (△), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 210R (□), 11842 (■), 702074 (▲) and 291 (◆) or acidified with glucono-delta-lactone (GDL) (◇) at pH 4.6. Each data point is the mean of three experiments.

2.4 Discussion

2.4.1 EPS production

This study aimed to investigate the structure-function relationship of EPS produced *in situ* by LAB in fermented milk. HC15 and 210R strains were chosen as control strains and as non-EPS-producer strains. However, sugar quantification showed that these strains produced EPS. In literature, the definition of non-EPS-producer strain remains unclear. Frequently, it is difficult to know the methods used to determine this criterion as few or no explanation appears in scientific paper (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Folkenberg *et al.*, 2006a). Some authors considered non-ropy strain as non-EPS-producer (Hess *et al.*, 1997). Recently, Hassan (2008) has classified EPS from LAB into four groups and one of them was the non-EPS-producer group including non-detectable EPS. On the other hand, the meaning of the expression «non-detectable EPS» remains unclear. Some workers have reported that non-EPS-producer or non-ropy strains from LAB can produce EPS in quantities as low as $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ up to higher concentrations (Petry *et al.*, 2003; van Marle & Zoon, 1995; Cerning *et al.*, 1986) as observed in this study. However, even with this EPS production, the rheological properties of milk fermented with control strains (HC15 and 210R) were similar to GDL milk (EPS-free control). Similar pH_{gel} and G' values of milk fermented with a non-ropy LAB strain ($90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and acidified with GDL were also observed by Girard and Shaffer-Lequart (2007a). In addition, Hassan *et al.* (2003b) have found that some non-EPS-producer strains gave higher G' than EPS-producer strains. In this study, the EPS produced by control strains (HC15 and 210R) did not influence gel formation and rheological properties of fermented milk and may act as non active fillers as proposed by van Marle and Zoon (1995).

2.4.2 Ropy character of EPS

The funnel test can be useful to give a quick idea of EPS production by ropy strains during fermentation until pH 5.2 e.g. before casein aggregation. For 0131 and 291 strains, ropy character was expressed as high as pH 5.7. This result was confirmed in the growth kinetic experiment because EPS was quantified at this pH value for these strains.

Measurement of flow time by the funnel test can be also useful to classify the strains based on the degree of ropy character. Ropy character was high for 291 strain, moderate for 0131 strain, low for 2104 strain and non-existent for the other strains. To our knowledge, it is the first study that has developed a method allowing the classification of the ropy character among different EPS. Comparing several strains producing different EPS structures with the funnel test allowed to observe different behaviors among ropy strains (0131, 2104 and 291). Ropy character was visually observed in fermented milk with 2104 strain at pH 5.5-5.3 but no notable change in flow time was noted as compared to the other ropy strains. In addition, the ropy character of 2104 strain was no more observable at pH 4.6. These results obtained by the funnel test underlined that ropy character seemed not to be the only factor affecting the rheological properties of fermented milk. For instance, the different structure of the EPS from 2104 (anionic, stiff and linear) as compared to the EPS from 0131 (neutral, flexible, few branching) and 291 (neutral, stiff, few branching) strains might rather explain this difference. Faber and co-workers (1998) have also found a positive correlation between ropy character, molecular weight and viscosity. Among two EPS with identical repeating units, higher viscosity was obtained with the EPS with the higher molecular weight. Furthermore, these authors have only observed the ropy character in milk fermented containing the EPS with the highest molecular weight. Finally, the comparison of many EPS with known structures has permitted to underline the importance of their structural characteristics on the modulation of rheological properties of fermented milk.

2.4.3 EPS structure-function relationship on gel formation

The T_{gel} of all fermented milk was influenced by the acidification profile of strains and GDL as was observed by Girard and Schaffer-Lequart (2007a) and van Marle and Zoon (1995). In this study, the longer acidification profiles for streptococci strains led to higher T_{gel} values as compared to milk fermented with lactobacilli strains and acidified with GDL which had faster acidification capacities to reach pH 4.6. Finally, the structural characteristics of EPS used in this study did not influence the T_{gel} .

The pH of gelation (pH_{gel}) of milk fermented with all strains and acidified with GDL occurred at pH 5.5-5.3 in agreement with results reported in the literature (Lucey *et al.*, 1998b; van Marle & Zoon, 1995; Heertje *et al.*, 1985). On the other hand, milk fermented with 2104 strain formed gel at pH 5.0. The pH_{gel} is related to the attractive interactions between milk proteins and thus, depends on heat treatment of milk controlling whey protein denaturation, incubation temperature and acidification rate (Haque *et al.*, 2001; Lucey *et al.*, 1998b; Heertje *et al.*, 1985). Among these parameters, acidification profile was the sole uncontrolled in this experiment. This factor directly influences rheological properties of fermented milk and depends on strain, inoculation rate and incubation temperature (Lee & Lucey, 2004; Haque *et al.*, 2001). It is often considered that fast acidification will lead to a firmer casein network (Lucey *et al.*, 1998b). Our results were not in accordance with the literature. For instance, despite 0131 and 2104 strains have similar acidification profiles, the pH_{gel} values were different. In addition, similar rheological properties (firmness, elastic modulus) were observed for fermented milk with lactobacilli 291 strain and streptococci 0131 strain although fermentation time was significantly longer for streptococci. Consequently, the pH_{gel} and the rheological properties of fermented milk seemed to be more influenced by the structural characteristics of EPS than by the acidification profile. Girard and Shaffer-Lequart (2007a) have also observed that the acidification profile did not influence the pH_{gel} of fermented milk with EPS-producer strains. Interactions between the anionic EPS from 2104 strain and caseins might be responsible of the modifications of the casein aggregation process.

During acidification, several physico-chemical changes occurred in milk. The acidification destabilizes progressively the initial structured organization of casein micelles leading to aggregation (Heertje *et al.*, 1985). At pH higher than their isoelectric point (pH 4.6), caseins are negatively charged (Heertje *et al.*, 1985). Growth kinetic experiments have shown that 2104 strain produced EPS at a pH as high as 5.7. Repulsive electrostatic interactions between anionic EPS from 2104 strain and negative charge of caseins may have contributed to delay the attractive interactions between caseins. The linearity and the stiffness of this EPS may have had an additional contribution to delay the casein aggregation process. Linear and stiff polysaccharide occupies a larger relative volume than branched and flexible molecules (Whistler & BeMiller, 1997). Another reason to the late pH_{gel} for milk fermented with 2104 strain can be the presence of a nonionic acid on the EPS backbone. The possibility to form a lactone into the EPS repeating units, in response to pH, might alter its functional properties as reported in literature (Lifely *et al.*, 1984; Lifely *et al.*, 1981). Girard and Schaffer-Lequart (2007a) have found higher pH_{gel} in fermented milk with EPS-producer strains although one of the three EPS studied was anionic. These authors have compared EPS from mesophilic and thermophilic strains. Consequently, fermentation of milk was made at different incubation temperatures (25 or 40 °C) depending on the strains used which is known to play an important role in the casein aggregation process (Lucey *et al.*, 1998b; Haque *et al.*, 2001). Stronger hydrophobic interactions due to higher temperature may have cause an earlier gelation. Furthermore, Girard and Schaffer-Lequart (2007a) have calculated the pH_{gel} with a G' value of 0.1 Pa instead of 1 Pa (in this study) which makes difficult the comparison among results of this study and their results. Hassan and co-workers (2003b) have also observed higher pH_{gel} in fermented milk with EPS (unknown structures) as compared to non-EPS-producer strains possibly because of to the incompatibility between EPS and caseins due to depletion interactions. The resulting phase separation can lead to an earlier casein aggregation as reported in the literature (Tuinier *et al.*, 2000). Finally, the pH_{gel} of fermented milk measured in this study was influenced by the structural characteristics of EPS produced by LAB especially with those with negative charge and produced at the early stage of the fermentation e.g. before the casein aggregation process.

According to the dynamic oscillatory rheology, gel formation of every fermented milk occurred at pH 5.5-5.3 which could seem contradictory with the funnel test results where no gels could be visually observed. Furthermore, no change on flow time of pH was observed for milk fermented with the non-ropy strains (Tab. 2.2). These differences may be due to the manipulation of samples in the funnel test disrupting weak gel as the samples in sterile tube were carefully transferred in the funnel before experiment. Furthermore, dynamic oscillatory rheology is more sensitive as compared to the funnel test.

Difference among gel formation between GDL and bacteria was observed in the funnel test. At pH 5.3, only GDL milk formed visible gel. Lucey *et al.* (1998b) have found that gel formed with GDL was different from bacterial gel. Faster acidification rate of GDL comparatively to bacteria may contribute to the difference of casein network formation (Lucey *et al.*, 1998b).

2.4.4 EPS structure-function relationship on rheological/physical properties

The elastic modulus (G') is related to protein-protein interactions and is an indication of the gel stiffness (Lucey, 2001). Irrespective of their structural characteristics, the presence of neutral EPS (0131, 11842, 702074 and 291 strains) caused a decrease of G' as compared to acidified milk with GDL (EPS-free control), control strains (HC15 and 210R) and 2104 strain. These results suggest that neutral EPS molecules modify casein gel network possibly through phase separation between the proteins and the non-absorbing polysaccharides (neutral EPS) as reported in the literature (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Hassan *et al.*, 2003b; Tuinier *et al.*, 2000). The anionic EPS from 2104 strain seemed to modify the casein network too, but in a different way than neutral EPS. Interactions between positive charges of caseins and anionic EPS from 2104 strain in addition to protein-protein interactions may contribute to reinforce the casein network. Fermented milk with higher elastic modulus has been observed by the addition of pectin (anionic and linear polysaccharide) due to electrostatic interactions between caseins and pectin (Everett & McLeod, 2005).

Fermented milk consisted to a casein network with holes in which serum is entrapped (Lucey *et al.*, 1998b). Assuming that the presence of EPS causes a phase separation, strains, EPS and serum should be found in the holes of the casein network in agreement with results reported in the literature (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Hassan *et al.*, 2003b). According to the growth kinetic experiment, all strains used in this study continued to produce EPS after gel formation. The EPS entrapped with serum inside of the holes of casein network may contribute to modulate apparent viscosity, firmness and syneresis.

The viscosifying effect of a polysaccharide in solution is function of the total volume occupied by the polysaccharide in the solvent (Whistler & BeMiller, 1997). The conformation adopted by the polysaccharide in the solvent depends on shape (degree of branching and flexibility of the backbone) and molecular weight (Whistler & BeMiller, 1997). The EPS from 2104, 0131 and 291 strains had the highest ability to increase apparent viscosity, firmness and whey retention. The higher apparent viscosity values were obtained with the anionic, linear and stiff EPS from 2104 strain. The reason is likely because linear polysaccharides occupy a larger radius of volume than branched polymer in solution (Whistler & BeMiller, 1997). This effect causes frequent collisions between molecules, consumes energy, produces friction and then, creates viscosity. Stiff chain also contributes to viscosity (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a) because polysaccharides adopt expended structure and thus, occupy a larger volume (Whistler & BeMiller, 1997). The contribution of electrostatic interactions between the anionic EPS from 2104 strain and caseins may also contribute to the enhancement of apparent viscosity. The molecular weight of EPS from 2104 has not been determined. Intermediate value of apparent viscosity was obtained in milk fermented with the EPS from 0131 strain known to have higher molecular weight. Higher molecular weight may occupy a larger radius of volume in addition to the higher monosaccharide units on backbone that increases the possibility to bind water via hydrogen bonds (Whistler & BeMiller, 1997). The neutrality, the flexibility and the branching of EPS from 0131 strain as compared to 2104 strain may explain the lower viscosity value.

Milk fermented with the 291 strain led to an increase of viscosity as compared to the 11842 and 702074 strains but values were lower than with the 0131 strain. This effect may be explained by the difference between molecular weight. The EPS from 291 strain had similar molecular weight than 11842 and 702074 strains but lower than 0131. The flexibility (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; Whistler & BeMiller, 1997) of the EPS from 11842 and 702074 strains might explain the lowest apparent viscosities as compared to the EPS from 291. In addition, the EPS from 702074 strain is flexible and highly branched and thus, may occupy a smaller radius of volume (Whistler & BeMiller, 1997). Xanthan gum, anionic, stiff and branched polysaccharide, led to viscous solutions at low concentrations due to its ability to expand in the solvent because of the stiffness of backbone (Whistler & BeMiller, 1997).

Although firmness and syneresis results were slightly different from apparent viscosity values, the same trends concerning the impact of structural characteristics can be made. An exception was observed for syneresis values for the EPS from 2104 strain e.g. syneresis values were comparable to those obtained for 210R control, 11842 and 702074 strains. Lower whey retention was also observed with an anionic EPS added as bio-ingredient as powder form (at high concentration) in milk acidified with GDL (Turgeon & Plesca, 2009; Girard & Schaffer-Lequart, 2007a). The reason is likely that electrostatic interactions between the anionic EPS and caseins may be favored instead of hydrogen bonds and thus, leading to less whey retention or electrostatic interactions may have hindered casein-casein interactions leading to a casein network with a lower ability to retain serum.

2.5 Conclusions

Gel formation and rheological properties are influenced by the structural characteristics of EPS produced by LAB. The presence of negative charge on EPS structure modified the casein aggregation process and contributed to the elasticity of the casein network. Apparent viscosity, firmness and whey retention of fermented milk were improved by the EPS with the highest molecular weight and stiff chain with few branching. The lowest values of apparent viscosity and firmness were obtained with flexible and highly branched EPS with low molecular weight. Finally, more investigation are needed regarding the structure-function relationship of EPS produced *in situ* by LAB in a dairy model system allowing the adjustment of milk protein composition in order to elucidate the role of EPS structure in terms of protein-polysaccharide interaction. In addition, it would be worthwhile to combine each EPS-producer strain with its complementary control strain (e.g. streptococci-lactobacilli combination) to simulate fermentation time of yoghurt manufacture.

2.6 Acknowledgements

Pierre Ward, research assistant at the Food Research and Development Centre (FRDC) of Agriculture and Agri-Food Canada is thanked for his expertise and his help in biomolecular techniques.

Chapitre 3 : Effect of milk protein composition and in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria on the rheological properties and the microstructure of dairy model system

Ce travail avait pour but d'étudier les interactions entre les protéines laitières et les EPS. Un système modèle laitier à base de perméat de lait a été développé afin d'ajuster la composition en protéines. Les résultats ont démontré qu'indépendamment de la composition en protéines laitières, la fonctionnalité des EPS versus leurs caractéristiques structurales sur la viscosité, le module élastique et la limitation de la synérèse demeure exceptée pour une teneur de 3 % en caséines. La formation d'un réseau d'EPS observé en microscopie électronique dans le système modèle laitier pourrait être à l'origine de la fonctionnalité des EPS. Finalement, ce travail a permis d'établir la composition protéique optimale du système modèle laitier pour étudier l'utilisation conjointe d'EPS et d'amidon modifié (Chapitre 4).

Résumé

Le but de ce travail était d'étudier l'impact de la concentration en protéines laitières sur les propriétés rhéologiques et la microstructure de systèmes modèles laitiers à base de perméat de lait et fermentés avec des bactéries produisant des exopolysaccharides (EPS) avec des caractéristiques structurales différentes. Quatre ferments ont été étudiés: HC15/210R (contrôle), HC15/291 (EPS neutre, rigide et ramifié), HC15/702074 (EPS neutre, flexible et hautement ramifié) et 2104/210R (EPS chargé, rigide et linéaire). La fermentation à 42 °C a été arrêtée lorsque le pH a atteint 4.6. Le système modèle laitier a permis la croissance bactérienne ainsi que la production d'EPS même sans protéines laitières. La formation des gels n'a pas été influencée par la présence d'EPS. Les propriétés rhéologiques et la microstructure des systèmes modèles laitiers ont été affectées par la composition en protéines laitières et par la présence des EPS. La viscosité a été plus élevée pour les EPS rigides produits par les ferments HC15/291 et 2104/210R. Une structure plus compacte avec de larges pores a été observée pour ces deux ferments. Cette augmentation de la taille des pores pourrait être expliquée par la présence d'un réseau d'EPS observé par microscopie électronique. Le module élastique était plus élevé dans le système modèle avec caséines et protéines sériques. Une valeur plus élevée du module élastique avec le ferment 2104/210R (EPS chargé, rigide et linéaire) serait due aux interactions électrostatiques entre les caséines et les EPS augmentant ainsi la force du gel. Des propriétés rhéologiques et une microstructure similaires ont été observées pour les ferments HC15/210R et HC15/702074. Cet effet pourrait être attribuable à l'EPS flexible et hautement ramifié du ferment HC15/702074 donnant une structure compacte en solution.

Mots-clé: exopolysaccharide, système modèle laitier, propriété rhéologique, microstructure

Abstract

The aim of this work was to study the effect of milk protein concentrations on the rheological properties and the microstructure of dairy model system based on milk permeate and fermented with lactic acid bacteria producing exopolysaccharides (EPS) with different structural characteristics. Four starters were used: HC15/210R (control), HC15/291 (neutral, stiff and branched EPS), HC15/702074 (neutral, flexible and highly branched EPS) and 2104/210R (anionic, stiff and linear EPS). Fermentation was made at 42 °C until pH reached 4.6. Dairy model system without milk proteins allowed bacterial growth as well as EPS production. Gel formation was not affected by the presence of EPS. The rheological properties and the microstructure of dairy model system were affected by milk protein composition and by the presence of EPS. Viscosity was higher for stiff EPS from HC15/291 and 2104/210R starters. The microstructure of these two starters showed a compact casein network with larger pores. The formation of a web-like structure of EPS in dairy model system without milk proteins observed by scanning electron microscopy may contribute to increase pore size. The elastic modulus was higher in dairy model system with casein and whey protein. Higher elastic modulus was measured with anionic EPS probably due to electrostatic interactions with casein that strengthen the network. Similar rheological properties and microstructure were observed for HC15/210R and HC15/702074 starters. This effect was attributed to the flexibility and the highly branched conformation of the EPS from HC15/702074 starter that led to compact structure in solution.

Key words: exopolysaccharide, dairy model system, rheological property, microstructure

3.1 Introduction

Exopolysaccharides (EPS) are microbial polysaccharides that are naturally produced by some lactic acid bacteria (LAB) during the fermentation process. Due to customer's demands for natural foods, EPS have been more extensively studied as natural stabilizers in fermented dairy products such as yoghurts. Their abilities to modulate viscosity and to bind water are not correlated to EPS concentration but to their structure and interactions with milk compounds, especially with proteins (Doleyres *et al.*, 2005; De Vuyst *et al.*, 2003; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a). Molecular weight (Faber *et al.*, 1998), monosaccharide composition (Petry *et al.*, 2003), conformation (flexibility and degree of branching) of backbone (Tuinier *et al.*, 2001) and charge (Turgeon & Plesca, 2009; Girard & Schaffer-Lequart, 2007a) of EPS influence the rheological properties and the microstructure of fermented milk. However, the interactions between milk proteins and EPS are poorly understood. The reason is likely because EPS are progressively produced during the fermentation process as compared to conventional stabilizer agents (modified starches, pectin) that are directly added to the mixture at the natural pH of milk. To overcome this problem, some authors have studied protein-polysaccharide interactions in model system where EPS was used as bio-ingredient i.e. purified and freeze-dried form added at the beginning of the process (Girard & Schaffer-Lequart, 2008; Tuinier *et al.*, 2000; Tuinier *et al.*, 1999). However, a comparative study had demonstrated different rheological properties of fermented milk with *in situ* or bio-ingredient EPS (Doleyres *et al.*, 2005). Purification and freeze-drying steps cause the lost of some functional properties such as ropy character when rehydrated in solution (Girard & Schaffer-Lequart, 2008).

Skim milk media are often used to study EPS production. However, the complexity of milk constituted of proteins (casein and whey protein), fat, sugars and salts adds to the difficulty of studying the interactions between milk proteins and EPS. Only one author has studied the interactions between one EPS with well-known structure produced *in situ* by *Lactococcus lactis* and whey proteins in milk permeate in order to simplify the milk media (Ayala-Hernández *et al.*, 2009; Ayala-Hernandez *et al.*, 2008). Results from scanning electron microscopy have shown interactions between the anionic EPS and whey proteins (2 to 8 %) at pH 4.5 after a fermentation of 12 h at 30 °C. However, the effect of casein was not studied.

In order to study the protein-EPS interactions in fermented dairy products such as yoghurt, a dairy model system allowing the control of protein concentration, bacterial growth with similar acidification rate and *in situ* EPS production must be used. The dairy model system should also have the same environment than milk in terms of sugars, minerals and vitamins which makes milk permeate a good system. In this study, a dairy model system based on milk permeate to simulate yoghurt formula as dilute system was used in order to study the interactions between milk proteins and three EPS with well-known structures. Furthermore, a comparative study of several EPS with known structures produced *in situ* by LAB in presence of different types and concentrations of milk proteins under the same fermentation conditions has never been carried out. The aim of this work was to study the effect of milk proteins (casein and whey protein) on the microstructure and the rheological properties (gel formation, elastic modulus, apparent viscosity) of dairy model systems fermented with LAB producing *in situ* EPS with several structural characteristics (charge, stiffness, degree of branching).

3.2 Material and Methods

3.2.1 Material

Skim milk powder was constituted of 34.4 % total protein and 98 % dry matter (low heat, spray drying process, René Rivet Inc., Terrebonne, Québec, Canada). Whey protein isolate (89 % whey proteins, 98 % dry matter) was purchased from Davisco Foods International (MN, USA). Lactose contained 98 % sugar (Saputo Dairy products Canada, St-Léonard, Québec). Milk permeate was prepared by the ultrafiltration of skim milk at 30 °C with a 10 PM polysulfone membrane (5-10 KDa). Milk permeate contained 0.27 % total protein, 0.75 % ash and 5.6 % dry matter. Native phosphocaseinate (NPC) were previously prepared by our team according to the method of Pierre et al. (Pierre *et al.*, 1992). The composition of NPC was constituted of 85 % total protein, 78 % casein, 7.2 % ash and 93 % dry matter. Bacto casamino acids (Difco), sucrose, sulphuric acid, trichloroacetic acid and magnesium sulfate were purchased from Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canada). Bacto casamino acids powder (69 % total protein, 18 % ash and 95 % dry matter) was constituted of highly hydrolyzed caseins (amino nitrogen to total nitrogen ratio of 0.87). Glycerol-2-phosphate disodium and phenol (> 98 %) were obtained from Sigma (Toronto, Ontario, Canada).

3.2.2 Bacterial strains and starter preparation

Two *Streptococcus thermophilus* strains were used: HC15 from Chr. Hansen (Mississauga, Ontario, Canada) and NIZO2104 (**2104**) from NIZO Food Research B.V., (Ede, Netherlands). Three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains were used: 210R from Waterford (Gist Brocades, Millville, UT), NCIMB702074 (**702074**) from NCIMB (Aberdeen, Scotland, United Kingdom) and DGCC291 (**291**) from Danisco (Buxière, Orsay, France). HC15 and 210R strains were chosen for their ability to not influence the rheological properties of fermented milk although EPS production (Chapter 2). With the single strains, four starters were made: HC15/210R (control), HC15/291 (neutral, stiff and branched EPS), HC15/702074 (neutral, flexible and branched EPS) and 2104 (anionic, stiff and linear EPS)/210R.

Structural characteristics of EPS were presented in Table 3.1. Reconstituted skim milk (RSM) from a low heat skim milk powder was used for strain preparation. Strains were stored at -80 °C in 20 % (wt/wt) RSM supplemented with 5 % (wt/wt) sucrose and 0.35 % (wt/wt) ascorbic acid and sterilized at 110 °C for 10 min. Stock cultures were inoculated at 10 % (vol/vol) in sterilized 12 % RSM (110 °C/10 min) and incubated at 37 °C for 16 h. Active strains were prepared by the inoculation of culture stock at 3% (vol/vol) in sterilized 12% RSM until the pH reached 5.2 for streptococci (4h30 to 6 h) and 4.8 for lactobacilli (3 to 4 h). Population of HC15, 291, 702074 strains was 5×10^8 CFU/mL. For 210R strain, population was 4×10^8 CFU/mL. For 2104 strain, an additional 3 % (vol/vol) subcultivation (42 °C for 6 h and stored overnight at 4 °C) was necessarily to reach a population of 2×10^8 CFU/mL. Active strains were stored overnight at 4 °C. Lactobacilli and streptococci were grown in acidified MRS (Difco) and M17 (Oxoid), respectively (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada).

Table 3-1: Structural characteristics of EPS from LAB

Strain	Charge	Molecular weight			References
		(g·mol ⁻¹)	Branching ¹	Flexibility	
HC15	-----Control-----				(Lambolej <i>et al.</i> , 2003)
2104	Negative ²	NA ³	-	Stiff	(Faber <i>et al.</i> , 2002)
210R	-----Control-----				(Lambolej <i>et al.</i> , 2003)
702074	Neutral	1.8×10^6	++	Flexible	(Harding <i>et al.</i> , 2005)
291	Neutral	1.4×10^6	+	Stiff	(Faber <i>et al.</i> , 2001a)

¹Branching = Linear (-), one branching (+), more than two branching (++) .

²N-acetyl = N-acetyl-galactosamine plus another monomer: 6-O-(3',9'-dideoxy-D-threo-D-althro-nononic acid-2'-yl)- α -D-glucopyranose.

³NA = Information not available.

3.2.3 Dairy model system preparation

NPC powder was firstly sieved with a stainless sieve (mesh 1 mm x 1 mm) to remove large dry particles formed by the freeze-drying process. NPC solution at 7% caseins was made by dissolving NPC powder in milk permeate at 50°C for 45 minutes under a constant agitation of 200 rpm with the propeller stirrer 3fl (R1381) of IKA RW 20 Digital mixer (Wilmington, NC, USA). NPC solution was kept under constant magnetic agitation for 16 h at 4 °C. Due to the poor solubility of NPC powder as mentioned by Pierre and co-workers (1992), a centrifugation step (10 min, 21 °C, 690 x g) was made to remove insoluble particles of the NPC solution at 7 % caseins (for more information, please see Annexe I). Casein level in supernatant (3.5 %) was measured by infrared analyzer using Fourier transform infrared: FT-120 (Foss North America, MN, USA). Neither the distribution of casein profile (α , β , κ , γ) evaluated by HPLC (Jaubert & Martin, 1992) nor the particle size (Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) has changed in the supernatant (Annexe II).

Supernatant (3.5 % caseins) was diluted (wt/wt) in milk permeate to obtain 1, 2 and 3 % caseins. In dairy model at 0 % casein, no casein was added: casamino acids powder (2 % (wt/wt)) was diluted in milk permeate. Glycerol-2-phosphate disodium was added at 0.5 % (wt/wt) and 1 % (wt/wt) to dairy model system at 0 % and 1 % caseins, respectively as buffering agent to promote bacterial growth and similar acidification profile. Dairy model system at 0 and 1 % caseins required also MgSO₄ (30 mM) to promote cellular division for lactobacilli as reported in literature (Lamboley *et al.*, 2003). At 2 and 3 % caseins, glycerol-2-phosphate disodium and MgSO₄ were not necessary. Total solids of dairy model system with different casein concentrations were not adjusted. To study the effect of the addition of 0.5 or 0.75 % as equivalent whey proteins, casein concentration was fixed at 2 %. Whey protein isolate was used as whey protein source. Total solid was adjusted to 10 % (wt/wt) with lactose. Final weight of solutions was 100 g. All solutions of dairy model system were stirred under magnetic agitation at 21 °C for 30 min to ensure complete dissolution.

All solutions of dairy model system with or without whey protein addition were homogenized (EmulsiFlex C5, Avestin Co., Ottawa, Ontario, Canada) by a single pass at 2000 PSI at 55 °C and heat treated at 90 °C for 2 min in an automatic control water bath (Laboratorium Wiesby GmbH & Co, Niebüll, Germany). The mixtures were rapidly cooled to fermentation temperature (42 °C) in the control water bath (about 15 min) or stored at 4 °C until used (maximum 24 h).

3.2.4 Fermentation of dairy model system

Dairy model systems were inoculated with starters to obtain an initial population of 2×10^7 CFU/mL with a streptococci to lactobacilli ratio of 50:50 for HC15/210R, HC15/291 and HC15/702074 starters. For 2104/210R starter, the streptococci to lactobacilli ratio was 40:60 to reach similar acidification profile than the other starters. After inoculation, 90 mL of solution was divided equally into 3 sterile tubes of 50 mL (Falcon, VWR, Montréal, Québec, Canada). The first one was for pH and EPS quantification. The second one was for titratable acidity and microbiological enumeration. The third one was for funnel test (evaluation of the ropy character of EPS). The last part (10 mL) of the inoculated solution was used for microscopy. Fermentation was made at 42 °C until pH reached 4.6 ± 0.05 . Titratable acidity expressed as % lactic acid, pH, microbiological enumeration and EPS quantification were measured before and after fermentation. EPS concentration was measured as described in chapter 2.

3.2.5 Ropy character of EPS

Immediately after fermentation, tubes (30 mL) of fermented dairy model system were put in ice until temperature reached 21 °C. Ropy character of EPS was evaluated by measuring the time (s) for 30 mL of samples to pass through a funnel as described in chapter 2.

3.2.6 Analytical methods

Buffering capacity of dairy model systems with different casein concentrations (0 to 3 %) was measured by the amount of 0.1 N HCl required to reach a pH of 3. The buffering index (dB/dpH) was calculated (Van Slyke, 1922). Official standard methods were used for titratable acidity, pH, dry matter and ash content (AOAC, 2000). Macro-Kjeldahl method was used to quantify total protein, non-casein nitrogen and non-protein nitrogen (St-Gelais *et al.*, 1998). Non-casein nitrogen of milk preparation was obtained by casein precipitation at pH 4.6 with H₂SO₄ (0.02 N). Acid solution was filtered (Whatman paper no. 40) and the filtrate was analyzed. Non-protein content was obtained by protein precipitation with 12 % TCA (wt/wt). The sample was filtered (Whatman paper no. 40). The filtrate was analyzed (St-Gelais *et al.*, 1998). Casein and whey protein contents were calculated by difference. A nitrogen conversion factor of 6.38 was used.

3.2.7 Microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize dairy model systems (S-3000N, Hitachi, Japan). Inoculated samples (10 mL) were directly fermented in 50 mL sterile tube (Falcon, VWR, Montréal, Québec, Canada) and put in water bath at 42 °C. When the pH 4.6 was reached, the samples were directly frozen in liquid nitrogen and lyophilized for 48 h at -45 °C (Freezone 2.5, Labconco, Kansas City, MO, USA). Samples were coated by gold (Marivac, Quebec, Canada) using the sputtering method with sputter coater equipment (Marivac, Quebec, Canada) before the observation.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) operating in fluorescence mode was used to evaluate the microstructure of dairy model systems (Nikon TE-2000E Eclipse, Nikon Canada, Mississauga, Ontario). Inoculated samples (10 mL) were transferred in the 50 mL sterile tube and stained with 30 µL acridine orange (protein dye) at 0.2 % (wt/wt) (Sigma-Aldrich, Toronto, Ontario, Canada) according to the method of Lee and Lucey (2004). Samples were gently mixed by inversion 5 times.

Samples (20 μL) were transferred in slides with a cavity (microslide single depression, no. CA48324-001, VWR, Montréal, Québec, Canada) and a coverslip was fixed with Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, MI, USA). Samples were put in petri dishes covered with parafilm to avoid dehydration and were incubated in an incubator at 42 °C. When the pH reached 4.6, samples were stored for 48 h at 4 °C before visualization. The samples were observed at an excitation wavelength of 488 nm with a He/Ne laser and with a water immersion 60 objective lens (numerical aperture = 1.4). Three representative images of samples were taken (depth of 10-20 μm).

