

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mr. HAMZAOUI SAMI ILIES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Nutrition et Santé

THÈME

*Etude de l'effet de la Transglutaminase sur la
qualité rhéologique d'un yaourt Brassé à base de
différents types de lait reconstitué*

Soutenue publiquement le **05/06/2015**

DEVANT LE JURY

Présidente	ZERROUKI Kheira	M.A.A	U. Mostaganem
Encadreur	BENBOUZIANE Bouasria	M.C.B	U. Mostaganem
Examineur	CHAALEL Abdelmalek	M.C.B	U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques et Aliment Fonctionnel et de la
santé –UMAB et au laboratoire du département Technique BDF NATURAL INGREDIENTS
S.L Girona Espagne.*

Remerciements

Toute ma gratitude et les plus vifs remerciements à :

❖ Monsieur **BENBOUZIANE BOUASRIA**, enseignant au département d'agronomie.

Pour sa générosité, son dévouement et Les précieuses directives ; qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

❖ Melle **Zerrouki Kheira**, enseignante au département de biologie. Pour l'honneur qu'elle m'a fait de présider mon jury.

❖ Mr **Chaalal Abdelmalek**, enseignant au département de biologie. Pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Un grand merci à madame **MARGARIDA SOLE I BOLDU**. Pour son accueil, sa disponibilité et son infinie gentillesse .et à l'ensemble de l'équipe **BDF NATURAL INGREDIENTS S.L** sans laquelle il aurait été impossible de réaliser ce travail.

Je tiens aussi à remercier particulièrement **Mr Riazi Ali** (Professeur à l'université de Mostaganem, responsable du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé laboratoire), ainsi que l'ensemble de son staff technique et pédagogique pour leur accueil et la confiance qu'ils ont portés en moi.

Résumé

Le présent travail concerne le lait fermenté de type yaourt brassé. En outre, ce travail s'intéresse à l'utilisation de la Transglutaminase et de l'amidon modifié 1442 pour améliorer la texture ainsi que le processus de stabilité d'un produit à haute valeur nutritionnelle et commerciale. Toutes ces améliorations vont permettre aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer le rendement, la productivité, la qualité, et la sécurité des produits finis par l'addition de l'enzyme Transglutaminase. Les essais réalisés dans ce sens ont révélé que l'addition de cette enzyme à raison de 0,30 g/L influe d'une façon très significative la viscosité des laits fermentés, car la meilleure viscosité est observée dans les yaourts faits à base de lait écrémé + TG + SIN 1442 atteignant une valeur de 3671(mPa.s), on comparant avec celui fait à base de lait demi-écrémé et lait entier. Cela est dû à la relation entre la TG et le taux élevé de protéine ainsi renforcé par l'effet de l'amidon 1442 qui viens renforcer le gel.

On obtient de meilleures valeurs de viscosité par rapport au témoin (sans TG). Cet effet est d'autant plus valorisé en jumelant les deux agents (TG et amidon modifié) dans la même formule. Les valeurs (3349 mPa.s, 2303 mPa.s et 1698 mPa.s) obtenues avec Transglutaminase respectivement en utilisant les laits : (demi-écrémé, écrémé et entier) contrairement aux valeurs obtenues sans Transglutaminase (1962 mPa.s, 1256 mPa.s et 1335 mPa.s).

Au vu des résultats observés, il apparait clairement que la TG agit en diminuant le taux de synérèse en comparaison au yaourt témoin (sans TG). Ce qui a été vérifié dans l'ensemble des formules testées.

Toutes ces améliorations nous ont permis d'utiliser la Transglutaminase et d'améliorer le rendement, la productivité, la qualité, et la sécurité des produits finis

Mots clés : Transglutaminase – Yaourt Brassé - Viscosité - Synérèse

Absract

This study aims at exploring the enzymatic activity of transglutaminase, which extracted from bacteria *Streptomyces mobaraense*. And who represents interests biotechnological with the aim of his application in the food-processing industry (meat, fish, dairy product). Transglutaminase is considered as a processing aid (89/107/EEC) by EFSA (European food authority) and labeling therefore unnecessary. This work concern the use of TG to improve the rheologic quality some fermented milk (yogurt). The assays realized in this sense revealed that the addition of this enzyme at rate of 0.30 g/L increases and improves yogurt texture. The result of the viscosity respectively obtained indicate that samples prepared in the presence of transglutaminase have higher values those samples.

Keywords : Transglutaminase, viscosity, yogurt, ferment lactic, syneresis, rheologic quality

Liste des abréviations :

ATP : adenosine triphosphate

EFSA : European Européen Food Safety Authority

EPS : exopolysaccharides

G' : module élastique

G'' : module visqueux

GDL : glucono-delta-lactone

GRAS : généralement reconnus comme sains

IPL : Isolât protéique de lactosérum

kDa : kilodalton

MIN: minute

mPa.s : millipascal-second

NC : Azote caséique

NNP : Azote non-protéique

NP: Azote protéique

NT : Azote total

pH : potentiel hydrogène

PLÉ: Poudre de lait écrémé

p/p: poids/poids

PS: protéines sériques

p/v: poids/volume

TG : Transglutaminase.

v/v: volume/volume

Liste des figures

Figure 01 : Structure 3D de la Transglutaminase.	P15
Figure 02 : Texturation enzymatique de la Transglutaminase.	P17
Figure 03 : Cross-linking des protéines.	P17
Figure 04 : Activité de la Transglutaminase en fonction du pH.	P18
Figure 05 : Activité de la Transglutaminase en fonction de la température.	P18
Figure 06 : Mode d'action de la Transglutaminase.	P19
Figure 07 : pH-mètre électronique.	P25
Figure 08 : Viscosimètre de Brookfield.	P26
Figure 09 : centrifugeuse réfrigérée.	P27
Figure 10 : Evolution du pH des yaourts à base de lait cru demi-écrémé page.	P29
Figure 11 : Evolution du pH des yaourts à base de lait écrémé reconstitué.	P30
Figure 12 : Evolution du pH des yaourts à base de lait entier reconstitué.	P30
Figure 13 : Viscosité des yaourts à base de lait cru demi-écrémé.	P31
Figure 14 : Viscosité des yaourts à base de lait écrémé (0% MG) reconstitué.	P32
Figure 15 : Viscosité des yaourts à base de lait entier (26% MG) reconstitué.	P32
Figure 16 : Synérèse des yaourts à base de lait cru demi-écrémé.	P33
Figure 17 : Synérèse des yaourts à base de lait écrémé (0% MG) reconstitué.	P34
Figure 18 : Synérèse des yaourts à base de lait entier (26% MG).	P34

Table des matières

Remerciements

Résumé

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre I : Revue de littérature

Partie 1 : yaourt

1.1 Définition du yogourt	P02
1.2 Fabrication de yogourt	P02
1.2.1 Matière première	P02
1.2.2 Préparation et standardisation du mélange laitier	P03
1.2.3 Homogénéisation et traitement thermique du lait	P04
1.2.4 Inoculation, fermentation et conditionnement	P05
1.2.5 Fermentation yogourt ferme vs yogourt brassé	P07
1.2.6 Refroidissement et transport	P08
1.3 Principaux défauts de texture	P08
1.3.1 Synérèse	P09
1.3.2 Autres défauts de texture	P10
1.4 Biocompatibilité	P10

1.4.1 Interactions de coopération	P11
1.4.2 Interactions de compétition	P12

Partie 2 : Transglutaminase

2.1.1 Nouvelles technologies appliquées aux enzymes	P13
2.2 LA Transglutaminase et sa production	P14
2.3 Origine	P15
2.4 Un point sur La Législation	P15
2.5 Les caractéristiques de l'enzyme	P16
2.6 Les effets de l'enzyme	P20

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Matière première	P22
1.2 Appareillage	P22

2. Méthodes

2.1 Fabrication du yaourt	P23
2.1.1 Préparation des laits	P23
2.1.2 Fermentation	P24
2.2 Analyses physico-chimiques du produit fini	P24

2.2.1 Mesure du pH P24

2.2.2 Mesure de la viscosité P25

2.2.3 Mesure de la synérèse P26

Chapitre III : Résultats et discussion

1- Résultat de la mesure du Ph P29

Résultats de la mesure de la viscosité P31

2.1. Influence de la Transglutaminase P31

3- Résultats de la mesure de la synérèse P34

Conclusion

Références bibliographiques

Revue de littérature

Chapitre I : Revue de littérature

Partie 1 : Yaourt

1.1 Définition du yogourt

La réglementation attribue l'appellation yaourt ou yogourt à un lait (entier, partiellement écrémé ou écrémé) ayant subi une fermentation par l'action conjointe des bactéries lactiques thermophiles *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (MAPAQ, 2003). Les quatre principaux types de yogourts que l'on retrouve sur le marché sont fermes, brassés, à boire ou encore les yogourts glacés (A.A.C., C.C.I.L., 2006).

1.2 Fabrication du yaourt

1.2.1 Matière première

Le lait est l'ingrédient de base pour toute fabrication de yogourt. Alors que l'Amérique du Nord préconise l'utilisation du lait de vache pour la production de yogourts commerciaux, le lait de plusieurs autres espèces de mammifères (par exemple chèvre ou buffle, pour ne nommer que ceux-ci) peut aussi être employé. En termes de composition chimique, quelques variations sont observées selon l'espèce choisie. Le lait de vache est constitué en majeure partie d'eau, soit généralement à près de 87.5%. Il contient aussi un mélange complexe de divers composants : des glucides (4.6%), des matières grasses (3.7%), des protéines (3.2%), ainsi que des vitamines et des minéraux (0.8%) (Amiot *et al.*, 2002). La plupart de ces constituants peuvent avoir un effet sur le produit fini tant au niveau des propriétés organoleptiques que rhéologiques. Par exemple, la présence de gras dans un yogourt influence l'onctuosité, la sensation en bouche et peut améliorer la rétention d'eau dans le produit (Sodini *et al.*, 2004; Lamontagne, 2002). Le lactose, un diholoside constitué d'un galactose et d'un glucose, est le sucre principal du lait et est aussi celui qui est utilisé par les bactéries lactiques pour leur croissance lors de l'étape de fermentation.

Les protéines jouent aussi un rôle important. Deux catégories sont retrouvées dans le lait et elles sont classées d'après leur solubilité dans l'eau ainsi que leur stabilité: les protéines insolubles et les protéines solubles. Les premières se retrouvent dans la suspension colloïdale et se regroupent sous la forme de micelles, soit les caséines. Il en existe quatre types nommées respectivement caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ . Celles-ci, qui englobent près de 80% de toutes les protéines du lait, sont chargées négativement, et précipitent sous l'action d'une présure ou d'un abaissement du pH à 4.6, soit leur point isoélectrique (Amiot *et al.*, 2002). Les protéines du

sérum, ou protéines sériques, se retrouvent quant à elles sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont l'a-lactalbumine et la P-lactoglobuline, qui précipitent sous l'action de la chaleur.

1.2.2 Préparation et standardisation du mélange laitier

Afin de répondre aux critères d'acceptabilité d'un yogourt, il est important d'obtenir les propriétés physiques désirées telles une viscosité et une consistance satisfaisante. Plusieurs étapes sont impliquées afin d'atteindre les attributs recherchés. Notamment, on compte l'étape d'enrichissement du lait, ou plus précisément la standardisation du mélange laitier. D'abord, le niveau de solides totaux, qui, au départ, se situe à près de 9% pour un lait écrémé (Amiot et al, 2002), est élevé à 14-16% pour la fabrication de yogourt (Shah, 2003; Tamime and Robinson, 1999). Ceci permet entre autres d'augmenter la viscosité du produit (Wu et al, 2009; Barretto Penna et al, 2006). Le niveau de solides non-gras (soit principalement le lactose, les protéines et les minéraux) se situe quant à lui normalement entre 8.2-8.6%. Dans de nombreux pays, il est d'usage d'ajouter des poudres de lait, dont la poudre de lait écrémé (PLÉ), laquelle est très répandue. Celle-ci, en plus des poudres de caséines, permet d'augmenter et d'ajuster le niveau de protéines du produit afin de contrer les variations saisonnières des composantes laitières qui sont observées dans l'industrie, et du même coup d'augmenter la viscosité du produit.

Depuis le début des années 1990, l'ajout de poudres dérivées du lactosérum au lait destiné à la fabrication de yogourt a largement été étudié. Parmi les plus répandues, on retrouve les concentrés protéiques de lactosérum (CPL) ainsi que les isolats protéiques de lactosérum (IPL), qui sont ajoutés à des taux variant entre 0.6 et 4%. Leur effet positif sur la rétention d'eau et sur la fermeté du gel a été démontré (Guinée et al, 1995; Cheng et al, 2000; Dave et al, 1988).

L'ajout d'agents stabilisants, les polysaccharides commerciaux, est très courant. Les polysaccharides les plus utilisés sont la gélatine, l'amidon, l'alginate, la carraghénane ou certains dérivés de cellulose, selon la législation (Trachoo, 2002). Leur fonction première est d'apporter une certaine consistance au gel. De plus, ils exercent un pouvoir de rétention d'eau sur le produit. Ces agents stabilisants s'avèrent bénéfiques pour le maintien de la texture du produit, considérant tous les traitements mécaniques pouvant être appliqués (brassage, pompages divers, lissage) durant sa production (Tamime et Robinson, 1999).

1.2.3 Homogénéisation et traitement thermique du lait

L'étape d'homogénéisation force le lait à passer dans une tubulure sous haute pression. Par ce mécanisme, il est possible de réduire la taille des globules de gras, qui sinon pourraient avoir tendance à s'agglomérer entre eux et/ou à remonter en surface du produit. Alors que la taille d'un globule varie normalement entre 1 et 10 μm , l'homogénéisation exercée permet de la réduire à moins de 2 μm (Tamime et Robinson, 1999). Ce traitement mécanique permet d'autant plus d'intégrer et de dissoudre les poudres fortifiantes ajoutées précédemment au lait, pour ainsi améliorer la stabilité, la consistance du gel et même en élever la valeur de module élastique (G') (Xu et al, 2008; Lucey, 2004).