3.2.8 Rheological properties

To measure the rheological properties of dairy model systems at 2 and 3 % caseins with or without whey proteins, a rheometer AR1000 (TA Instruments, New Castle, DE) was used to monitor the gelation profile at 42 °C of dairy model system as described by Girard and Schaffer-Lequart (2007a). To minimise the effect of slippery due to syneresis, rugged plate geometry (4 cm) was used. To limit dehydration of sample, a solvent trap was used. Prior each experiment, plates were disinfected with ethanol (70 %) to avoid contamination. After inoculation, 1.5 mL of inoculated solution was transferred in the rheometer. The remaining volume of the inoculated solution was used to follow the pH in time by using a glass electrode and a standard pH meter (model 140, Corning, Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Gelation point was defined as the time (T_{gel}) and the pH (pH_{gel}) when $G' > 1 \text{ Pa}$ (van Marle & Zoon, 1995). Raw data to obtain T_{gel} and pH_{gel} were calculated as described in chapter 2. When the pH reached 4.6 ± 0.05 , the test of the elastic modulus as function of time was stopped and a temperature ramp test (elastic modulus as function of temperature) was applied (40 min for 1 °C / min) at 0.1 Hz and 0.02 % strain to simulate the cooling step of yoghurt manufacture to storage (4 °C). A conditioning step of 5 min at 4 °C was applied. After cooling to 4 °C, a continuous ramp test was applied to measure the viscosity as function of shear rate (0 to 100 s^{-1}).

3.2.9 Statistical methods

A split-plot was applied to evaluate the effect of casein concentrations or whey protein concentrations on the composition, the microbiological population, the pH, the titratable acidity and the rheological properties of dairy model system fermented with starters producing various EPS. Starter was the sub-plot factor. Significant differences were tested at $P < 0.05$. Statistical analysis was carried out with the general linear models procedure of SAS (Version 9.1.3, 2003, Cary, NC, USA). Experiments were performed in triplicate.

3.3 Results

3.3.1 Effect of casein concentration

3.3.1.1 Composition and buffering capacity

Composition and initial pH of dairy model systems at different casein concentrations are presented in Table 3.2. Total protein and dry matter was significantly affected by casein concentration. Ash level was significantly higher for dairy model system at 0 % casein due to the higher ash content of casamino acids powder added in dairy model system. Initial pH of dairy model systems at 0 and 1 % caseins was significantly higher because of the addition of glycerol-2-phosphate disodium.

Table 3-2: Composition and initial pH of dairy model systems at different casein concentrations

Item	Casein concentration (%)			
	0	1	2	3
Dry matter	7.35 ^c	7.55 ^c	8.59 ^b	9.79 ^a
Total protein	1.48 ^c	1.45 ^c	2.75 ^b	3.80 ^b
Casein	0.02 ^d	1.03 ^c	2.03 ^b	3.04 ^a
Ash	1.61 ^a	0.75 ^b	0.68 ^c	0.79 ^b
Initial pH	6.54 ^a	6.51 ^a	6.18 ^b	6.22 ^b

^{a-d}Values with same superscripts in the same row are not significantly different ($P < 0.05$).

Buffering capacity of milk permeate was lower than milk due to the absence of milk protein (Annexe III). To allow bacterial growth, a buffering agent was added in the dairy model system at 0 and 1 % caseins causing different buffering capacity (Fig. 3.1). In dairy model systems at 2 and 3 % caseins, the buffering capacity was maximal at pH 5.0. For the dairy model system at 1 % casein, the dB/dpH value was slightly higher at pH 5.0. For the dairy model system at 0 %, the maximum of buffering capacity was rather at pH 3 to 4. This effect was due to acidic amino acids in casamino acids powder (Annexe III) as described by Salaün, Mietton et al. (2005). The high value of dB/dpH at pH 6.0 was due to the addition of the buffering agent (Annexe III).

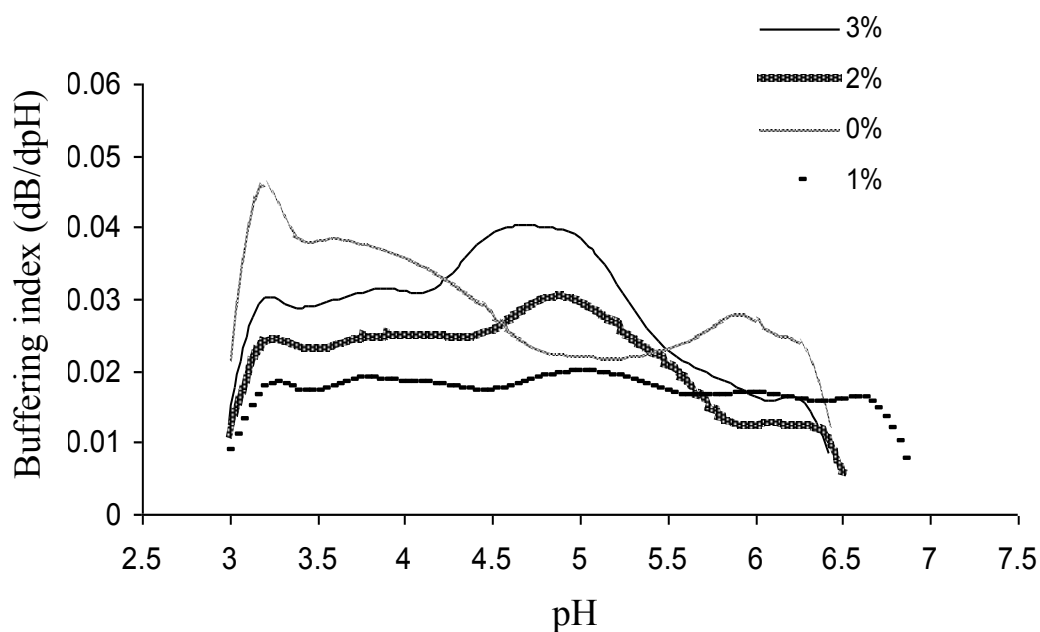


Figure 3-1: Buffering capacity of dairy model systems with different casein concentrations (0 to 3 %) before fermentation.

3.3.1.2 Bacterial growth, lactic acid production, EPS production and ropiness character

Initial population of dairy model system was controlled at $2.3 \pm 0.09 \times 10^7$ CFU/mL with streptococci to lactobacilli ratio of 51 ± 2 for control, HC15/291 and HC15/702074 starters. Initial population for dairy model system fermented with 2104/210R starter was $1.9 \pm 0.09 \times 10^7$ CFU/mL with streptococci to lactobacilli ratio of 40 ± 2 . Final pH of all dairy model systems was not significantly different (4.58 ± 0.02).

Lactobacilli population, fermentation time, lactic acid production, EPS production and ropiness character of EPS evaluated by the funnel test are presented in Table 3.3. As streptococci population was not significantly different (LOG 8.48 ± 0.04 CFU/mL), results were not shown. Lactobacilli population was significantly affected by starter and casein concentration. Significant interaction between starter and casein concentration was also observed. For all starters, lactobacilli population was significantly lower in the dairy model system at 0 % casein. Lactobacilli population of HC15/291 starter was significantly lower for all casein concentrations.

Fermentation time was significantly affected by starter and casein concentration. Significant longer fermentation time was measured in dairy model system at 0 % casein for all starters as compared to the other concentrations. Fermentation with HC15/210R and HC15/702074 starters was significantly longer. Lactic acid production was significantly affected by casein concentration. Higher values were observed for dairy model systems at 0 and 1 % caseins (0.48 ± 0.01 %) than that at 2 and 3 % caseins (0.44 ± 0.01 %).

The casein concentration had no significant effect on EPS production for each starter. EPS production was affected by the type of starter used. Highest EPS production was observed for 2104/210R starter although not significantly different from control and HC15/291 starters. EPS production from HC15/702074 starter tended to be lower.

A significant interaction between starter and casein concentration was observed for the ropy character of EPS (Tab. 3.3). At 0 and 1 % caseins, no gel was formed at pH 4.6. For the dairy model systems at 0 and 1 % caseins, the time to pass through the funnel was significantly longer for HC15/291 and 2104/210R starters, especially at 1 % casein. For control and HC15/702074 starters, the time to pass through the funnel was not affected by the presence of casein. For the dairy model systems at 2 and 3 % caseins, ropy character could not be measured by the funnel test as gels were formed at pH 4.6. Gel properties of dairy model system at 3 % caseins with all starters were not significantly different: T_{gel} (177 ± 9 min), pH_{gel} (4.68 ± 0.08), G' at $42^\circ C$ (3 ± 0.9 Pa) and G' at $4^\circ C$ (16 ± 8 Pa). At 2 % caseins, a weak gel was formed (G' at $42^\circ C < 1$ Pa).

Table 3-3: Fermentation parameters (lactobacilli population, fermentation time, lactic acid production), EPS production and ropy character evaluated by the funnel test (flow time) of dairy model systems at different casein concentrations fermented with different starters at pH 4.6

Casein (%)	Starter	Lactobacilli (Log CFU/mL)	Fermentation time (min)	Lactic acid production (%)	EPS production (mg/L)	Flow time ^A (s)
0	Control	7.93 ^{def}	322 ^a	0.46 ^a	49 ^b	11 ^d
	HC15/291	7.79 ^{fg}	307 ^{ab}	0.50 ^a	43 ^b	24 ^c
	HC15/702074	7.86 ^{efg}	325 ^a	0.48 ^a	31 ^c	11 ^d
	2104/210R	7.96 ^{cdef}	287 ^b	0.48 ^a	68 ^a	37 ^{bc}
1	Control	8.17 ^{ab}	235 ^{cde}	0.49 ^a	53 ^{ab}	14 ^d
	HC15/291	7.69 ^g	218 ^{de}	0.46 ^a	52 ^{ab}	64 ^a
	HC15/702074	8.06 ^{bcd}	242 ^c	0.45 ^{ab}	34 ^c	13 ^d
	2104/210R	8.18 ^{ab}	205 ^{de}	0.45 ^{ab}	65 ^a	50 ^{ab}
2	Control	8.10 ^{abcd}	241 ^c	0.44 ^b	39 ^{bc}	Gel
	HC15/291	8.00 ^{bcd}	203 ^{de}	0.42 ^b	45 ^b	Gel
	HC15/702074	8.25 ^a	240 ^c	0.39 ^b	33 ^c	Gel
	2104/210R	8.14 ^{abc}	197 ^e	0.42 ^b	57 ^a	Gel
3	Control	8.12 ^{abc}	240 ^c	0.43 ^b	50 ^{ab}	Gel
	HC15/291	7.81 ^{efg}	195 ^e	0.42 ^b	70 ^a	Gel
	HC15/702074	8.07 ^{abcd}	236 ^{cd}	0.43 ^b	40 ^{bc}	Gel
	2104/210R	8.29 ^a	200 ^e	0.42 ^b	61 ^a	Gel

^{a-g}Values with same superscripts in the same column are not significantly different ($P < 0.05$).

^AThe evaluation of the flow time (s) by the funnel test was not possible for dairy model system at 2 and 3 % caseins due to the gel formation at pH 4.6.

3.3.2 Effect of whey protein concentration

3.3.2.1 Composition

To study the impact of the addition of whey protein in dairy model system, a casein concentration of 2 % was chosen as it was the lowest casein level allowing gel formation. The composition of dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.5 and 0.75 % whey proteins is presented in Table 3.4. Dry matter, casein, non-nitrogen protein and ash were not significantly different. The high value of non-casein nitrogen may be due to the presence of proteose-peptone fraction in NPC powder as explained by Pierre and co-workers (1992) in addition to the trace of whey proteins in milk permeate. These authors estimated that 40 % of non-casein nitrogen values are proteose-peptone fraction. The reason is probably because this fraction is soluble at pH 4.6 and insoluble at pH lower than 4.2 (Pierre & Douin, 1984). Consequently, proteose-peptone fraction over estimates the non-casein nitrogen value and inversely, underestimates the non-protein nitrogen value.

Table 3-4: Composition of dairy model systems at 2 % caseins with the addition of 0.5 or 0.75 % whey proteins

Constituent (%)	Whey protein addition (%)	
	0.5	0.75
Dry matter	9.69 ^a	9.83 ^a
Total protein	3.21 ^b	3.49 ^a
Casein	2.00 ^a	2.03 ^a
Non-casein nitrogen	1.20 ^b	1.46 ^a
Non-protein nitrogen	0.18 ^a	0.19 ^a
Ash	0.71 ^a	0.71 ^a

^{a-b}Values with same superscripts in the same row are not significantly different ($P < 0.05$).

3.3.2.2 Bacterial growth and EPS production

Initial population and streptococci to lactobacilli ratio were controlled at $2.2 \pm 0.06 \times 10^7$ CFU/mL and 48 ± 1 , respectively. Initial pH of blend was 6.27 ± 0.018 . Fermentation was stopped when pH reached 4.60 ± 0.05 for all dairy model systems. Lactic acid production was 0.38 ± 0.01 % for all dairy model systems. Lactobacilli population and fermentation time were significantly affected by starter (Tab. 3.5). Streptococci population (8.48 ± 0.04 CFU/mL) was not significantly different (data not shown). Final population of lactobacilli was significantly lower for HC15/291 starter as compared to the others. Fermentation time was significantly longer for dairy model systems at all whey protein concentrations fermented with HC15/702074 starters than those with the other starters. EPS production was not significantly different (51 ± 6 mg/L) among whey protein concentration and starter although EPS production tended to be lower for HC15/702074 starter (Tab.3.5).

3.3.2.3 Rheological properties

The T_{gel} was significantly affected by starter (Tab. 3.5). The longest T_{gel} were measured for and HC15/702074 starter following by the HC15/210R (control) starter. The T_{gel} and pH_{gel} were significantly affected by whey protein concentration (Tab. 3.5). Adding 0.75 % whey proteins as compared to 0.5 % led to significant faster T_{gel} and higher pH_{gel} . Starter was the main factor that influenced significantly the G' at both temperatures i.e. after the gel formation and after the cooling step (Tab. 3.5). Dairy model system fermented with 2104/210R starter tended to get higher G' at both temperatures but were not significantly different from dairy model system fermented with HC15/291 starter. Viscosity was significantly affected by starter irrespective of whey protein concentration (Tab. 3.5). Dairy model systems fermented with HC15/291 and 2104/210R starters had significant higher viscosity than those fermented with control and HC15/702074 starters.

Table 3-5: Fermentation parameters (fermentation time, lactobacilli population, EPS production, gelation time (T_{gel}), pH of gelation (pH_{gel})) and rheological properties (elastic modulus (G') before (42 °C) and after cooling step (4 °C) and apparent viscosity (10 and 100 s^{-1})) of dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.5 or 0.75 % whey proteins and fermented with different starters

Item	Whey protein addition							
	0.5 %				0.75%			
	Control	HC15/291	HC15/702074	2104/210R	Control	HC15/291	HC15/702074	2104/210R
Time (min)	190 ^{bc}	197 ^{bc}	233 ^a	160 ^d	197 ^{bc}	183 ^{cd}	213 ^{ab}	177 ^d
Lactobacilli (Log CFU/mL)	8.2 ^a	7.7 ^b	8.1 ^a	8.1 ^a	8.2 ^a	7.7 ^b	8.2 ^a	8.1 ^a
EPS production (mg/L)	46 ^a	51 ^a	41 ^a	67 ^a	51 ^a	67 ^a	41 ^a	57 ^a
T_{gel} (min)	157 ^b	140 ^{bc}	187 ^a	114 ^c	132 ^c	124 ^c	165 ^a	120 ^c
pH_{gel}	4.91 ^b	5.08 ^{ab}	4.97 ^b	5.11 ^{ab}	5.09 ^{ab}	5.24 ^a	5.23 ^a	5.18 ^a
G' (Pa) at 42 °C	6 ^c	18 ^{abc}	5 ^c	26 ^a	13 ^{bc}	19 ^{abc}	12 ^{bc}	28 ^a
G' (Pa) at 4 °C	31 ^c	109 ^{abc}	39 ^c	151 ^a	67 ^{bc}	100 ^{abc}	80 ^{bc}	178 ^a
Viscosity at 10 s^{-1} (Pa)	0.154 ^c	1.89 ^{ab}	0.163 ^c	1.05 ^b	0.262 ^c	2.88 ^a	0.184 ^c	0.714 ^b
Viscosity at 100 s^{-1} (Pa)	0.024 ^c	0.190 ^{ab}	0.027 ^c	0.113 ^b	0.055 ^c	0.241 ^a	0.031 ^c	0.083 ^b

^{a-c}Values with same superscripts in the same row are not significantly different ($P < 0.05$).

3.3.3 Microstructure

Fermented dairy model systems at 2 % caseins showed different casein aggregates depending on starter (Figs. 3.2a-d). Dairy model system fermented with starter led to large and interconnected casein aggregates. More compact casein aggregates were observed with HC15/291, HC15/702074 and 2104/210R starters. Furthermore, microstructure of dairy model system fermented with HC15/702074 starter was different from those fermented with HC15/291 and 2104/210R starters. Adding 0.75 % whey proteins to the dairy model system at 2 % caseins (Figs. 3.2e-h) led to the formation of different casein network comparatively to dairy model system without whey protein (Figs. 3.2a-d). Highly interconnected casein network was observed with control and HC15/702074 starters. Casein network was more compact (in green) with larger pores when HC15/291 and 2104/210R starters were used.

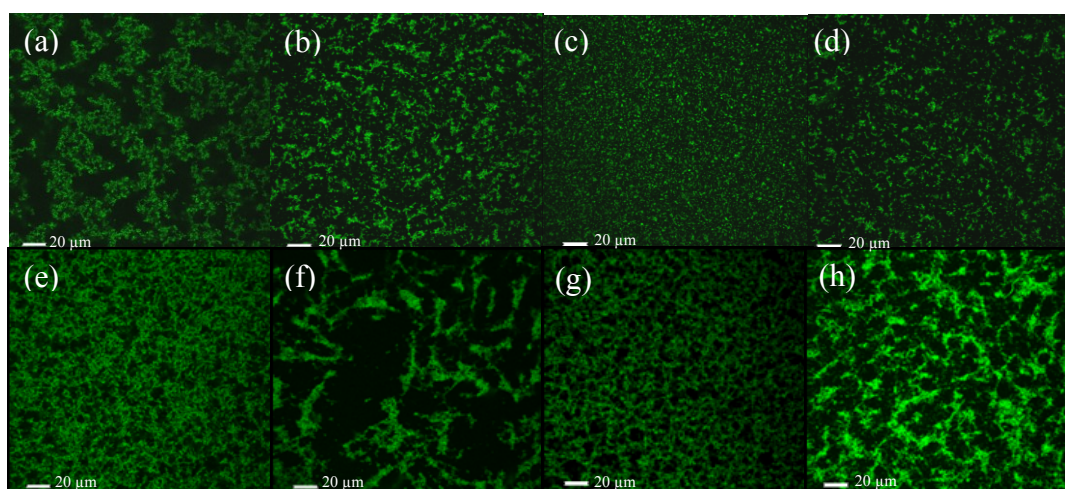


Figure 3-2: CLSM observations of dairy model systems at 2 % caseins without (a-d) or with the addition of 0.75 % whey proteins (e-h) fermented at pH 4.6 with control (a, e), HC15/291 (b, f), HC15/702074 (c, g) and 2104/210R (d, h) starters.

Microstructure of dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.75 % whey proteins observed by SEM showed different pictures depending on starter. Dairy model system fermented with control starter led to a homogenous network (Fig. 3.3a). For HC15/291 starter, the casein network was compact with heterogeneous and larger pores than with control starter (Fig. 3.3b). In addition, large strands probably due to the presence of EPS were observed around the pores. The microstructure of the dairy model system fermented with HC15/702074 starter was similar to HC15/291 starter but the network was less compact (Fig. 3.3c). For the 2104/210R starter, large and tangled strands (probably EPS) were observed within a compact network (Fig. 3.3d).

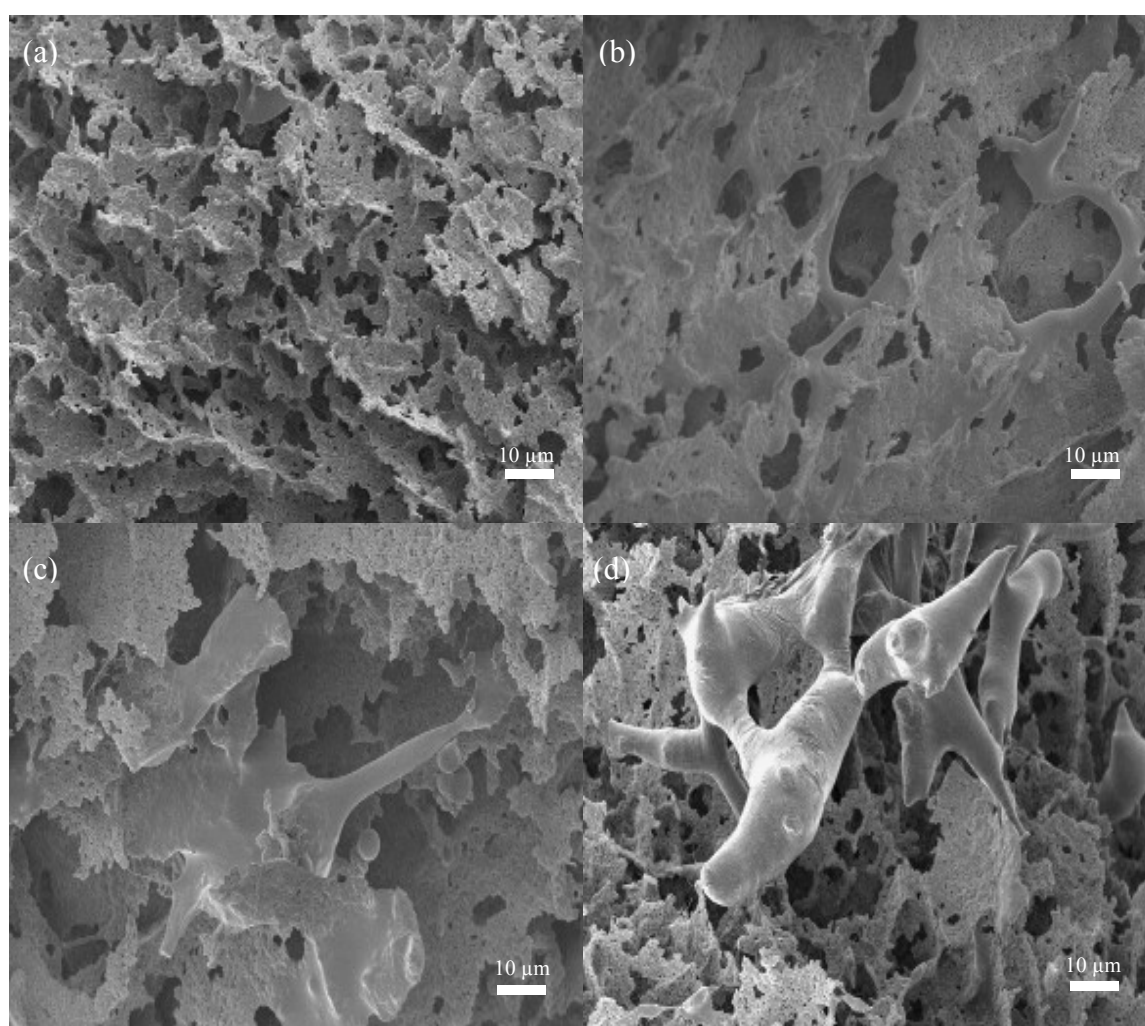


Figure 3-3: Microstructure of dairy model system with 2 % casein and with the addition of 0.75 % whey proteins with control (a), HC15/291 (b), HC15/702074 (c) and 2104/210R (d) starters at pH 4.6 by scanning electron microscopy (1 K).

Dairy model system at 0 % casein fermented with HC15/921 starter at pH 4.6 was a viscous and transparent solution. After freeze-drying, the appearance of the solution was a fluffy and spaced out mass (Fig. 3.4a). Microstructure of dairy model system at 0 % casein fermented with HC15/921 starter at pH 4.6 observed by SEM showed a web-like structure (Fig. 3.4c). For dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.75 % whey proteins acidified with glucono-delta-lactone at pH 4.6, the appearance, after freeze-drying, was a compact and white mass (Fig. 3.4b). Homogenous casein network with small pores without strands was observed in dairy model system acidified with glucono-delta-lactone (Fig. 3.4d).

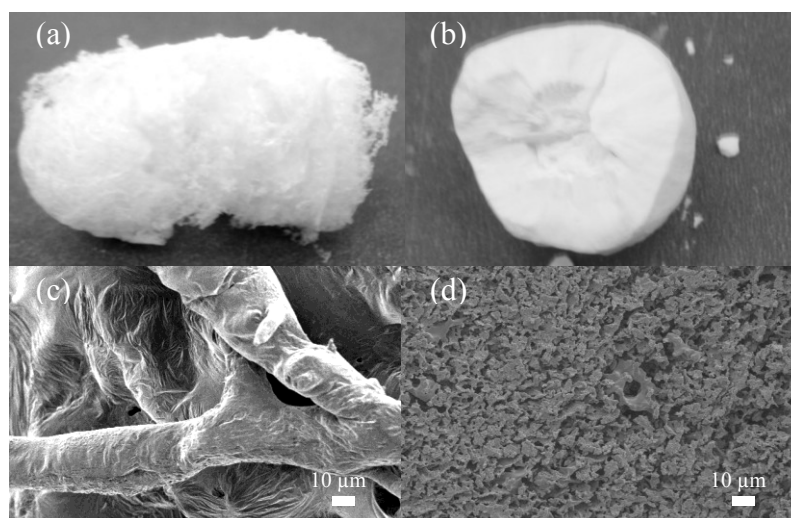


Figure 3-4: Appearance of dairy model system at 0 % casein fermented with HC15/291 starter at pH 4.6 (a, c) and dairy model system with 2 % caseins with the addition of 0.75 % whey proteins acidified with glucono-delta-lactone (1.4 % (wt/wt)) at pH 4.6 (b, d) after freeze-drying process (a, b) and visualized by scanning electron microscopy (0.5 K) (c, d).

3.4 Discussion

3.4.1 Bacterial growth and EPS production

This work aimed to investigate the effect of concentration and type of milk proteins on the microstructure and the rheological properties of dairy model system based on milk permeate and fermented with LAB producing *in situ* EPS with different structures. It is important to point out that milk permeate did not support bacterial growth and EPS production (Ayala-Hernandez *et al.*, 2008). This effect was attributed to the poor buffering capacity of this media due to the absence of milk proteins (Salaün *et al.*, 2005). To allow bacterial growth with similar acidification rate among starters and EPS production, milk permeate was enriched with buffering agent and casamino acids at low casein concentrations (0 and 1 %).

Streptococci population was not affected by milk protein concentration while lactobacilli population was lower in dairy model system at 0 % casein. The dairy model system at 0 % casein had the same environment (salt, sugar, and vitamin) than milk except for the nitrogen source which came from casamino acids (highly hydrolyzed caseins). The culture media must contain essential amino acids because LAB cannot synthesise them. Lactobacilli had higher proteolytic activity than streptococci in addition to fastidious nutritional requirement (Monnet *et al.*, 2008). Streptococci requires only two auxotrophies instead of eleven to fifteen for lactobacilli (Altan *et al.*, 2008). Consequently, the lower lactobacilli population may be attributed to the lack of specific essential amino acids or the quantity was too low in the dairy model systems at 0 % casein. Some heat-sensible amino acids such as lysine, histidine and arginine essential to lactobacilli may have also been altered during the heat treatment (Béal *et al.*, 2008). Another factor can be the buffering capacity. For the growth of LAB, the buffering capacity of the media culture is important (Salaün *et al.*, 2005). The reason is probably because of the by-product of fermentation process: lactic acid is known as a growth-limiting factor that can lead to lethality (Monnet *et al.*, 2008). The buffering capacity of dairy model systems at 2 and 3 % caseins were similar to those obtained in milk probably due to similar casein content (Monnet *et al.*,

2008; Salaün *et al.*, 2005). Using casamino acids and glycerol-2-phosphate disodium in dairy model system at 0 % casein caused a shift of maximum buffering capacity to acidic pH as compared to milk and in a lower case at pH 6. The higher buffering capacity at pH 6 in dairy model system at 0 % casein as compared to the other casein concentrations may have favored streptococci. The reason is likely that the optimal pH for optimal growth was pH 6.5 for streptococci and pH 5.8 to lactobacilli (Béal *et al.*, 1989). However, it is difficult to interpret the relation between buffering capacity and microbiological growth because it depends on strain and species (Salaün *et al.*, 2005). Lactobacilli population of HC15/291 starter was lower in all dairy model systems as compared to the other lactobacilli. This effect was not observed in skim milk at 12 % dry matter (Annexe IV). For this specific strain, it seemed that there is a lack of a growth factor in the composition of dairy model system allowing optimal growth.

Fermentation time was strain dependent as observed in fermented skim milk with single strain (Chapter 2). Gelation time of all dairy model systems was influenced by the fermentation time among starters as observed by other authors (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; van Marle & Zoon, 1995). The longer fermentation time in all dairy model systems at 0 % casein was probably due to the lower lactobacilli population. These bacteria are well known as acidifying strain as compared to streptococci (Monnet *et al.*, 2008). The different buffering capacity profile of dairy model system at 0% casein as compared to the other casein concentration may have also contributed to higher fermentation time.

Preliminary results of this study have shown that EPS production was similar in dairy model systems at 0 and 1 % caseins and in skim milk (12 % dry matter) except for HC15/702074 starter (Annexe IV). EPS production among starters was strain dependent as observed by Cerning and co-workers (1990). EPS production from *Streptococcus thermophilus* in milk permeate enriched with casamino acids at 1, 2, 3 or 4 % was lower than in skim milk while a similar EPS production was observed for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in both media (Cerning *et al.*, 1990).

3.4.2 EPS structure-function relationship

At 0 and 1 % caseins, no gels were formed at pH 4.6. Ropy character of HC15/291 and 2104/210R starters was expressed in all dairy model systems even at 0 % casein. Macy (1923) has also observed that 1 % lactose solution allowing the expression of ropy character of EPS. The mechanism of ropy character of EPS remains unknown but our results tend to relate ropy character to the ability of EPS to increase viscosity of solution by the formation of hydrogen bonds with water or/and due to specific structural characteristics. The ropy character was more pronounced when 1 % casein was added to the dairy model system even though EPS production was similar. The non correlation between EPS concentration and rheological properties of the media is generally accepted (Doleys *et al.*, 2005; De Vuyst *et al.*, 2003; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a; Cerning *et al.*, 1990). Adding casein to dairy model system led to a synergistic effect on the ropy character for ropy EPS. Similar observation was noted when casein was added to lactose solution (Macy, 1923).

Rheological properties (pH_{gel} , T_{gel} , G' at 42 and 4 °C) of dairy model system at 3 % caseins were not affected by the presence of EPS. These results suggested that casein concentration was too high and hid the functional properties of EPS. It was also important to point out that the pH_{gel} of dairy model system at 3 % caseins was next to pH 4.6 (isoelectric point of casein). This value was similar to those reported for unheated milk or for media with 3.5 % caseins (Famelart *et al.*, 2004; Lucey *et al.*, 1998c). The pH_{gel} shifted to higher pH when whey protein was added. The reason is likely related to the higher isoelectric point of whey proteins (pH 5.2) and the interactions between whey protein and κ -casein (Famelart *et al.*, 2004). Gel formation of dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.75 % whey proteins with all starters occurred at pH 5.2 in accordance to the pH_{gel} of gelation reported in literature for fermented milk (Heertje *et al.*, 1985).

Significant higher viscosities were measured with the EPS from HC15/291 starter following by the EPS from 2104/210R starter as also observed in fermented milk with 291 and 2104 single strains (Chapter 2). The ability of polysaccharide to influence viscosity is functions of the total volume occupied in solution and depends on molecular weight,

flexibility and branching of backbone (Whistler & BeMiller, 1997). Higher molecular weight polysaccharide occupied a volume with a larger radius than lower molecular weight polysaccharide as well as enhancing the possibility to bind water contributing to viscosity. The stiffness may also contribute to viscosity because of polysaccharide may adopt an expanded structure occupying a larger radius of volume (Whistler & BeMiller, 1997). For the same molecular weight, linear polysaccharide as compared to highly branched polysaccharide occupied a larger radius of volume and thus, increased the viscosity (Whistler & BeMiller, 1997). The molecular weight of the EPS from 2104 strain was not determined. The EPS from 291 and 2104 strains have both a stiff backbone which may have contributed to the enhancement of viscosity. The linearity (EPS from 2104 strain) and few branching (EPS from 291 strain) may have also contributed to viscosity. As compared to control starter, dairy model system fermented with HC15/702074 starter had no significant effect on viscosity. Molecular weights of the EPS from 291 and 702074 strains are similar. The non-contribution of the EPS from 702074 strain to viscosity can be due to the highly branched and the flexibility of backbone causing the compactness of polysaccharide and thus, smaller radius of volume (Whistler & BeMiller, 1997).

Adding whey proteins to the dairy model system increased gel stiffness (G') as compared to dairy model system with casein alone. This result underlines the importance of whey proteins in the network formation as explained by Famelart and co-workers (2004). The whey protein concentration, used in this study, did not influence G' values probably due to the small difference between both concentrations. Among starters, a higher G' value was measured with the anionic EPS from 2104/210R starter. Turgeon and Plesca (2009) have also observed higher G' with anionic EPS from *Lactobacillus rhamnosus*. These authors attributed this effect to associative phase separation due to electrostatic interactions between EPS and casein that reinforces the casein network. Finally, it has been postulated that neutral EPS may dissolve easily in water because it interacts less with the positive charged caseins (van den Berg *et al.*, 1995). Consequently, neutral EPS contributes more to viscosity but it has no effect on gel stiffness (G') contrarily to anionic EPS where electrostatic interactions with caseins may occur as observed in this study.

3.4.3 Microstructure

Microstructure of dairy model systems at 2 % caseins without the addition of whey protein showed casein aggregates instead of a highly branched network due to the lack of whey protein (Famelart *et al.*, 2004). For control starter, casein aggregates were large and interconnected as observed for a solution of 3.5 % caseins fermented at pH 4.6 (Famelart *et al.*, 2004). The presence of EPS increased the compactness of the casein network probably due to the formation of EPS network-like structure within casein aggregates. However, it is unclear if specific interactions occurred between the casein network and EPS. The visualization of dairy model system at 0 % casein fermented with HC15/291 starter by SEM showed a web-like structure as also observed by other authors (Hassan *et al.*, 2003a; Goh *et al.*, 2005b). The observation of EPS web-like structure was in concordance to the literature as non-absorbing polysaccharide (neutral EPS) may form a network structure within colloidal particles such as caseins (Syrbe *et al.*, 1998).

Adding whey protein to dairy model system allowed the formation of a highly branched interlinked network. This structure was also observed when whey protein was added to a solution of 3.5 % caseins (Famelart *et al.*, 2004). Microstructure of control starter was a typical casein network formed by chemical acid acidification of skim milk at 10 % dry matter (Turgeon & Plesca, 2009). Similar microstructure and rheological properties of HC15/702074 and control starters may be due to the lower radius of volume due to the flexibility and the branching of the EPS produced by the 702074 strain. More compact network with larger pores was observed with HC15/291 and 2104/210R starters. This type of microstructure was also observed in other studies with fermented milk containing EPS possibly caused by phase separation due to depletion flocculation (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Hassan *et al.*, 2003a; Hassan *et al.*, 2003b; Tuinier *et al.*, 2000; Tuinier *et al.*, 1999). Structural characteristics (linear or few branched and rigid backbone) of the EPS from HC15/291 and 2104/210R starters may have led to higher radius of volume as shown by larger pores in CLSM leading to a more compact structure. Larger radius of volume linked to higher viscosity may have caused the compactness of casein aggregates due to more phase separation.

For 2104/210R starter, the casein network seemed to be more interconnected as compared to HC15/291 starter. An absorbing polysaccharide such as anionic EPS may interact with positive charged caseins through electrostatic interactions and thus, strengthen the casein network as observed in this study. Girard and Shaffert-Lequart (2007a) have also observed a compact casein network with larger pores irrespective of the flexibility, the degree of branching and the charge of EPS but incubation temperature (25 and 40 °C) and final pH (5.2 to 4.6) were not the same among strain in their study. These factors are well-known to influence the casein network (Tamine & Robinson, 1999).

EPS seemed to be found in the pores of the casein network with serum and bacteria as reported in literature (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Hassan *et al.*, 2003b). Contrarily to conventional stabilizer agents such as modified starches, EPS are progressively produced during fermentation instead of being generally added at the beginning of process. The inhomogeneous sizes of pores observed for HC15/291 and 2104/210R starters may be attributed to EPS production after the gel formation. Previous work has demonstrated that EPS was produced after gel formation for 291 and 2104 single strains (Chapter 2). Consequently, it can be postulated that gel formation trapped randomly bacteria and EPS may be more concentrated in some local patches.

Microstructure observed by SEM of dairy model system fermented with HC15/291 and HC15/702074 starters showed compact casein network with strands around the pores. For 2104/210R starter, larger and tangled strands were observed within the network. This structure may be due to the possible electrostatic interactions between caseins and EPS. Some authors attributed the filament formation of EPS to artifacts caused by the dehydration of samples (Ayala-Hernandez *et al.*, 2008; Hassan *et al.*, 2003a). The strands around the pores before the freeze-drying process covered all the pores and with the dehydration, it was broken. Pictures from cryo-SEM (without dehydration step) showed pores covered entirely by EPS (Hassan *et al.*, 2003a). Finally, in this study, SEM observation has shown that EPS were found in the large pores of the casein network and may interact with casein network in presence of anionic charge on EPS backbone.

3.5 Conclusions

This study has shown the impact of milk protein composition and EPS structures on the microstructure and the rheological properties of dairy model system. The dairy model system allowed bacterial growth with similar acidification rate among starters as well as EPS production even without milk proteins. Milk protein composition in dairy model system had little impact on EPS production but a significant effect on gelation process (time and pH), viscosity, elastic modulus and microstructure of gels. The structural characteristics of EPS had also an effect on microstructure and rheological properties of dairy model system. The presence of linear, stiff and anionic EPS contributed to the gel stiffness (elastic modulus) possibly through electrostatic interactions with caseins as well as for viscosity. Neutral, stiff and few branched EPS contributed more to viscosity because of its ability to retain whey and increases the bulk volume. The microstructure of dairy model system was a more open structure with EPS with stiff backbone regardless of the charge. The formation of EPS network-like structure within casein network was also demonstrated and might explain the ability of EPS to modulate whey retention, viscosity and elastic modulus. Current work is done to study the impact of adding commercial stabilizers such as modified starches on the microstructure and the rheological properties of dairy model system fermented with LAB producing different EPS structures.

Chapitre 4 : Effect of modified starch concentration and in situ EPS production by lactic acid bacteria on the rheological properties and the microstructure of dairy model system

Le but de ce travail était d'étudier l'effet de la concentration en amidon modifié dans un système modèle laitier avec des EPS aux structures connues. Les résultats ont démontré que la fonctionnalité des EPS demeure malgré l'ajout d'amidon modifié. Aucune synergie ni d'effet antagonique de l'utilisation conjointe des EPS et de l'amidon modifié n'a été observée pour le module élastique et la viscosité. Finalement, les résultats ont permis de déterminer la concentration optimale d'amidon modifié à utiliser pour la fabrication de yogourts ferme et brassé à l'échelle pilote (Chapitre 5).

Résumé

Le but de ce travail était d'évaluer l'effet de la concentration en amidons modifiés et de ferments producteurs d'exopolysaccharides (EPS) possédant des caractéristiques structurales différentes sur les propriétés rhéologiques (formation de gel, module élastique, viscosité, synérèse) et la microstructure de système modèle laitier à 2 % de caséines additionné de 0.75 % de protéines sériques. Quatre ferments ont été utilisés : HC15/210R (Témoin), HC15/291 (EPS neutre, rigide et peu ramifié), HC15/702074 (EPS neutre, flexible et hautement ramifié) et 2104/210R (EPS chargé, rigide et linéaire). Quatre concentrations en amidon modifié ont été étudiées : 0, 0.2, 0.6 et 1 %. La fermentation a été réalisée à 42 °C jusqu'à l'obtention du pH 4.6. Le processus de formation de gel n'est pas influencé par l'ajout d'amidon modifié ni par la présence de ferments producteurs d'EPS. Le module élastique semble plutôt influencé par la charge portée par l'EPS du ferment 2104/210R permettant des liaisons électrostatiques avec les caséines que par l'ajout d'amidon modifié. Indépendamment des ferments utilisés, l'ajout d'amidon modifié a diminué la synérèse tandis que la viscosité est demeurée inchangée. Parmi les ferments producteurs d'EPS, la viscosité et la limitation de la synérèse a été supérieure pour l'EPS rigide et ramifié produit par le ferment HC15/291. L'utilisation du couple HC15/702074 a donné des valeurs de viscosité et de synérèse similaires au ferment témoin pouvant être expliquée par les caractéristiques structurales de cet EPS: chaîne flexible et hautement ramifiée. L'ajout d'amidon modifié a augmenté la densité du réseau caséique pour tous les ferments utilisés tandis que des réseaux caséiques plus compacts avec de larges pores ont été observés avec les ferments producteurs d'EPS rigide et linéaire ou peu ramifié comparativement aux autres ferments.

Mots-clé: exopolysaccharide, propriété rhéologique, microstructure, amidon modifié

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of modified starch concentration and starters producing exopolysaccharides (EPS) with different structures on the rheological properties (gel formation, elastic modulus, viscosity, syneresis) and the microstructure of a dairy model system at 2% caseins with the addition of 0.75 % whey proteins. Four starters were used: HC15/210R (control), HC15/291 (neutral, stiff and few branched EPS), HC15/702074 (neutral, flexible and highly branched EPS) and 2104/210R (anionic, stiff and linear EPS). Four modified starch concentration was studied: 0, 0.2, 0.6 and 1 %. Fermentation was carried out at 42 °C until pH 4.6 was reached. Gel formation was not significantly influenced by starters neither by modified starch concentration. Modified starch did not contribute to the elastic modulus whereas 2104/210R starter producing anionic EPS influenced elastic modulus possibly through electrostatic interactions with caseins. The addition of modified starch had limited syneresis of dairy model systems fermented with all starters but had no effect on viscosity. Among starters, viscosity and control of syneresis were higher for HC15/291 starter producing stiff and branched EPS. Fermented dairy model system with HC15/702074 starter did not contribute to viscosity and syneresis as values were similar to control starter probably due to its structural characteristics: highly branched and flexible EPS. The addition of modified starch increase the density of casein network for all starters used although stiff and linear or few branching on EPS backbone showed a compact casein network with more open structure than those with the other starters.

Key words: exopolysaccharide, rheological property, microstructure, modified starch

4.1 Introduction

Yoghurt results from the slow fermentation of lactose contained in milk into lactic acid by two lactic acid bacteria (LAB): *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bularicus*. Yoghurt production may cause technological defects such as whey expelled at the surface of the product namely called syneresis and variability in viscosity. Syneresis is one of the major concerns of dairy industry because it affects consumer acceptability. In North America, stabilizing agents as modified starches are currently used to avoid technological defects. Although the addition of stabilizers agents, technological defects still occur. The addition of exopolysaccharides (EPS) may be used in association with conventional stabilizers agents to control the rheological properties of fermented dairy products in order to limit technological defects.

EPS are polysaccharides naturally produced by some LAB during the fermentation process. Contrarily to conventional stabilizer agents, no clear correlation has been found between EPS concentration and their positive effect on the rheological properties of fermented milk (Petry *et al.*, 2003; van Marle & Zoon, 1995; Wachter-Rodarte *et al.*, 1993; Cerning *et al.*, 1986). It has been postulated that their effect is rather related to structural characteristics of EPS (molecular weight, charge, degree of branching, stiffness) and their interactions with milk components, especially with proteins (Faber *et al.*, 1998).

Combination of two polysaccharides in fermented dairy products may be beneficial to decrease syneresis. For instance, a mixture of xanthan gum (EPS from *Xanthomonas campestris* as bio-ingredient) and locust gum (3 g/L) had synergistic effect to decrease syneresis of fermented milk (Keogh & O'Kennedy, 1998). Synergistic and antagonist effects on viscosity and reduction of syneresis were also observed in fermented milk enriched with pectin depending on the EPS producer starters used (Olsen, 2003). On the other hand, as the EPS structures were unknown, no structure-function relationship has been established.

Understanding the role of interactions between polysaccharides and EPS in presence of milk proteins is important in order to produce fermented dairy products with desirable rheological properties for consumer's acceptance. To our knowledge, only one study has studied the effect of inulin (dietary fiber) and one EPS produced *in situ* by starters in yoghurt (Ramchandran & Shah, 2009). However, the EPS structure was unknown and thus, no structure-function relationship can be established.

Before studying the interactions between polysaccharides and EPS in presence of milk proteins, a comprehensive work was realized on the interactions between milk proteins and three EPS with well-known structures in a dairy model system based on milk permeate (Chapter 3). A dairy model system was used to control the composition of milk proteins (casein and whey protein concentrations) in order to simplify the study of the interactions between milk proteins and EPS. Results showed that anionic EPS contributed to gel stiffness whereas EPS with stiff backbone improved viscosity and limited syneresis irrespective of casein and whey protein concentrations in the dairy model system (Chapter 3). The objective of the present work was to evaluate the effect of modified starch concentration and starters producing *in situ* EPS with different structural characteristics (charge, degree of branching, stiffness) on the rheological/physical properties (gel formation, viscosity, elastic modulus, syneresis) and the microstructure of dairy model system.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Material

Milk permeate, native phosphocaseinate, whey protein isolate and lactose used for dairy model system preparation were already presented in chapter 3. The same lot was used for all ingredients. Modified starch from waxy maize (Thermtex) was given by National Starch (Boucherville, Québec, Canada). Modified starch powder was constituted of 87 % total carbohydrate with 91 % dry matter.

4.2.2 Bacterial strains and starter preparation

Bacterial strains used were the same as in chapter 3. Reconstituted skim milk (RSM) at 12 % dry matter was used for strain preparation as described in chapter 3. Stock cultures were prepared as described in chapter 3. Stock cultures were firstly activated by the inoculation at 10 % (vol/vol) in RSM and incubated at 37 °C for 16 h. Active strains were prepared by the inoculation of culture stock at 3% (vol/vol) in RSM until the pH reached 5.2 for streptococci (4h30 to 6 h) and 4.8 for lactobacilli (3 to 4 h) and were stored overnight at 4 °C. Population in active strains was enumerated in acidified MRS (Difco) and M17 (Oxoid) for lactobacilli and streptococci, respectively (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Population in active strains was similar to those obtained in our previous work (Chapter 3).

4.2.3 Dairy model system preparation

A dairy model system with 2 % casein content (from native phosphocaseinate) with addition of 0.75 % whey proteins (from whey protein isolate) was prepared as described in chapter 3. Modified starch was added at 0, 0.2, 0.6 and 1 % (wt/wt). Lactose was used to adjust the total solid content at 10 %. Final weight of solutions was 100 g. Homogenization and heat treatment were made as described in chapter 3. Solutions were then rapidly cooled to fermentation temperature (42 °C) in a control water bath (about 15 min) or stored at 4 °C until used (maximum 24 h).

4.2.4 Fermentation process

Inoculation of starters was made as described in chapter 3 to obtain an initial population of 2×10^7 CFU/mL with a streptococci to lactobacilli ratio of 50:50 for HC15/210R (control), HC15/291 and HC15/702074 starters in dairy model systems. For 2104/210R starter, the streptococci to lactobacilli ratio was lower (40:60) to reach similar acidification profile than the other starters. Directly after inoculation, 90 mL of each solution was divided equally into 4 sterile tubes of 50 mL (Falcon, VWR, Montréal, Québec, Canada). One was used to follow pH, a second one for titratable acidity and microbiological population. The two other tubes were used for the evaluation of syneresis. The last part (10 mL) of the inoculated solution was used for microstructure observation. Fermentation process, in a water bath at 42 °C, was stopped when pH reached 4.6 ± 0.05 . Microbiological population, pH and titratable acidity expressed as % lactic acid were measured directly after the inoculation and at the end of the fermentation.

4.2.5 Gel formation, rheological properties and syneresis

Gelation profile was made according to the method of Girard and Schaffer-Lequart (2007a). Rheological properties (elastic modulus, viscosity) of dairy model system were measured as described in chapter 3. Syneresis was measured by centrifugation method. After fermentation at pH 4.6, samples (2 tubes) were stored at 4 °C for 16 h to measure syneresis. After storage, samples were centrifuged at $210 \times g$ for 20 minutes at 4 °C (Gentès, 2007). The clear supernatant was poured off, weighed and recorded as syneresis (as % of total sample volume).

4.2.6 Analytical methods

Composition (total protein, casein, whey protein, dry matter, ash) of dairy model system was measured as described in chapter 3. Titratable acidity expressed as % lactic acid and pH were measured by official methods (AOAC, 2000).

4.2.7 Microscopy

Microstructure of dairy model system was evaluated by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Preparation of samples was made according to the method described in chapter 3. Proteins were marked with acridine orange (Sigma-Aldrich, Toronto, Ontario, Canada) at 0.2 % (wt/wt) according to the method of Lee and Lucey (2004).

4.2.8 Statistical methods

A split-plot was applied to evaluate the effect of modified starch concentration and starter producing EPS with various structures on the composition, the microbiological population, the pH, the titratable acidity and the rheological properties of dairy model system. Starter was the sub-plot factor. Significant differences were tested at $P < 0.05$. Statistical analysis was carried out with the general linear models procedure of SAS (Version 9.1.3, 2003, Cary, NC, USA). Experiments were performed in triplicate.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Dairy model system composition

The composition of dairy model systems containing different concentrations of modified starch was not significantly different : 3.33 ± 0.04 % total protein, 1.96 ± 0.03 % casein, 1.37 ± 0.05 % non-casein nitrogen, 0.2 ± 0.02 % non-protein nitrogen, 0.70 ± 0.03 % ash and 9.82 ± 0.05 % dry matter. The high value of non-casein nitrogen was due to the presence of proteose-peptone fraction in native phosphocaseinate powder in addition to trace of whey protein contained in milk permeate as explained in chapter 3. Initial pH (6.36 ± 0.02) or final pH (4.61 ± 0.01) of all dairy model systems was not significantly different.

4.3.2 Microbiological population and fermentation process

Initial population at inoculation time was controlled: $2.05 \pm 0.09 \times 10^7$ CFU/mL for all modified starch concentrations with a streptococci to lactobacilli ratio of 54 ± 1 . To obtain similar acidification profile to the other starters, initial population ($1.45 \pm 0.09 \times 10^7$ CFU/mL) and streptococci to lactobacilli ratio (46 ± 1) were lower for 2104/210R starter. Microbiological population after fermentation was significantly affected by starter (Tab. 4.1). The lower lactobacilli population for HC15/291 starter was also observed previously (Chapter 3). The reason is likely that the dairy model system lacked of an essential nutriment allowing optimal growth.

Fermentation time was not significantly affected by the addition of modified starch (data not shown). Similar results were reported for fermented milk with 1 % starch (Oh *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2003). Fermentation time was strain dependent as observed in skim milk fermented with single strain and in dairy model system at different milk protein concentrations fermented with streptococci-lactobacilli starter (Chapters 2 and 3). For instance, 2104 strain had the longer fermentation time to reach pH 4.6 when used alone in milk (Chapter 2) but the combination with 210R strain led to significant faster acidification rate (Chapter 3 and this study).

Lactic acid production was significantly affected by the type of starters used. HC15/291 starter produced significantly less lactic acid probably because of the lower lactobacilli population (Tab. 4.1). Lactobacilli are well known as acidifying strain compared to streptococci (Monnet *et al.*, 2008).

Table 4-1: Fermentation parameters (microbiological population, fermentation time, lactic acid production) of dairy model system fermented at pH 4.6 with different starters

Parameter	Starter			
	Control	HC15/291	HC15/702074	2104/210R
Streptococci (CFU/mL)	8.36 ^b	8.54 ^a	8.27 ^c	8.43 ^b
Lactobacilli (CFU/mL)	8.05 ^a	7.78 ^b	8.14 ^a	8.05 ^a
Fermentation time (min)	203 ^a	185 ^b	195 ^{ab}	163 ^c
% lactic acid	32 ^{ab}	28 ^c	31 ^{bc}	34 ^a

^{a-d}Values with same superscripts in the same row are not significantly different ($P < 0.05$).

4.3.3 Gel formation

Gel formation (T_{gel} and pH_{gel}) is presented in Table 4.2. The pH_{gel} was not significantly affected by modified starch concentration or starter (Tab. 4.2). All dairy model systems formed gel at $pH 5.25 \pm 0.07$. This value of gel formation was similar to those reported for fermented milk with (Oh *et al.*, 2007) or without starch (Heertje *et al.*, 1985). Oh and co-workers (2007) have also found that the addition of starch up to 1 % did not influence the pH_{gel} of fermented milk. Modified starch concentration had no significant effect on T_{gel} . This parameter was rather influenced by starter more specifically linked to fermentation time among starters as observed in Chapter 3 and by other authors (van Marle & Zoon, 1995; Girard & Schaffer-Lequart, 2007a). For instance, fermented dairy model system with 2104/210R starter had the significant lower fermentation time and the significant faster T_{gel} .

Table 4-2: Gelation pH (pH_{gel}) and time (T_{gel}) and elastic modulus (G') after fermentation (42 °C) and after cooling step (4 °C) of dairy model system fermented at pH 4.6 with different starters and modified starch concentrations

Modified starch (%)	Starter	pH_{gel}	T_{gel}	G' at 42 °C (Pa)	G' at 4 °C (Pa)
0	Control	5.29 ^a	135 ^a	26 ^{ab}	171 ^a
	HC15/291	5.30 ^a	129 ^a	37 ^a	256 ^a
	HC15/702074	5.23 ^a	140 ^a	19 ^b	91 ^b
	2104/210R	5.32 ^a	114 ^b	32 ^a	194 ^a
0.2	Control	5.22 ^a	134 ^a	35 ^a	214 ^a
	HC15/291	5.22 ^a	139 ^a	26 ^{ab}	149 ^{ab}
	HC15/702074	5.20 ^a	143 ^a	13 ^b	96 ^b
	2104/210R	5.20 ^a	115 ^b	32 ^a	195 ^a
0.6	Control	5.24 ^a	138 ^a	29 ^a	127 ^b
	HC15/291	5.20 ^a	133 ^a	28 ^a	149 ^b
	HC15/702074	5.22 ^a	134 ^a	14 ^b	101 ^b
	2104/210R	5.25 ^a	117 ^b	31 ^a	170 ^a
1	Control	5.30 ^a	132 ^a	26 ^{ab}	154 ^b
	HC15/291	5.21 ^a	132 ^a	24 ^{ab}	138 ^b
	HC15/702074	5.25 ^a	126 ^a	22 ^b	112 ^b
	2104/210R	5.30 ^a	106 ^b	51 ^a	253 ^a

^{a-b}Values with same superscripts in the same row are not significantly different ($P < 0.05$).

At the end of fermentation process, the effect of cooling (42 to 4 °C) on elastic modulus (G') was monitored by rheological measurement. Measurement of G' provides useful information about the nature of the bonds (strength and numbers) in terms of gel stiffness (Lucey, 2001). The final G' after gel formation at 42 °C or after the cooling step to 4 °C was significantly influenced by starter (Tab. 4.2). Among starters, the final G' at both temperatures was significantly different for 2104/210R and HC15/702074 starters. The G' values tended to be higher for 2104/210R starter but were not significantly different from the G' values of control and HC15/291 starters. These results were in accordance to those obtained in our previous work where higher G' values were measured for dairy model systems with different milk protein concentrations and fermented with 2104/210R and HC15/291 starters (Chapter 3). The higher final G' for 2104/210R starter may be attributed to the negative charge of EPS from 2104 strain as reported previously in the case of the addition of negative charge EPS in fermented milk (Turgeon & Plesca, 2009).

Electrostatic interactions between EPS and caseins may cause a strengthening effect and increase gel stiffness (higher G'). Decreasing slowly (1 °C/min) incubation temperature (42 °C) to 4 °C led to an increase of G' for all dairy model systems. This observation is in agreement with the literature for fermented milk acidified with glucono-delta-lactone (Bikker *et al.*, 2000; Lucey *et al.*, 1997). Lowering temperature causes a shift of hydrophobic bonds involved in gel formation by non-covalent interactions such as hydrogen bonds, dipolar and electrostatic interactions responsible of the increase of the gel stiffness (Haque *et al.*, 2001).

Modified starch concentration had no effect on final G' after gel formation at 42 °C or after the cooling step to 4 °C (Tab. 4.2). Oh and co-workers (2007) have found opposite results e.g. that the addition of native potato starch influenced the final G' of fermented milk before and after cooling. They explained the effect of starch on the stiffness of casein network in relation to gelatinization process. During heating, hydrophilic bonds responsible for the cohesiveness of starch granules decrease (Eliasson, 2004). Starch granules dissolve in solvent causing hydration of granules as well as swelling. The hydration of starch granule will increase the density of casein network and thus, may contribute to the gel stiffness. Starch concentration will also contribute to the density of the casein network. During gelatinization process, starch granule will release some amylose. Cooling will favor association of amylose units due to hydrogen bonds strengthening that will contribute to the final viscosity of the solution. This effect may have contributed to the gel stiffness, too. Finally, the difference among results of this study and the work of Oh and co-workers (2007) of starch on gel stiffness may be attributed to the different starch used. In fact, waxy maize did not contain amylose (< 1 %) as compared to potato starch (21 %) (Whistler & BeMiller, 1997). In addition, swollen potato starch may have a diameter up to 100 μm (Whistler & BeMiller, 1997) as compared to 20 μm for waxy maize from Thermtex (Fig. 1.3). Consequently, the effect of swollen starch granule on the density of casein network may be different due to the difference among diameter.

4.3.4 Rheological properties and syneresis

A linear relationship between elastic (G') or viscous (G'') modulus and frequency of the dairy model systems fermented with different starters was observed (Fig. 4.1). Higher G' value than G'' indicated the elastic or solid-like character of gels. G' and G'' values were not significantly affected by modified starch concentration (data not shown). This observation is in agreement with results reported in the literature (Oh *et al.*, 2007).

Among starters, G' and G'' values were significantly lower in dairy model systems fermented with HC15/702074 starter. Lower G' value of fermented milk with LAB producing EPS as compared to non-EPS producers LAB were reported in literature (Hassan *et al.*, 2003b). These authors attributed this effect to phase separation that decreases the possibility of the interactions between protein aggregates due to the presence of EPS. However, as structural characteristics of EPS were unknown, no structure-function relationship can be established. The G' value for dairy model system fermented with 2104/210R starter, although not significantly different, tended to be higher. This effect may be attributed to the negative charge carried by the EPS of 2104/210R starter. In previous work, it has been observed that the anionic EPS from 2104 strain had a significant effect on G' in milk fermented with the 2104 single strain (Chapter 2). These results underline the difference of using single EPS producer strain in combination with another strain.

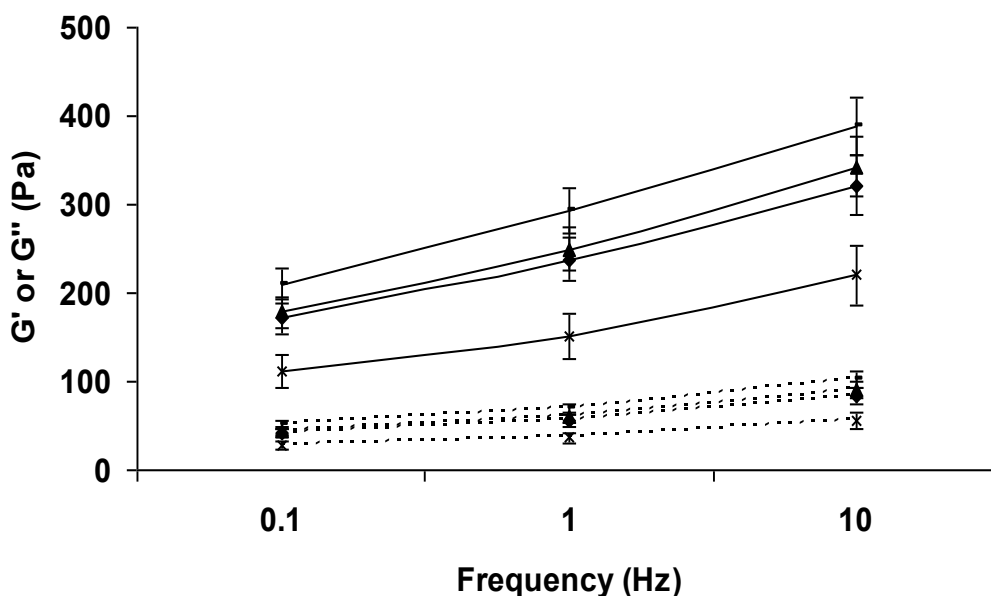


Figure 4-1: Elastic (G') (plain line) and viscous (G'') (dotted line) modulus of dairy model systems fermented at pH 4.6 with control (\diamond), HC15/291 (\blacktriangle), HC15/702074 (\times) and 2104/210R (-) starters. Measurements were made at 4 °C.

Viscosity of dairy model systems with modified starch concentrations and fermented with different starters is presented in Figure 4.2. At all modified starch concentrations, the same viscosity profile upon shearing was observed for all starters. Dairy model systems fermented with HC15/291 and 2104/210R starters led to higher viscosity than control and HC15/702074 starters. Similar trend was observed in previous work in dairy model system with different milk protein concentrations (Chapter 3). In order to correlate structural characteristics of EPS to functionality in terms of viscosity, it is important to mention that the ability of polysaccharides to contribute to viscosity is functions of the total volume occupied in solution (Whistler & BeMiller, 1997). The conformation of the polysaccharide in solution depends on shape (branching and flexibility of backbone) as well as on molecular weight (Whistler & BeMiller, 1997). EPS from HC15/702074 and HC15/291 starters have similar molecular weight but it is unknown for 2104/210R starter (Chapter 2). Linearity in addition to the stiffness of EPS backbone from 2104/210R starter may contribute to larger radius of volume in solution as explained previously in chapter 2.