Le lait destiné à la fabrication de yogourt a toujours subi un traitement thermique, et ce, même de façon traditionnelle. En plus de permettre l'élimination de microorganismes non-désirables et/ou pathogènes, le but de celui-ci était, à l'origine, d'amener le lait à son point d'ébullition pour ainsi le réduire aux deux tiers de son volume initial. Ceci était, anciennement, une façon d'augmenter le niveau de solides (cette méthode demeure toutefois pratiquée actuellement dans certaines laiteries confectionnant le yogourt de façon artisanale). De nos jours, une étape du traitement thermique est toujours présente afin d'éliminer les bactéries indésirables, mais aussi de créer des modifications physicochimiques du lait. Ainsi, plusieurs types de traitements thermiques différents peuvent être appliqués, allant d'une simple thermisation à $<65^{\circ}\text{C}$ ne provoquant aucun changement irréversible des constituants laitiers jusqu'à un traitement pouvant frôler les 150°C , qui altère grandement les propriétés physicochimiques du lait et qui a comme risque de se répercuter sur la couleur et la saveur de celui-ci (Tamime et Robinson 1999). Les traitements thermiques courants sont de l'ordre de 85°C durant 30 minutes, ou encore de $90-95^{\circ}\text{C}$ avec retenue allant de 5 à 10 minutes (Trachoo, 2002). La principale modification encourue est la dénaturation des protéines sériques dont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine (pour cette dernière, le traitement thermique doit toutefois être sévère) (Laws et Marshall, 2001). L'ouverture de la structure globulaire de ces protéines favorisera les interactions avec la caséine K, qui forme la partie externe de la micelle, par la formation d'un pont disulfure (-S-S-) (Sharma et Dalglish, 1994; Amiot et al, 2002). La dénaturation et l'association de l' α -lactalbumine résulte en une surface micellaire plus lisse (Benezech et Maingonnat, 1994). Le traitement thermique a aussi des répercussions sur d'autres constituants du lait, dont l'équilibre salin. Le calcium, le phosphate, le citrate et le magnésium sont des sels pouvant exister sous forme d'ions solubles ou encore sous forme colloïdale dans le complexe protéique, que sont les micelles de caséines (Tamime et Robinson, 1999). Sous

l'effet de la chaleur, il a été observé qu'une fraction du calcium soluble pouvait se retrouver dans la phase colloïdale. Ainsi, l'observation microscopique a révélé une implication des sels, en majeure partie le phosphate de calcium et les citrates, dans la formation de filaments et la création de réseaux protéiques (Davies *et al*, 1978; Tamime et Robinson, 1999). La chaleur provoque aussi l'inactivation de certaines enzymes et la destruction de vitamines thermolabiles (Singh et Creamer, 1992).

1.2.4 Inoculation, fermentation et conditionnement

Suite au traitement thermique du lait, la température du mélange est abaissée entre 40-45°C en vue d'y ensemer les bactéries lactiques thermophiles. On inocule alors la préparation de lait avec deux souches bactériennes, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*. Le ratio d'ensemencement se situe habituellement entre 1/1 et 2/1 pour le yogourt nature mais peut grimper jusqu'à 10/1 dans le cas d'un yogourt aux fruits (Tamime et Robinson 1999; Hui *et al*, 2004). La tendance à favoriser les streptocoques par rapport aux lactobacilles s'explique du fait que ces derniers, lorsque présents en trop grande quantité, ont tendance à provoquer une post-acidification du produit ainsi que des arômes non-désirables (Champagne, 1998). L'ensemencement permet d'amorcer la phase d'acidification du lait. Il est préférable d'ensemencer à un taux plus élevé que trop faible, afin de permettre aux bactéries de surmonter les obstacles à leur développement tel un manque de facteurs de croissance ou encore une phase de latence trop longue. Cela permet aussi d'éviter d'obtenir un produit trop «sableux» en bouche, ou encore qui présenterait de la synérèse comme il serait le cas advenant un ralentissement de l'acidification (Luquet *et al*, 1985). L'inoculation directe avec des ferments purs ou encore indirecte, qui implique le repiquage de ferments une ou plusieurs fois dans une base de lait, se situe entre 1 et 5% de la préparation (Sodini *et al*, 2004). Cultivée de façon individuelle, la souche *S. thermophilus* possède une croissance optimisée entre 35-40°C alors qu'une culture de *L. bulgaricus* croît idéalement à une température légèrement supérieure, soit entre 43-45°C (Hui *et al*, 2004). L'incubation se fait donc en moyenne à près de 42-45°C afin de satisfaire la croissance des deux genres bactériens et de manière à favoriser la synergie entre elles. (Clark et Plotka, 2004; Lamontagne, 2002; Mahaut *et al*, 2000; Tamime et Robinson, 1999).

La fermentation des glucides est le mécanisme biochimique mis en application par les bactéries lactiques. Lors de la fermentation du lait, *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* amorce son activité en libérant dans un premier temps des acides aminés suite à la protéolyse des caséines. Or, à ce stade, la croissance de cette souche est minimale. Les nutriments libérés par celle-ci

permettent néanmoins aux streptocoques d'amorcer la fermentation du lactose en glucose, galactose et acide lactique car le pH naturel du lait de 6.6 est favorable pour ce genre bactérien (pH optimal de croissance entre 6.0-6.5). Celui-ci procure aux lactobacilles les composantes nécessaires à leur activité fermentaire comme l'acide formique et le gaz carbonique. Lorsque le pH du milieu diminue à moins de 6.0, les lactobacilles quittent la phase de latence pour entrer en phase exponentielle. Elles se mettent donc à hydrolyser les caséines de façon partielle, ce qui libère de courts peptides et des acides aminés qui favorisent davantage la croissance des streptocoques. Toutefois, la diminution de pH due à la présence toujours croissante d'acide lactique inhibera peu à peu la croissance de ces derniers (Sandine et Elliker, 1970).

Le catabolisme du lactose par les souches *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* s'effectue à l'intérieur-même des cellules bactériennes. La première étape de la fermentation consiste à amener la molécule de lactose directement à l'intérieur de la paroi de la bactérie. Certains organismes du groupe homofermentatif, dont font partie les bactéries du yogourt, (qui, à partir du lactose, ne peuvent produire que de l'acide lactique (Champagne, 1998) transportent ce sucre par le biais des systèmes phosphoenolpyruvate-dépendant et phosphotransferase. Or, le transport le plus communément utilisé par les souches bactériennes *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* se fait à l'aide de l'enzyme galactoside perméase, ou encore la lactose phosphotransferase. Par la suite, l'action de l'enzyme β -D-galactosidase est requise pour scinder le lactose afin de libérer une molécule de D-glucose et de P-D-galactose. Le monosaccharide D-glucose est métabolisé par la bactérie, tandis que le catabolisme du galactose demeure nébuleux, quoique des études menées à ce sujet aient observé que le galactose ressort de la bactérie pour revenir dans le yogourt (Tamime et Robinson, 1985). C'est par ce moyen que les bactéries lactiques obtiennent l'énergie nécessaire sous forme d'ATP leur permettant d'assimiler les éléments nutritifs et d'assurer le fonctionnement de leur métabolisme. Les facteurs influençant la vitesse de transformation du lactose (ou glycolyse) auront aussi une influence parallèle sur la vitesse de croissance des bactéries lactiques.

La diminution du pH, provoquée durant la fermentation par l'accumulation continue de l'acide lactique, crée des déséquilibres du mélange laitier et conduit à des modifications physico-chimiques du milieu. Au pH naturel du lait, les micelles de caséines sont chargées négativement et un phénomène de répulsion s'exerce donc entre elles. Lors de l'abaissement du pH à 5.5, leur potentiel de surface (potentiel zêta) est réduit, ce qui permet une agglomération des petites micelles aux grosses. C'est ainsi que l'on observe une augmentation du diamètre moyen des micelles de caséines. Ensuite, un déséquilibre des sels se produit à pH <5.3,

engendrant la solubilisation du phosphate de calcium micellaire (Tamime et Robinson, 1999). La charge initiale des caséines est peu à peu perdue, et la force ionique de la solution augmente (Lucey et Singh, 1998a). Lorsque le pH atteint une valeur de 5.0, l'agrégation des micelles s'accroît et certaines vont même fusionner entre elles. Le phénomène se poursuit jusqu'à la neutralisation complète de leurs charges au point isoélectrique, qui est atteint au pH de 4.6. À ce stade, les caséines sont dénaturées et peuvent donc subir un étirement, créant une matrice de gel tridimensionnelle avec enchevêtrement des protéines. Les liens qui relient les protéines entre elles sont faibles en énergie et sont constitués principalement de liaisons électrostatiques, hydrophobes et van der Waals (Tamime et Robinson, 1999; van Vliet et al, 1991). De façon générale, le processus de fermentation est d'une durée variant entre 3 et 6 heures. (Amiot et al, 2002; Lucey 2004).

Ce coagulum nouvellement créé donnera la consistance et la viscosité du produit (Brochu et al, 1984). Le caillé obtenu par acidification bactérienne possède certes une certaine consistance, mais ce type de gel demeure fragile, peu manipulable et risque de briser facilement, comparativement à un gel issu d'une coagulation enzymatique (Tamime et Robinson, 1999). Les composés contribuant à la saveur que l'on retrouve de façon typique suite à la fermentation sont l'acide lactique, l'acétaldéhyde, l'acide acétique, le diacétyl ainsi que certains acides gras volatils. Ces composés procurent respectivement les goûts sûr, légèrement acide, quelque peu vinaigré et avec goût léger de beurre (Hui et al, 2004).

1.2.5 Fermentation yogourt ferme vs yogourt brassé

C'est à l'étape de fermentation que les démarches doivent être entreprises selon que l'on désire obtenir du yogourt ferme ou encore du yogourt brassé. Les procédures employées détermineront le type de gel obtenu dans le produit fini.

Pour l'obtention d'un yogourt de type ferme, le mélange laitier est réparti directement dans les pots de vente après l'inoculation. La fermentation a ainsi lieu directement en pots, dans une chambre de maturation. Dans le cas du yogourt brassé, la totalité du mélange laitier est entreposée dans un réservoir maintenu à température de fermentation appelé maturateur (Yildiz, 2010). Lorsque le pH atteint 4.6 ou le niveau d'acide lactique a atteint 0.9% (Tamime et Robinson, 1999) la fermentation est stoppée en diminuant la température. Une action mécanique d'agitation à l'intérieur du maturateur est alors amorcée, préalable à l'étape de lissage du yogourt.

1.2.6 Refroidissement et transport

Au terme de l'incubation, un refroidissement à une ou deux phases est effectué. Dans le cas d'un refroidissement à une phase, il y a abaissement rapide de la température à moins de 10°C. Ce processus, généralement entrepris en fabrication de yogourts fermes, est réalisé en transférant les pots dans une chambre réfrigérée, ou peut être accéléré par le passage dans un tunnel de refroidissement. Un refroidissement à deux phases est quant à lui plutôt adapté pour la production de yogourts brassés. Il requiert une diminution de la température à environ 20°C pour effectuer les étapes de brassage, de lissage, d'addition des fruits (s'il y a lieu) et de conditionnement en pots. Le brassage mécanique du yogourt force la dispersion des particules de gel dans le sérum. L'étape de lissage, quant à elle, oblige le caillé à passer par une pompe, ce qui permet de détruire les grumeaux pour ainsi donner un gel lisse. Or, des liens seront rapidement reformés de façon à former un gel faible qui reprendra de la consistance durant les premiers jours d'entreposage (Tamime et Robinson, 1999; Zoon, 2003). Un second stade de refroidissement inférieur à 10°C est effectué sur le produit afin de ralentir l'activité bactérienne des souches thermophiles et de contrôler le plus possible l'acidité du produit. L'étape de conditionnement et de mise en pots étant la dernière avant la réfrigération, elle n'est pas à négliger puisqu'elle doit assurer la salubrité du produit jusqu'au moment de la consommation. Une stérilisation des pots, au moyen de différents procédés, est donc souvent effectuée. Finalement, le produit sera transporté (habituellement par voie terrestre) aux différents points de vente, et ce toujours dans le souci de maintenir la chaîne de froid pour éviter toute altération du produit (Tamime et Robinson, 1999).

1.3 Principaux défauts de texture

La texture d'un aliment englobe tous ses attributs structuraux et rhéologiques, pouvant être analysés soit de façon mécanique ou sensorielle (Sodini et al, 2004). Visuellement, le yogourt devrait présenter une texture brillante, lisse, uniforme, et exempte de grains (Tamime et Robinson, 1999). Malgré des efforts concertés et un contrôle rigoureux des procédés de fabrication, il n'est pas rare d'observer des variations dans la texture des yogourts. Les causes possibles de l'apparition de défauts sont diverses: changement des conditions d'incubation (température et/ou durée), un débalancement des ferments modifiant le développement d'acide ou le profil de post-acidification, un manque de consistance du mélange laitier (niveau de protéines), une activité protéolytique de certaines souches psychrophiles, la présence d'enzymes dans le lait, l'utilisation de stabilisants (les polysaccharides végétaux) ou encore de souches productrices d'exopolysaccharides (Lucey, 2004).