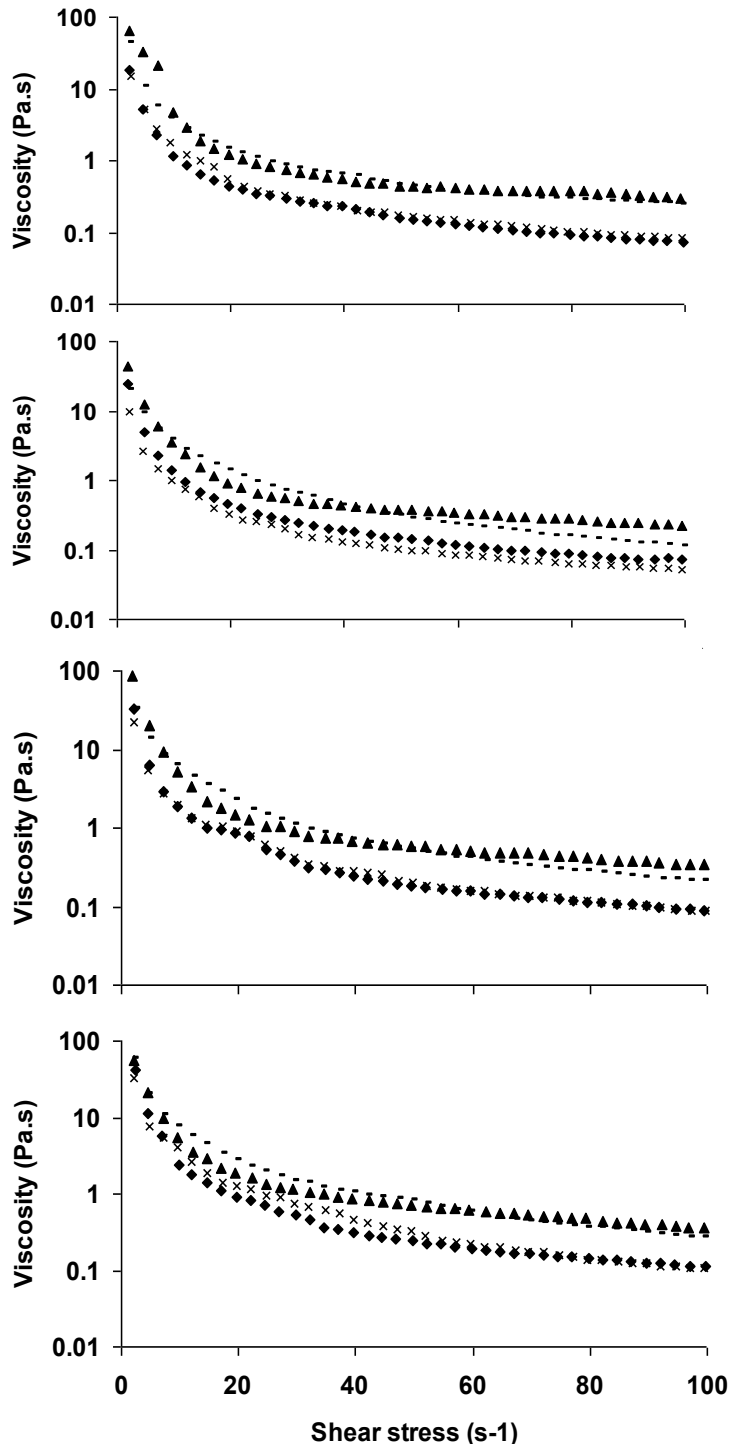


Figure 4-2: Viscosity of dairy model systems fermented at pH 4.6 with control (\blacklozenge), HC15/291 (\blacktriangle), HC15/702074 (\times) and 2104/210R (-) starters with 0 (a), 0.2 (b), 0.6 (c) and 1 (d) % modified starch. Measurements were made at 4 °C.

The EPS from HC15/291 starter contributed significantly to viscosity probably as compared to the EPS from HC15/702074 starter although similar molecular weight due to the stiffness and few branching on backbone. However, structural characteristics of EPS from HC15/702074 starter (highly branched and flexible EPS) may have caused a lower radius of volume and thus, had not contributed to viscosity as explained previously in chapter 2.

The concentration of modified starch had no effect on the viscosity of dairy model systems for all starters used (Fig. 4.2). Williams and co-workers (2003) had found contrary results e.g an improvement of viscosity by the addition of 1 % modified starch to stirred yoghurt. The fundamental difference between set and stirred yoghurt products is that stirred yoghurt results on the destruction of the original set yoghurt gel (Sodini *et al.*, 2004) may explain the divergence among our result and the observation of Williams and co-workers (2003). The results obtained in this study underline the importance of the casein network in addition to the presence of EPS with specific structural characteristics on the contribution of viscosity of unstirred dairy model system.

As mentioned before, the ability of polysaccharides to improve viscosity is function of the volume occupied in solution. As compared to those polysaccharides, functionality of starch relationship to viscosity cannot be explained as functions of radius of volume due to its structure. Starch structure is highly organized in a granular form. Functional properties of starch are rather related to the gelatinization process as explained before. Upon heat treatment, starch granules dissolve in aqueous solutions allowing hydration and swelling. Hydroxyl groups in glucose monomers of amylose and amylopectin bind water and thus, viscosity increases. Competition of other molecules for water such as proteins may affect swelling process of starch granules and thus, leads to decrease their functional properties (Eliasson, 2004; Colonna & Thibault, 1986). Consequently, competition for water by the protein network may have altered the functional properties of modified starch.

Syneresis was significantly affected by modified starch concentration and starter (Fig. 4.3). No significant interaction between modified starch concentration and starter was observed. The addition of 0.6 % or 1 % of modified starch significantly decreased syneresis value of dairy model systems (Fig. 4.3a) as previously shown with 1 % addition of modified starch in low fat stirred yoghurt (Ares *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2003). As syneresis values of dairy model systems were not significantly different with the addition of 0.6 or 1 %, the optimal modified starch concentration seemed to be 0.6 %.

Dairy model system fermented with HC15/291 starter showed significant lower syneresis than the other starters (Fig. 4.3b). Similar result was observed for the 291 single strain that had the highest ability to reduce syneresis in fermented milk (Chapter 2). The EPS produced by HC15/702074 starter is considered to have a similar molecular weight to the EPS of HC15/291 starter but this EPS had no positive effect on syneresis. The flexibility and the presence of a high degree of branching may explain this result. Although the EPS produced by 2104/210R starter was stiff and linear, no positive effect on syneresis was observed, too. Similar result was observed for milk fermented with the single 2104 strain (Chapter 2). Electrostatic interactions between caseins and the anionic EPS may be favored instead of hydrogen bonds causing less whey retention or may have hindered casein-casein interactions leading to a casein network with a lower ability to retain serum. Finally, competition for serum retention between modified starch and EPS seemed not to occur as the addition of modified starch decreased syneresis regardless of the concentration.

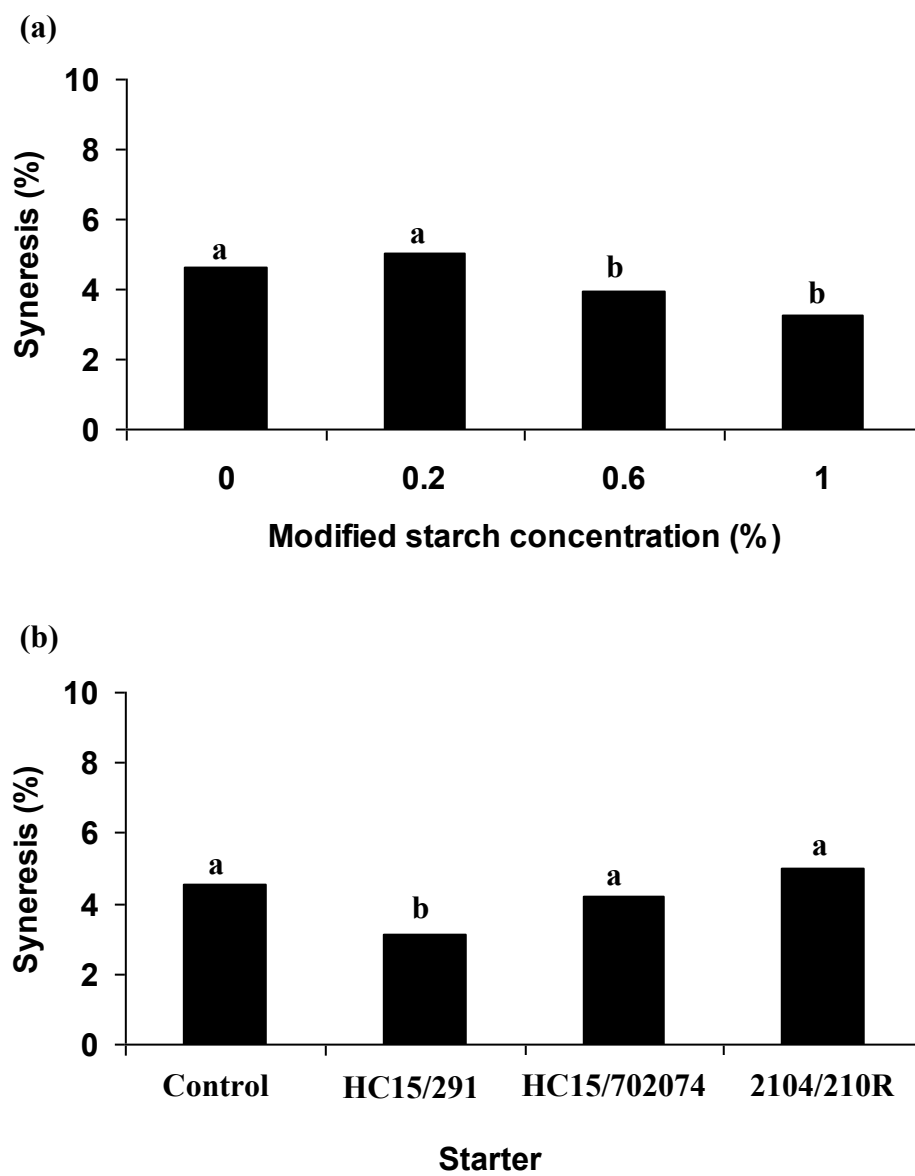


Figure 4-3: Syneresis (%) after centrifugation at 210 x g for 20 min at 4 °C of dairy model systems fermented at pH 4.6 as function of modified starch concentration (a) and starters (b).

4.3.5 Microstructure

Microstructure of all dairy model systems showed a casein network as the dominant continuous phase (Fig. 4.4). Increasing modified starch concentration led to a more compact casein network as also observed by Oh and co-workers (2007). Phase separation possibly through depletion flocculation mechanism was observed in all dairy model systems in agreement to the published literature (Noisuwan *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2007; de Bont *et al.*, 2002). Different degree of phase separation was observed depending on modified starch concentration. Phase separation was higher in all dairy model systems with 0.2 % modified starch (Figs. 4.4 e-h) as compared to the other concentrations. More homogenous casein network with smaller pores were observed at 0.6 % modified starch for all starters. At 1 % modified starch, phase separation was higher for all starters except for control starter. Literature indicates optimal starch concentration range from 0.1 to 0.7 % (Clark & Plotka, 2004). Consequently, adding 0.6 % modified starch in dairy model systems seemed to be the optimal concentration.

Without modified starch, casein network of control starter (Fig. 4.4a) was similar to those observed in fermented milk with starter of acidified with glucono-delta-lactone (Turgeon & Plesca, 2009; Lucey & Singh, 1998; Famelart *et al.*, 2004). Using starters producing EPS may cause phase separation due to depletion flocculation mechanism as reported in the literature (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Tuinier *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2003b; Tuinier *et al.*, 1999). For HC15/291 and 2104/210R starters, it is possible to observe the bacteria responsible for the EPS production, cocci (2104 strain) and rods (291 strain) in the pores of the casein network. No bacteria were visible for HC15/702074 and control starters. In addition, EPS seemed to be found in the pores of casein network with serum and bacteria as previously showed in the literature (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Hassan *et al.*, 2003a).

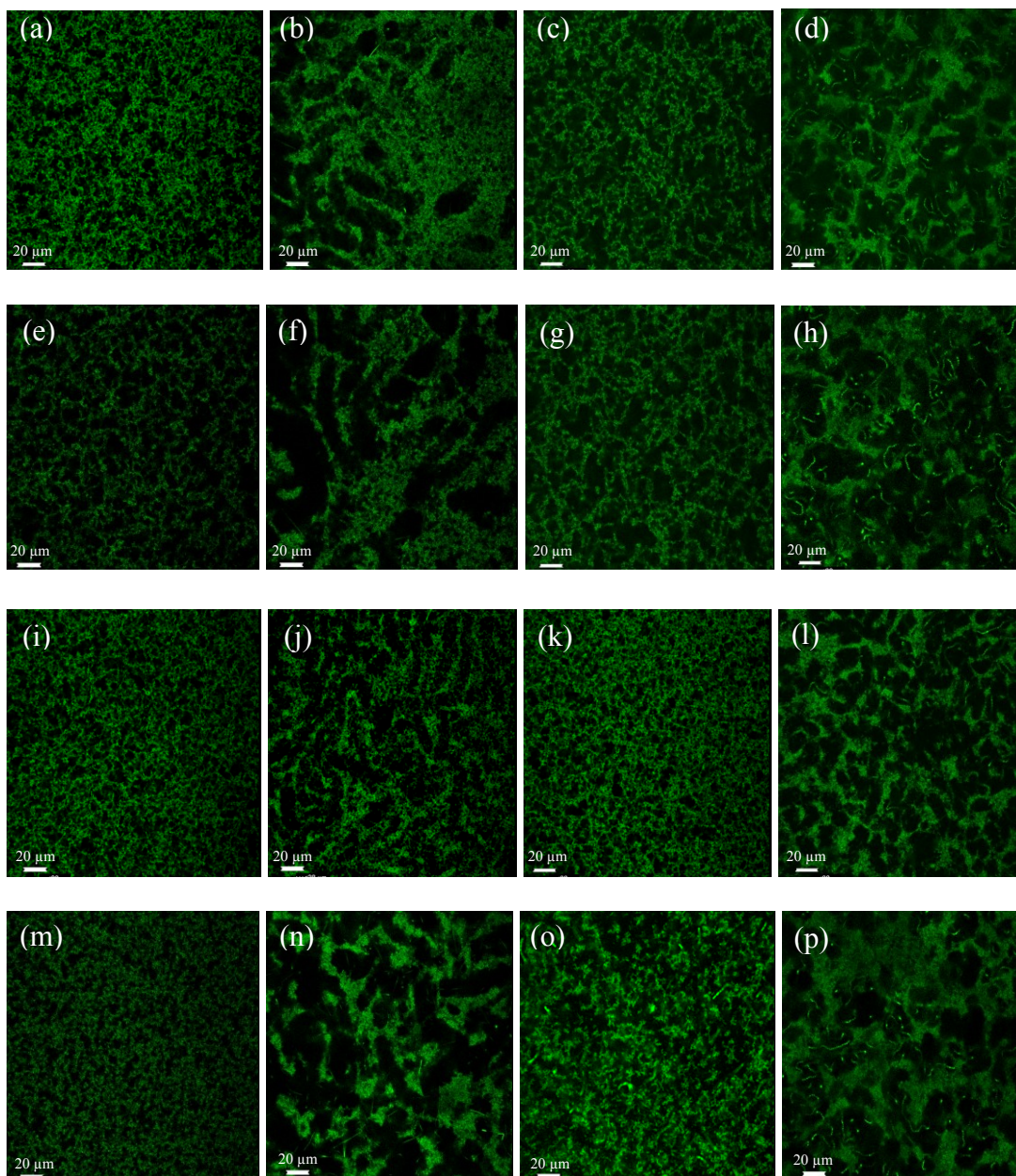


Figure 4-4: Microstructure of dairy model systems at 0 (a-d), 0.2 (e-h), 0.6 (i-l) and 1 (m-p) % modified starches fermented at pH 4.6 with control (a, e, i, m), HC15/291 (b, f, j, n), HC15/702074 (c, g, k, o) and 2104/210R (d, h, l, p) starters.

Microstructure of dairy model systems fermented with control and HC15/702074 starters showed similar pore sizes to those reported in milk acidified with glucono-delta-lactone (Lucey & Singh, 1998). Small pore sizes HC15/702074 starters might explain the non contribution of EPS from HC15/702074 starter to viscosity. As explained before, the high degree of branching and the flexibility of EPS backbone may cause a lower radius of volume and thus, did not contribute significantly to viscosity. The microstructure of dairy model system fermented with HC15/702074 starter might also explain the lower G' value. Firstly, fewer interconnections between casein aggregates than dairy model system fermented with control were observed. In addition, the EPS from HC15/702074 starter did not contribute to viscosity due to its structural characteristics. Larger pores ($> 30 \mu\text{m}$) and a more compact casein network were observed for dairy model systems fermented with HC15/291 and 2104/210R starters regardless of modified starch concentration. This observation was in accordance to theory in terms of viscosity. Larger radius of volume due to the stiffness in addition the linearity or few branching on backbone of EPS may be responsible to the larger pores for these starters. Girard and Shaffert-Lequart (2007a) have also observed larger pores in fermented milk at pH 5.2-5.0 irrespective of structural characteristics of EPS. On the other hand, the final pH was not at pH 4.6 (pH final of yoghurt). In addition, incubation temperature and final pH were not the same among strains. These factors are well known to influence the casein network (Tamine & Robinson, 1999). Although the different microstructure of dairy model systems fermented with HC15/291 and 2104/210R starters as compared to those fermented with control starter, similar G' values were observed. This effect may be attributed to the density of casein network in addition to the significant contribution to viscosity due to specific structural characteristics of these EPS. For the 2104/210R starter, the presence of negative charge may have also contributed to increase the gel stiffness due to possible electrostatic interactions with caseins as observed in chapter 2.

4.4 Conclusions

This study has shown the impact of modified starch concentration and starters producing EPS with different structures on the gel formation, the rheological properties and the microstructure of dairy model system at 2 % caseins with the addition of 0.75 % whey proteins. The addition of modified starch limited syneresis irrespective of starters producing EPS with different structures but had no effect on gel formation, on viscosity neither on gel stiffness (elastic modulus). The structural characteristics of EPS had also an effect on the rheological properties and the microstructure of dairy model system. Gel stiffness (elastic modulus) seemed to be more influenced by the presence of linear, stiff and anionic EPS possibly due to electrostatic interactions with caseins. Stiff and linear or slight branching in EPS backbone was related to viscosity improvement. The microstructure of dairy model system was more open structure with stiff and few branching on EPS backbone although syneresis was lower than the control starter and the starter producing highly branched and flexible EPS where homogenous casein network with small pores was observed. Finally, this work had shown that starters producing EPS irrespective of structural characteristics may be used in association with modified starch (conventional stabilizer agent) to control the rheological/physical properties of fermented dairy model systems in order to limit technological defects such as syneresis. Current work is done in order to study the impact of modified starch and starters producing EPS with several structural characteristics in yoghurt.

Chapitre 5 : Effect of modified starch addition and *in situ* exopolysaccharide production by lactic acid bacteria on the rheological properties and the microstructure of set and stirred yoghurts

Le but de ce dernier chapitre était d'étudier la relation structure-fonction des EPS dans des yogourts fermes et brassés avec amidon modifié. Les résultats ont démontré que les fonctionnalités des EPS associées à la charge (amélioration du module élastique) et de la chaîne rigide et linéaire ou peu ramifiée (amélioration de la viscosité apparente et rétention du sérum) demeurent autant dans les yogourts fermes que brassés. L'ajout d'amidon modifié n'a eu que peu d'effet sur les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts fermes. Par contre, un effet synergique de l'ajout d'amidon modifié et de la présence d'EPS, indépendamment de leurs caractéristiques structurales, a été observé sur la viscosité, la limitation de la synérèse et le module élastique des yogourts brassés. Finalement, les résultats ont démontré qu'il est possible d'améliorer les qualités du yogourt avec l'utilisation conjointe d'amidon modifié et d'EPS.

Résumé

Le but de ce travail était d'évaluer l'effet de l'ajout d'amidon modifié (0 et 0.75 %) et de ferments producteurs d'exopolysaccharides (EPS) avec des caractéristiques structurales différentes sur les propriétés rhéologiques/physiques (module élastique, fermeté, viscosité apparente, synérèse) et la microstructure de yogourts fermes et brassés. Quatre ferments constitués chacun d'une souche de *Streptococcus thermophilus* et d'une souche de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et produisant des EPS aux structures connues ont été utilisés: HC15/210R (témoin), HC15/291 (EPS neutre, rigide et peu ramifié), HC15/702074 (EPS neutre, flexible et hautement ramifié) et 2104/210R (EPS chargé, rigide et linéaire). La fermentation a été réalisée à 42 °C jusqu'à l'obtention du pH 4.6. Les yogourts brassés ont été lissés à 20 °C par une pompe avec une vis sans fin à 40 PSI. Les propriétés rhéologiques/physiques ont été mesurées après 2 et 8 jours d'entreposage à 4 °C. Les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts étaient principalement gouvernées par le réseau caséique. L'EPS et l'amidon modifié, semblent être piégés dans les pores du réseau caséique et ajoutent une contribution additionnelle. Le module élastique des yogourts fermes sans amidon modifié a été amélioré par la présence de l'EPS chargé du ferment 2104/210R possiblement dû aux interactions électrostatiques entre l'EPS chargé et les caséines tandis que la viscosité apparente et la rétention du sérum ont été améliorées par la présence d'EPS linéaire ou peu ramifié et rigide des ferments HC15/291 et 2104/210R. L'ajout d'amidon modifié dans des yogourts fermes a eu peu d'effet sur les propriétés rhéologiques/physiques résultantes possiblement par un gonflement non optimal du granule d'amidon, connu pour influencer leur fonctionnalité, dû au volume restreint des pores de la matrice caséique des yogourts fermes. Le lissage a eu une influence significative sur les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts en accord avec la microstructure. La fonctionnalité des EPS avec des caractéristiques structurales spécifiques demeure même après le lissage. Un effet synergique de l'ajout d'amidon modifié et d'EPS aux caractéristiques structurales spécifiques a été observé possiblement dû à la séparation de phases ségrégative. Le temps d'entreposage a permis d'améliorer les propriétés rhéologiques/physiques des yogourts plus particulièrement ceux brassés.

Mots-clé: exopolysaccharide, propriétés rhéologique/physique, yogourt, amidon modifié

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of the addition of modified starch (0 and 0.75 %) and starters producing exopolysaccharides (EPS) with several structural characteristics on the rheological/physical properties (elastic modulus, firmness, apparent viscosity, syneresis) and the microstructure of set and stirred yoghurts. Four starters constituted of one strain of *Streptococcus thermophilus* and one strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: HC15/210R (control), HC15/291 (neutral, stiff and few branched EPS), HC15/702074 (neutral, flexible and highly branched EPS) and 2104/210R (anionic, stiff and linear EPS). Fermentation was carried out at 42 °C until pH 4.6 was reached. Stirred yoghurt was smoothed at 20 °C with a screw pump at 40 PSI. The rheological/physical properties were measured after 2 and 8 days of storage at 4 °C. The rheological/physical properties of yoghurt were mainly driven by the casein network) where the presence of EPS with specific structural characteristics and modified starch, probably located in the pores of the casein network, added an additional contribution. The elastic modulus of set yoghurt without modified starch was more influenced by the presence of linear, stiff and anionic EPS from 2104/210R starter possibly due to electrostatic interactions with caseins despites of stiff and linear or few branched EPS from HC15/291 and 2104/210R starters was related to viscosity improvement. The addition of modified starch had few effects on the rheological/physical properties of set yoghurt probably due to non-optimal swelling of starch granules, which is related to its functionality, caused by the limited space available in the pores of the casein network of set yoghurt. The rheological/physical properties of yoghurt were significantly affected by the smoothing process as confirmed the visualization of the microstructure. Although smoothing process, the functionality of EPS with specific structural characteristics still remained. Synergistic effect between modified starch addition and the presence of EPS with specific structural characteristics on the rheological/physical properties of stirred yoghurt observed was probably due to segregative phase separation. Improvement of rheological/physical properties of yoghurt during the storage period was more pronounced in stirred yoghurt.

Key words: exopolysaccharide, rheological/physical properties, yoghurt, modified starch

5.1 Introduction

In Canada, stabilizer agents such as modified starch are often used in yoghurt formulation to limit technological defects such as whey separation namely called syneresis and variation of viscosity. Although the addition of stabilizer agents, technological defects still occur. In terms of constant improvement of food quality, it is important to improve technology or even to develop new strategy. A new way to stabilize the rheological properties of yoghurt is the combination of modified starch and exopolysaccharides (EPS) produced *in situ* by the starters used for yoghurt manufacture: *Streptococcus thermophilus* and/or *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, as explained in chapter 4. One of the advantages of the EPS is that they are naturally produced during the fermentation process. The combination of modified starch and starters producing EPS could be beneficial to the Canadian dairy industry because of starters producing EPS could play double functions: be involved in the casein network formation responsible to yoghurt texture through fermentation and to add functionality due to the capacity of EPS to improve whey retention and modulate viscosity. The ability of EPS to modulate rheological properties of yoghurt is not related to their concentration but rather to their structural characteristics such as charge, molecular weight, composition of monomers, degree of branching and stiffness of backbone as observed in chapters 2 and 3 and by other authors (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Petry *et al.*, 2003; Tuinier *et al.*, 2001; Faber *et al.*, 1998). To our knowledge, the impact of modified starch and starters producing EPS on rheological and physical properties of yoghurt has never been studied.

Previous studies have underlined the importance of structural characteristics of EPS on their functionality in a dairy model system especially the charge, the stiffness and the ramification on EPS backbone (Chapters 2 and 3). The impact of modified starch concentration in combination to starters producing EPS with several known structure in a dairy model system has been firstly studied (Chapter 4). Results have shown that modified starch addition had no effect on gel stiffness and apparent viscosity of dairy model system irrespective of the concentration added. The gel stiffness was rather influenced by the

presence of anionic EPS due to possible electrostatic interactions with caseins which strengthening the casein network. On the other hand, viscosity was improved by the use of EPS with stiff and linear or low degree of branching on their backbone. Adding modified starch had rather a positive effect on the reduction of syneresis in addition to specific structural characteristics of EPS. Finally, these results underline the importance of the structural characteristics of EPS on their functionality in presence of modified starch in a dairy model system simulating yoghurt.

In order to mimic industrial conditions, it is important to confirm results obtained in laboratory scale in yoghurt made at pilot scale. Few authors have studied the impact of stirring (with a spoon) on the microstructure of fermented milk with EPS and without stabilizer agents (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a; Hassan *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2002a). Hassan and co-workers (2002a) have observed that stirring fermented milk did not mix EPS with protein but favored local concentration of EPS. As the EPS structure was unknown, no structure-function can be established. Girard and Shaffer-Lequart (2007a) have shown that mixing fermented milk with a spoon led to homogenous casein network for anionic EPS as compared to neutral EPS. They attributed this effect to electrostatic interactions between casein and anionic EPS. On the other hand, the effect of industrial stirring on the resulting rheological properties of yoghurt fermented with starters producing EPS with well-known structures has never been studied.

The objective of the present work was to study the effect of modified starch addition and starters producing *in situ* EPS with several known structural characteristics (charge, degree of branching, stiffness) on the rheological/physical properties (apparent viscosity, syneresis, elastic modulus, firmness) and the microstructure of set and stirred low fat yoghurts made at pilot scale. The effect of storage period (8 days at 4 °C) was also studied.

5.2 Material and Methods

5.2.1 Materials

Pasteurized skim milk (Natre, St-Laurent, Québec, Canada), whey protein isolate (82 % whey proteins, 98 % dry matter, Davisco Foods International, MN, USA), skim milk powder (low heat, spray drying process, 29 % casein, 5.4 % whey proteins, 98 % dry matter, René Rivet Inc., Terrebonne, Québec, Canada), lactose (98 % sugar, Saputo Dairy products, St-Léonard, Québec, Canada) and modified starch (87 % total carbohydrates, 91 % dry matter, Thermtex, National Starch, Boucherville, Québec, Canada) were used to make yoghurt with a constant composition of 14 % dry matter, 4.0 % total protein, 3 % casein, 0.75 % whey proteins with the addition or not of 0.75 % modified starches. At each production, the composition of pasteurized skim milk was performed by an infrared analyzer using Fourier transform infrared: FT-120 (Foss North America, MN, USA).

5.2.2 Bacterial strain and starter preparation

Four starters constituted of one strain of *Streptococcus thermophilus* and one strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were used: control (HC15/210R), HC15/291 (neutral, stiff and branched EPS), HC15/702074 (neutral, flexible and branched EPS) and 2104 (anionic, stiff and linear EPS)/210R. For complete EPS structure, please see chapter 2. Stock cultures of single strain were stored at -80 °C in 20 % (wt/wt) reconstituted skim milk (RSM) from a skim milk powder rehydrated in distilled water supplemented with 5 % (wt/wt) sucrose (Fisher scientific, Nepean, Ontario, Canada) and 0.35 % (wt/wt) ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Toronto, Ontario, Canada) and sterilized at 110 °C for 10 min. A 12 % (wt/wt) reconstituted skim milk (RSM) was prepared by dissolving a skim milk powder in distilled water and stirred during 2 h at room temperature then, sterilized at 110 °C for 10 min in autoclave as media culture. The sterilized RSM was stored at 4 °C until use. Active strains were prepared by the inoculation of RSM (100 mL) at 10 % (vol/wt) with stock culture and incubated for 16 h at 37 °C. Strains were subcultivated at 3% (vol/wt) for 3 h for 702074, 3h30 for 210R, 4h for HC15, 4h30 for 291 and 6 h for 2104 at 42 °C in RSM previously heat treated (90 °C/1 min) with automatic control water bath (Laboratorium

Wiesby GmbH&Co, Niebüll/W., Germany). The volume of RSM used was different for each active strain depending on the final population: 1.7 kg for HC15, 1.5 kg for 2104, 1.1 kg for 210R, 800 g for 291 and 700 g for 702074. The fermentation was made into an incubator (CS-20, Coldstream Drive, Jordan Valley, IL, USA) until pH reached 5.2 for streptococci and 4.8 for lactobacilli then, the active strains were rapidly cooled at 4 °C with the immersion in ice. Population of more than 1×10^8 CFU·mL⁻¹ was obtained for all strains. For 2104 strain, another 3 % (vol/vol) subcultivation (42 °C for 6 h) was necessarily to reach a population of 1×10^8 CFU·mL⁻¹. All active strains were stored overnight at 4 °C before use. The day of the production, the active strains were mixed together to form the starter combinations of one streptococci to one lactobacilli. The quantity added depends on the population of each active strain to reach an initial population of 2×10^7 CFU/mL and a ratio of 50:50 except for 2104/210R a ratio of 45 is necessary to reach the same acidification profile than the other combination. Each starter was completed at a final weight of 1.4 kg with RSM to be incorporated into the recipe. Populations of activate strains, during yoghurt production and during storage were enumerated on M17 for streptococci (Oxoid, VWR, Montréal, Québec, Canada) and acidified MRS for lactobacilli (Difco, VWR, Montréal, Québec, Canada).

5.2.3 Manufacture of yoghurt

Set and stirred yoghurts were made at pilot scale. Eight different yoghurts were made: two levels of modified starch (0 and 0.75 %) and four starters. Set and stirred yoghurts were made with the same recipe. For each production, one recipe (120 kg) with or without modified starch was prepared. Solid ingredients were added to liquid with centrifuged pump (25 000 L/H) and mixed for 5 min. Recipe was homogenized at 55 °C into two stages: one at 500 PSI and the latter at 1500 PSI (homogenizer, Alpha Laval) following by a heat treatment of 90 °C/1 min (plate pasteurizer, Alpha Laval). Recipe was rapidly cooled at 42 °C after the heat treatment process. Four parts (18.6 kg) of the recipe were rapidly transferred into 25 kg stainless container and was inoculated with the appropriated starters to a final volume of 1.4 kg. For set yoghurt, after inoculation, 10 kg of recipe was

transferred into 175 mL plastic cup and incubated at 42 °C in an incubator (CS-20, Coldstream Drive, Jordan Valley, IL, USA). For stirred yoghurt, the left recipe was fermented directly in the 25 kg stainless container at 42 °C in the incubator. Fermentation was stopped when the pH reached 4.6 ± 0.05 . When the targeted pH was reached, for set yoghurt, the plastic cups were rapidly transferred into a chamber at 4 °C. For stirred yoghurt, set yoghurt into the 25 kg stainless container was gently stirred 10 times with a stainless tool and then, smoothed at 40 PSI with a screw pump (Allweiller AG 0-100 L/h, Netzch, Germany) and at 20 ± 2 °C by the use of mobile plate exchanger system (Type P30A, α Alpha Laval). Stirred yoghurt was also filled in 175 mL plastic cups and then, rapidly transferred into the chamber at 4 °C until use. The evolution of pH, titratable acidity and rheological/physical properties was measured after 2 and 8 days of storage at 4 °C.

5.2.4 Analytical methods

Composition of yoghurt was measured as described in chapter 3. Titratable acidity expressed as % lactic acid and pH were measured by the official methods (AOAC, 2000).

5.2.5 Rheological and physical properties of yoghurt

Viscosity, firmness and syneresis were measured as described in chapter 2. Elastic (G') and viscous (G'') modulus were measured at 0.1 Pa (stirred yoghurt) and 1 Pa (set yoghurt), in the linear region of viscoelasticity of each yoghurt, as function of frequency range of 0.1 to 10 Hz with a dynamic stress rheometer using a bob and a cup (Rheometric, Model SR-2000, TA Instrument, New Castle, DE, USA). All measurements were performed at 4°C after 2 and 8 days of storage. The viscosity was also measured after 1 day of storage.

5.2.6 Microscopy

Set and stirred yoghurts were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) operating in fluorescence mode with He/Ne laser (Nikon TE-2000E Eclipse, Nikon Canada, Mississauga, Ontario). After inoculation, samples of set yoghurt (10 mL) were transferred in the 50 mL sterile tube and stained with 30 μ L acridine orange (protein dye) at

0.2 % (wt/wt) (Sigma-Aldrich, Toronto, Ontario, Canada) according to the method of Lee and Lucey (2004). Samples were gently mixed by inversion 5 times. Samples (20 μ L) were transferred in slides with a cavity (microslide single depression, no.CA48324-001, VWR, Montréal, Québec, Canada), the cover slip was fixed with Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, MI, USA) and the slides were put in petri dishes covered with parafilm to avoid dehydration. All samples were incubated at 42 °C in the same incubator used for the yoghurt manufacture. When the pH reached 4.6, samples were stored for 48 h at 4 °C. For stirred yoghurt, after the smoothing process, samples (10 mL) were transferred in the 50 mL sterile tube and were stained and mixed as described above. Samples (20 μ L) were transferred in the slide with a cavity and treated exactly as explained for set yoghurt. Samples of stirred yoghurt were then, stored at 4 °C for 48 h before visualization. Samples were observed at an excitation wavelength of 488 nm with a water immersion 60 objective lens (numerical aperture = 1.4) at a depth of 10 to 20 μ m.

5.2.7 Statistical methods

A split-split plot was applied to evaluate the effect of modified starch, starters producing EPS and types of yoghurt (set or stirred) on the composition, the microbiological population, the pH and the titratable acidity of yoghurt. A split-split-split-plot design was used to study the evolution of the microbiological population, pH, titratable acidity and rheological/physical properties of set and stirred yoghurts made with or without modified starches and fermented with starters producing EPS with different structures during the storage. Starters producing EPS with different structures, types of yoghurt and time factors were respectively the sub-plot, the sub-sub-plot and the sub-sub-sub-plot. Significant differences were tested at $P < 0.05$. Statistical analysis was carried out with the general linear models procedure of SAS (Version 9.1.3, 2003, Cary, NC, USA). Experiments were performed in triplicate.

5.3 Results

5.3.1 Composition and fermentation

Composition among yoghurt was not significantly different: 3.02 ± 0.05 % caseins, 0.797 ± 0.003 % whey proteins, 3.95 ± 0.07 % total protein and 13.77 ± 0.07 % dry matter. The initial pH and titratable acidity of all blends after the inoculation were not significantly different: pH 6.50 ± 0.04 and 0.20 ± 0.002 % lactic acid, respectively. The initial population was $3.1 \pm 0.1 \times 10^7$ CFU/mL with streptococci to lactobacilli ratio of 57 ± 3 for all starters except for 2104/210R starter which the initial population and streptococci to lactobacilli ratio were $1.88 \pm 0.09 \times 10^7$ CFU/mL and 44 ± 3 , respectively. At the end of the fermentation, all types of yoghurt had a final pH of 4.54 ± 0.03 and lactic acid content was of 0.52 ± 0.2 % after 181 ± 1 min of fermentation. Microbiological population was not significantly different among yoghurt at the end of the fermentation: LOG 8.69 ± 0.06 CFU/mL for streptococci and LOG 8.51 ± 0.03 CFU/mL for lactobacilli.

5.3.2 Evolution of pH, lactic acid and bacterial population during storage

The evolution of pH during 8 days of storage at 4 °C was significantly influenced by the single factors: starters, types of yoghurt and storage period (Fig. 5.1). Three double significant interactions (modified starch addition and types of yoghurt, modified starch addition and storage period, starters and types of yoghurt) were also observed for the evolution of pH. Triple or quadruple interaction was not significant. Set yoghurt without modified starch had similar pH values among starters and storage period, except for HC15/291 starter which had a higher pH value. Set yoghurt with modified starch and fermented with control and HC15/291 starters had significant higher pH values than the other starters irrespective of storage period. For all starters, pH values decreased significantly during the storage period for set yoghurt with modified starch. For stirred yoghurt without modified starch, the pH values were not significantly affected by storage period and the type of starters. Stirred yoghurt with modified starch and with HC15/291 and HC15/702074 starters had higher pH values at day 2 but at day 8, pH values decreased significantly for these starters to reach similar values than control and 2104/210R starters.

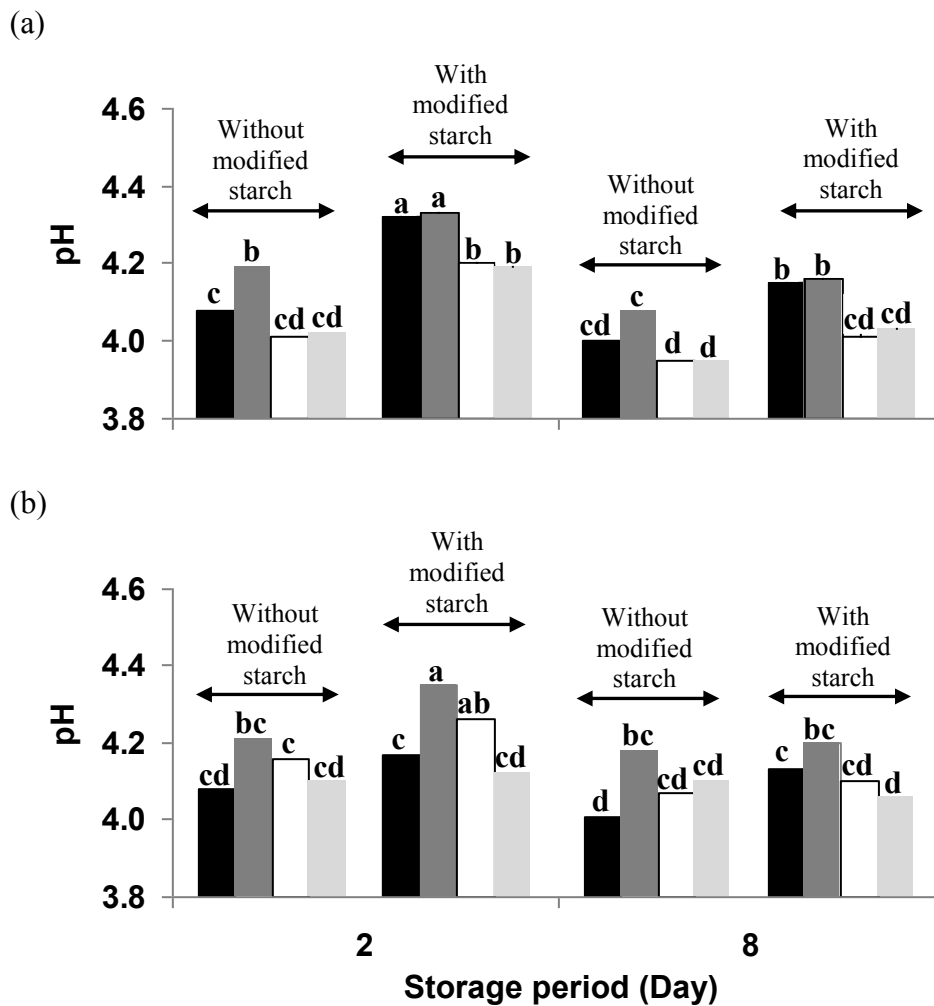


Figure 5-1: Evolution of pH of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of storage period.

Lactic acid production was significantly affected by starters and storage period (Fig. 5.2). Significant interactions between starters and types of yoghurt, between modified starch addition and storage period and between modified starch addition, starters and types of yoghurt were observed. Among starters, lactic acid production was significantly lower for set yoghurt fermented with HC15/291 starters. During storage period, lactic acid production increased significantly for set yoghurt without modified starch with HC15/702074 and 2104/210R starters. Lactic acid production for set yoghurt with modified starch fermented with HC15/291 starter increased also significantly during storage period. Lactic acid production was not significantly different among starters, modified starch addition and storage period for stirred yoghurt, except for 2104/210R starter that lactic acid production significantly increased after 8 days of storage.

Streptococci population was significantly affected by the type of starters but did not vary significantly during storage period (Fig. 5.3). No interaction between starters, type of yoghurt or storage period was significant. Control and 2104/210R starters had significant lower streptococci population. The evolution of lactobacilli during storage period is presented in Figure 5.4. Lactobacilli population was significantly affected by starters, types of yoghurt and storage period. The interactions between modified starch addition and types of yoghurt, between starters and types of yoghurt and between modified starch addition and storage period were also significant. Set and stirred yoghurts fermented with control and 2104/210R starters had the significant higher lactobacilli population than those with the other starters. Set yoghurt had significant higher lactobacilli population ($\text{LOG } 8.59 \pm 0.01 \text{ CFU/mL}$) as compared to stirred yoghurt ($\text{LOG } 8.53 \pm 0.01 \text{ CFU/mL}$). During storage period, the lactobacilli population significantly decreased from $\text{LOG } 8.58$ to $\text{LOG } 8.53 \pm 0.01 \text{ CFU/mL}$. Lactobacilli population did not vary significantly during storage period for set and stirred yoghurts fermented with control and 2104/210R starters irrespective of modified starch addition. During storage period, lactobacilli population significantly decreased for set yoghurt fermented with HC15/291 and HC15/702074 starters irrespective of modified starch addition as compared to stirred yoghurt.

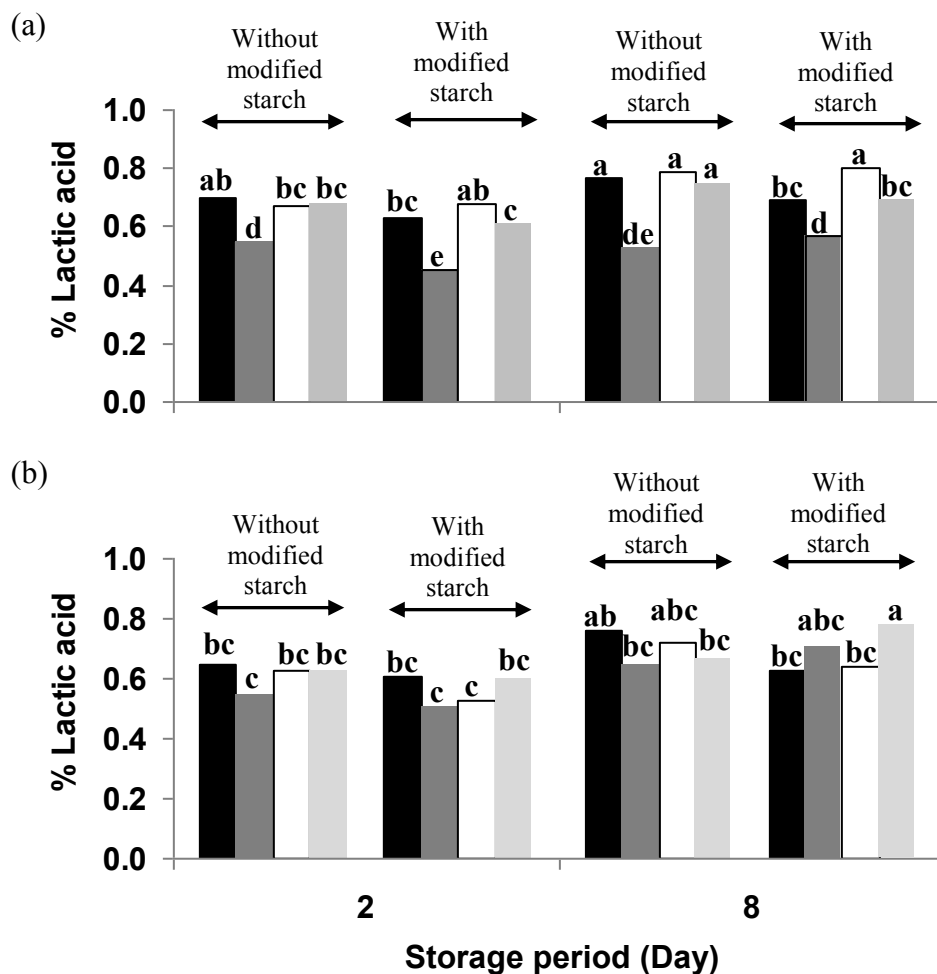


Figure 5-2: Evolution of % lactic acid of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of storage period.

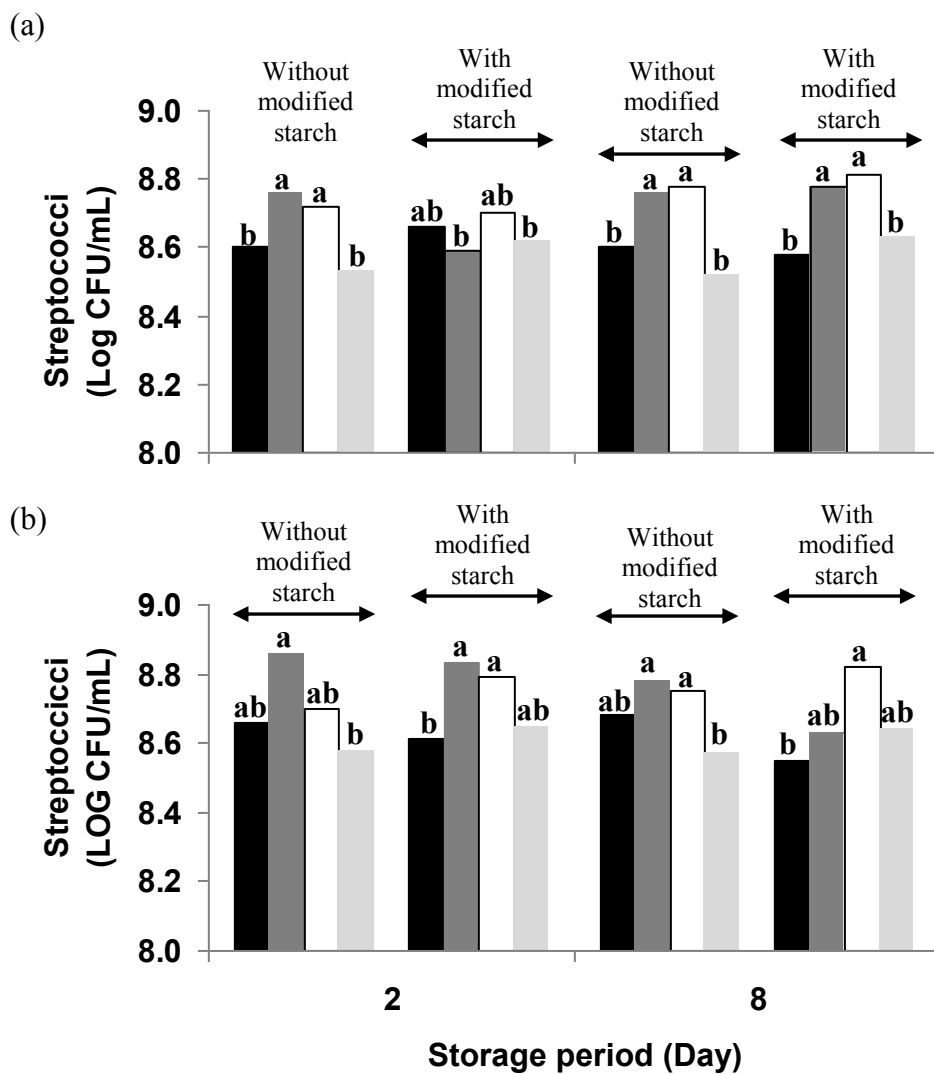


Figure 5-3: Evolution of streptococci population of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of storage period.

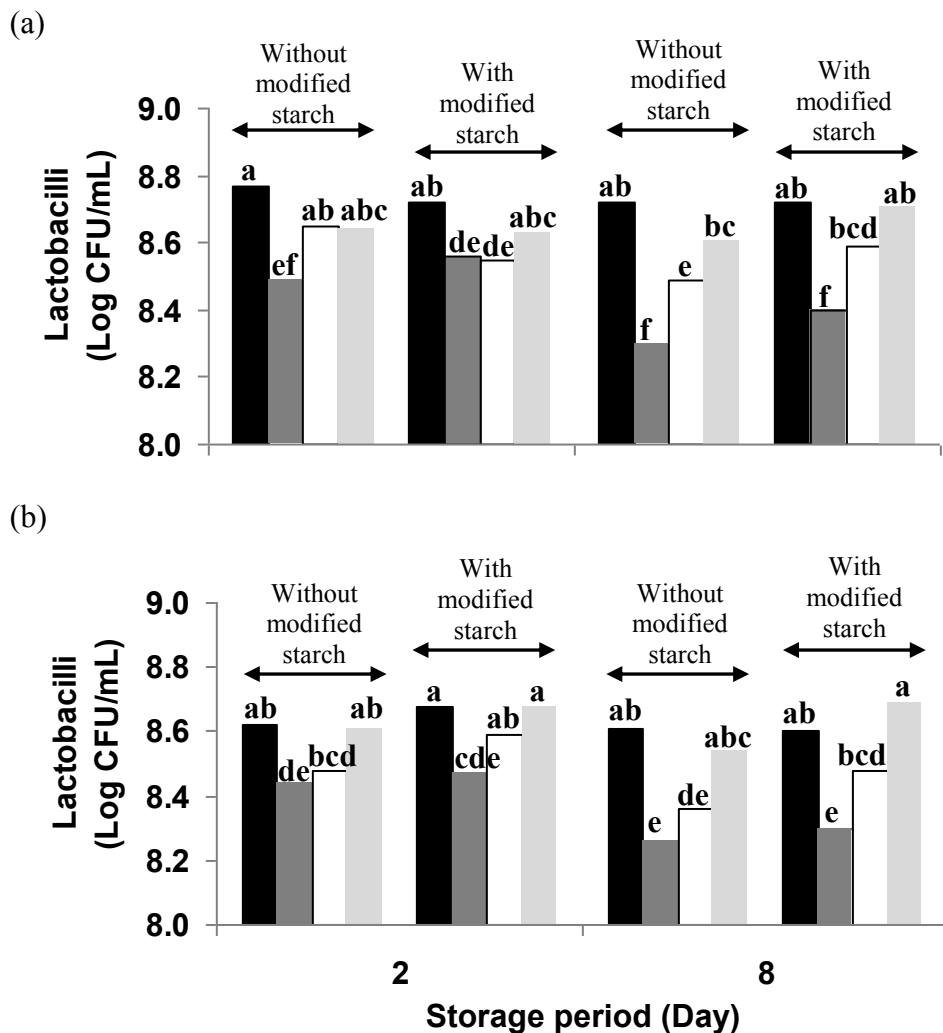


Figure 5-4: Evolution of lactobacilli population of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of storage period at 4 °C.

5.3.3 Rheological and physical properties of yoghurt during storage

5.3.3.1 Apparent viscosities

Apparent viscosities of set and stirred yoghurts are presented in Figure 5.5. A significant quadruple interaction between type of starters, modified starch addition, types of yoghurt and storage period was observed. Apparent viscosity values of set yoghurt fermented with control, HC15/702074 and 2104/210R starters were not significantly affected by the addition of modified starch. On the other hand, adding modified starch significantly improved the apparent viscosity of set yoghurt fermented with HC15/291 starter. Apparent viscosity values did not vary significantly during storage period for set yoghurt fermented with all starters. Among starters, apparent viscosities were significantly higher for HC15/291 and 2104/210R starters as compared to control and HC15/702074 starters.

Smoothing yoghurt led to different viscosity profile among starters, modified starch addition and storage period as compared to set yoghurt. Stirred yoghurt had significant lower apparent viscosity (2.88 ± 0.06 Pa·s) than set yoghurt (4.67 ± 0.06 Pa·s). The addition of modified starch led to an increase of apparent viscosity values for stirred yoghurt. Apparent viscosities of stirred yoghurt fermented with control, HC15/702074 and 2104/210R starters did not vary significantly or slightly during storage period irrespective of modified starch addition. Improvement of apparent viscosity values were measured for stirred yoghurt fermented with HC15/291 starter regardless of modified starch addition during storage period. As observed in set yoghurt, stirred yoghurt fermented with HC15/291 starter had the significant highest apparent viscosity values.

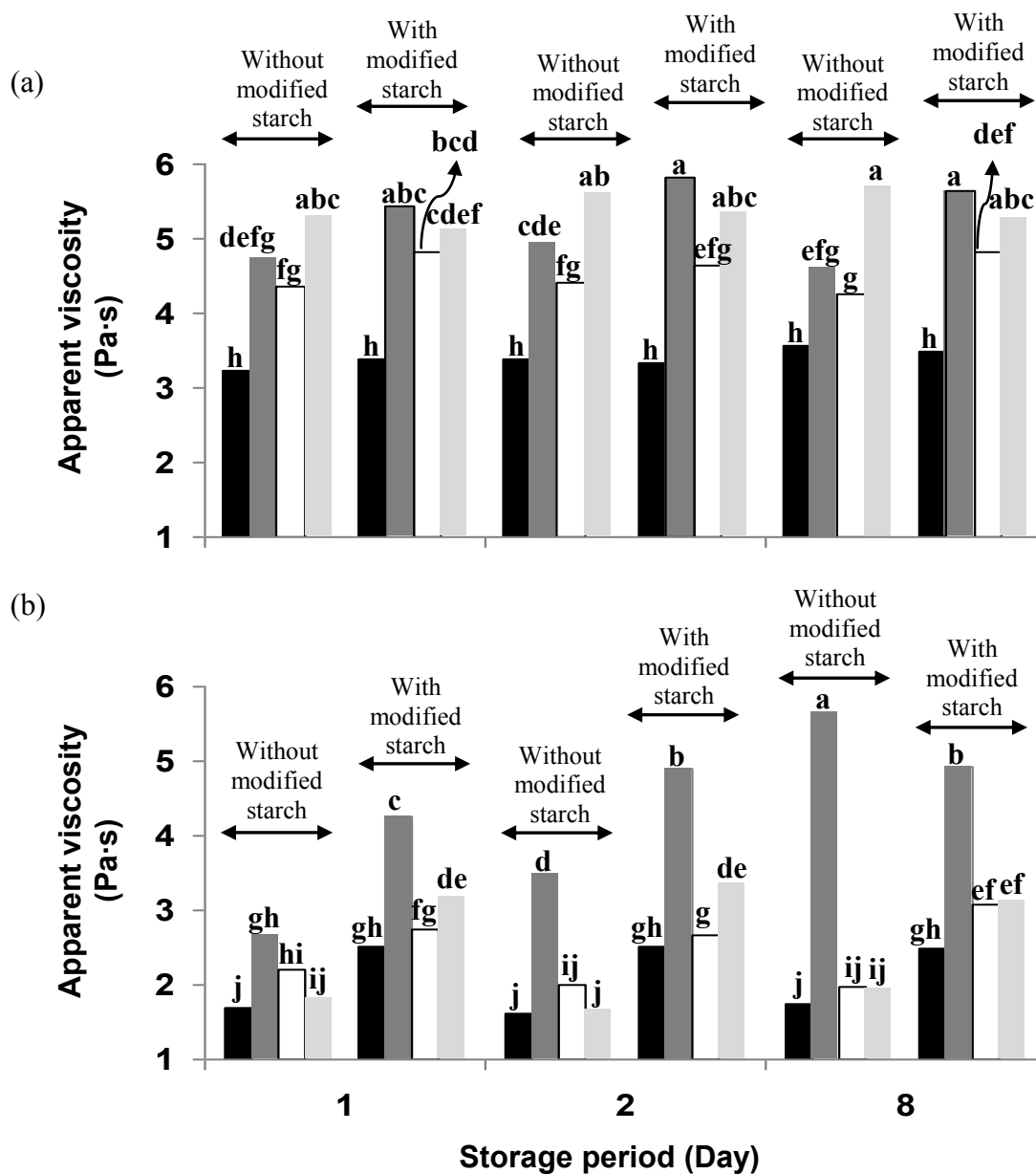


Figure 5-5: Apparent viscosity at 10 s^{-1} of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of storage period at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.3.2 Firmness

Firmness of set and stirred yoghurts was significantly affected by starters, types of yoghurt and storage period (Fig. 5.6). Significant interactions between modified starch addition and starters, between modified starch addition and types of yoghurt, between starters and types of yoghurt, between types of yoghurt and period storage and between modified starch addition, starter and types of yoghurt was observed. Set yoghurt fermented with HC15/291 and HC15/702074 starters had the significant highest firmness values than those with the other starters regardless of modified starch addition and storage period. Firmness increased significantly during storage period for all conditions, except for control and 2104/210R starters without modified starch and HC15/291 starter with modified starch.

Smoothing process had a significant impact on firmness: stirred yoghurt had lower value ($435 \pm 35 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$) than set yoghurt ($1964 \pm 35 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$). In addition, fewer differences were observed among starters as compared to set yoghurt. Stirred yoghurt had similar firmness values irrespective of starters, modified starch addition and storage period, except for yoghurt with modified starch and fermented with 2104/210R starter.

5.3.3.3 Elastic modulus

Elastic modulus as functions of frequency of set and stirred yoghurts is presented in Figure 5.7. Linear relation between G' and frequencies was observed. Viscous modulus (G'') was not presented and had similar profile upon frequencies to G' values. However, it is important to mention that G'' values were lower for all conditions than G' values indicating the elastic or solid-like character of gels. Elastic modulus was significantly affected by starters, types of yoghurt and storage period. The interactions between modified starch addition and starters, between modified starch addition and types of yoghurt and between starters and types of yoghurt were also significant.

Smoothing process had a significant effect on elastic modulus. Stirred yoghurt had significant lower elastic modulus at all frequencies as compared to set yoghurt irrespective of starters, modified starch addition and storage period. G' values were significantly higher for set yoghurt fermented with 2104/210R starter following by HC15/702074 starter. Adding modified starch to set yoghurt led also to significant higher G' values for both starters. Set yoghurt with modified starch and fermented with HC15/702074 starter had similar G' values than set yoghurt without modified starch and fermented with 2104/210R starter. Set yoghurt without modified starch and fermented with HC15/291 starter had the significant lower G' value at day 2. The addition of modified starch to set yoghurt fermented with HC15/291 starter led to similar G' values than those with control starter with and without modified starch addition. After 8 days of storage, different G' profiles were observed as compared to 2 days of storage. The higher G' values were obtained with set yoghurt with modified starch and fermented with HC15/702074 starter following by set yoghurt with modified starch and fermented with 2104/210R starter. Without modified starch, set yogurts fermented with HC15/702074 and 2104/210R starters had similar G' values but were significant lower than those with modified starch. Set yoghurt with and without modified starch addition and fermented with control and HC15/291 starters had the lowest G' values especially for set yoghurt with modified starch and fermented with HC15/291 starter had the significant lower G' values. The addition of modified starch had no significant effect on set yoghurt fermented with control starter after 8 days of storage. Elastic modulus values, at days 2 and 8, were significantly higher for stirred yoghurt with modified starch and fermented with 2104/210R starter following by HC15/702074 starter whereas the lowest values were measured with control and HC15/291 starters but the G' values were not significantly different. For all starters, modified starch addition to stirred yoghurt led to significant higher G' values than those without modified starch. Stirred yoghurt without modified starch had similar G' values for all starters and during the storage period.

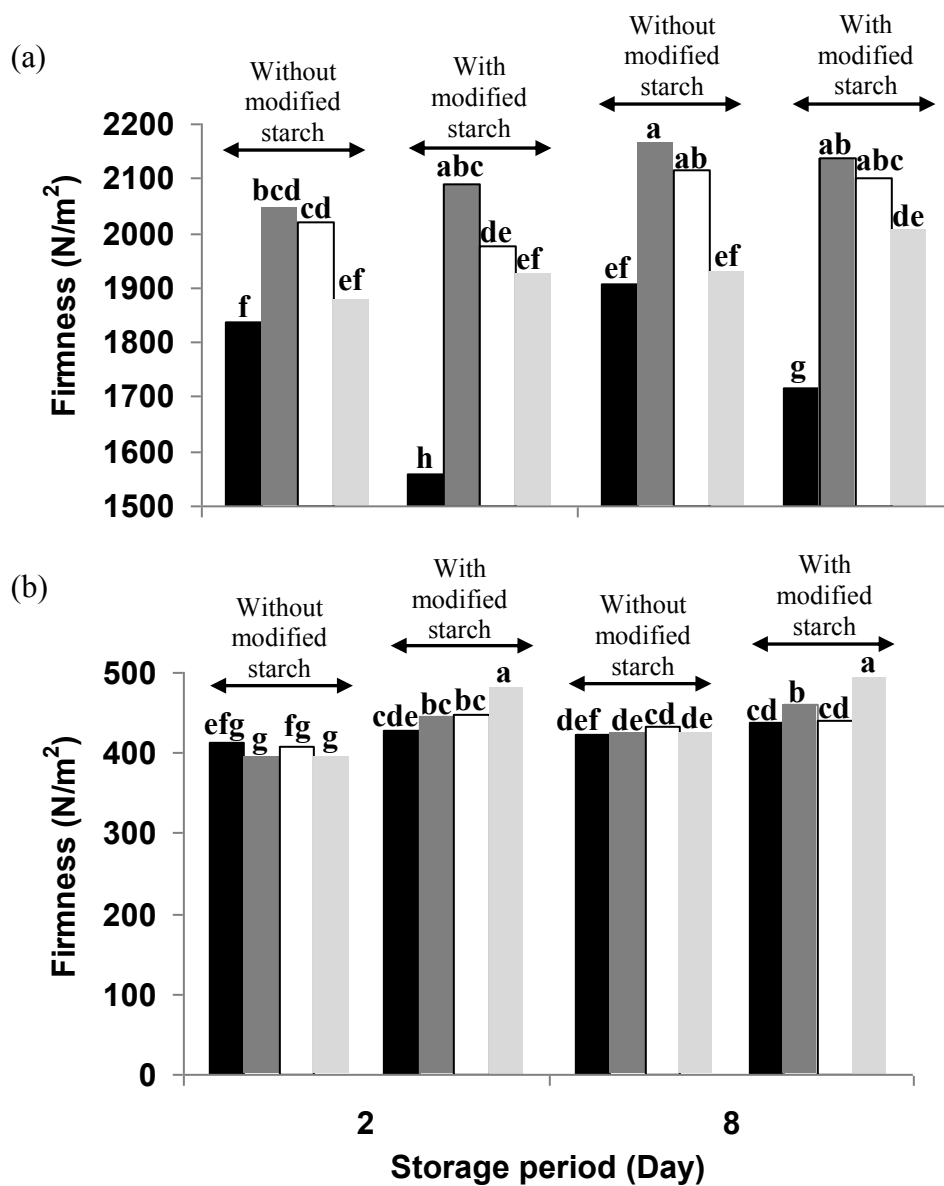
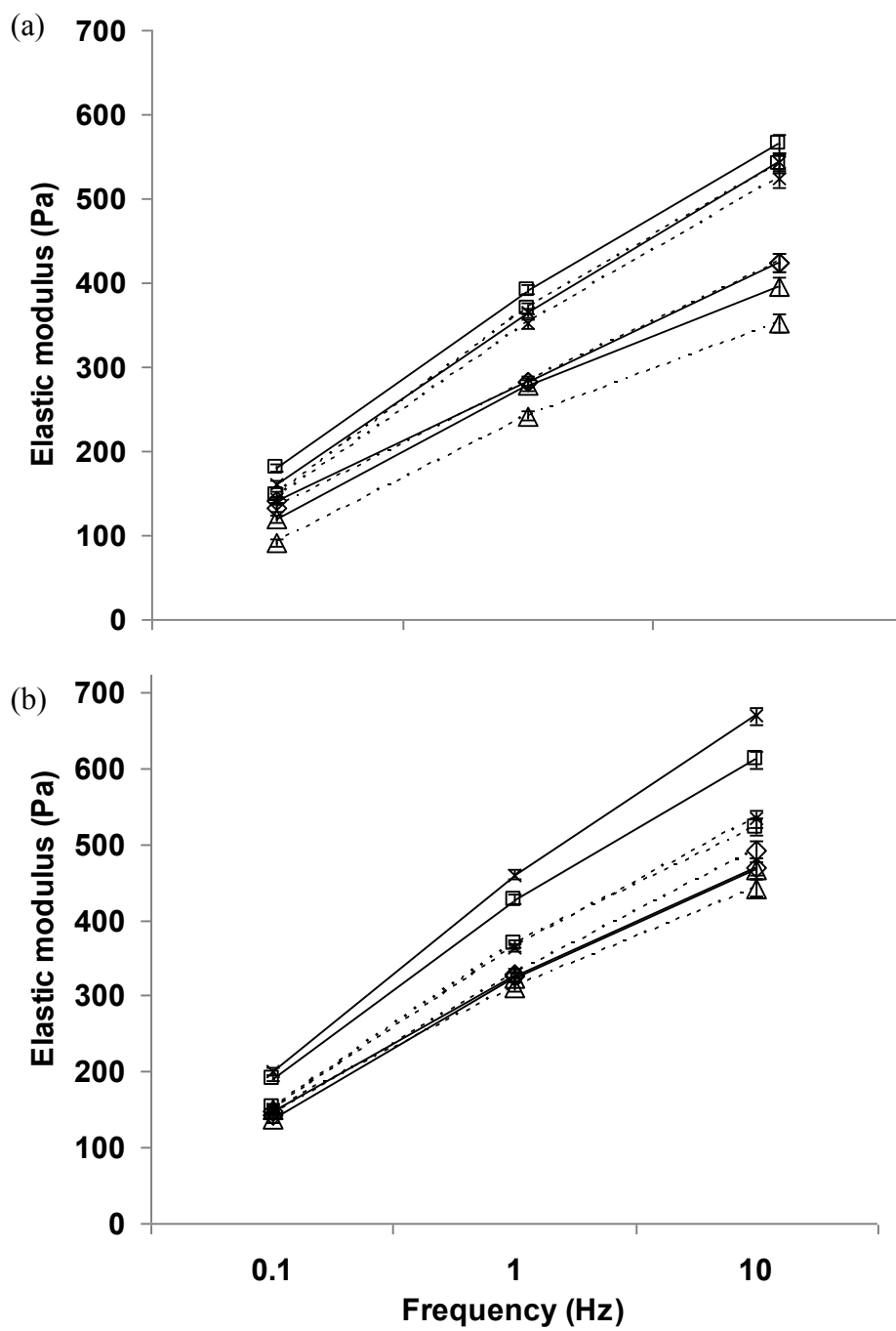


Figure 5-6: Firmness of set (a) and stirred (b) yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of storage period at 4 °C.