1.3.1 Synérèse

L'un des défauts le plus apparent et le plus fréquemment retrouvé dans le yogourt est la synérèse (Lucey, 2004). Phénomène indésirable, la synérèse se traduit par une expulsion du lactosérum de la matrice protéique, qui tend alors à remonter en surface du gel (Amatayakul et al, 2006a). Ce défaut est directement remarqué par le consommateur lors de l'ouverture d'un pot de yogourt. Or. La présence de lactosérum dans le produit est souhaitable puisque c'est à celui-ci que l'on doit la texture semi-solide et la viscosité du yogourt. C'est aussi pourquoi, en fabrication de yogourt, aucune étape d'égouttage n'est effectuée, contrairement à la fabrication fromagère, ou celle-ci permet la séparation du lactosérum du caillé (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). Par conséquent, et ceci dans le but d'obtenir une viscosité recherchée, la matrice doit posséder la capacité à emmagasiner et retenir ce liquide.

La synérèse se présente sous deux formes, soit spontanée (endogène) ou encore provoquée. La synérèse est dite spontanée lorsque le lactosérum remonte en surface du yogourt à la suite de son expulsion du gel par la force de contraction de la matrice protéique. Cet événement peut avoir lieu soit au cours de la phase de gélification ou encore lors de l'entreposage (Lucey, 2001; van Vliet et al, 1991). Par opposition, la synérèse provoquée fait référence au lactosérum apparent suite à l'application d'une force externe sur le gel. À l'échelle moléculaire, deux mécanismes peuvent être à l'origine des défauts de synérèse. Le premier est dû à la relaxation des liens intermoléculaires protéines-protéines, induite par le mouvement thermal. La seconde se manifeste suite à un stress interne dans la matrice. Le mouvement Brownien, ou encore la déformation des filaments et des liaisons entre les protéines, créent un rapprochement du réseau. Du même coup, le gel tend à se refermer sur lui-même. Ceci cause donc une pression endogène sur le lactosérum et induit la synérèse (van Vliet et al, 1991).

Divers changements dans les procédés de fabrication peuvent être responsables des défauts de synérèse. Ils peuvent survenir par exemple lorsque la fermentation est trop rapide ou que la température d'incubation est trop élevée. Le résultat obtenu est un réseau protéique grossier avec de larges pores renfermant le sérum et pouvant mener à l'expulsion de celui-ci (Green, 1989; Lagoueyte et al, 1994). Une standardisation du mélange laitier inadéquate, reflétée par une teneur faible en solides totaux, peut aussi induire la séparation du sérum à la structure solide. L'homogénéisation du mélange, de par son effet stabilisant sur les protéines, permet de prévenir ce type de défauts. Une suracidification du produit ou un bris de la chaîne de froid contribuent aussi à l'apparition de la synérèse (Lamontagne, 2002). Afin d'évaluer le

taux de synérèse d'un yogourt, les méthodes couramment utilisées sont le drainage ou encore la centrifugation (Van Vliet et al. 1991).

1.3.2 Autres défauts de texture

Les défauts de texture font allusion principalement à la fermeté (ou consistance) du gel ainsi qu'à sa viscosité. Une fermeté inadéquate se traduit par une texture trop molle ou à l'inverse trop ferme, un manque d'onctuosité ou encore une sensation granuleuse ou sableuse au palais (Lamontagne, 2002). La viscosité du gel, qui se définit comme la capacité de résister à la déformation (Duboc et Mollet, 2001), donne une consistance de pouding au yogourt lorsqu'elle est trop élevée, ou à l'inverse se traduit par un gel beaucoup trop liquide lorsqu'elle est faible. En général, si le niveau de solides du lait est élevé, il en sera de même pour la viscosité et la fermeté du gel (Becker et Puhan, 1989; Guirguis et al, 1984). L'apparition de l'un ou l'autre de ces défauts de texture peut être causée par une formulation inadéquate du mélange laitier, une température de pasteurisation ou un traitement thermique déficient, un déséquilibre des ferments ou des stabilisants ajoutés, une température d'incubation inadéquate, ou un brassage insuffisant dans le cas des yogourts brassés (Hui et al, 2004).

Plusieurs solutions ont été proposées afin d'éliminer les défauts décrits plus haut. Comme la texture d'un yogourt dépend des matières premières utilisées, des procédés de fabrication ainsi que des conditions d'incubation, différentes approches technologiques peuvent être appliquées en industrie sur l'un ou l'autre de ces facteurs afin d'en arriver à la texture souhaitée. Parmi celles-ci, on note l'élévation des solides du produit soit par l'addition de gras, de protéines, de sucres comme le glucose ou le fructose, ou encore l'addition d'agents stabilisants (Shah, 2003). Ces derniers sont des polysaccharides d'origine végétale ou algale tels que la pectine, l'amidon, l'alginate, la carraghénane et la gélatine, une protéine animale. L'addition de tels stabilisants doit être permise par la législation et augmente les coûts de matière première. De plus, la tendance actuelle des consommateurs dans le marché du yogourt est axée sur un produit affichant une courte liste d'ingrédients, incluant donc le moins d'additifs possibles, et qui est réduit ou même exempt de matières grasses (Jolly et al, 2002).

1.4 Biocompatibilité

De façon ancestrale, les produits laitiers fermentés étaient réalisés à partir de laits crus coagulés, desquels une petite quantité de caillé était prélevée afin d'inoculer à nouveau un lait cru frais pour réamorcer le processus. À cette période, les «ferments» issus des laits coagulés étaient composés d'un important nombre de souches bactériennes et peu d'informations étaient

détenues sur celles-ci. Aujourd'hui, une gestion plus étroite et rigoureuse des ferments est appliquée, et ce dans le but d'optimiser les courbes d'acidifications durant la fermentation et ultimement de posséder un meilleur contrôle des flores. Ainsi, les ferments lactiques modernes contiennent souvent 2 ou 3 souches, tout au plus (Champagne, 1998). Des cultures pures d'un seul microorganisme sont aussi retrouvées sur le marché.

L'emploi d'une combinaison de ferments à des fins de fabrication de produits laitiers nécessite une connaissance et une compréhension des interactions possibles entre ceux-ci. L'étude de ces interactions a permis d'observer des phénomènes favorables de coopération (aussi nommée association ou encore symbiose) et d'autres de compétition, constituant dans ce cas une interaction négative. Les interactions de coopération regroupent les interactions de type commensalisme, mutualisme et protocoopération. La première se définit par un organisme qui tire avantage d'un second qui lui, n'en est pas affecté; la seconde est une relation obligatoire, bénéfique aux deux partenaires. La troisième se définit comme la précédente, mais est non-obligatoire. Les interactions négatives, quant à elles, incluent l'amensalisme (production d'un composé par un organisme qui soit nuisible pour un second organisme), la compétition (deux organismes luttant pour la même ressource), la prédation (un organisme en attaque ou en engloutit un second) et le parasitisme (un organisme tirant profit de l'autre, ce second en étant affecté). Le neutralisme est quant à lui un phénomène qui s'observe lorsqu'aucune des deux souches n'a d'incidence sur la croissance de l'autre.

1.4.1 Interactions de coopération

Une interaction de coopération survient lorsqu'il y a stimulation de la croissance d'une espèce bactérienne suite à la production ou la libération de métabolites particuliers dans le milieu (acide lactique, arômes, disponibilité de composés azotés, etc.) par une première espèce. Ce type d'interaction peut aussi être observé lorsque la croissance d'une première espèce apporte des modifications au milieu (changement du pH, éliminations de facteurs inhibiteurs, etc.), le rendant ainsi favorable à la croissance d'une seconde espèce (Juillard *et al*, 1987). Un bon exemple de ce type d'interaction est retrouvé chez les souches utilisées pour la production de yogourt. En effet, on observe que le profil d'acidification est nettement optimisé lorsque les bactéries *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* se développent conjointement plutôt qu'indépendamment. Tel que mentionné précédemment, les lactobacilles libèrent et fournissent des acides aminés et des peptides aux streptocoques, qui se mettent alors à croître très rapidement. Par la suite, la libération d'acide lactique, d'acide formique, de CO₂ et de pyruvate par les streptocoques stimule la croissance des lactobacilles acido-tolérants (Driessen *et al*,

1982). On croit même que la mort cellulaire de certains streptocoques libérerait des facteurs de croissance pour les lactobacilles (Champagne et al, 1992).

1.4.2 Interactions de compétition

Alors qu'un apport exogène d'acides aminés ou de fractions peptidiques peut moduler de façon positive la croissance d'une souche lorsque combinée à une autre, il peut arriver que la production de bactériocines, d'antibiotiques, le rejet de produits amenant à modifier les conditions physico-chimiques du milieu ou encore la compétition vis-à-vis le substrat soient, à l'inverse, à l'origine des interactions de compétition (Juillard et al, 1987). Ainsi, il est possible qu'une souche bactérienne nuise ou encore inhibe complètement la croissance d'une seconde souche. Sommairement, la présence d'une interaction de coopération des souches du yogourt se traduit par une acidification plus rapide et une obtention plus probable des propriétés rhéologiques recherchées. L'obtention d'un résultat inverse signifie la présence d'une interaction de compétition. Une validation de la biocompatibilité peut être effectuée par l'étude de cinétiques de croissance des bactéries, d'étude comparée de l'acidification, ou par l'évaluation des métabolites produits (Juillard et al, 1987). Les techniques utilisées se résument en des tests antagonistes sur milieu gélose, ou plus récemment en utilisant la spectrophotométrie automatisée (Champagne et al, 2009). Cette dernière méthode consiste à inoculer une culture bactérienne d'intérêt dans le surnageant acellulaire récupéré d'une première culture bactérienne. La croissance de la souche est observée par le degré de turbidité, mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (Vinderola et al, 2002). Cette technique détermine si une souche libère ou non des facteurs de croissance pouvant être utilisés par d'autres cultures, et permet de comparer le niveau de compatibilité entre les souches.

Partie 2 : Transglutaminase

Après avoir étudié les différents domaines d'utilisation des microorganismes, dans les industries en général puis dans les industries agro-alimentaires, nous allons maintenant présenter les pistes de recherches directement envisageables pour la technologie laitière. Nous nous intéresserons à la possibilité de remplacer un additif chimique par un opérateur microbien. Les additifs utilisés à l'heure actuelle en industrie agroalimentaire permettent d'améliorer les qualités organoleptiques des produits et ont de forts potentiels. Depuis de nombreuses années un additif récurrent est utilisé dans l'industrie des produits carnés, la Transglutaminase.

2.1 Les nouvelles technologies appliquées aux modifications des caractéristiques des aliments

Ces technologies sont a priori prises en compte par la réglementation du paquet « agents d'améliorants » (règlements additifs, arômes, enzymes et procédure d'autorisation) ou par la réglementation « Novel Food ». Les détails relatifs à ces textes réglementaires sont exposés dans la suite de ce document.

2.1.1 Nouvelles technologies appliquées aux enzymes

Les systèmes enzymatiques introduits lors de la fabrication des aliments ont pour objectif de protéger (par exemple avec l'utilisation de lysozyme dans les fromages ou de lactoperoxydase dans les saumures de saumon fumé), de faciliter les procédés technologiques (addition d'amylases, de pullulanases, ou de pectinases dans les jus de fruits ou les boissons, par exemple), d'améliorer la qualité organoleptique du produit (utilisation de lipases, xylanases ou lipoxygénases, en panification par exemple), ou encore d'améliorer la présentation (transglutaminases). Ces enzymes peuvent être extraites de ressources animales ou végétales (présure, papaine) (Beatrice et al ., 2009).

Elles sont majoritairement produites à partir de microorganismes, non OGM, OGM auto clonés, ou encore OGM avec un gène synthétique (issu d'une autre espèce mais bénéficiant des apports de l'ingénierie protéique). Pour ces enzymes « OGM », outre le dossier toxicologique conventionnel, il importe de connaître le mode de construction de la souche, et la séquence de l'insertion génétique. Il faut également vérifier que seul le gène d'intérêt est inséré, ainsi que l'absence d'ADN recombinant dans la préparation finale. Les enzymes, notamment issues de micro-organismes OGM, sont très largement utilisées dans les industries alimentaires (Beatrice et al ., 2009).

2.2 LA Transglutaminase et sa production

Les additifs utilisés à l'heure actuelle en industrie agroalimentaire permettent d'améliorer les qualités organoleptiques des produits et ont de forts potentiels. Depuis de nombreuses années un additif récurrent est utilisé dans l'industrie des produits carnés, la Transglutaminase est une enzyme composée de chaînes d'acides aminés simples et son action est de « souder » des aliments riches en protéines tels que les viandes, les volailles, les poissons et les fruits de mer mais aussi les produits laitiers. Il est ainsi possible par exemple de souder différentes petites pièces de viandes pour en faire une plus grosse et permettre une meilleure uniformité de cuisson ou un type de présentation différent et appétissant.

La Transglutaminase produite par fermentation a été découverte en 1987. En 2008, l'utilisation d'enzyme était autorisée en Europe, en 2009 l'application dans les denrées alimentaires évaluée par la réglementation 1332/2008 (Catalin et al ., 2009). La transglutaminase est une enzyme qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre des groupements amines libres (ex. : Lysines) et le groupement gamma-carboxamide des glutamines. Les liaisons formées par la transglutaminase montrent une grande résistance à la protéolyse. Elle peut donc permettre de lier des protéines vigoureusement (Catalin et al ., 2009).

La transglutaminase est une aminocytétransférase qui catalyse la réaction glutamine protéique + alkylamine N5-alkylglutamine + NH₃, souvent appelée «coller à viande» (Catalin et al ., 2009).

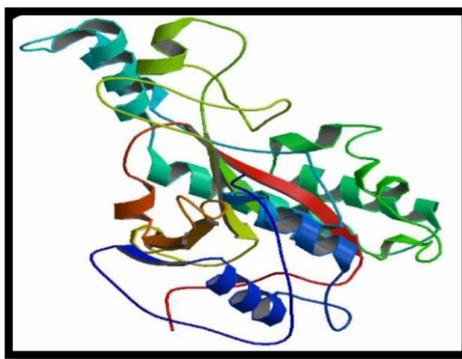


Figure 01 : la structure 3D de Transglutaminase.