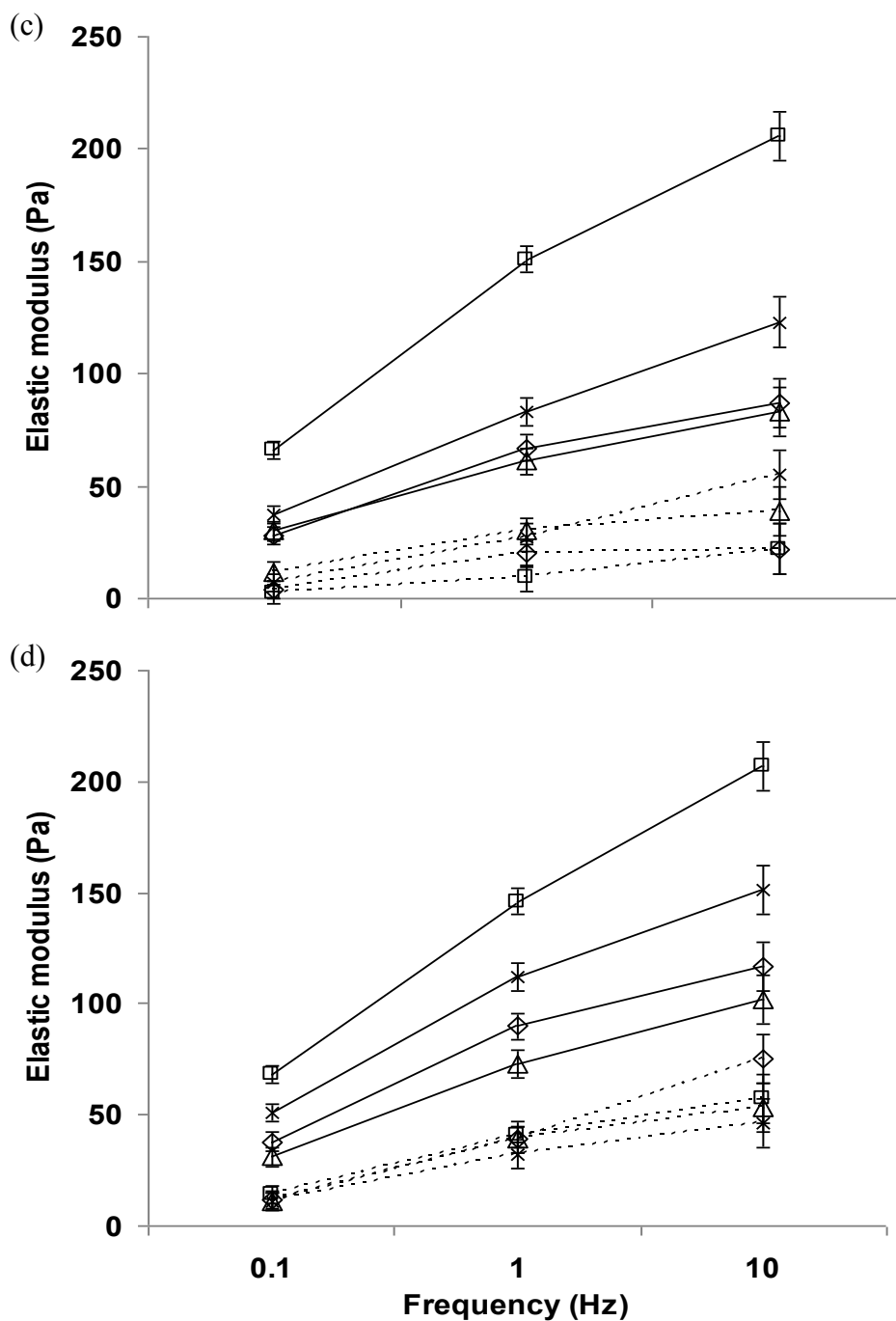


Figure 5-7: Elastic modulus as functions of frequency of set (a-b) and stirred (c-d) yoghurts with 0 (dotted line) and 0.75 (plain line) % modified starch and fermented with starters producing EPS: control (\diamond), HC15/291 (Δ), HC15/702074 (\times) and 2104/210R (\square) after 2 (a and c) and 8 (b and d) days of storage at 4 °C. Each data point is the mean of three experiments. Bars indicate standard error of the mean.

5.3.3.4 Syneresis

Syneresis of set and stirred yoghurts was significantly affected by starters, modified starch addition and types of yoghurt (Fig. 5.8). Significant interactions between modified starch addition and types of yoghurt and between starters and types of yoghurt were also observed. Storage period had no significant effect on syneresis. Stirred yoghurt had significantly higher syneresis value (16 ± 1 %) as compared to set yoghurt (11 ± 1 %). Adding modified starch led to a significant decrease of syneresis to 18 to 9 ± 0.5 %. Set yoghurt fermented with HC15/291 starter had significant lower syneresis values irrespective of modified starch addition. On the other hand, smoothing process had a significant effect on increasing syneresis for stirred yoghurt fermented with HC15/291 starter regardless of modified starch addition. The impact of smoothing process was also significant for yoghurt fermented with 2104/210R starter and without modified starch addition.

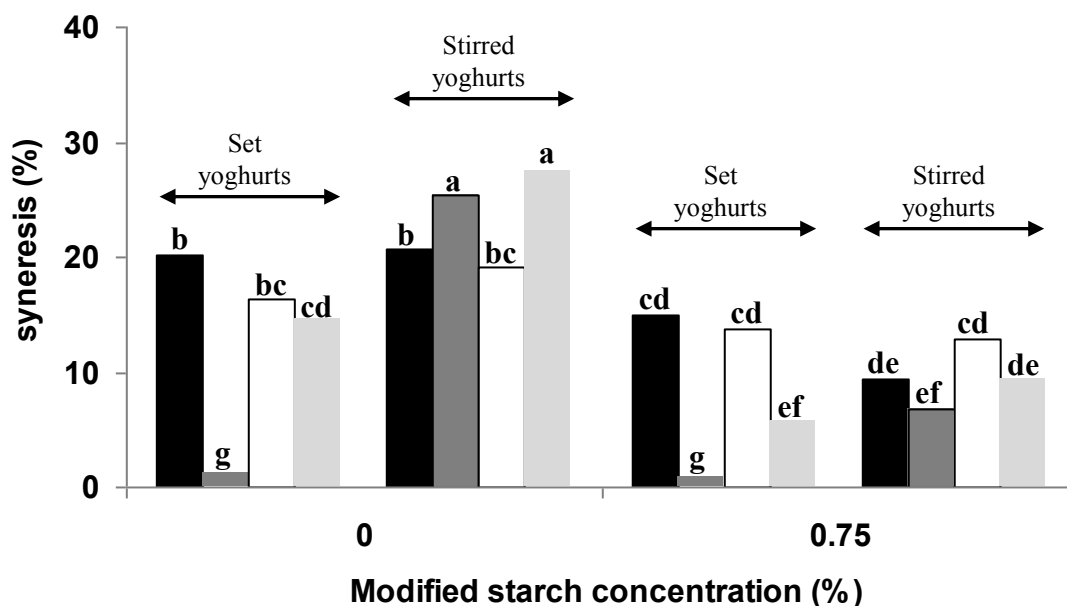


Figure 5-8: Syneresis after centrifugation at $210 \times g$ of set and stirred yoghurts fermented with starters producing EPS: control (■), HC15/291 (■), HC15/702074 (□) and 2104/210R (■) as functions of modified starch concentration. Measurements were made at 4°C .

5.3.4 Microstructure of yoghurt

Microstructure of set and stirred yoghurts observed by CLSM is presented in Figure 5.9. Among starters, different microstructures were observed for set yoghurt irrespective of modified starch addition. Set yoghurt fermented with control starter showed homogenous casein network (Fig. 5.9a) as compared to the other starters. More compact casein network (green area) and larger pores (black area) were observed with set yoghurt fermented with HC15/291 (Fig. 5.9b) and 2104/210R starters (Fig. 5.9c) than with HC15/702074 starter (Fig. 5.9d). The addition of modified starch to set yoghurt fermented with HC15/702074 and 2104/210R starters (Figs. 5.9g-h) led to a more homogenous casein network with smaller pores than those without modified starch (Figs. 5.9 c-d). The addition of modified starch led to a less compact casein network with larger pores for set yoghurt fermented with control starter (Fig. 5.9a) as compared to no addition of modified starch (Fig. 5.9c). For the HC15/291 starter, the heterogeneity of casein network remained after the addition of modified starch but the casein network was less compact (Figs. 5.9b and 5.9f). It is also important to point out that bacteria responsible to EPS production were visible in set yoghurt with and without modified starch addition especially with HC15/291 (rods) and 2104 (cocci)/210R starters. Bacteria are all located in the dark areas depleted from the casein network (green area).

Smoothing process had a significant impact on the microstructure of yoghurt irrespective of modified starch addition and the starters used. Fluffy structures with smaller pores were observed in all stirred yoghurt (Figs. 5.9i-p) as compared to compact casein network for all set yoghurt. Without modified starch, stirred yoghurt fermented with control starter had homogenous and compact casein network (Fig. 5.9i) whereas smaller pores were observed with the other starters (Figs. 5.9j-l). Modified starch addition led to larger pores with an inhomogeneous casein network for all starters used (Figs. 5.9m-p). The effect was more pronounced for HC15/291 starter (Fig. 5.9n). With the addition of modified starch, less contact point and larger pores were observed for stirred yoghurt fermented with control starter (Fig. 5.9m).

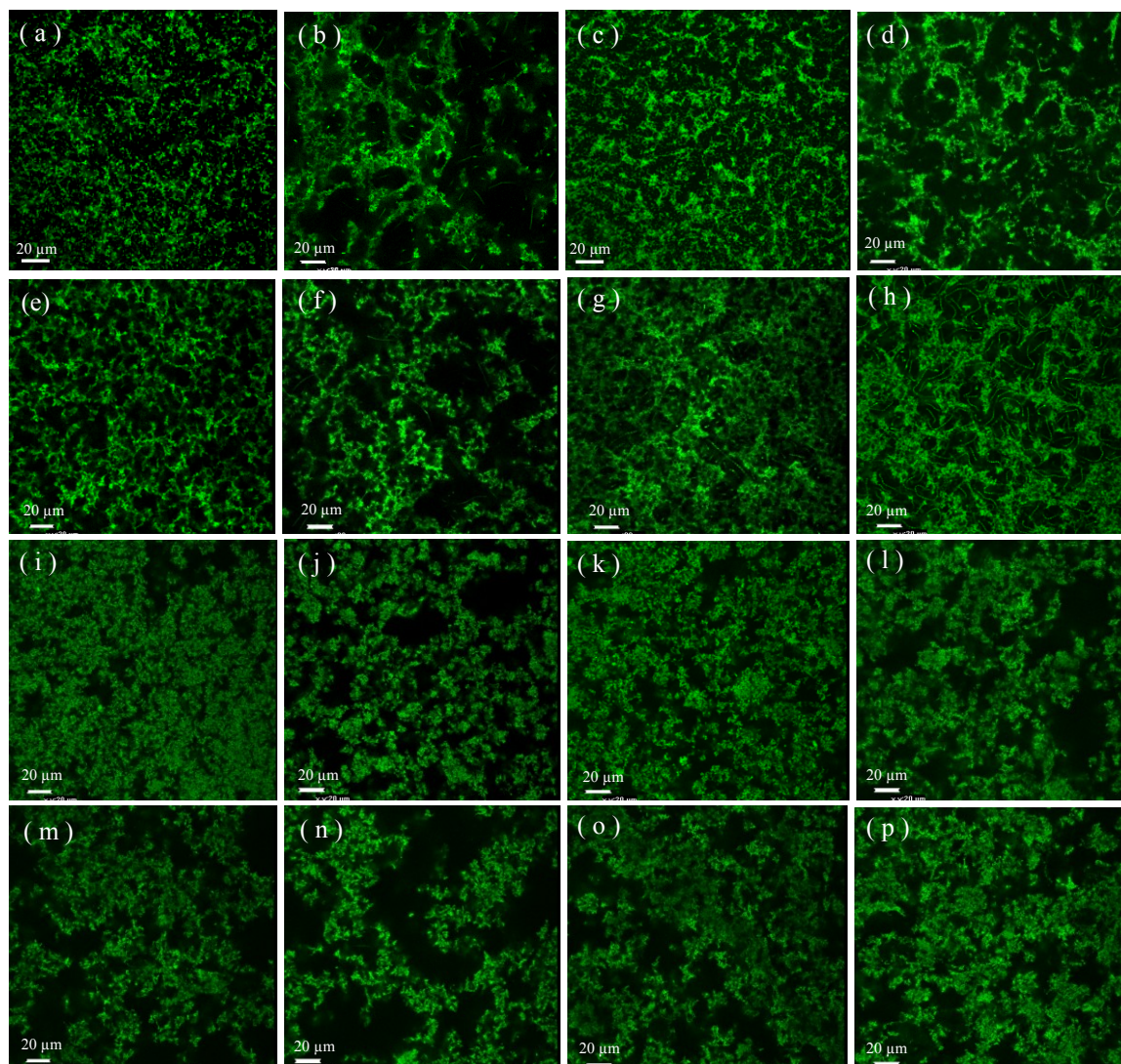


Figure 5-9: Microstructure of set (a-h) and stirred (i-p) yoghurt at 0 % (a-d and i-l) and 0.75 % (e-h and m-p) modified starch fermented with control (a, e, i, m), HC15/291 (b, f, j, n), HC15/702074 (c, g, k, o) and 2104/210R (d, h, l, p) starters producing EPS with different structural characteristics.

5.4 Discussion

The aim of this work was to study the impact of the combination of starters producing EPS with several known structures and modified starch on the rheological/physical properties and the microstructure of set and stirred yoghurts made at pilot scale. The rheological and physical properties of set and stirred yoghurts were influenced by the presence of EPS and modified starch addition as well as the technological process (smoothing process, storage period). The presence of EPS and modified starch in set and stirred yoghurts caused different degree of phase separation possibly due to thermodynamic incompatibility between the different compounds as observed in fermented milk with modified starch (Oh *et al.*, 2007) and in solution with EPS and with casein (Tuinier *et al.*, 1999) or whey protein (Tuinier *et al.*, 2000). The major phase was constituted of the casein network (green areas). EPS and modified starch seemed to be both located in the pores (black areas) of the casein network as observed in fermented milk with starch acting as active fillers (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2003; Kalab & Emmons, 1975) or with EPS with known structures (Girard & Schaffer-Lequart, 2007a). Although it was impossible to confirm this hypothesis because of modified starch and EPS were not stained, our results tended to support it.

5.4.1 EPS structure-function relationship in set yoghurt

The rheological (apparent viscosity, firmness, elastic modulus) and physical (syneresis) properties of set yoghurt were mainly governed by the casein network and the presence of EPS, which make an additional contribution to the rheological/physical properties due to specific structural characteristics. The addition of modified starch had few effects on the rheological/physical properties of set yoghurt.

The presence of the anionic, linear and stiff EPS from 2104/210R starter had a significant effect on the improvement of apparent viscosity and elastic modulus of set yoghurt without modified starch compared to the control starter and the other starters as previously observed in fermented milk (Chapter 2) and dairy model system (Chapters 3 and 4). The increase of apparent viscosity was attributed to the stiffness and the linearity of the EPS resulting in a larger radius of volume correlated to viscosity improvement (Whistler & BeMiller, 1997). The visualization of the microstructure was in accordance to this theory of large radius of volume effect on viscosity because of larger pores (black areas) were observed for 2104/210R starter as compared to the control starter. The EPS functionality of the 2104/210R starter on elastic modulus may be attributed to the negative charge on its backbone. This effect may be attributed to associative phase separation due to possible electrostatic interactions between EPS and casein that reinforces the casein network as observed by Turgeon and Plesca (2009). The non-contribution of the EPS from 2104/210R starter on the limitation of syneresis may be explained by electrostatic interactions between caseins and the anionic EPS that may be favored instead of hydrogen bonds causing less serum retention. Another explanation can be that casein-casein interactions might be hindered due to electrostatic interactions between caseins and the anionic EPS leading to a casein network with a lower ability to retain serum.

The presence of the EPS from HC15/291 starter had a significant positive impact on the apparent viscosity, the firmness and the limitation of syneresis as compared to the control starter. These results were in accordance to those obtained in previous works (Chapters 2 to 4). The EPS from HC15/291 and HC15/702074 starters had similar molecular weight but for the EPS from 2104/210R starter, this structural characteristic was not available in literature. The contribution of the EPS from HC15/291 starter to viscosity and whey retention as compared to the EPS from HC15/702074 starter may be due to the few branching and the stiffness of backbone which may cause a larger radius of volume in accordance to the microstructure. Larger pores (black areas) were observed in set yoghurt without modified starch and with HC15/291 starter compared to HC15/702074 starter.

As compared to the anionic EPS from 2104/210R starter, the neutral EPS from HC15/291 starter may dissolve easily in serum because it interacts less with the positive charged caseins in accordance to the literature (van den Berg *et al.*, 1995). The EPS web-like structure observed in scanning electron microscopy (Chapter 3) may also explain the functionality of this EPS and might have had an additional contribution to the properties of the continuous phase due to its own functional properties.

Firmness and elastic modulus of set yoghurt without modified starch were improved by the presence of the EPS from HC15/702074 starter. This observation was quite surprising since this EPS had no effect on these rheological properties (firmness and elastic modulus) in addition on the limitation of syneresis and the apparent viscosity of fermented milk (Chapter 2) and in dairy model system (Chapters 3 and 4) as compared to the control starter. The main difference between these previous works and this study was the time of the measurement of rheological/physical properties after the final pH of 4.6 was reached (end of the fermentation process) e.g. 2 days in this study and 16 h (Chapter 2) or 40 min (Chapters 3 and 4). Instead of the final pH values of yoghurt were controlled during the fermentation process, the evolution of pH during storage cannot be controlled and depends on the persistent metabolic activity of bacteria (Béal *et al.*, 1999). The functionality of set yoghurt with HC15/702074 starter might be attributed to the lower pH as compared to the control starter. In previous work, the 702074 strain in fermented milk has shown the strongest acidifying character as compared to the other single strains (Chapter 2). The post-acidification occurring during storage, as observed in this study, might have a significant effect on the rheological/physical properties of yoghurt (Béal *et al.*, 1999; Harwalkar & Kalab, 1986). Harwalkar and Kalab (1986) have observed an increase of firmness of fermented milk at pH 3.85 as compared to those at pH 4.5. They have attributed this effect to higher intramicellar repulsion by the increase of positive charge of casein (at pH below isoelectric point of casein) resulting in the swelling of caseins causing a more rigid network. At lower pH (3.85), fermented milk showed a more open structure due to the reduction of intramicellar interactions. The microstructure of set yoghurt with HC15/70204 starter showed a less compact casein network with larger pores as compared to the control starter

in accordance to the explanation of Harwalkar and Kalab (1986). Finally, the post-acidification might contribute to the enhancement of firmness of set yoghurt rather than by the presence of the EPS from HC15/702074 starter. Another explanation may be the combination of 702074 strain with HC15 (control) strain that have changed the kinetic of EPS production from 702074 strain and thus, leading to different functionality. Contrarily to conventional stabilizer agents directly added to the mixture at the natural pH of milk, EPS are progressively produced during the fermentation process and thus, depending on the pH, might cause different impact on the casein network formation. Finally, the different composition (ratio casein to whey protein, dry matter) of fermented milk (Chapter 2), dairy model system (Chapters 3 and 4) and yoghurt (in this study) might contribute to the different EPS functionality. For instance, in dairy model systems with 3 % caseins, the rheological properties were mainly driven by the casein network because of the functionality of EPS was no more observable as compared to 2 % caseins. Other workers have underlined the importance of the composition (ratio casein to whey protein, dry matter) of fermented milk on the EPS functionality (Amatayakul *et al.*, 2006a; Amatayakul *et al.*, 2006b). However, as the structures of EPS used by these authors were unknown, no EPS structure-function relationship can be established.

Although the addition of modified starch had no effect on firmness and apparent viscosity of set yoghurt, the functionality of EPS remained. These results were consistent to those obtained in fermented dairy model system with different modified starch concentration (Chapter 4). Assuming that EPS and modified starch remained in the pores within the casein network, these two hydrocolloids coexisted with serum in a limited space. The presence of starch and non-starchy polysaccharides such as EPS in the solution would result in no specific interaction besides excluded volume causing a segregative phase separation due to thermodynamic incompatibility (Alloncle & Doublier, 1991). However, in yoghurt, these hydrocolloids were physically entrapped in limited space due to the presence of the casein network. The different degree of phase separation of set yoghurt with and without modified starch observed in CLSM have shown that pore sizes were governed by starters producing EPS and casein network instead of the presence of modified starch.

As compared to the other polysaccharides such as EPS, the functionality of starch regarding to viscosity cannot be explained as functions of radius of volume like the other polysaccharides due to its structure. Starch structure is highly organized in a granule (Appelqvist & Debet, 1997; Colonna & Thibault, 1986). Functional properties of starch are rather related to the gelatinization process as explained in chapter 4. During heat treatment, starch granules progressively dissolve in aqueous solutions allowing hydration and swelling. Hydroxyl groups of amylose and amylopectin bind water leading to less whey expulsion and thus, increase viscosity. Consequently, the competition of other molecules for water (Eliasson, 2004; Colonna & Thibault, 1986) such as proteins and EPS may affect swelling process of starch granules and thus, may have altered their functional properties. In addition, the limited space might also contribute to limit the optimal swelling process of modified starch although a decrease of syneresis was observed. The improvement of elastic modulus, related to protein-protein interactions as an indicator of gel stiffness (Lucey, 2001), for set yoghurt with modified starch and all starters except for HC15/291 starter might be explained by the higher interconnections of the casein network observed in CLSM as compared to those without modified starch. More interconnections were also observed by CLSM with the addition of starch in fermented milk (Oh *et al.*, 2007). The higher pH of stirred yoghurt with modified starch as compared to those without modified starch might also contribute to the difference observed among rheological/physical properties and microstructures. As the characteristics of yoghurt are mainly driven by the continuous phase e.g. the casein network, the final pH had a significant effect on it. Rönnegard and Dejmek (1993) have observed significant higher elastic modulus for yoghurt at pH 4.25 as compared to the other at pH 4.5. The higher pH of yoghurt with modified starch as compared to those without modified starch cannot be explained. This effect was not observed in previous work with the dairy model system (Chapter 4).

5.4.2 EPS structure-function relationship in stirred yoghurt

The smoothing process led to the deconstruction of the initial casein network causing a significant impact on the rheological/physical properties of yoghurt in accordance to the different microstructure between set and stirred yoghurts visualized by CLSM. The visualization of the microstructure showed that EPS were not mixed with proteins for stirred yoghurt as also observed by Hassan and co-workers (2003b and 2002b). Consequently, thermodynamic incompatibility causing phase separation between proteins and EPS still remain after the smoothing process. However, Girard and Schaffer-Lequart (2007a) have observed a more homogenous microstructure of stirred (with a spoon) fermented milk with an anionic EPS. These authors attributed this effect to electrostatic interactions that may have contributed to mix EPS with proteins of the casein network as compared to the neutral EPS. Homogenous microstructure of anionic EPS as compared to neutral EPS was not observed in this study. This effect may be explained by the different stirring process e.g. with a spoon in the case of the work of Girard and Schaffer-Lequart (2007a) and with a screw pump in addition to a constant pressure used in this study.

The EPS structure-function relationship on apparent viscosity and elastic modulus with specific structural characteristics remained but at a less extent after the smoothing process. However, the EPS functionality on firmness evaluated by penetrometry test was no more observable. This kind of measurement was based on rupture test. As stirred yoghurt consisted in a broken gel from the original casein network gel, this effect might explain the similarity among the different stirred yoghurt as explained by Marshall and Rawson (1999). In addition, the EPS from HC15/291 starter which had the highest ability to retain whey in set yoghurt lost this capacity. The smoothing process might have broken the original EPS web-like structure possibly responsible to the enhancement of serum retention. The microstructure seemed to be in accordance to this postulate because of more homogenous casein network with less larger pores were observed in stirred yoghurt than in set yoghurt without modified starch and with the EPS from HC15/291 starter.

Hassan and co-workers (2003b) have also observed that stirring with a spoon led to a more homogenous casein network with lower pore sizes as compared to set fermented milk with EPS. However, the EPS structure was unknown.

The addition of modified starch improved the rheological/physical properties of stirred yoghurt as also observed by Williams *et al.* (2003). Contrarily to set yoghurt, stirred yoghurt consisted to a broken gel with a less restricted volume of the aqueous phase (black areas) in accordance to the microstructure visualized by CLSM. As explained before, the ability of modified starch to improve rheological/physical properties is functions of the swelling process (Oh *et al.*, 2007). Consequently, the less restricted volume seemed to have contributed to the functionality of modified starch because of larger pores were observed in stirred yoghurt with modified starch as compared to those without modified starch. Optimal swelling granule might have limited the local serum mobility (aqueous phase) causing an enhancement of apparent viscosity and elastic modulus in addition to more serum retention as observed in this study.

No specific interactions between EPS and modified starch seemed to occur because of the functionality of the EPS with specific structural characteristics remained. These both polysaccharides co-existed in the same area (aqueous phase) but segregative phase separation due to thermodynamic incompatibility seemed to occur. Some authors have postulated that synergistic interaction between starch and polysaccharides may be attributed to phase separation (Alloncle & Doublier, 1991). Self-aggregation of starch granules due to depletion-flocculation mechanism has been also postulated to explain synergistic effect of starch and xanthan (Abdulmola *et al.*, 1996).

5.4.3 Effect of storage on EPS structure-function relationship

The functionality of EPS on the rheological/physical properties of set and stirred yoghurts with and without modified starch remained during the storage period of 8 days at 4 °C. During storage period, the improvement of apparent viscosity, firmness and elastic modulus was mostly observed in stirred yoghurt with and without modified starch addition. Afonso and Miao (1999) have also found that set yoghurt were more stable during the storage than stirred yoghurt probably due to the rearrangement process causing by partial structure recovery. Improvement of rheological/physical properties of yoghurt was also observed during storage at 4 °C by other authors (Gentès, 2007; Purwandari *et al.*, 2007; Amatayakul *et al.*, 2006a; Martens, 1972). The modulation of rheological/physical properties might be rather due to post-acidification (Harwalkar & Kalab, 1986; Martens, 1972) as observed in this study.

The storage period had no effect on the limitation of syneresis for all types of yoghurt made in this study as also observed by Amatayakul and co-workers (2006a) for stirred yoghurt with and without EPS stored at 4 °C for 28 days. However, greater serum retention in set and stirred yoghurts was measured during long-time storage (5 to 21 days) probably due to protein hydration (Afonso & Miao, 1999; Dave & Shah, 1998).

Some authors have observed a degradation of EPS due to glycohydrolytic enzymes during a prolonged fermentation of 25 to 72 h (Petry *et al.*, 2003; Degeest & De Vust, 1999). However, Amatayakul and co-workers (2006a) did not observe a decrease of EPS quantities after 28 days of storage at 4 °C. These authors have suggested that storage at 4 °C may help to suppress the activity of glycohydrolytic enzymes. Consequently, the modulation of rheological properties measured in their study was not influenced by the degradation of EPS. In this study, the EPS production was not quantified but no EPS degradation seemed to occur because of rheological/ physical properties remained stable or were improved during storage period.

5.5 Conclusions

This study has shown the effect of modified starch concentration and starters producing EPS with several structural characteristics on the rheological/physical properties and the microstructure of set and stirred yoghurts. The rheological/physical properties of yoghurt were mainly driven by the continuous phase e.g. the casein network. The presence of EPS with specific structural characteristics and modified starch, which probably located in the pores of the gel, added an additional contribution to the rheological/physical properties of yoghurt. The elastic modulus of set yoghurt was more influenced by the presence of linear, stiff and anionic EPS possibly due to electrostatic interactions with caseins despite of stiff and linear or few branched EPS was related to viscosity improvement. Modified starch addition had no or few effects on the rheological/physical properties of set yoghurt probably due to the restricted volume of the pores of the casein network causing a non-optimal swelling process of starch granules, which is known to affect its functional properties. The smoothing process had a significant impact on the rheological/physical properties of yoghurt confirmed by CLSM microscopy. The improvement of the rheological/physical properties of stirred yoghurt with EPS with specific structural characteristics by the addition of modified starch was probably due to segregative phase separation. Consequently, this work has shown that starters producing EPS with specific structural characteristics may be used in association with modified starch to improve the rheological/physical properties of yoghurt, especially with stirred yoghurt. Finally, it will be worthwhile to make an exhaustive study integrating the different steps of yogurt manufacture to mimic industrial conditions to give tool to the Canadian dairy industry to produce yoghurt with desirable rheological/physical properties.

5.6 Acknowledgements

Gaétan Bélanger, research assistant at Food Research and Development Centre (FRDC) of Agriculture and Agri-Food Canada, is thanked for his expertise and his technical help for the production of yoghurt at pilot scale.