2.3 Origine

En industrie alimentaire, la Transglutaminase utilisée est issue d'une fermentation bactérienne. Cette Transglutaminase est classée par la Food and Drug Administration comme un produit GRAS (généralement reconnu comme sains). C'est donc un additif considéré comme sans danger pour les consommateurs.

C'est *Streptomyces mobaraense*, anciennement *Streptoverticillium mobaraense*, qui excrète cette enzyme. Il y a plusieurs fabricants, notamment AJINOMOTO (Japon) et BDF INGREDIENTS (Espagne) qui vendent cette enzyme pure sous forme de poudre. Pour information, cette enzyme est vendue au prix de 50 euros le kilo environ. La Transglutaminase est désactivée par la plupart des techniques de cuisson et ne confère aucune saveurs aux aliments. Elle est donc indétectable par le consommateur. Son action peut être contrôlée précisément lors d'un process industriel. En effet, les variations de température vont pouvoir l'activer, l'inhiber voire la dénaturer (Yokoyama.K et al ., 2009)

2.4 Un point sur La Législation

Le règlement 1332/2008 (EC) est entré en vigueur en Janvier 2009. Il réglemente l'utilisation des enzymes en alimentation humaine, dans l'Union Européenne. Ce règlement vise, entre autres, à établir une liste positive des enzymes autorisées pour une utilisation alimentaire, après une évaluation de l'EFSA, l'autorisation par la Commission et un vote par le Parlement. La Transglutaminase sera parmi les enzymes à être évaluées. Tant que la liste positive n'a pas été établie, les enzymes alimentaires et les aliments utilisant

des enzymes alimentaires pourront être mis sur le marché et utilisés en conformité avec les règles nationales en vigueur dans les États membres. Selon Le règlement n°258/97, communément appelé « Novel Food ». Comme étant ceux qui correspondent aux deux critères suivants :

_ Leur consommation est restée négligeable dans les pays de l'Union européenne avant mai 1997.

_ Ils relèvent des catégories suivantes :

_ Les aliments ou ingrédients qui présentent une structure moléculaire primaire nouvelle, ou délibérément modifiée.

_ Les aliments ou ingrédients qui sont composés de micro-organismes, de champignons ou d'algues isolés à partir de ceux-ci.

_ Les aliments ou ingrédients qui sont composés de végétaux, ou isolés à partir de ceux-ci, ou d'ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux, à l'exception des aliments et des ingrédients alimentaires obtenus par des pratiques de multiplication ou de reproduction traditionnelle et dont les antécédents sont sûrs en ce qui concerne l'utilisation en tant que denrées alimentaires, ou

_ Les aliments ou ingrédients auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé, lorsque ce procédé entraîne dans la composition ou dans la structure des aliments ou des ingrédients alimentaires des modifications significatives de leur valeur nutritive, de leur métabolisme ou de leur teneur en substances indésirables.

2.5 Les caractéristiques de l'enzyme

La Transglutaminase est une enzyme qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre des groupements amines libres (ex. : lysines) et le groupement gamma-carboxamide des glutamines. Les liaisons formées par la transglutaminase montrent une grande résistance à la protéolyse.

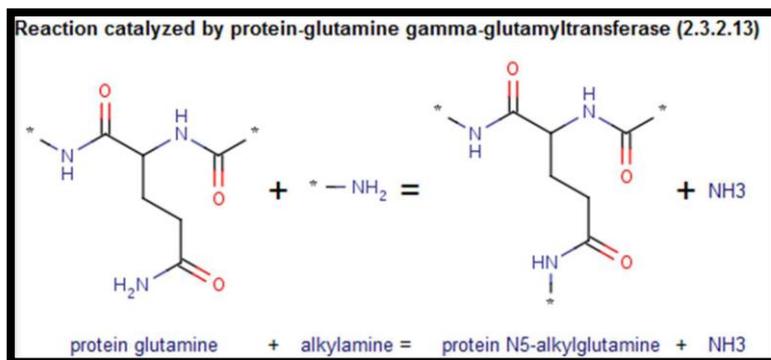


Figure 02: texturation enzymatique de la Transglutaminase.

Elle peut donc permettre de lier des protéines vigoureusement. Elle est naturellement présente chez les végétaux, animaux et bactéries. Chez l'homme il en existe 8 sortes qui sont indispensables à l'organisme pour former des barrières et structures stables. Elle est impliquée dans la coagulation du sang, la synthèse de peau et de cheveux. Ainsi la Transglutaminase forme des polymères de protéines généralement insolubles (Gianfrani C et al., 2005).

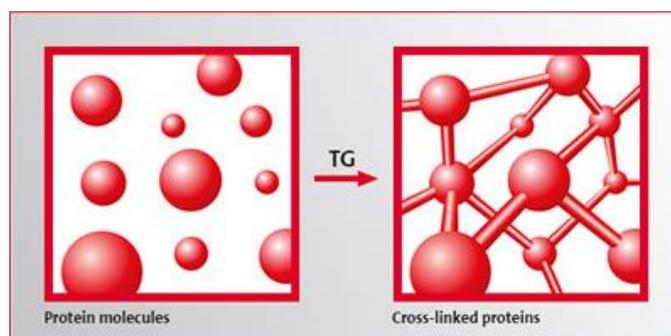


Figure 03 : cross-linked des protéines.

On peut aussi relever qu'elle a un faible poids moléculaire, son pH optimum d'activité est compris entre 5 et 8, sa température optimale est de 55°C et elle est inactivée à 70°C (Gianfrani C et al., 2005).

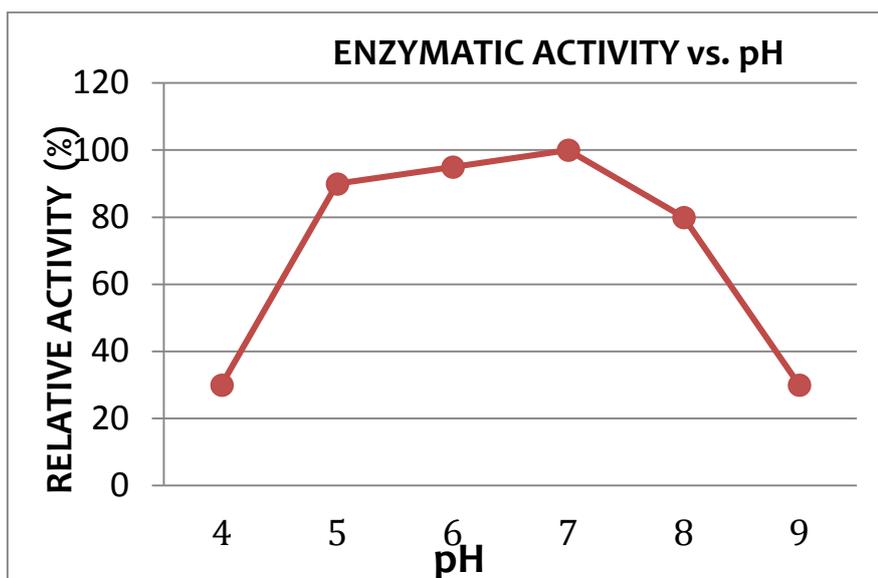


Figure 04 : Activité de la Transglutaminase en fonction du pH.

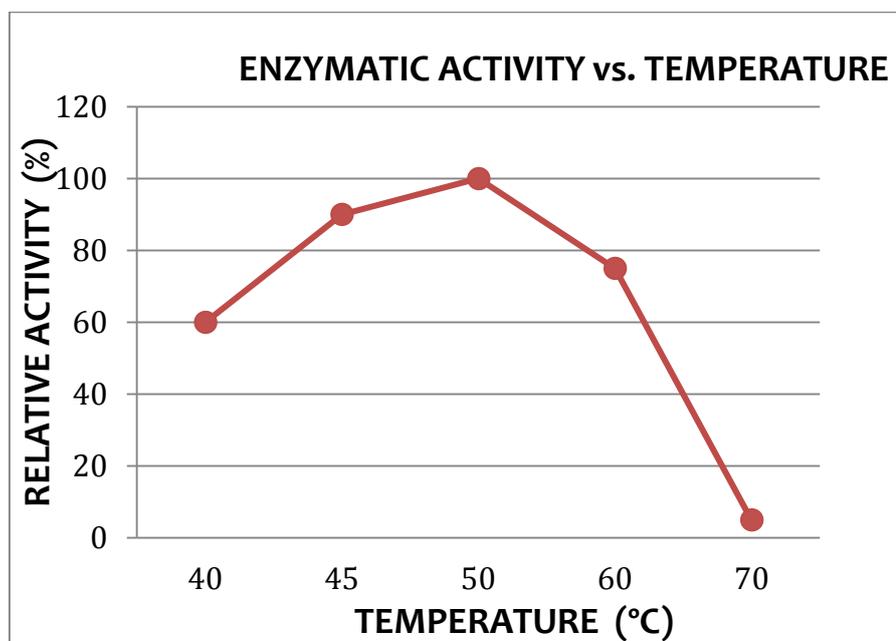


Figure 05: Courbe de l'activité enzymatique de la Transglutaminase en fonction de la température.

La Transglutaminase est isolée de *Streptovercillium mobaraense*, elle renferme 331 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 37, 86 kDa et une fonction thiol libre. C'est une structure monocaténaire non glycosylée bien que renfermant 2 sites potentiels de glycosylation. Le pH optimum d'activité est compris entre 6 et 7 et stable sur une gamme de pH allant de 4 à 9. L'enzyme est indépendante de la concentration en calcium (contrairement à la Transglutaminase isolée du foie) ceci est un avantage quand on travaille avec des caséines, sa

température optimale d'activité est de 50C° mais elle est capable d'agir à des températures de l'ordre de 10C°. Elle est dénaturée à 70C° (Catalin et al., 2009).

La Transglutaminase est une enzyme qui permet d'effectuer les réactions selon la figure suivante :

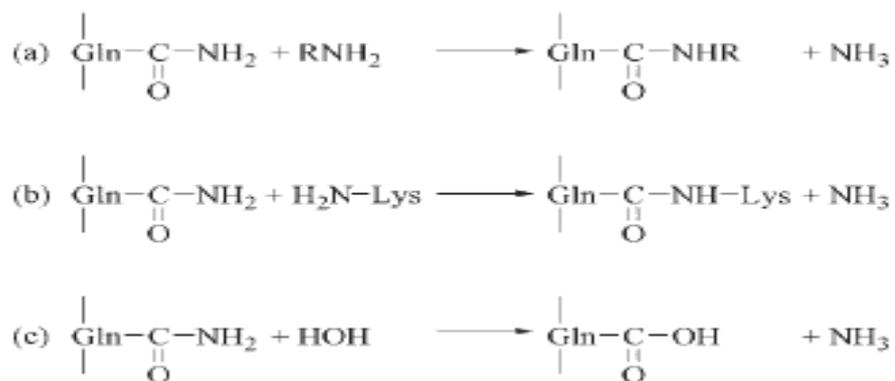


Figure 06 : Mode d'action de la Transglutaminase (Catalin et al., 2009).

La fonction carboxamide de la glutamine s'échange avec une fonction amine d'un acide aminé (transfert de radicaux acylés), la fonction ε NH₂ d'une lysine ou une amine biogène provenant des réactions de décarboxylation (réaction de réticulation). Cette réaction n'est possible que dans la mesure où la fonction carboxylique est bloquée sous la forme ester ou amide de façon à éliminer la charge négative exprimée par la fonction acide (Catalin et al., 2009).

La fonction carboxamide de la glutamine réagit avec une molécule d'eau pour donner une réaction de désamination en générant le glutamate. Cette enzyme est utilisée pour donner des aspects fermes à certains produits ou pour fabriquer une structure tridimensionnelle à partir de solution de protéines dans le secteur des produits carnés, des produits de la mer, des produits laitiers et des produits végétaux.

La méthode utilisée pour déterminer l'activité de la Transglutaminase c'est l'hydroxamate, ainsi la méthode de chromatographie ou HPLC (Catalin et al., 2009).

2.6 Les effets de l'enzyme

Cette enzyme a plusieurs effets et peut être utilisée pour différents aliments qui sont résumés dans le tableau suivant (Yokoyama.K et al ., 2009):

Tableau 01: l'utilisation de la Transglutaminase en industrie agro-alimentaire.

Produits	Effets
Viandes carnés	Relie les morceaux de viande carnés à haute valeur ajoutée.
Saucisses, jambons, saucissons secs	Normalisation des produits, minimisation des déchets.
Poissons	Restructure les parures de poissons produites lors du filetage.
Yaourts	Augmente la viscosité, améliore l'onctuosité pour les yaourts pauvres en matière grasse, diminue la synérèse, joue le rôle de stabilisant.

Pour les viandes, cette enzyme permet d'associer plusieurs morceaux ce qui a pour but d'améliorer la valeur ajoutée du produit. Pour les produits de salaisons elle permet une normalisation des produits ce qui est recherché par le consommateur. Cette normalisation permet un traitement homogène du produit tout au long du processus mais aussi une facilitation lors de sa manipulation ou de son tranchage par exemple. Le poids et la forme étant toujours identiques, ceci permet aussi d'optimiser les calculs de coûts. Cette enzyme peut valoriser les déchets dans le cas des poissons qui peut induire une ressource non négligeable (Yokoyama.K et al ., 2009).

Enfin, pour Les yaourts, elle améliore leurs qualités organoleptiques par une texture plus onctueuse. Elle peut être aussi utilisée dans de nombreux autres cas comme l'épaississement des jaunes d'œufs, pour renforcer les mélanges de pâte, produire des effets spéciaux comme les pâtes vermicelles de viande et de légumes (à l'aide de gélatine comme liant) ou en cuisine moléculaire (saucisses sans boyaux) etc.(Yokoyama.K et al ., 2009).

Matériel & Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée en partie au niveau du laboratoire de Micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé. De l'université de Mostaganem ; ainsi qu'au laboratoire BDF Natural ingrédients S.L. de l'Université de Gérone en Espagne. Où on a eu recours aux matériels et aux méthodes décrites ci-après.

II.1 Matériel

II.1.1 Matière première

Ce travail a nécessité l'utilisation de plusieurs types de lait, nous avons en premier utilisé du lait cru demi-écrémé de la marque LETONA (espagnole). Ensuite nous sommes passés à l'utilisation de lait en poudre à 26% de matière grasse de la marque fronterra nouvelle Zélande, et à 0% (MG) (armor ingrédient France). Deux marques de ferment ont été utilisées ; la culture L903 de Chr. Hansen et la culture LCD 44 de BDF Ingrédients. L'Object principal de cette étude à savoir la Transglutaminase a été également fournie par BDF Ingrédients ; il s'agit du PROBIND CH 2.0.

II.1.2 Appareillage

Les appareils utilisés ont été fournis en majeure partie par le laboratoire du département technique de BDF NATURAL INGREDIENTS S.L ainsi que par le laboratoire commun du xParc Scientifique et Technologique de l'université de Gérone.

- Bain Marie (Memmert)
- Balance analytique à affichage digital (précision 0.001g) Radwag PS 600 R2
- Centrifugeuse réfrigérée Beckman Coulter « Avanti J-E »
- pH-mètre Hanna HI-2030-02 Edge
- Étuve Memmert
- Agitateur magnétique
- Mixeur sur socle
- Thermomix Vorwerk TM5
- Viscosimètre NDJ-8S (Shanghai Nirun Intelligent Technology Co., Ltd)

- Machine à emballage sous-vide à cloche W8
- Thermomètre de poche HANNA Instruments Inc. (HI 98501 Checktemp® Thermometer)
- Décompteur avec signal sonore Electronic Timer Clock
- Lave-vaisselle Miele G7783CD Dishwasher
- Chambre froide

Un certain nombre d'accessoire et de petit matériel spécifique ont été utilisés au cours de cette étude tels que : bécher, pipettes, dispositif de titration, verre de montre, Microtube Eppendorf, Tube à centrifuger gradué (plastique), ainsi que des flacons en verre et en plastique de différents volume.

II.2 Méthodes

II.2.1 Fabrication du yaourt

II.2.1.1 Préparation des laits

Les yaourts ont été réalisés à base de lait cru ou reconstitué qui aura préalablement subi un traitement thermique de pasteurisation à 95C° pendant 5 min à l'aide du Thermomix. Avant de laisser refroidir pour ensemercer a 45 C°.

Le lait en poudre a été reconstitué a un extrait sec total de 110 g/L et homogénéisé à l'aide d'un Thermomix à froid pendant 2 min.

Afin d'explorer l'effet de la Transglutaminase sur la qualité organoleptique du yaourt, des essaies ont été réalisés en incorporant l'enzyme « Probind CH2.0 » au moment de l'inoculation (après pasteurisation) ; à un taux de 0.3 g/L. les résultats de ce test seront en même temps comparés au témoin (yaourt sans Transglutaminase) et aux résultats obtenus par l'incorporation de l'amidon modifié à 1%, considéré comme l'additif classique; couramment utilisé pour améliorer la qualité organoleptique du yaourt.

Une série d'essaies a été réalisée notamment pour évaluer l'effet des deux additifs utilisés simultanément dans une même formule.

II.2.1.2 Fermentation

Après pasteurisation, le lait est refroidi jusqu'à 45C° ; température d'inoculation du ferment. Les souches *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* et de *St.thermophilus* serontensemencées a raison de 0.02%. Après homogénéisation le lait inoculé est versé dans des pots en verre de 100g et mis à l'étuve. La fermentation est effectuée dans une étuve thermostatée à 42C°. Des mesures du pH sont réalisées toutes les heures, ce qui permet de tracer la courbe du pH et de repérer le pH cible de 4,6 auquel l'incubation est arrêtée. Pour finir ; les yaourts sont refroidis et entreposés immédiatement a 5C° a l'intérieur de la chambre froide du laboratoire.

II.2.2 Analyses physico-chimiques du produit fini

II.2.2.1 Mesure du pH

Le principe de la pH-metrie consiste à mesurer la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence.

Le pH est déterminé directement en utilisant un pH-mètre électronique (figure1); après étalonnage de l'appareil, l'électrode est directement plongée dans la masse du produit à analyser (lait inoculé) après un temps de mesure la valeur du pH s'affiche.



Figure 07 : pH-Mètre électronique

II.2.2.2 Mesure de la viscosité

La viscosité des yaourts a été mesurée à 20C° avec un viscosimètre Brookfield NDJ-8S Shanghai Nirun Intelligent Technology Co., Ltd (figure 2) après 24H de conservation. Les yaourts ont été préalablement brassés à l'aide d'un mixeur sur socle pendant 2 min a force 1. La broche utilisée est la numéro 3 (spindle 3) avec 4 vitesses de rotation différentes (60 rpm, 30 rpm, 12 rpm et 6 rpm). La valeur de la viscosité est relevée sur l'écran après 1 min de rotation à l'aide d'un décompteur avec signal sonore (Electronic Timer Clock) pour l'homogénéité des résultats.

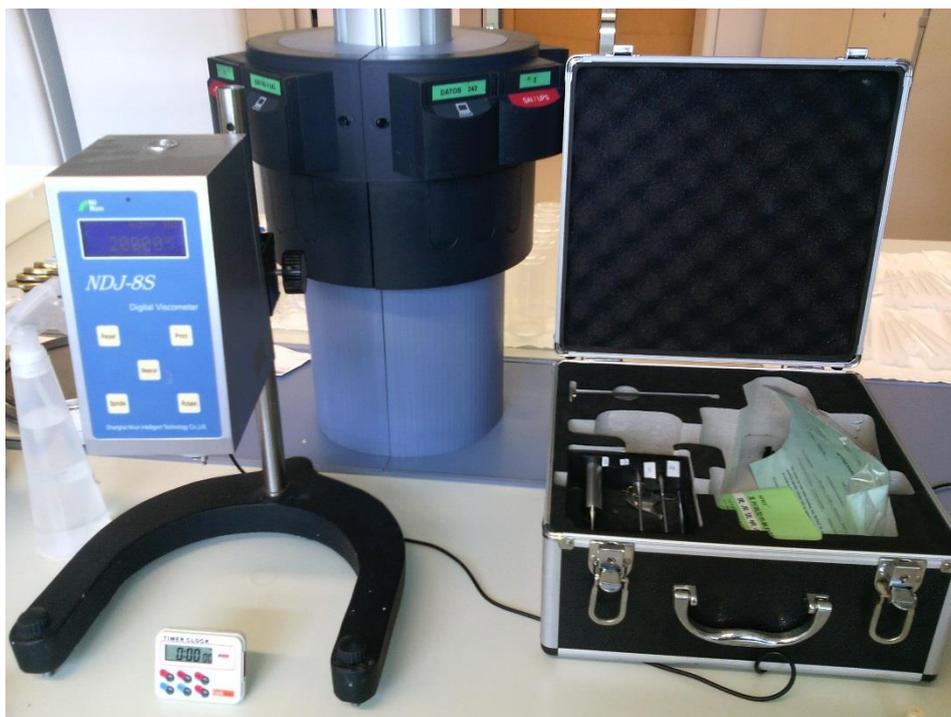


Figure 08 : Viscosimètre Brookfield

Le principe de mesure de la viscosité retenu par Brookfield est d'appliquer une force de mouvement à un produit en mettant en rotation à vitesse fixe, un mobile de taille fixe. La résistance du produit au mouvement de rotation du mobile est enregistrée à l'aide d'un ressort spiralé interne, puis convertie en unité viscosimétrique. Afin d'élargir les plages de viscosité mesurables, plusieurs mobiles, vitesses et types de ressort peuvent être utilisés.

II.2.2.3 Mesure de la synérèse

La synérèse a été mesurée suivant la méthode de Schoch (1968) décrite par Zheng et Sosulski (1998). Après brassage des yaourts ; les gels obtenus sont disposés dans des tubes à centrifuger à raison de 3 tubes par essai, les poids de chaque tubes à vide et après remplissage sont soigneusement notés. Avant d'être centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée Beckman Coulter Avanti J-E (figure 9) à 6000 trs/min à 10C° pendant 10 min. le surnageant dans chaque tube est recueilli et pesé, la synérèse est déterminée par le rapport de la masse d'eau séparée du gel après centrifugation sur la masse initiale du gel.



Figure 09 : centrifugeuse réfrigérante

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

1- Résultat de la mesure du pH

Les résultats obtenus lors du suivi du pH au cours du temps ne permettent en aucun cas de discerner un éventuel changement dans l'allure de la courbe. Puisque toutes les valeurs obtenues lors des différents essais s'inscrivent dans un intervalle très serré au voisinage de la courbe obtenue pour le témoin. Cette observation est valable pour les différentes formules réalisées (avec et sans TG, et avec et sans amidon) et reproductibles avec les différents laits utilisés (cru, 0% et 26% de M.G). Ce qui nous permet d'infirmar l'existence d'un impact quelconque de la Transglutaminase sur le métabolisme bactérien.