Chapitre 6 : Discussion générale

Ce chapitre présente une synthèse de tous les résultats obtenus à la suite de la réalisation des objectifs de cette thèse doctorale afin d'étudier la relation structure-fonction des EPS et l'influence de la composition (teneur et type de protéines, ajout d'amidon modifié) et du procédé de fabrication (lissage) de systèmes laitiers fermentés. Une meilleure compréhension de ces souches productrices d'EPS particulièrement en présence d'amidon permettra d'optimiser leur utilisation. La mesure de plusieurs propriétés rhéologiques (suivi de la formation de gel, fermeté, module élastique, viscosité apparente) et physiques (aptitude à la synérèse) a permis d'établir quelles caractéristiques structurales des EPS influencent le plus une propriété rhéologique ou physique donnée en présence ou non d'amidon modifié. La relation structure-fonction des EPS selon les résultats obtenus aux chapitres 2 à 5 a été résumée au tableau 6.1. Les effets des EPS sur les propriétés rhéologiques/physiques des systèmes laitiers fermentés fermes et brassés avec ou sans amidon modifié sont représentés par les symboles suivants : amélioration (+), effet négatif (-), aucun effet (=) ou effet inconnu (?).

6.1 Formation du réseau caséique qu'est le yogourt

Le yogourt consiste en un réseau de caséines interconnectées formé suite à une acidification par le ferment lactique et piégeant l'eau et les bactéries dans les pores de ce gel. Dans notre étude, la présence d'EPS ne semble pas agir directement sur la formation de ce réseau caséique (temps et pH de gélification) mais, influence la microstructure finale du gel de même que les propriétés rhéologiques et physiques résultantes. Une exception a été observée : le processus de formation de gel a été retardé pour la bactérie 2104 seule produisant l'EPS chargé c'est-à-dire que le gel a été formé à pH 5.0 comparativement à pH 5.5-5.3 avec les autres bactéries. Les résultats ont démontré que la production de l'EPS par la bactérie 2104 commençait à pH 5.7 pouvant ainsi influencer le processus de formation de gel puisque les caséines et l'EPS sont de même charge négative à ce pH. La structure de cet EPS possède un groupement chargé permettant de former une lactone en fonction du pH

Table 6-1: Relation structure-fonction des EPS dans des systèmes laitiers fermes et brassés enrichis ou non en amidon modifié (AM)

Propriété rhéologique ou physique	Type de systèmes laitiers fermentés	Caractéristique structurale des EPS ^A							
		Charge		Conformation de la chaîne				Poids moléculaire	
		Neutre	Négative	Linéaire ou peu ramifié	Ramifié	Flexible	Rigide	Élevé > 5000 KDa	Faible < 2000 KDa
Fermeté évaluée par faibles déformations (Module élastique)	Ferme sans AM	-	+	+	-	-	+, -	+	=
	Ferme avec AM	+	+	+	+	+	+	?	=
	Brassé sans AM	-	+	+, -	-	-	+, -	?	?
	Brassé avec AM	+	+	+	+	+	+	?	?
Fermeté évaluée par pénétrométrie	Ferme sans AM	+, -	+	+	-	-	+, -	+	=
	Ferme avec AM	=	=	=	=	=	=	?	=
	Brassé sans AM	=	=	=	=	=	=	?	?
	Brassé avec AM	=	=	=	=	=	=	?	?
Viscosité apparente	Ferme sans AM	+, =	+	+	-	-	+	+	=
	Ferme avec AM	=	=	=	=	=	=	?	=
	Brassé sans AM	+, =	+	+	-	-	+	?	?
	Brassé avec AM	+	+	+	+	+	+	?	?
Limitation de la synérèse	Ferme sans AM	+, -	-	+, -	-	-	+, -	+	=
	Ferme avec AM	=	=	=	=	=	=	?	=
	Brassé sans AM	-, =	-	-	=	=	-	?	?
	Brassé avec AM	+	+	+	+	+	+	?	?

^ALes abréviations signifient : une amélioration (+), un effet négatif (-), aucun effet (=) ou un effet inconnu (?) sur les propriétés rhéologiques/physiques des systèmes laitiers fermentés.

pouvant également être à l'origine de la modification du processus de formation de gel. Par contre, lorsque cette bactérie productrice d'EPS a été jumelée avec la bactérie complémentaire témoin pour former le ferment lactique, le processus de formation de gel n'est plus modifié (Chapitres 3 et 4). La combinaison de deux bactéries dont une produisant un EPS permettait d'obtenir une vitesse d'acidification similaire entre les différents ferments. La majeure différence entre le ferment et la bactérie seule est une augmentation de la vitesse d'acidification dans le cas du ferment. Conséquemment, la cinétique de production d'EPS a pu être modifiée expliquant l'effet observé sur le processus de formation de gel. De plus, l'étude des interactions EPS-protéines laitières est plutôt complexe puisque contrairement aux agents stabilisants conventionnels, ajoutés directement au début du procédé de fabrication du yogourt, les EPS sont progressivement produits en cours de fermentation. L'évolution de la charge des protéines durant la fermentation peut influencer les interactions EPS-protéines laitières et donc, leur fonctionnalité (Hassan, 2008).

Lorsque des bactéries productrices d'EPS non chargés sont utilisées, les systèmes laitiers présentent une séparation de phases entre les EPS et les protéines observable par microscopie. De plus, la taille des pores du réseau caséique variait selon les caractéristiques structurales des EPS. Ce comportement est en accord avec les travaux de Tuinier et ses collaborateurs (2000; 1999) ayant démontré une séparation de phases ségrégative causée par le phénomène de déplétion-floculation à pH neutre entre les caséines ou les protéines sériques et un EPS neutre. Les conditions ségrégatives dominent dans les systèmes avec des EPS neutres à tous les pH ou avec des EPS anioniques à des pH supérieurs au point isoélectrique des protéines alors que les protéines porteront une charge négative (Turgeon et *al.*, 2003).

6.2 La composition du système laitier fermenté : un facteur clé influençant la relation structure-fonction des exopolysaccharides

Les résultats obtenus en système modèle laitier permettant de contrôler le contenu en caséines et protéines sériques, ont démontré que la teneur et le type de protéines influençaient le processus de formation de gel du réseau caséique (Chapitre 3). Par exemple, l'ajout de protéines sériques au système modèle laitier a permis d'obtenir un pH de formation du gel plus élevé qu'avec les caséines seules. De plus, il a été observé qu'à une concentration en caséines de 3 % dans le système modèle laitier à 10 % de solides totaux, la fonctionnalité des EPS n'était plus observée. Il semble qu'il y ait une concentration critique masquant la fonctionnalité des EPS et ainsi, démontrant la gouvernance du réseau caséique sur les propriétés rhéologiques et physiques de système laitier fermenté. Par contre, bien que les yogourts fabriqués en usine pilote étaient constitués de 3 % de caséines, la fonctionnalité des EPS a été mesurée (Chapitre 5). Cette différence pourrait s'expliquer par la teneur en solides totaux de 10 % dans le cas du système modèle laitier et de 14 % pour le yogourt; la teneur en caséines n'étant plus la même. Certains auteurs ont également observé une perte de fonctionnalité des EPS plus précisément de la fermeté évaluée par pénétrométrie selon la concentration en solides totaux et le ratio caséines-protéines sériques de yogourts fermes (Amatayakul *et al.*, 2006b). Conséquemment, la composition (teneur et type de protéines, solides totaux) est un facteur d'influence sur la fonctionnalité des EPS et doit être considéré dans le développement de produits laitiers fermentés afin d'obtenir des propriétés rhéologiques et physiques désirées.

6.3 La relation structure-fonction des exopolysaccharides : importance du système laitier fermenté étudié

L'effet des EPS sur les propriétés rhéologiques et physiques a été étudié dans un lait fermenté (Chapitre 2), un système modèle laitier (Chapitres 3 et 4) de même que dans un yogourt (Chapitre 5). Le système modèle laitier développé et simulant le yogourt s'est avéré efficace pour permettre la croissance bactérienne et la production *in situ* d'EPS en plus d'ajuster la composition en protéines laitières. De plus, la fonctionnalité des EPS observée dans le système modèle laitier s'accorde avec les résultats de fonctionnalité obtenus dans le yogourt confirmant ainsi la pertinence de l'utilisation de système modèle laitier dans l'étude de la relation structure-fonction des EPS. Le lissage des yogourts a eu un impact significatif sur les propriétés rhéologiques et physiques en diminuant leurs valeurs comparativement aux yogourts fermes. Malgré le lissage, la fonctionnalité des EPS s'est encore exprimée.

6.4 Importance des caractéristiques structurales des exopolysaccharides sur leur fonctionnalité

La mesure de diverses propriétés rhéologiques et physiques a permis d'obtenir un portrait global de la fonctionnalité des EPS étudiés. Les résultats ont démontré que les trois types de caractéristiques structurales des EPS (charge, conformation de la chaîne (flexibilité et ramification) et poids moléculaire) ont eu de l'impact sur leur fonctionnalité (Tab. 6.1). Pour influencer une propriété rhéologique ou physique donnée dans un système laitier fermenté, une seule caractéristique structurale ou une combinaison de plusieurs caractéristiques structurales est requise. Il importe de mentionner que l'analyse des résultats a été basée sur la comparaison d'un ferment témoin choisi pour son potentiel à ne pas produire d'EPS. Par contre, les résultats du chapitre 2 ont démontré que chacune des bactéries témoin constituant le ferment témoin produisait des EPS mais, n'ayant aucune influence sur les propriétés rhéologiques et physiques de laits fermentés. La structure des EPS produits par les bactéries témoin est inconnue.

6.4.1 Charge

Les interactions entre les protéines et les polysaccharides (incluant les EPS) peuvent être de nature attractive ou répulsive dépendant de la charge de ces deux macromolécules. Les interactions associatives sont observées lorsque les macromolécules ont des charges opposées tandis que les conditions ségrégatives dominent lorsque le polysaccharide est de charge neutre ou de charge similaire aux protéines (Turgeon *et al.*, 2003). La charge des polysaccharides en présence de protéines a donc une influence sur les propriétés rhéologiques et physiques résultantes. Conséquemment, un EPS anionique peut former des liaisons électrostatiques avec les caséines de charges positives à pH acide et ainsi, augmenter la fermeté du gel tandis qu'un EPS neutre sera libre dans la phase aqueuse et pourrait plus facilement interagir avec le sérum via des liaisons hydrogène (Robijn *et al.*, 1995; Robijn *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 1995).

Les résultats ont démontré que la charge anionique de l'EPS de la bactérie 2104 influençait positivement le module élastique, la fermeté et la viscosité apparente des systèmes laitiers fermentés possiblement dû à une séparation de phases associative. Le module élastique, mesure rhéologique effectuée à faibles déformations, est une indication de la force du gel en terme d'interactions protéines-protéines dans le réseau protéique au repos tandis que la fermeté obtenue par pénétrométrie mesure la force requise pour briser le gel. Les interactions électrostatiques entre les protéines et l'EPS chargé pourraient être à l'origine de cette augmentation de la fermeté et du module élastique. La résistance aux cisaillements corrélée avec une amélioration de la viscosité apparente des systèmes laitiers fermentés pourrait également être attribuable aux interactions électrostatiques entre les caséines et l'EPS anionique. Par contre, l'EPS chargé de la bactérie 2104 n'a eu que peu d'influence sur la limitation de la synérèse. Cet effet pourrait être relié aux interactions électrostatiques entre l'EPS et les caséines causant ainsi une diminution des interactions caséines-caséines et donc, limitant la capacité du réseau caséique à retenir le sérum. Une autre explication pourrait être que les interactions électrostatiques sont favorisées entre l'EPS chargé et les caséines par rapport aux interactions avec l'eau causant ainsi une diminution de la rétention du sérum.

Contrairement à l'EPS chargé, la fonctionnalité des EPS neutres ne semble pas provenir d'interactions spécifiques avec le réseau caséique mais plutôt, de la séparation de phases ségrégative causée par une incompatibilité thermodynamique. La phase continue est le réseau caséique et la phase aqueuse contient les EPS. La fonctionnalité des EPS neutres découle donc de leur effet sur la phase aqueuse (pores du réseau caséique) comme la mobilité du sérum (viscosité) et la rétention de ce dernier (aptitude à la synérèse). La charge neutre de l'EPS ne semble donc pas être une caractéristique structurale dominante pour la modulation des propriétés rhéologiques et physiques de système laitier fermenté mais, lorsque combinée à d'autres caractéristiques structurales comme la conformation de la chaîne, elle pourrait jouer un rôle en facilitant les interactions EPS-eau via des liaisons hydrogène dans la phase aqueuse.

6.4.2 Conformation de la chaîne (flexibilité et ramification)

La flexibilité et le degré de ramification de la chaîne de l'EPS ont affecté les propriétés rhéologiques et physiques des systèmes laitiers fermentés étudiés. La fonctionnalité des polysaccharides sur la viscosité est fonction du volume occupé en solution. La flexibilité des polysaccharides permet aux molécules de s'entremêler ensemble et donc, d'occuper un volume moins grand en solution comparativement aux polysaccharides rigides qui auront tendance à s'étendre en solution (Whistler & BeMiller, 1997). Les polysaccharides linéaires occupent un plus large volume en solution puisqu'ils s'étendent au lieu d'adopter la conformation plus compacte des molécules ramifiées et donc, contribueront à augmenter le volume de la solution (Whistler & BeMiller, 1997). Les résultats obtenus dans les différents chapitres de cette thèse tendent à confirmer cette théorie puisque la visualisation de la microstructure a démontré différents degrés de séparation de phases selon les caractéristiques structurales des EPS corrélés à différentes propriétés rhéologiques et physiques. L'amélioration de la viscosité apparente des systèmes laitiers est associée aux EPS neutres ou chargés avec des chaînes linéaires ou peu ramifiées et rigides des bactéries 2104 et 291. La microstructure a confirmé une taille des pores plus importante que dans le cas du ferment témoin et de l'EPS de la bactérie 702074 hautement ramifié et flexible qui ne contribue pas à la viscosité

L'augmentation locale de la viscosité du sérum a aussi une influence sur la rétention du sérum dans le réseau caséique suite à une centrifugation pour évaluer l'aptitude à la synérèse des systèmes laitiers fermentés. L'EPS neutre, rigide et peu ramifié de la bactérie 291 a contribué à limiter le plus l'expulsion du sérum comparativement aux autres bactéries.

6.4.3 Poids moléculaire

Le poids moléculaire et la conformation de la chaîne ont une influence sur la viscosité des solutions de polysaccharides parce que ces caractéristiques structurales contribuent au volume occupé par le polysaccharide en solution résultant en une modulation des propriétés rhéologiques et physiques (Whistler & BeMiller, 1997). Un poids moléculaire élevé soit de plus de 5000 KDa, dans le cas de cette étude, peut occuper un volume plus grand qu'un polysaccharide de plus faible poids moléculaire (< 2000 KDa) en plus d'augmenter la possibilité d'interactions avec les molécules d'eau en raison du nombre plus élevé de monosaccharides sur la chaîne (Whistler & BeMiller, 1997). Les résultats obtenus au chapitre 2 tendent à confirmer la théorie du volume occupé par le polysaccharide en solution en fonction du poids moléculaire versus la viscosité et la rétention du sérum. En effet, le poids moléculaire élevé de l'EPS de la bactérie 0131 était associé à une fermeté et une viscosité apparente plus élevées ainsi qu'une rétention accrue du sérum comparativement aux EPS de plus faibles poids moléculaires. Entre les EPS de mêmes poids moléculaires soit des bactéries 291, 702074 et 11842, la conformation de la chaîne semblait déterminante soit que la rigidité et le peu de ramifications (EPS de la bactérie 291) contribuait positivement à la viscosité, la fermeté et la rétention du sérum comparativement aux EPS de chaînes flexibles et ramifiées des bactéries 702074 et 11842. Par contre, la fonctionnalité des EPS versus le poids moléculaire n'a pu être établie clairement pour les autres chapitres de cette thèse expliquant l'utilisation de point d'interrogation comme symbole dans le tableau intégrateur 6.1. La raison étant que seulement trois des cinq EPS étudiés ont été choisis pour former les ferments utilisés aux chapitres 3 à 5 et que parmi ces trois EPS, un des poids moléculaires était inconnu.

6.5 Caractère filant des exopolysaccharides versus leur fonctionnalité

La comparaison de plusieurs EPS aux caractéristiques structurales connues, avec ou sans caractère filant, a permis d'établir que le caractère filant, reconnu dans la littérature comme une caractéristique dominante pour la modulation des propriétés rhéologiques et physiques, n'a pas été un facteur déterminant dans cette étude. En effet, des différences entre les EPS ont été observées par le test de l'entonnoir (Chapitre 2). Les résultats ont démontré que les caractéristiques structurales des EPS semblaient être à l'origine de ces différents comportements d'écoulement. Les bactéries produisant des EPS filants sont 2104, 0131 et 291. Ces EPS possèdent tous des caractéristiques structurales (haut poids moléculaire, chaîne rigide et/ou peu de ramification) ayant un impact significatif sur l'amélioration des propriétés rhéologiques et physiques des systèmes laitiers fermentés comparativement aux EPS non filants des bactéries 11842 et 702074 (faible poids moléculaire, chaîne ramifiée et flexible) n'apportant que peu ou pas d'effet. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait pu établir cette corrélation en raison du peu d'études comparatives de la relation structure-fonction de plusieurs EPS aux caractéristiques structurales connues sur diverses propriétés rhéologiques et physiques.

6.6 Interactions exopolysaccharides-amidon modifié

6.6.1 Système laitier fermenté de type ferme

Dans le yogourt, le granule d'amidon ne semble pas interagir directement avec le réseau caséique. L'incompatibilité thermodynamique causant une séparation de phases ségrégative semble gouverner. Conséquemment, l'amidon modifié semble également se retrouver dans la phase aqueuse avec les EPS. La visualisation de la microstructure tend à confirmer cette hypothèse puisque l'ajout d'amidon modifié en présence d'EPS cause la formation de réseaux caséiques avec des tailles de pores plus importantes comparativement à ceux sans amidon modifié. Malgré l'ajout d'amidon modifié, la fonctionnalité des EPS demeure. Par contre, l'utilisation d'amidon modifié dans les systèmes modèles laitiers et les yogourts fermes n'a eu que peu d'effet sur les propriétés rhéologiques et physiques résultantes.

La fonctionnalité de l'amidon modifié est fonction du gonflement du granule d'amidon influençant ainsi la rétention d'eau et la viscosité des solutions. Comme les EPS et l'amidon modifié semblent coexister dans la même phase aqueuse avec un volume limité (taille des pores) défini par le réseau caséique, la fonctionnalité de l'amidon modifié pourrait avoir été diminuée par un gonflement non optimal du granule d'amidon. Une autre explication pourrait être une compétition pour l'eau entre les EPS et l'amidon modifié causant ainsi un gonflement non optimal et donc, une perte de fonctionnalité.

6.6.2 Système laitier fermenté de type brassé

Lorsque le yogourt est brassé, l'ajout d'amidon modifié permet d'améliorer les propriétés rhéologiques et physiques. Par contre, il importe de mentionner que malgré cette amélioration, la fonctionnalité des EPS demeure tel que démontré par la présence d'une séparation de phases ségrégative observée en microscopie électronique. La différence majeure entre les yogourts fermes et brassés est que le brassage résulte en un bris du réseau caséique original formant des agrégats caséiques plus ou moins interconnectés avec des plus gros pores tel que démontré par la visualisation de la microstructure. L'effet bénéfique de l'ajout d'amidon modifié en présence d'EPS pourrait s'expliquer par un gonflement optimal du granule d'amidon suite à la disparition du volume restrictif des pores dans le cas du yogourt ferme.

Conclusion générale

Le but de ce projet de recherche était de déterminer le rôle structural d'EPS produits *in situ* par certaines bactéries lactiques en présence d'amidon modifié dans des systèmes laitiers fermentés de type yogourt pour l'optimisation de leur utilisation. L'hypothèse de ce projet de recherche était que l'étude comparative de plusieurs EPS aux caractéristiques structurales connues dans divers systèmes laitiers fermentés avec ou sans amidon modifié permettra de déterminer quelles caractéristiques structurales influencent le plus une propriété rhéologique ou physique donnée. Ainsi, l'étude s'est intéressée à l'utilisation conjointe de plusieurs ferments producteurs d'EPS aux structures connues et d'amidon modifié dans des systèmes laitiers fermentés de type yogourts fermes et brassés et leur effet sur les propriétés rhéologiques/physiques.

Afin de valider l'hypothèse de recherche, plusieurs objectifs ont été définis et réalisés en laboratoire. L'objectif 1 a démontré différentes fonctionnalités des EPS sur les propriétés rhéologiques et physiques de laits fermentés en fonction de leurs caractéristiques structurales. La mesure de plusieurs propriétés rhéologiques/physiques (suivi de la formation de gel, module élastique, viscosité apparente, fermeté, aptitude à la synérèse) et la comparaison de plusieurs EPS aux structures connues a également permis de déterminer les caractéristiques structurales les plus influentes pour une propriété rhéologique ou physique donnée (Chapitre 2). L'effet de la composition des systèmes laitiers fermentés (teneur et type de protéines, ajout d'amidon modifié) sur la relation structure-fonction des EPS a été démontré à l'objectif 2 (Chapitre 3 et 4). L'étude des interactions EPS-protéines lactiques (Objectif 2) a nécessité le développement d'un système modèle laitier à base de perméat de lait qui s'est avéré efficace autant pour ajuster la composition en protéines lactiques que pour permettre la croissance bactérienne et la production d'EPS. Le dernier objectif a permis d'étudier la fonctionnalité des EPS lorsque des traitements de cisaillement (effet du lissage) étaient appliqués au système laitier fermenté avec amidon modifié (Chapitre 5).

Suite à la réalisation de tous les objectifs fixés, il a été possible de proposer une relation structure-fonction pour les EPS étudiés. Tous les résultats de fonctionnalité des EPS, obtenus aux différents objectifs, ont démontré la même tendance indépendamment du système laitier étudié (lait fermenté, système modèle laitier ou yogourts ferme et brassé) et de la composition protéique (teneur en protéines sériques ou en caséines). La charge négative s'est avérée le facteur d'importance pour modifier le processus d'agrégation caséique (Chapitre 2 seulement) et moduler la fermeté et la viscosité apparente. Une chaîne linéaire ou peu ramifiée de même que rigide est requise pour améliorer la viscosité apparente et la fermeté ainsi que de réduire la synérèse des systèmes laitiers fermentés. L'ajout d'amidon modifié a peu ou pas d'effet sur les propriétés rhéologiques/ physiques des systèmes modèles laitiers fermes. Il n'est donc pas utile d'en ajouter aux formulations de ces systèmes. Par contre, une synergie a été observée lors de l'utilisation conjointe d'EPS et d'amidon modifié dans des systèmes laitiers fermentés brassés. Cette combinaison permet donc d'améliorer les propriétés rhéologiques/physiques des systèmes laitiers fermentés brassés.

Les résultats obtenus dans cette thèse confirment donc l'hypothèse émise soit que la comparaison de plusieurs EPS aux structures connues a permis d'établir les caractéristiques structurales influençant une propriété rhéologique ou physique donnée dans des systèmes laitiers fermentés de type yogourts fermes et brassés avec différentes compositions (protéines, solides totaux, ajout d'amidon modifié). Conséquemment, les connaissances acquises pourront permettre de produire des yogourts enrichis en amidon modifié avec des propriétés rhéologiques et physiques spécifiques et désirées en choisissant judicieusement le ferment producteur d'EPS.

Comme il s'agissait du premier projet de recherche dans ce domaine, plusieurs pistes demeurent à explorer. La section suivante intitulée « Perspectives de recherche » présente les améliorations à apporter à ce travail et suggère quelques pistes à étudier afin de rendre possible l'utilisation des EPS dans l'industrie laitière canadienne.

Perspectives de recherche

Ce projet de recherche a été développé sur une approche novatrice basée sur la compréhension de la relation structure-fonction des EPS dans l'optique de l'amélioration constante des propriétés rhéologiques/physiques finales du yogourt et de leur contrôle. Étant donné le caractère novateur de cette étude, les résultats obtenus de l'utilisation conjointe d'EPS et d'amidon modifié dans la formulation de yogourt ont suscité plusieurs questions et ont ouvert plusieurs pistes à explorer avant la maîtrise de l'applicabilité des EPS par l'industrie laitière canadienne. Plusieurs points à considérer pour de futures études peuvent être proposés afin d'enrichir les connaissances scientifiques acquises au cours de ce travail.

Tout d'abord, il aurait été préférable de choisir des EPS avec des caractéristiques structurales identiques sauf pour une caractéristique afin de faciliter la compréhension de la relation structure-fonction des EPS. Le nombre restreint d'EPS produits par les bactéries du yogourt avec des structures connues et l'inaccessibilité de certaines de ces bactéries (instance de brevet, secret commercial, etc) ont été des facteurs limitant. Il serait également utile de déterminer le poids moléculaire de la bactérie 2104, la seule caractéristique structurale manquante de tous les EPS étudiés dans ce travail, afin de faciliter l'interprétation des résultats.

Le système modèle laitier développé s'est avéré adéquat pour permettre la croissance bactérienne et la production *in situ* d'EPS en plus d'ajuster la composition en protéines laitières (Chapitre 3). Par contre, une amélioration au système modèle laitier sans protéines laitières pourrait être apportée. La concentration du produit utilisé pour créer le pouvoir tampon (glycérophosphate) pourrait être ajustée légèrement à la baisse ou un autre produit pourrait être utilisé afin d'obtenir un profil de pouvoir tampon en fonction du pH plus semblable au lait. Cet ajustement permettrait d'obtenir une vitesse d'acidification similaire aux autres conditions avec protéines laitières soit de 3h-3h30 au lieu de 5h dans le but de contrôler plus efficacement le procédé de fabrication.

Une autre amélioration pourrait être apportée à la méthodologie du chapitre 3. Tout d'abord, les résultats ont démontré que la charge anionique portée sur les EPS influençait le processus de formation de gel et la fermeté du gel (Chapitre 2). Afin d'approfondir les connaissances sur les interactions protéines-EPS, la cinétique de production d'EPS en fonction du pH devrait être évaluée au lieu de la quantification finale en EPS (Chapitre 3). La principale difficulté est que contrairement aux agents stabilisants conventionnels ajoutés au début de la fabrication du yogourt, les EPS sont produits progressivement lors de la fermentation. Par conséquent, la cinétique de production des EPS en fonction du pH pourrait influencer les interactions avec les protéines. Les résultats du chapitre 2 ont confirmé que la cinétique de production d'EPS et la vitesse d'acidification sont différentes dépendant de la souche et de l'espèce. Par contre, lorsque la bactérie productrice d'EPS a été jumelée avec la bactérie complémentaire témoin pour obtenir une vitesse d'acidification similaire entre tous les ferments, la croissance bactérienne de même que la vitesse d'acidification ont été affectées. Comme les EPS sont associés à la croissance bactérienne (Chapitre 2), il est possible que la cinétique de production d'EPS ait été également modifiée donnant lieu à une différence sur les propriétés rhéologiques/physiques des systèmes laitiers fermentés. Lorsqu'en combinaison, la cinétique de production des EPS n'a pu être mesurée puisque les bactéries témoins produisaient également des EPS et que la méthode de dosage des EPS utilisée ne permettait pas de discriminer entre les deux EPS. Finalement, des étapes de purification et de mise au point de méthodes aurait été nécessaires pour permettre de mesurer la cinétique de production des EPS.

Un autre point à améliorer serait au niveau de l'étude des interactions protéines laitières-EPS qui n'ont pu être suivies en fonction du pH en raison de l'inexistence d'une méthode d'analyse. Le défi est donc de développer une méthode d'analyse permettant de visualiser ou de quantifier les interactions entre les protéines laitières et les EPS produits *in situ* en fonction du pH directement dans les systèmes laitiers fermentés. Le développement d'une telle méthode permettrait de mieux comprendre les différents changements qu'apportent la présence des EPS lors de la fermentation dans un environnement complexe comme le lait et donc, d'aider à la compréhension de la relation structure-fonction des EPS.

Pour les chapitres 4 et 5, il serait requis de développer une méthode pour visualiser simultanément le réseau caséique, les EPS et l'amidon modifié en microscopie confocale afin d'appuyer les résultats rhéologiques et physiques obtenus et ainsi, visualiser l'emplacement des EPS et de l'amidon modifié dans les pores de la matrice caséique et de déterminer le type d'interactions entre ces différents constituants.

Au chapitre 5, les résultats ont démontré que les ferments n'avaient pas tous la même cinétique de post-acidification dans le yogourt durant l'entreposage. La sur-acidification causée par un ferment comparativement aux trois autres ferments semble avoir été en cause dans l'amélioration des propriétés rhéologiques/physiques de ces yogourts plutôt que de l'effet de la fonctionnalité de l'EPS menant ainsi à un biais. Cette amélioration de propriétés rhéologiques/physiques n'avait pas été observée lors des études dans le système modèle laitier. Une question demeure : est-ce la sur-acidification ou la fonctionnalité de l'EPS qui est à l'origine de l'amélioration des propriétés rhéologiques/physiques? L'amélioration à apporter serait donc de choisir des ferments ayant le même profil de post-acidification afin de valider cet effet.

Du point de vue de l'applicabilité industrielle, une connaissance approfondie de l'impact des procédés de fabrication utilisés en industrie laitière comme la simulation du pompage du yogourt (diamètre et longueur des tuyaux, vitesse de cisaillement, pression de pompage) pourrait permettre d'enrichir les outils développés afin de choisir les ferments producteurs d'EPS spécifiques pour l'obtention de caractéristiques finales désirées. Il serait également utile de mesurer les propriétés rhéologiques/physiques du yogourt sur une plus longue période d'entreposage comme la durée de vie du yogourt (1-2 mois) afin d'en évaluer la stabilité des EPS. Certains auteurs affirment que les EPS pourraient être dégradés dans le temps suite à une dégradation enzymatique tel qu'expliqué au chapitre 1. Un suivi de la teneur en EPS au cours d'un entreposage prolongé pourrait permettre de vérifier ce postulat.

Comme les conditions expérimentales réalisées en laboratoire sont facilement contrôlables, il serait également justifié de simuler volontairement des problèmes technologiques vécus en industrie laitière permettant de mimer la réalité industrielle comme le bris de la chaîne de froid menant à une sur-acidification afin de valider l'impact sur les propriétés rhéologiques/physiques résultantes des yogourts avec des EPS et des amidons modifiés.

Finalement, comme d'autres agents stabilisants sont aussi utilisés en Amérique du Nord (pectine, gomme xanthane, etc), il serait intéressant d'étudier leur effet sur les propriétés rhéologiques/physiques résultantes des yogourts avec des EPS. En établissant la relation structure-fonction des EPS dans des yogourts enrichis avec plusieurs agents stabilisants (amidon modifié, pectine, gomme xanthane, etc.), il sera possible de mieux exploiter industriellement les fonctionnalités des EPS afin de développer efficacement de nouveaux produits à valeur ajoutée. En effet, les EPS pourraient agir à titre de prébiotiques. Ainsi, la diversité des yogourts mis en marché devrait pouvoir s'enrichir, de même que pour la qualité des produits existants dans l'optique d'une éventuelle croissance de la consommation de ce produit fermenté par la population canadienne.

Bibliographie

- Abdulmola N.A., Hember M.W.N., Richardson R.K., Morris E.R., 1996, Effect of xanthan on the small-deformation rheology of crosslinked and uncrosslinked waxy maize starch, *Carbohydrate Polymers*, 31 (1-2): 65-78.
- Afonso I.M., Miao J.M., 1999, Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yogurt, *Journal of Food Engineering*, 42 (4): 183-190.
- Alloncle M., Doublier J.L., 1991, Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid paste and gels, *Food Hydrocolloids*, 5 (5): 455-467.
- Altan D., Béal C., Champomier-Vergès M.-C. et al., 2008, Métabolisme et ingénierie métabolique, Dans *Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments*, Éditeurs: Corrieu G. et Luquet F.M., TEC & DOC Lavoisier, Paris, France, pp. 273-510.
- Amatayakul T., 2005, Physical characteristics of set yogurts as affected by co-culturing with non-EPS and EPS starter cultures and supplementation with WPC, *Australian Journal of Dairy Technology* 60 (3): 238-243.
- Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F., Shah N.P., 2006a, Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios, *International Dairy Journal* 16 (1): 40-51.
- Amatayakul T., Sherkat F., Shah N.P., 2006b, Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food Hydrocolloids*, 20 (2-3): 314-324.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R., 2002, Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologiques et techniques d'analyses du lait, Dans *Sciences et technologie du lait*, Éditrice: C.L. Vignola, Presses internationales Polytechnique, Montréal, Canada, pp. 1-73.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 2000, Chapter 33: Dairy products, Dans *Official methods of analysis*, Volume 2, 17^{ième} édition, Éditeur: Horwitz D.W., pp. 69-82.
- Appelqvist I.A.M., Debet M.R.M., 1997, Starch-biopolymer interactions - a review. *Food Reviews International*, 13 (2): 163-224.
- Ares G., Gonçalves D., Pérez C., Reolon G., Segura N., Lema P., Gambaro A., 2007, Influence of gelatin and starch on the instrumental and sensory texture of stirred yogurt, *International Journal of Dairy Technology*, 60 (4): 263-269.

- Ariga H.I., Urashima T.A., Michihata E.I., Ito M.A., Morizono N.O., Kimura T.S., Takahashi S.E., 1992, Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus sajivarius* subsp. *thermophilus* OR 901 isolated from commercial yogurt, *Journal of Food Science*, 57 (3): 625-628.
- Ayala-Hernandez I., Goff H.D., Corredig M., 2008, Interactions between milk proteins and exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* observed by scanning electron microscopy, *Journal of Dairy Science*, 91 (7): 2583-2590.
- Ayala-Hernandez I., Hassan A.N., Goff H.D., Corredig M., 2009, Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Food Hydrocolloids* 23 (5): 1299-1304.
- Béal C., Louvet P., Corrieu G., 1989, Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32 (2): 148-154.
- Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F., Obert J.-P., 2008, Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques, Dans *Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments*, Éditeurs: Corrieu G. et Luquet F.M., TEC & DOC Lavoisier, Paris, France, pp. 661-786.
- Béal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N., Corrieu G., 1999, Combined effect of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt, *Journal of Dairy Science*, 82: 673-681
- Behare P.V., Singh R., Kumar M., Prajapati J.B., Singh R.P., 2009, Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review, *Journal of Food Science and Technology*, 46 (1): 1-11.
- Bhullar Y.S., Uddin M.A., Shah N.P., 2002, Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt, *Milchwissenschaft*, 57 (6): 328-332.
- Bikker J.F., Anema S.G., Li Y., Hill J.P., 2000, Rheological properties of acid gels prepared from heated milk fortified with whey protein mixtures containing the A, B and C variants of beta-lactoglobulin, *International Dairy Journal*, 10: 723-732.
- Bönish M.P., Manfred H., Lauber S., Kulozik U., 2007, Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation, *Food Hydrocolloids*, 21: 585-595.

- Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M.J., 1997, Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production, *Journal of Dairy Science*, 80 (10): 2310-2317.
- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.
- Broadbent J.R., McMahon D.J., Welker D.L., Oberg C.J., Moineau S., 2003, Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A Review, *Journal of Dairy Science*, 86 (2): 407-423.
- Cerning J., 1995, Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria, *Lait*, 75 (4-5): 463-472.
- Cerning J., 1990 Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 87 (1-2): 113-130.
- Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J., Landon M., 1988, Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*, *Biotechnology Letters*, 10: 255-260.
- Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J., Landon M., 1986, Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*, *Biotechnology Letters*, 8: 625-628.
- Cerning J., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M.J., 1992, Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 75 (3): 692-699.
- Cerning J., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M.J., 1990, Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria, *Sciences des Aliments*, 10 (2): 443-451.
- Cheer R.L., Lelievre J., 1983, Effects of sucrose on the rheological behavior of wheat starch pastes, *Journal of Applied Polymer Science*, 28 (6): 1829-1836.
- Clark S., Plotka V.C., 2004, Yogurt and sour cream: operational procedures and processing equipment, Dans *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Éditeurs: Hui Hui Y.H. et al., Taylor and Francis (CRC Press), New York, USA, pp.159-182.
- Colonna M., Thibault M., 1986, Propriétés fonctionnelles des pectines, Dans *Propriétés fonctionnelles des polysaccharides*, APRIA, TEC & DOC Diffusion, Paris, France, pp. 187-212.

- Corredig M., Dalgleish D.G., 1996, Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk, *Food Research International*, 29 (1): 49-55.
- Dave R.I., Shah N.P., 1998, The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt, *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(3): 180-184.
- de Bont P.W., van Kempen G.M.P., Vreeker R., 2002, Phase separation in milk protein and amylopectin mixtures, *Food Hydrocolloids*, 16 (2): 127-138.
- de Kruif K.G., Tuinier, R., 2001, Polysaccharide protein interactions, *Food Hydrocolloids*, 15: 555-563.
- De Vuyst L., Degeest B., 1999, Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (2): 153-177.
- De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F., Degeest B., 2001, Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11(9): 687-707.
- De Vuyst L., Vanderveken F., Van de Ven S., Degeest B., 1998, Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis, *Journal of Applied Microbiology*, 84 (6): 1059-1068.
- De Vuyst L., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Marshall V., Degeest B., Vaningelgem F., 2003, Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks, *International Dairy Journal*, 13 (8): 707-717.
- Degeest B., De Vuyst L., 1999, Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 2863-2870.
- Doleyres Y., Schaub L., Lacroix C., 2005, Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties, *Journal of Dairy Science*, 88 (12): 4146-4156.
- Dubert-Ferrandon A., Niranjan K., Grandison A.S., 2006, A novel technique for differentiation of proteins in the development of acid gel structure from control and heat treated milk using confocal scanning laser microscopy, *Journal of Dairy Research*, 73: 423-430.
- Duboc P., Mollet B., 2001, Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy Journal*, 11 (9): 759-768.

- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28 (3): 350-356.
- Eliasson A., 2004, *Starch in food: structure, function and applications*, Woodhead Publishing Limited, CRC Press LLC, Florida, USA, 605p.
- Everett D.W., McLeod R.E., 2005, Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt, *International Dairy Journal*, 15 (11): 1175-1183.
- Faber E.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 2001a, Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291, *Carbohydrate Research*, 331 (2): 183-194.
- Faber E.J., van den Haak M.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 2001b, Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3, *Carbohydrate Research*, 331(2): 173-182.
- Faber E.J., van Haaster D.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 2002, Characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 8S containing an open chain nononic acid, *European Journal of Biochemistry*, 269 (22): 5590-5598.
- Faber E.J., Zoon P., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 1998, The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures, *Carbohydrate Research*, 310 (4): 269-276.
- Famelart M.-H., Tomazewski J., Piot M., Pezenec S., 2004, Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems, *International Dairy Journal*, 14 (4): 313-321.
- Folkenberg D.M., Dejmek P., Skriver A., Ipsen R., 2006a, Interactions between exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains in mixed yoghurt cultures, *Journal of Dairy Research*, 73 (04): 385-393.
- Folkenberg D.M., Dejmek P., Skriver A., Skov Guldager H., Ipsen R., 2006b, Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures, *International Dairy Journal*, 16 (2): 111-118.
- Folkenberg D.M., Dejmek P., Skriver A., Ipsen R., 2005, Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and in stirred yoghurts produced with different starter cultures, *Journal of Texture Studies*, 36 (2): 174-189.
- Garcia-Garibay M., Marshall V.M.E., 1991, Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Journal of Applied Microbiology*, 70 (4): 325-328.

- Gentès M.-C., 2007, Utilisation de complexes formés de pectine et d'isolat de protéines sériques dans la formulation de yogourts brassés, Mémoire de Maîtrise, Université Laval, Québec, Canada, 160p.
- Girard M., Schaffer-Lequart C., 2008, Attractive interactions between selected anionic exopolysaccharides and milk proteins, *Food Hydrocolloids* 22 (8): 1425-1434.
- Girard M., Schaffer-Lequart C., 2007a, Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides. *International Dairy Journal*, 17 (6): 666-673.
- Girard M., Schaffer-Lequart C., 2007b, Gelation of skim milk containing anionic exopolysaccharides and recovery of texture after shearing, *Food Hydrocolloids*, 21 (7): 1031-1040.
- Goh K.K.T., Haisman D.R., Archer R.H. Singh H., 2005a, Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media, *Food Research International*, 38 (6): 605-613.
- Goh K.K.T., Haisman R.D., Singh H., 2005b, Examination of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using confocal laser scanning and scanning electron microscopy techniques, *Journal of Food Science*, 70 (4): M224-M229.
- Harwalkar V.R., Kalab M., 1986, Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yogurt made from reconstituted nonfat dry milk, *Food Microstructure*, 5: 287-294.
- Haque A., Richardson R.K., Morris E.R., 2001, Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt, *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6): 593-602.
- Harding L.P., Marshall V.M., Hernandez Y., Gu Y., Maqsood M., McLay N., Laws A.P., 2005, Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074, *Carbohydrate Research*, 340 (6): 1107-1111.
- Hassan A.N., 2008, ADSA Foundation scholar award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods, *Journal of Dairy Science*, 91 (4): 1282-1298.
- Hassan A.N., Frank J.F., Elsoda M., 2003a, Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy, *International Dairy Journal*, 13 (9): 755-762.
- Hassan A.N., Ipsen R., Janzen T., Qvist K.B., 2003b, Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides, *Journal of Dairy Science*, 86 (5): 1632-1638.

- Hassan A.N., Corredig M., Frank J.F., 2002a, Capsule formation by nonropy starter cultures affects the viscoelastic properties of yogurt during structure formation, *Journal of Dairy Science*, 85 (4): 716-720.
- Hassan A.N., Frank J.F., Qvist K.B., 2002b, Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy, *Journal of Dairy Science*, 85: 1705-1708.
- Heertje I., Visser J., Smits P., 1985, Structure formation in acid milk gels, *Food Microstructure*, 4: 267-277.
- Hess J.S., Roberts R.F., Ziegler G.R., 1997, Rheological properties of nonfat yoghurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer systems, *Journal of Dairy Science*, 80: 252-263.
- Isleten M., Karagul-Yuceer Y., 2006, Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt, *Journal of Dairy Science*, 89 (8): 2865-2872.
- Jaubert A., Martin P., 1992, Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins: Identification of alpha s-1 and alpha s-2 genetic variants, *Lait*, 72 (3): 235-247.
- Jolly L., Stinglee F., 2001, Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11 (9): 733-745.
- Kalab M., 1993, Practical aspects of electron microscopy in dairy research, *Food Structure*, 12: 95-114.
- Kalab M., 1979, Microstructure of dairy foods: I-Milk products based on protein, *Journal of Dairy Science*, 62 (8): 1352-1364.
- Kalab M., Allan-Wojtas P., Phipps-Todd B.E., 1983, Development of microstructure in set-style nonfat yoghurt-A review, *Food Microstructure*, 2: 51-66.
- Kalab M., Emmonds D.B., 1975, Milk-gel structure: IV-Microstructure of yoghurts in relation to the presence of thickening agents, *Journal of Dairy Research*, 42: 453-458.
- Kalab M., Harwalkar V.R., 1973, Milk gel structure: I-Application of scanning electron microscopy to milk and other food gels. *Journal of Dairy Science*, 56 (7): 835-842.
- Keogh M.K., O'Kennedy B.T., 1998, Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids, *Journal of Dairy Science*, 63: 108-112.

- Laligant A., Famelart M.-H., Paquet D., Brulé G., 2003, Fermentation by lactic bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk: II-Dynamic approach of the gel construction, *Lait*, 83 (4): 307-320.
- Lamboley L., St-Gelais D., Champagne C.P., Lamoureux M., 2003, Growth and morphology of thermophilic dairy starters in alginate beads, *Journal of General and Applied Microbiology*, 49 (3): 205-214.
- Laws A.P., Marshall V.M., 2001, The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11 (9): 709-721.
- Lee W.J., Lucey J.A., 2004, Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature, *Journal of Dairy Science*, 87 (10): 3153-3164.
- Lelièvre J., Husbands J., 1989, Effects of sodium caseinate on the rheological properties of starch pastes, *Starch*, 41 (6): 236-238.
- Lifely M.R., Gilbert A.S., Moreno C., 1984, Rate, mechanism, and immunochemical studies of lactonisation in serogroup B and C polysaccharides of *Neisseria meningitides*, *Carbohydrate Research*, 134 (2): 229-243.
- Lifely M.R., Gilbert A.S., Moreno C., 1981, Sialic acid polysaccharide antigens of neisseria meningitidis and escherichia coli: Esterification between adjacent residues, *Carbohydrate Research*, 94 (2): 193-203.
- Lin T.Y., Chang Chien M.F., 2007, Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time, *Food Chemistry*, 100 (4): 1419-1423.
- Looijesteijn P.J., Trapet L., de Vries E., Abee T., Hugenholtz J., 2001, Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*, *International Journal of Food Microbiology*, 64 (1-2): 71-80.
- Looijesteijn P.J., van Casteren W.H.M., Tuinier R., Doeswijk-Voragen C.H.L., Hugenholtz J., 2000, Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures, *Journal of Applied Microbiology*, 89 (1): 116-122.
- Lucey J.A., 2004, Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties, *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2/3): 77-84.
- Lucey J.A., 2002, Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85 (2): 281-294.

- Lucey J.A., 2001, The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels, *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6): 603-608.
- Lucey J.A., Munro P.A. Singh H., 1999, Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels, *International Dairy Journal*, 9 (3-6): 275-279.
- Lucey J.A., Singh H., 1998a, Formation and physical properties of acid milk gels: a review, *Food Research International*, 30 (7): 529-542.
- Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.A., 1998b, A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone, *Food Research International*, 31 (2): 147-155.
- Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.A., 1998c, Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels, *Journal of Dairy Research*, 65 (4): 555-567.
- Lucey J.A., Teo C.T., Munro P.A., Singh H., 1997, Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk, *Journal of Dairy Research*, 64 (4): 591-600.
- Ma L., Barbosa-Canovas G.V., 1995, Review: instrumentation for the rheological characterization of foods, *Food Science and Technology International*, 1 (1): 3-17.
- Macura D., Townsley P.M., 1984, Scandinavian ropy milk: Identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion, *Journal of Dairy Science*, 67 (4): 735-744.
- Macy H., 1923, A ropy milk organism isolated from the Finnish "Piima" or "Fiili", *Journal of Dairy Science*, 6 (2): 127-130.
- Marshall V.M., Rawson H.L., 1999, Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt, *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (2) : 137-143.
- Martens R., 1972, Influence de quelques facteurs sur la consistance et le goût du yoghourt brassé, *Revue de l'agriculture*, 3 : 461-480.
- McKinley M.C., 2005, The nutrition and health benefits of yoghurt, *International Journal of Dairy Technology*, 58 (1): 1-12.

- Monnet C., Latrille E., Béal C., Corrieu G., 2008, Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques, Dans Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments, Éditeurs: Corrieu G. et Luquet F.M., TEC & DOC Lavoisier, Paris, France, pp. 511-611.
- Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.-M., Remaud-Siméon M., 2001, Homopolysaccharides from lactic acid bacteria, International Dairy Journal, 11 (9): 675-685.
- Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T., Yura T., 1981, Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways, Journal of Bacteriology: 148 (1): 64-71.
- Mullineux G., Simmon M.J.H., 2008, Influence of rheological model on the processing of yoghurt, Journal of Food Engineering, 84: 250-257.
- Noisuwan A., Bronlund J., Wilkinson B., Hemar Y., 2008, Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. Food Hydrocolloids, 22 (1): 174-183.
- Oh H.E., Anema S.G., Wong M., Pinder D.N., Hemar Y., 2007, Effect of potato starch addition on the acid gelation of milk, International Dairy Journal, 17 (7): 808-815.
- Olsen S., 2003, Microstructure and rheological properties of yoghurt, Dans Proceeding of IDF seminar on aroma and texture of fermented milk Brussels, Belgium, pp. 302-312.
- Peng Y., Serra M., Horne D.S., Lucey J.A., 2009, Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt, Journal of Food Science, 74 (9): C666-C673.
- Petry S., Furlana S, Waghornec E., Saulnier L., Cerning J., Maguin E., 2003, Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides, FEMS Microbiology Letter, 221: 285-291.
- Pierre A., Douin M., 1984, Eléments d'étude du procédé Bridel de fabrication de caséine à partir de lait décaionisé par échanges d'ions (E.I.), Lait, 64: 521-536.
- Pierre A., Fauquant J., Graet Y.L., Piot M., Maubois J.L., 1992, Native micellar casein separation through cross flow membrane microfiltration, Lait, 72 (5): 461-474.
- Puvanenthiran A., Williams R.P.W., Augustin M.A., 2002, Structure and viscoelastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios, International Dairy Journal, 12 (4): 383-391.

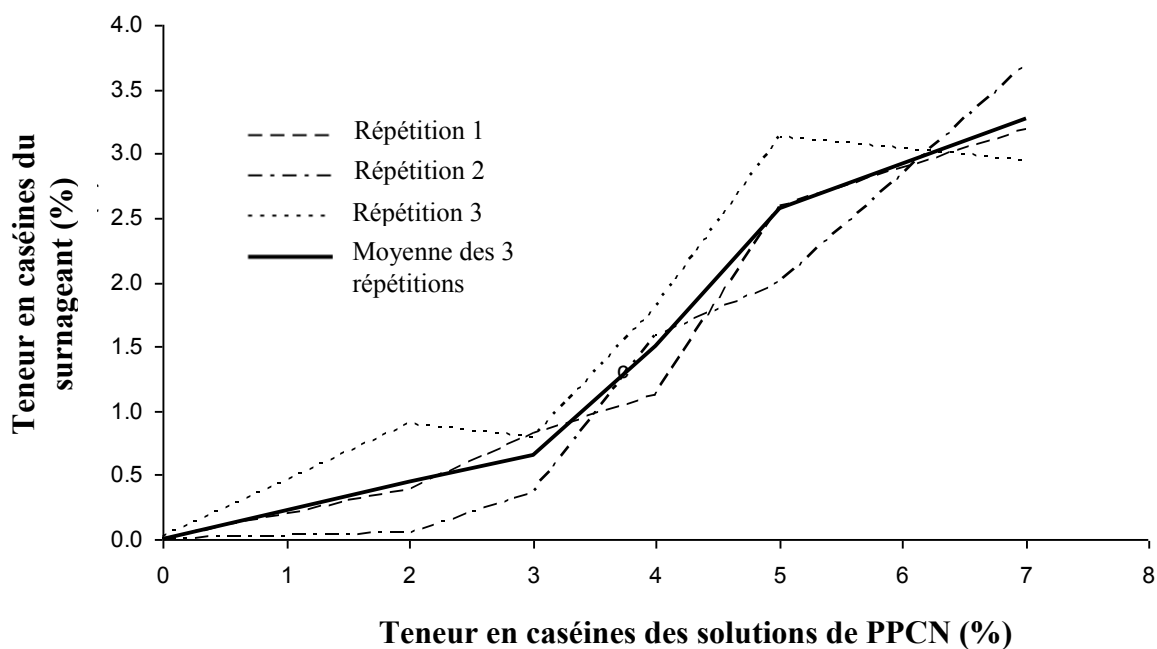
- Ramchandran L., Shah N.P., 2009, Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme and alpha-glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage, *Dairy Science and Technology*, 89 (6): 583-600.
- Ricciardi A., Clementi F., 2000, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications, *Italian Journal of Food Science*, 1 (12): 23-45.
- Rimada E.S., Abraham A.G., 2003, Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey, *Lait*, 83 (1): 79-87.
- Robijn G.W., van den Berg D.J.C., Haas H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 1995, Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1, *Carbohydrate Research*, 276 (1): 117-136.
- Robijn G.W., Wienk H.L.J., van den Berg D.J.C., Haas H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 1996, Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1, *Carbohydrate Research*, 285: 129-139.
- Robitaille G., Tremblay A., Moineau S., St-Gelais D., Vadeboncoeur C., Britten M., 2009, Fat-free yogurt made using a galactose-positive exopolysaccharide-producing recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Dairy Science*, 92 (2): 477-482.
- Rönnegard E., Dejmek P., 1993, Development and breakdown of structure of yogurt studied by oscillatory rheological measurements, *Lait*, 73: 371-379.
- Ruas-Madiedo P., Alting A.C., Zoon P., 2005, Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks, *International Dairy Journal*, 15: 155-164.
- Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilan C.G., 2005, Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 88 (3): 843-856.
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P., 2002a, An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12 (2-3): 163-171.
- Ruas-Madiedo P., Tuinier R., Kanning M., Zoon P., 2002b, Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks, *International Dairy Journal*, 12 (8): 689-695.

- Salaün F., Mietton B., Gaucheron F., 2005, Buffering capacity of dairy products, *International Dairy Journal*, 15 (2): 95-109.
- Salvador A., Fiszman S.M., 1998, Textural characteristics and dynamic oscillatory rheology of maturation of milk gelatin gels with low acidity, *Journal of Dairy Science*, 81 (6): 1525-1531.
- Sandoval-Castilla O., Lobato-Calleros C., Aguirre-Mandujano E., Vernon-Carter E.J., 2004, Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14 (2): 151-159.
- Satoh E., Ito Y., Sasaki Y., Sasaki T., 1997, Application of the extracellular alpha-amylase gene from *Streptococcus bovis* 148 to construction of a secretion vector for yogurt starter strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (11): 4593-4596.
- Sava N., Plancken I.V.D., Claeys W., Hendrickx M., 2005, The kinetics of heat-Induced structural changes of β -lactoglobulin, *Journal of Dairy Science*, 88 (5): 1646-1653.
- Shene C., Canquil N., Bravo S., Rubilar M., 2008, Production of the exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity, *International Journal of Food Microbiology*, 124 (3): 279-284.
- Sodini I., Remeuf F., Haddad S., Corrieu G., 2004, The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt Texture: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (2): 113 – 137.
- Spinnler H.E., Corrieu G., 1989, Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement, *Journal of Dairy Research*, 56: 755-764.
- St-Gelais D., Roy D., Audet P., 1998, Manufacture and composition of low fat Cheddar cheese from milk enriched with different protein concentrate powders, *Food Research International*, 31 (2): 137-145.
- Sutherland I.W., 2001, Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria, *International Dairy Journal*, 11 (9): 663-674.
- Syrbe A., Bauer W.J., Klostermeyer H., 1998, Polymer Science Concepts in Dairy Systems-An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction, *International Dairy Journal*, 8 (3): 179-193.
- Tabasco R., Paarup T., Janer C., Peláez C., Requena T., 2007, Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk, *International Dairy Journal*, 17 (9): 1107-1114.

- Tamine A.Y., Robinson R.K., 1999, *Yoghurt: Science and Technology*, Second edition, Woodhead Publishing Limited CRC Press LLC, Cambridge, England, 619p.
- Thomas D.J., Atwell W.A., 1999, *Starches*, Eagan Press, Minnesota, USA, 94p.
- Tuinier R., van Casteren W.H.M., Looijesteijn P.J., Schols H.A., Voragen A.G.J., Zoon P., 2001, Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*, *Biopolymers*, 59 (3): 160-166.
- Tuinier R., Dhont J.K.G., De Kruif C.G., 2000, Depletion-induced phase separation of aggregated whey protein colloids by an exocellular polysaccharide, *Langmuir*, 16 (4): 1497-1507.
- Tuinier R., Ten Grotenhuis E., Holt C., Timmins P.A., De Kruif C.G., 1999, Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide. *Physical Review E (Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics)*, 60 (1): 848-856.
- Turgeon S.L., Plesca V., 2009, Study of interactions between exopolysaccharides produced by strain *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M and milk proteins, Dans 5th International Symposium on Food Rheology and Structure; Proceeding ISFRS 2009, Zurich, Suisse, pp.416-419.
- Van Calsteren M.-R., Gagnon F., Guertin N., Broadbent J.R., 2008, Year high-resolutions ¹H and ¹³C NMR structure determination of a polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ATCC 11842, Affiche scientifique présentée au Proceedings of the 9th International conference on the applications of magnetic resonance in food science, September 15-17, Reykjavik, Iceland.
- van den Berg D.J.C., Robijn G.W., Janssen A.C., Giuseppin M.L.F., Vreeker R., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., Ledebouer A.M., Verrips C.T., 1995, Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8): 2840-2844.
- van Geel-Schutten G.H., Flesch F., ten Brink B., Smith M.R., Dijkhuizen L., 1998, Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50 (6): 697-703.
- van Marle M.E., Zoon P., 1995, Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49: 47-65.
- Van Slyke D.D., 1922, On the measurement of buffer values and on the relationship of buffer value to the dissociation constant of the buffer and the concentration and reaction of the buffer solution, *Journal of Biological Chemistry*, 52 (2): 525-570.

- van Vliet T., van Dijk H.J.M., Zoon P., Walstra P., 1991, Relation between syneresis and rheological properties of particle gels, *Colloid and Polymer Science*, 269 (6): 620-627.
- Vanigelgem F., Meulen R.V.D., Zamfir M., Adriany T., Laws A.P., Vuyst L.D., 2004a, *Streptococcus thermophilus* ST111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium, *International Dairy Journal*, 14 (10): 857-864.
- Vanigelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L., 2004b, Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2): 900-912.
- Wacher-Rodarte C., Galvan M.V., Farres A., Gallardo F., Marshall V.M.E., Garcia-Garibay M., 1993, Yogurt production from reconstituted skim milk powder using different polymer and non-polymer forming starter cultures, *Journal of Dairy Research*, 60: 247-254.
- Walstra P, Woulters J.T.M., Geurts T.J., 2006, Milk Components, Dans Dairy Science and Technology, CRC Taylor & Francis Group, Florida, USA, pp. 63-83.
- Welman A.D., Maddox I.S., 2003, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges, *Trends in Biotechnology*, 21 (6): 269-274.
- Whistler R.L., BeMiller J.N., 1997, Polysaccharides, Dans Carbohydrate chemistry for food scientists, AACC Chemist, Eagan Press, St-Paul, Minnesota, USA, pp. 63-89.
- Williams R.P.W., Glagovskaia O., Augustin M.A., 2003, Properties of stirred yogurts with added starch: effects of alterations in fermentation conditions, *Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 228-232.

Annexe I : Teneur moyenne en caséines des surnageants après centrifugation (10 min, 21 °C, 690 x g) de solutions de PPCN à différentes teneurs en caséines (0 à 7% (p/p))



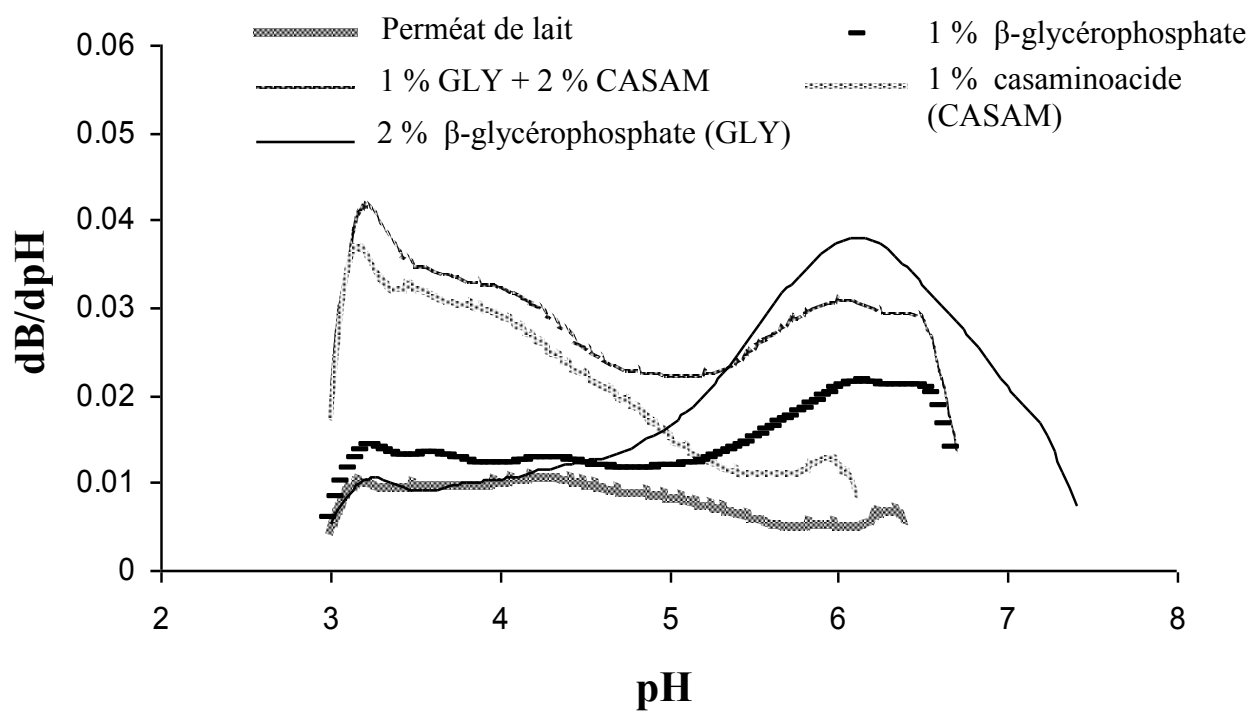
Annexe II : Distribution de la fraction caséique* et la taille des particules de la solution de PPCN à 7 % et dans le surnageant après centrifugation (10 min à 21 °C et à 690 x g)**

Solution de PPCN	Taille des particules (nm)	Teneur en caséines (%)	Distribution de la fraction caséique (sur 100 %)				
			α -S1	α -S2	β	κ	γ
Solution 7 % caséines	394 ^a	7.09 ^a	39.29 ^a	7.77 ^a	29.61 ^a	9.81 ^a	13.52 ^a
Surnageant 3.5% caséines	333 ^a	3.27 ^b	37.66 ^a	8.16 ^a	30.09 ^a	10.16 ^a	13.94 ^a

*La distribution de la fraction caséique contenue dans les solutions de PPCN avant et après centrifugation a été déterminée par chromatographie liquide à haute performance selon la méthode de Jaubert et Martin (1992).

**La taille des particules des solutions de PPCN avant et après centrifugation a été mesurée avec un analyseur de la taille des particules basé sur la diffraction de la lumière (Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Les échantillons, préalablement dilués de 50 fois avec du perméat de lait filtré sur 0.22 μ m, ont été analysés à 25 °C dans des cuvettes de quartz.

Annexe III : Pouvoir tampon du perméat de lait, de solutions de casaminoacide (1 et 2% (p/p)) et de solutions de β -glycérophosphate disodique (1 et 2% (p/p))



Annexe IV : Comparaison de la population bactérienne et de la production d'EPS dans un lait écrémé reconstitué à 12 % de solides totaux et des systèmes modèles laitiers à 0 et 1 % de caséines fermentés à pH 4.6

Mélange	Ferment	Streptocoque (Log UFC/mL)	Lactobacille (Log UFC/mL)	EPS (mg/L)
Lait écrémé*	HC15/210R	8.5 ^{ab}	8.6 ^a	68 ^a
	HC15/291	8.7 ^a	8.6 ^a	65 ^a
	HC15/702074	8.6 ^{ab}	8.6 ^a	83 ^a
	2104/210R	8.5 ^b	8.5 ^a	52 ^a
0% CAS	HC15/210R	8.5 ^{ab}	7.9 ^b	49 ^{ab}
	HC15/291	8.8 ^a	7.6 ^e	42 ^b
	HC15/702074	8.5 ^{ab}	7.9 ^{cd}	31 ^b
	2104/210R	8.5 ^{ab}	8.0 ^b	68 ^a
1% CAS	HC15/210R	8.4 ^{ab}	8.2 ^b	52 ^a
	HC15/291	8.7 ^a	7.7 ^{de}	53 ^a
	HC15/702074	8.8 ^a	7.9 ^c	25 ^b
	2104/210R	8.7 ^a	8.2 ^b	52 ^a

*Le lait écrémé reconstitué a été stérilisé (110 °C/10 min) au préalable.