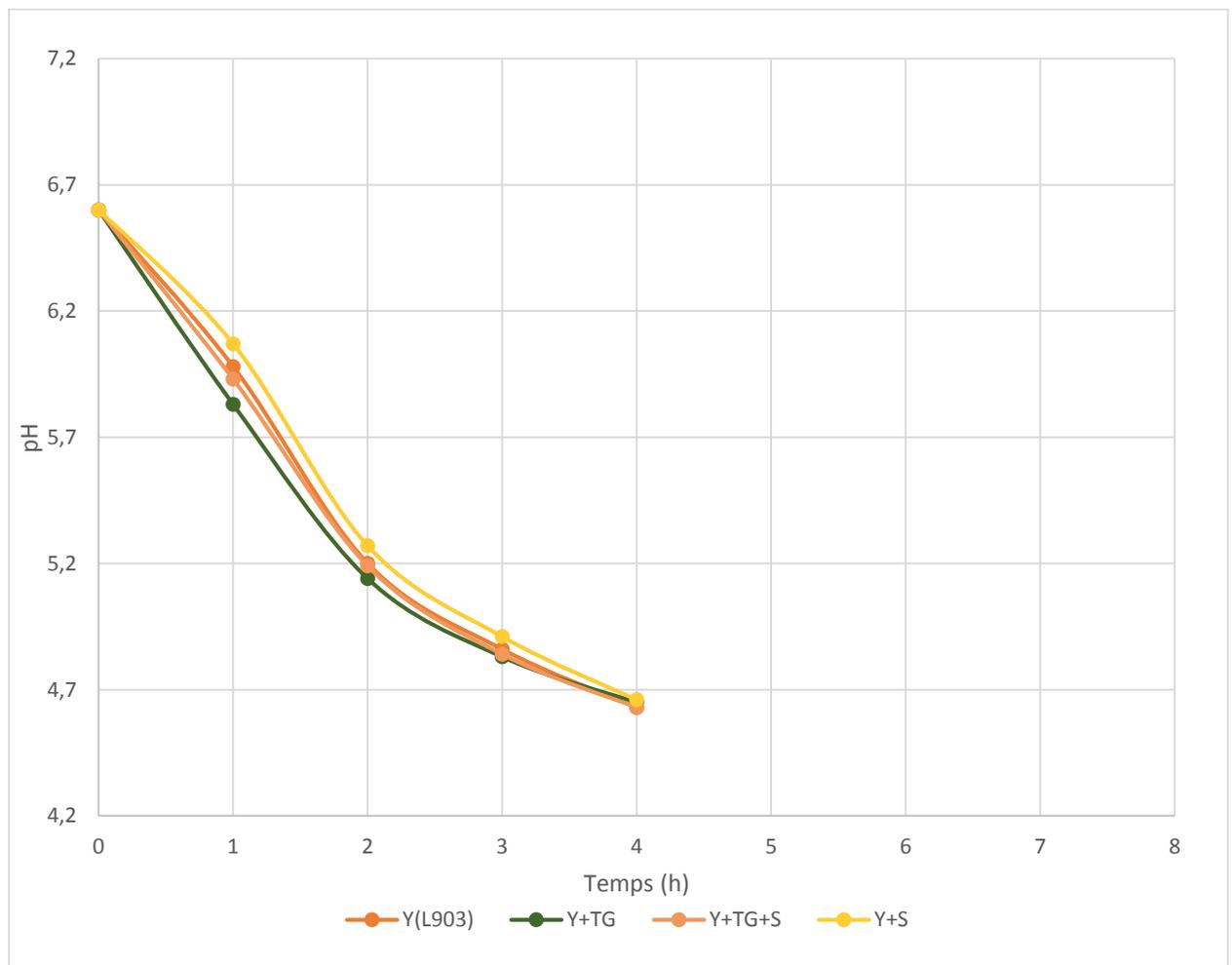


Figure 10 : Evolution du pH des yaourts à base de lait cru demi-écrémé

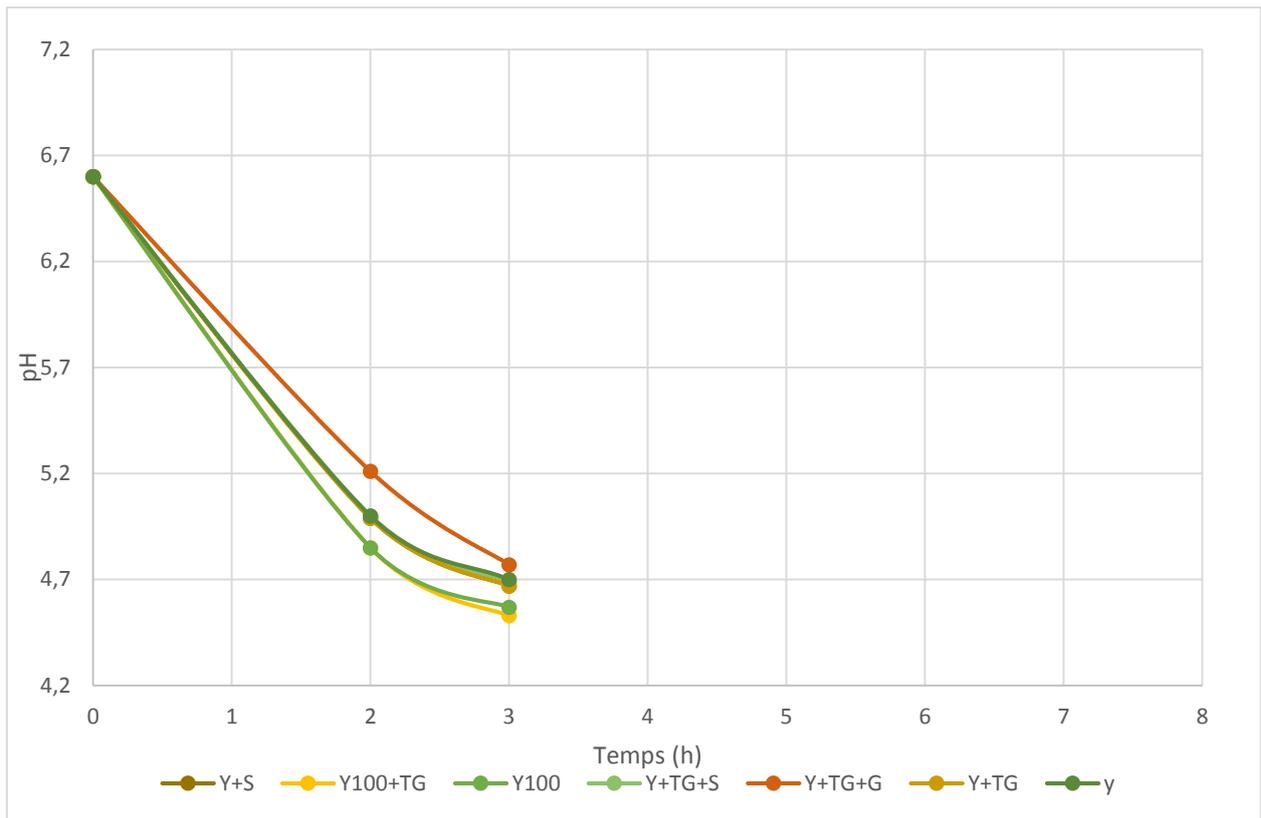


Figure 11: Evolution du pH des yaourts à base de lait écrémé reconstitué.

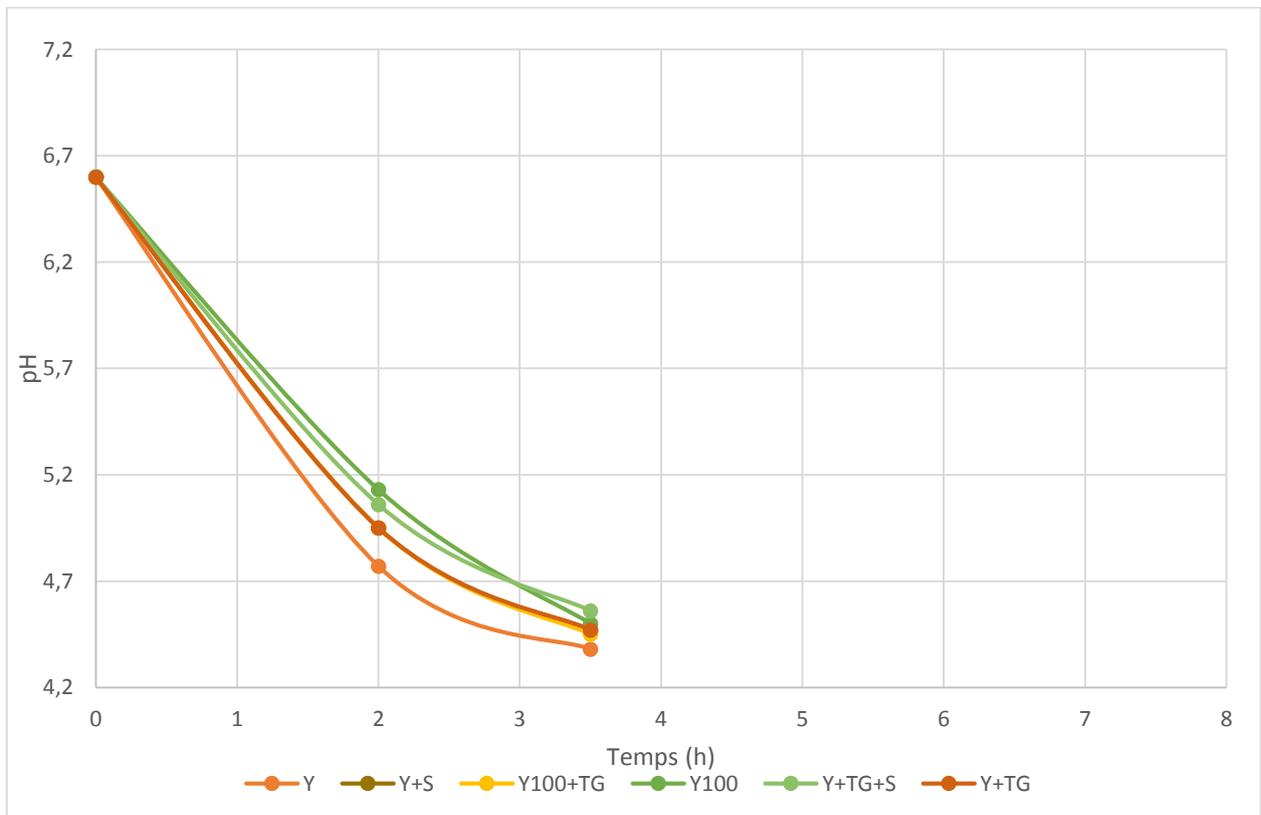


Figure 12 : Evolution du pH des yaourts à base de lait entier reconstitué.

2- Résultats de la mesure de la viscosité

Les différents tests réalisés montrent une homogénéité des résultats obtenus ce qui conforte l'hypothèse générale que la Transglutaminase améliore les paramètres rhéologiques du yaourt. On remarque à travers la lecture des résultats représentés par les figures 13, 14 et 15 qu'en présence de Transglutaminase on obtient de meilleures valeurs de viscosité par rapport au témoin (sans TG) et que cet effet est d'autant plus valorisé en jumelant les deux agents (TG et amidon modifié) dans la même formule. Ce qui est représenté schématiquement par les pics de viscosité obtenus (valeurs les plus importantes).

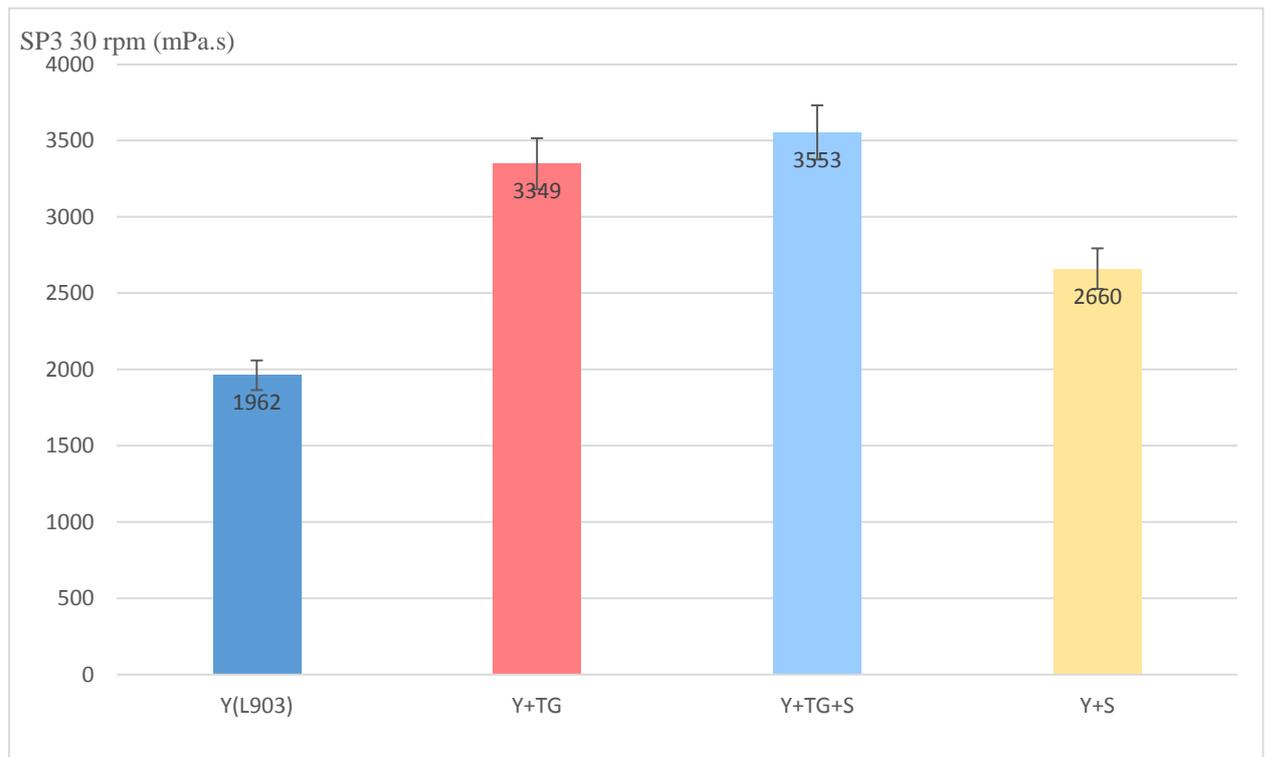


Figure 13 : Viscosité des yaourts à base de lait cru demi-écrémé

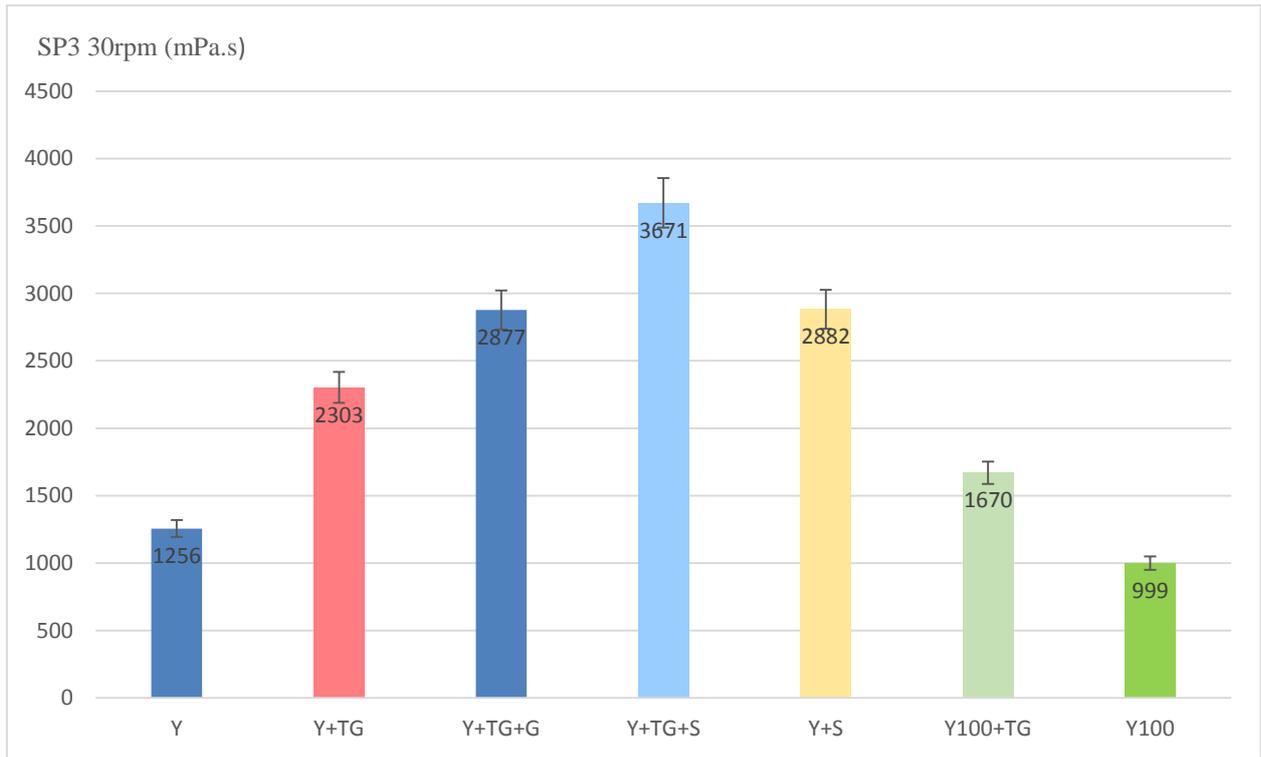


Figure 14 : Viscosité des yaourts à base de lait écrémé (0% MG) reconstitué.

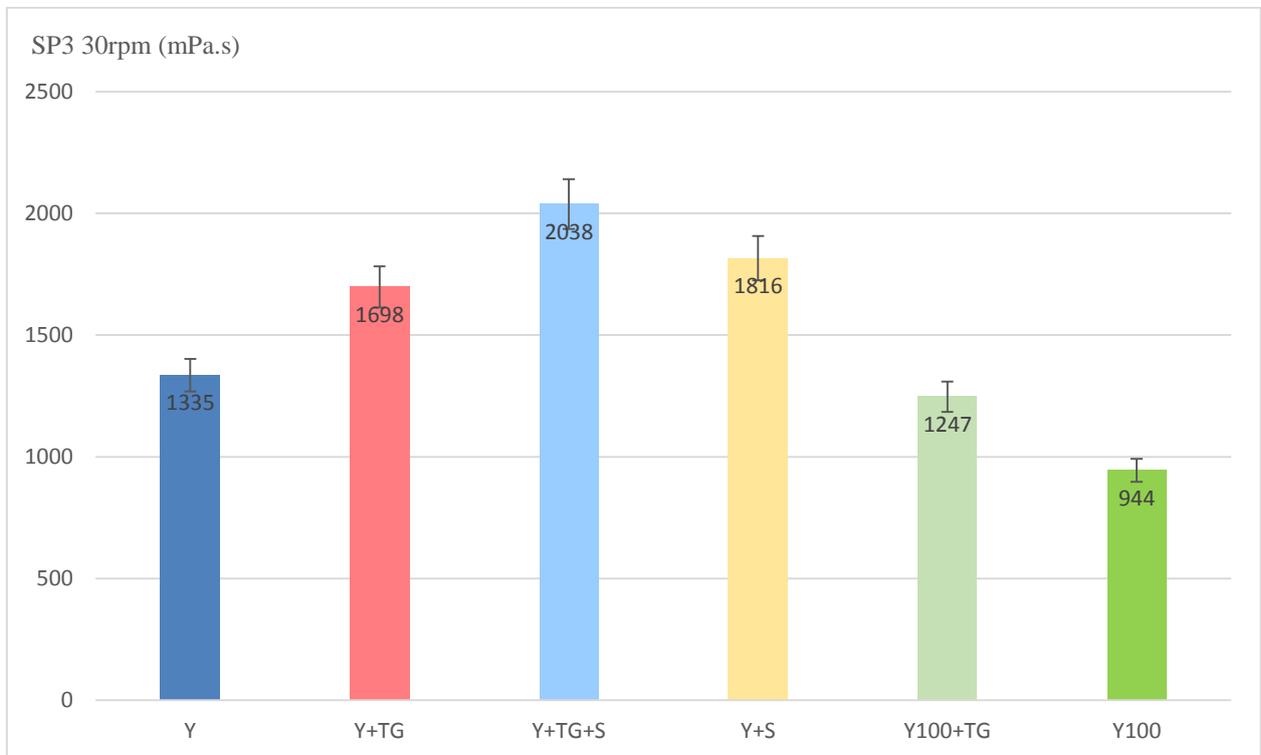


Figure 15: Viscosité des yaourts à base de lait entier (26% MG) reconstitué

Ce phénomène peut s'expliquer par les réarrangements protéiques, où les interactions-protéines-protéines sont catalysées par l'effet de l'enzyme. De ce fait, la viscosité du produit fini est d'autant plus importante que le réseau du gel soit plus dense.

3- Résultats de la mesure de la synérèse :

La mesure du taux de synérèse a permis de mettre à jour la relation existante entre ce paramètre et l'effet de la Transglutaminase. Au vu des résultats observés, il apparaît clairement que la TG agit en diminuant le taux de synérèse en comparaison au yaourt témoin (sans TG). Ce qui a été vérifié dans l'ensemble des formules testées.

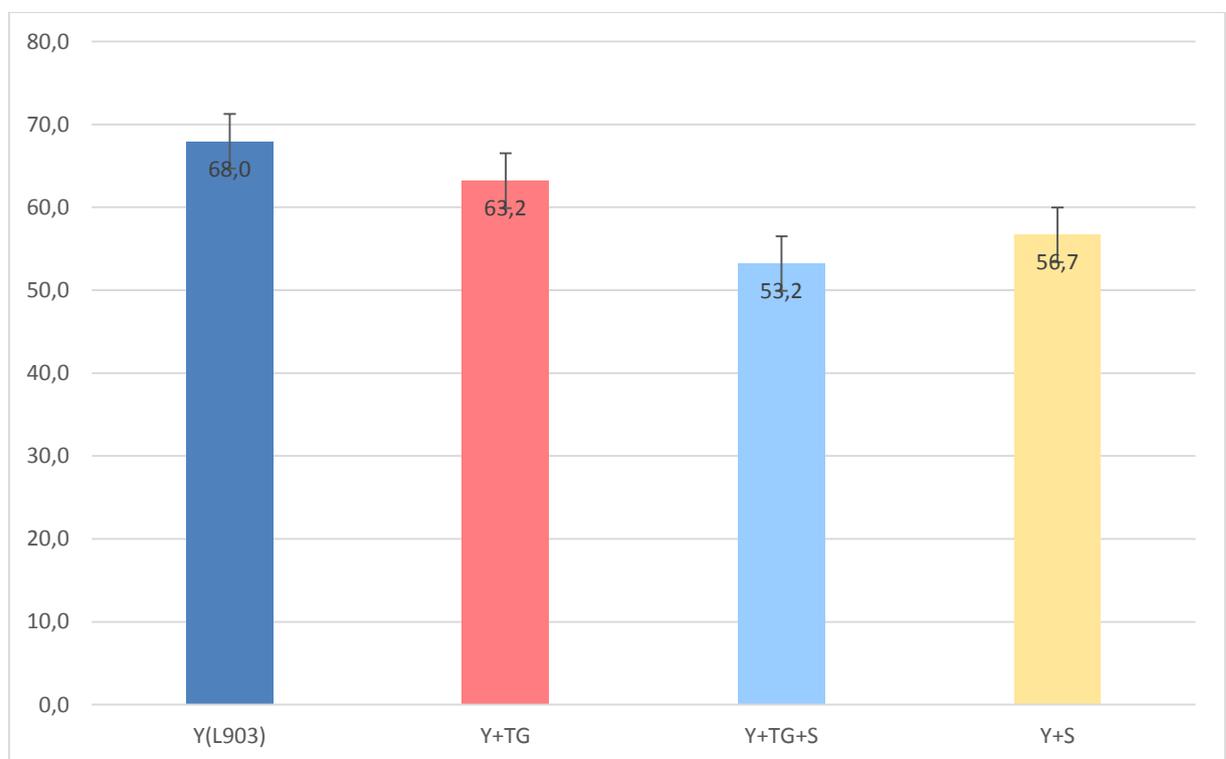


Figure 16 : Synérèse des yaourts à base de lait cru demi-écrémé.

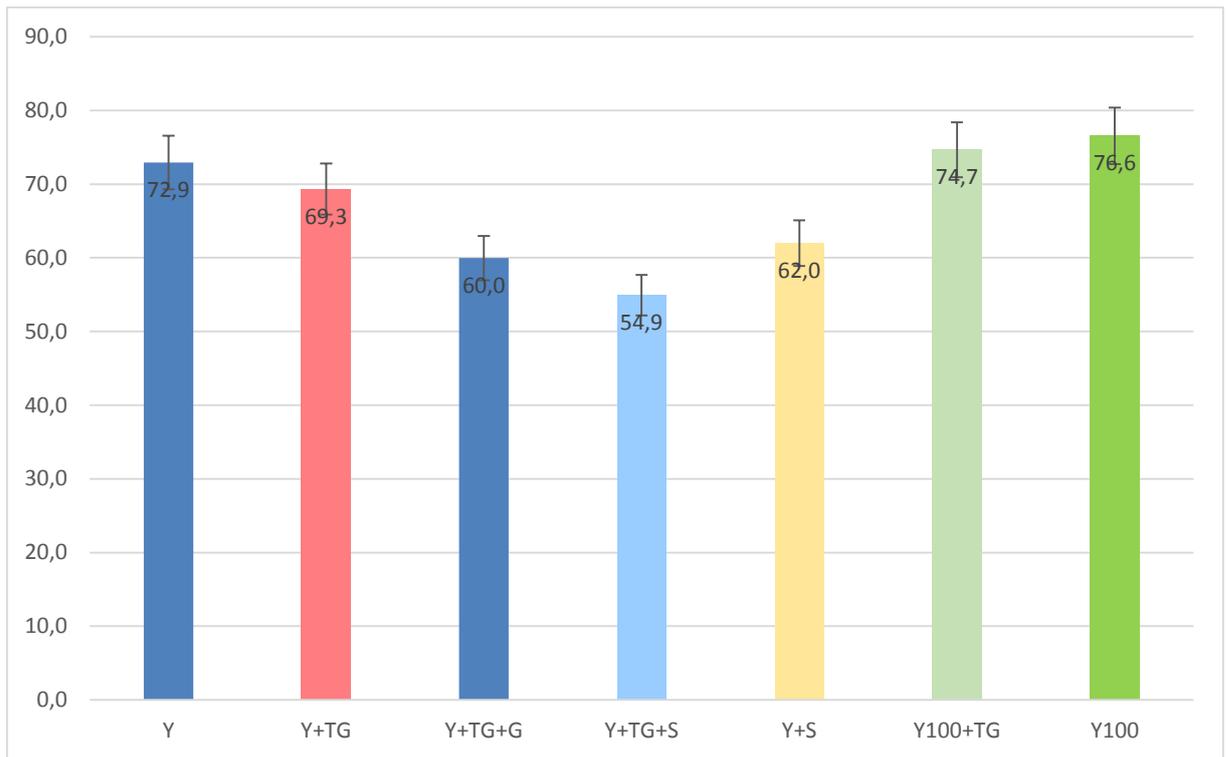


Figure 17 : Synérese des yaourts à base de lait écrémé (0% MG) reconstitué.

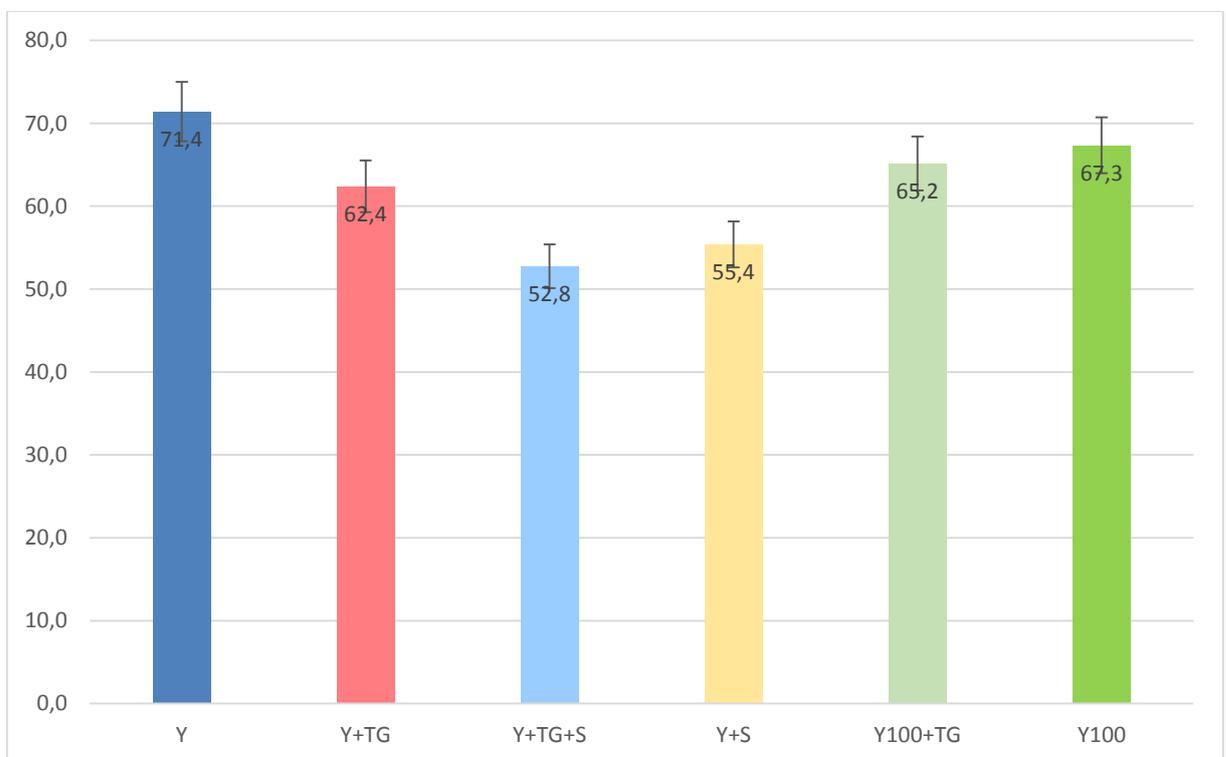


Figure 18 : Synérese des yaourts à base de lait entier (26% MG)

Selon ces résultats; nous pouvons conclure que la Transglutaminase agit en favorisant le « cross-linking » au sein du réseau du gel, ce qui se répercute par une meilleure rétention du lactosérum dans de la matrice protéique, le liquide se sépare donc plus difficilement de son gel ce qui réduit le taux de synérèse relevée.

Conclusion

Après avoir étudié les différents domaines d'utilisation des microorganismes, dans les industries en général puis dans les industries agro-alimentaires, nous avons présenté les pistes de recherches directement envisageables pour la technologie laitière. Nous nous sommes intéressés à la possibilité de remplacer un additif chimique par un opérateur microbien. Les additifs utilisés à l'heure actuelle en industrie agroalimentaire permettent d'améliorer les qualités organoleptiques des produits et ont de forts potentiels. Depuis de nombreuses années un additif est utilisé dans l'industrie des produits carnés, la Transglutaminase.

Un des objectifs principaux assignés à ce travail est d'explorer l'impact de cette solution enzymatique sur les propriétés organoleptiques d'un lait fermenté de type yaourt brassé. Les essais réalisés dans ce sens ont révélé que l'addition de cette enzyme améliore d'une façon très significative la viscosité et diminue le taux de synérèse des yaourts.

Le lait fermenté de type yaourt nature présente des propriétés organoleptiques meilleures que les deux autres types d'échantillons de yaourt. Reste à étudier l'effet de cette enzyme sur la survie du ferment lactique utilisé et aussi sur la post-acidification pendant la période d'entreposage similaire aux conditions industrielles.

Avec ces effets favorables, notamment sur la texture et la valeur nutritionnelle du produit fini, l'ajout de la Transglutaminase comme auxiliaire technologique est une piste intéressante à explorer au niveau technologique surtout que jusqu'à présent les gros tonnages de texturant sont utilisés en plus de problèmes qu'ils peuvent causer sur la santé tels que les allergies et les dysfonctionnements métaboliques.

References bibliographiques

- **Abbasi, H., Ehsani, M.R., Ali, S.M., Mousavi E., Djomeh, Z.E., Vazirib, M. (2009).** Influence of exopolysaccharide producing starter cultures and incubation temperatures on the physical and rheological properties of low fat set type yogurt. **Book of Abstracts European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6) Copenhagen, 16-20 September 2007.**
- **Agriculture et agroalimentaire Canada (2009).** Qu'est-ce qu'un aliment fonctionnel et un produit nutraceutique? **Site web d'Agriculture et agroalimentaire Canada** <http://ww4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=171305207040&lang=fra> (mise à jour: 08-04-2009)
- **Amatayakul, T., Halmos, A.L., Sherkat, F., Shah, N.P. (2006c).** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. **International Dairy Journal 16: 40-51.**
- **Amatayakul, T., Sherkat F., Shah, N. P. (2006a).** Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. **International Journal of Dairy Technology 59: 216-221.**
- **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: 314-324.**
- **Amiot, J., Fournier, S., Leboeuf, Y., Paquin, P., Simpson, R. (2002) Chapitre 1 :** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Science et Technologie du lait; transformation du lait.
- **Association des transformateurs laitiers du Canada (ATLC) (2005).** Statistiques de l'industrie. Site web des transformateurs laitiers du Canada <http://www.dpac-atlc.ca/francais/processors/statistics.cfm> (Mise à jour: 2005).
- **Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990).** Official methods of analysis. USA. 15th Ed. AOAC, Washington, DC.
- **Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2000).** Official methods in analytic of AOAC international, **Chapter 33: Dairy products. Volume 2, 17ième edition, Dr. William Horwitz (Eds), p. 69-82.**

- **Ayala-Hernandez, L, 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: 2583-2590.**
- **Barretto Penna, A. L., Converti, A., Oliveira de, M. N. (2006).** Simultaneous effects of total solids content, milk base, heat treatment temperature and sample temperature on the rheological properties of plain stirred yogurt. **Food Technology and Biotechnology 44(4): 515-518.**
- **Beal, C, Corrieu, G. (1991).** Influence of pH, température, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. **Biotechnology and Bioengineering 38: 90-98.**
- **Beal, C, Skokanova J., Latrille E., Martin, N., Corrieu, G. (1999).** Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science 82: 673-681.**
- **BEATRICE DE REYNAL, JEAN-LOUIS MULTON,** Additifs et Auxiliaires de Fabrication dans les Industries Agroalimentaires, **Lavoisier Tec & DOC, 2009 (4ème Edition).**
- **Becker, T., Puhán, Z. (1989).** Effect of different process to increase the milk solids non-fat content on the rheological properties of yoghurt. **Milchwissenschaft 44: 626-629.**
- **Begot, C, Desnier, I., Daudin, J. D., Lebert, A. (1996).** Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of microbiological methode 25: 225-232.**
- **Behare, P.V., Rameshwar, S., Kumar, M., Prajapati, JB., Singh, R.P. (2009).** Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: a review. **Journal of food and science technology 46(1): 1-11.**
- **Bellengier, P., Richard J., Foucaud, C. (1997).** Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. **Journal of dairy science 80: 1520-1527.**
- **Benezech, T., Maingonnat, J.-F. (1994).** Characterization of the Rheological Properties of Yoghurt-A Review. **Journal of Food Engineering 21(4): 447-472.**

- **Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M. (1997).** Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. **Journal of Dairy Science 80: 2310-2317.**
- **Broadbent, J. R., Mc Mahon, D.J., Welker, D. L., Oberg, C. J., Moineau, S. (2003).** Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide production *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science 86: 407-423.**
- **Brochu, E., Dumais, R., Julien, J-P., Nadeau, J., Riel, R (1984).** Science et technologie du lait. **Les Presses de l'Université Laval, Québec, Canada, 531 pages.**
- **Catalin IANCU¹, Nicolae BUTU², Gabriela BHRIM¹. (2009).** PRELIMINARY STUDIES REGARDING TRANSGLUTAMINASE SYNTHESIS BY POLAR FILAMENTOUS BACTERIA OF THE GENUS STREPTOMYCES SP. **Innovative Romanian Food Biotechnology Vol. 4, Issue of March, 2009**
- **Champagne, C., P., Gagnon, D., St-Gelais, D., Vuilleumard, J. C. (2009).** Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. **International dairy journal 19: 669-674.**
- **Champagne, C.P., Lange, M., Biais, A., Goulet, J. (1992).** Caractéristiques et emploi de cultures lactiques dans l'industrie laitière. **CDAQ, Québec, p. 17.**
- **Champagne, CP. (1998).** Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. **La fondation des Gouverneurs, Agriculture et Agroalimentaire Canada, CRDA. Edisem. St-Hyacinthe, Québec, 210 pages.**
- **Courtin, P., Rul, F. (2003).** Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. **Lait 84: 125-134.**
- **Dave, R.I., Shah, N.P. (1988).** The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt. **Australian journal of dairy technology 53:180-184.**
- **DeJong and S.J. Koppelman. (2002).** Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. **Journal of Food Science Volume 67, Issue 8, pages 2798–2806, October 2002.**

- **Farmer, F. A., Schmidt, K. A., Shalabi, S. I. (1995).** Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning microscopy. **Journal of dairy science** **78**: 2629-2636.
- **ZHENG, G. H. and F.W. SOSULSKI.** Determination of Water Separation from Cooked Starch and Flour Pastes after Refrigeration and Freeze-thaw. **Journal of Food Science** Volume **63**, Issue **1**, pages **134–139**, January **1998**
- **Gianfrani, C Mamone, G; Camarca, A; Addeo, F; Longobardo, L; Ferranti, P; Auricchio, S; Troncone, R.** SUSCEPTIBILITY TO DEAMIDATION BY TISSUE TRANSGLUTAMINASE AS A TOOL TO IDENTIFY IMMUNOGENIC GLIADIN PEPTIDES IN THE WHOLE GLIADIN EXTRACTS. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**: May 2005 - Volume **40** - Issue **5** - p **665**
- **Guirguis, N., Broome, M. C, and Hickey, M. W. (1984).** The effect of partial replacement of skim milk powder with whey protein concentrate on the viscosity and syneresis of yoghurt. **Australian Journal of Dairy Technology** **39**: 33-35.
- **Gustaw, W., Glibowski, P., Mleko, S. (2006).** The rheological properties of yoghurt with incorporated whey protein aggregates/polymers. **Milchwissenschaft** **61**: 415—419.
- **Harwalkar, V.R., Kalab, M. (1986).** Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yoghurt made from reconstituted nonfat dry milk. **Food Microstructure** **5(2)**: 287-294.
- **inistère de l'agriculture, de l'alimentation et des pêcheries du Québec (MAPAQ) (2003).** P-30, Loi sur les produits laitiers et leurs succédanées. Règlements sur la pasteurisation des produits laitiers, sur la composition, l'emballage et l'étiquetage et sur les normes microbiologiques des produits laitiers, p.50-51, 55-57, 64.
- **Juillard, V., Spinnler, H.,E., Desmazeaud,**
- **Kuciikcetin, A. (2008).** Effect of heat treatment of skim milk and final fermentation pH on graininess and roughness of stirred yogurt. **International journal of dairy technology** **61(4)**: 385-390.
- **Lagoueyte, N., Lablee, J., Lagaude, A., Tarodo de la Fuente, B. (1994).** Temperature affects microstructure of renneted milk gels. **Journal of food science** **5**:956-959.

- **Lamboley, L. St-Gelais, D., Champagne, C, P., Lamoureux, M. (2003).** Growth and morphology of thermophilic dairy starters in alginate beads. **Journal of general applied microbiology 49: 205-214.**
- **Lamontagne, M. (2002).** Produits laitiers fermentes. **Science et technologie du lait.**
- **Larson B. L., Roller G. D. (1955).** Heat dénaturation of the specific serum proteins in milk. **Journal of Dairy Science 38: 351-360.**
- **Lorenzen, P. C, Ebert, Y., Clawin-Ràdecker, I., Schlimme, E. (2003).** Influence of heat impact in reconstituted skim milk on the properties of yoghurt fermented by ropy or nonropy starter cultures. **Nahrung/Food 47(5): 349 - 353.**
- **Lucey, J. A. (2001).** The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. **Food Hydrocolloids 15: 603-608.**
- **Lucey, J. A. (2004).** Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. **International Journal of Dairy Technology 57: 77-84**
- **Lucey, J. A., Singh, H. (1997).** Formation and physical properties of acid milk gels. **Food Research International 30: 529-542.**
- **Lucey, J. A., Singh, H. (1998a).** Formation and properties of acid milk gels: a review. **Food research international 30: 529-542.**
- **Lucey, J.A., Munro, P.A. Singh, H. (1998b).** Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. **Journal of food science 63(4): 660-664.**
- **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: 275-299.**
- **Luquet, F. M., Bonjean-Linczowsky, Y. (1985).** Laits et produits laitiers : volume 2, les produits laitiers, transformation et technologies. **Technique et documentation Lavoisier, Paris, 250 pages.**
- **Lyster, R. (1970).** The dénaturation of alphas₁-lactalbumin and beta-lacto-globulin in heated milk. **Journal of Dairy Research, 37: 233.**

- **M., J., Boquien, C, Y. (1987).** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. **Le lait 67(2): 149-172.**
- **M.L. (1989).** The formation and structure of milk protein gels. **Food chemistry 6: 41-49**
- **Mahaut, M., Jeantet, R., Schuck, P., Brûlé. G. (2000).** Produits fermentés et desserts lactés. Les produits industriels laitiers, **Éditions TEC et DOC, Paris, p.25-37.**
- **Marshall V.M., Rawson H.L. (1999).**
- **Mottar J., Bassier A., Joniau M., Baert J. (1989).** Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. **Journal of dairy science 72: 2247-2256.**
- **Normand M, Roland N, Richoux R & Kerjean J-R. (2006).** Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières. **Programme Nutrition Santé en Bretagne.**
- **Radke-Mitchell, L., Sandine, W.E. (1984).** Associative growth and differential enumeration of streptococcus thermophilus and lactobacillus bulgaricus: **A review. Journal of food protection 47(3): 245-248.**
- **Ramchandran, L., Shah, N. P (2010).** Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **Food Science and Technology 43: 819-827.**
- **Ramchandran, L., Shah, N. P. (2009).** Effect of EPS on the proteolytic and ACE inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. **Journal of dairy science, 92: 895-906.**
- **Rawson, H. L, Marshall, V.M. (1997/** Effect of 'ropy' strains of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus and streptococcus thermophilus on rheology of stirred yogurt. **International journal of dairy food science and technology 32:213-220.**
- **Robinson, R.K. (1998).** The effect of elevated milk solids and incubation temperature on the physical properties of natural yoghurt. **Milchwissenschaft 53:510-513.**
- **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.**

- **Rohm, H., & Kovac, A. (1994).** Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yoghurt gels. **Journal of Texture Studies, 25: 311-329.**
- **Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Int. Dairy Journal 12:163-171.**
- **Sandine, W.E., Elliker, P.R. (1970).** Microbiology induced flavors and fermented foods: flavour in fermented dairy products. **Journal of agriculture and food chemistry 18: 557-562.**
- **Shah, N. P. (2003).** Yogurt: The product and its manufacture. In B. Caballero, L.C Trugo, & P. M. Finglas, **Encyclopedia of Food Science and Nutrition, 2e edition, volume 10.** New York Academic Press, (p. 6252-6260).
- **Sharma, S.K., Dalgleish, D.G. (1994).** Effect of heat treatments on the incorporation of milk serum proteins into the fat globule membrane of homogenized milk. **Journal of Dairy Research 61: 375-384.**
- **Shihata, A., Shah, N.P. (2002).** Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial A BT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. **International Dairy Journal 12 (9):765-772.**
- **Tamime, A. Y., Deeth, H. C. (1980).** Yogurt: Technology and biochemistry. **Journal of Food Protection, 43: 939-977.**
- **Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (1985).** Yoghurt: Science and technology. **Pergamon Press, Toronto, Canada. 423 pages.**
- **Tamime, A.Y., Robinson, R.K., (1999).** Yoghurt Science and Technology. **CRC Press LLC, Woodhead publishing limited Second edition, England, 619 pages.**
- **Tayeb, J., Bouillanne, C, Desmazeaud, M.J. (1984).** Computerized control of growth with temperature in a mixed culture of lactic acid bacteria. **Journal of fermentation technology 62: 461-470.**

- **Teggatz, J. A., Morris, H. A. (1990).** Changes in the rheology and microstructure of ropy yoghurt during shearing. **Food Structure (9): 133-138.**
- **Tinson, W., Broome, M. C, Hillier, A. J., Jago, G. R. (1982).** Metabolism of Streptococcus thermophilus. 2. Production of CO₂ and NH₃ from urea. **Australian Journal of dairy technology, 37: 14-16.**
- **Trachoo, N. (2002).** Yogurt : the fermented milk. **Songklanakarin journal of science and technology 24: 727-737.**
- **Williams, R.P.W, Augustin, MA., (2002).** Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. **International Dairy Journal 12:383-391.**
- **Yokoyama K, Nakamura N, Saguaro K, Kubota K (2000).** Overproduction of microbial transglutaminase in Escherichia coli, in vitro refolding, and characterization of the refolded form. **Biosci Biotechnol Biochem 64:1263–1270**