



HAL
open science

Etude de l'impact couplé du procédé de congélation et des conditions d'entreposage sur la qualité des produits surgelés. : Application aux matrices poreuses

Amira Zennoune

► To cite this version:

Amira Zennoune. Etude de l'impact couplé du procédé de congélation et des conditions d'entreposage sur la qualité des produits surgelés. : Application aux matrices poreuses. Génie des procédés. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB015 . tel-03854395

HAL Id: tel-03854395

<https://pastel.hal.science/tel-03854395v1>

Submitted on 15 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Etude de l'impact couplé du procédé de congélation et des conditions d'entreposage sur la qualité des produits surgelés.

Application aux matrices poreuses

Study of the combined effect of the freezing process and storage conditions on the quality of frozen products. Application to porous matrices

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 : Agriculture, Alimentation, Biologie,
Environnement et Santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Génie des procédés

Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans les unités de recherche **FRISE (Université Paris-Saclay, INRAE)**
et le **Laboratoire 3SR (Université Grenoble Alpes, Grenoble INP, CNRS)** sous la
direction de **Christian GEINDREAU**, Professeur, le co-encadrement de **Hayat
BENKHELIFA**, Maître de conférences, de **Fatou-Toutie NDOYE**, Ingénieure de
recherche, et de **Frédéric FLIN**, Chargé de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 31 mars 2022, par

Amira ZENNOUNE

Composition du Jury

Philippe BOHUON Professeur, Institut Agro Montpellier	Président
Sylvie CHEVALLIER Ingénieure de recherche, HDR, ONIRIS Nantes	Rapporteur & Examinatrice
Luc SALVO Professeur, INP GRENOBLE	Rapporteur & Examineur
Anh Minh TANG Directeur de recherche MTE, École des Ponts ParisTech	Examineur
Christian GEINDREAU Professeur, Université Grenoble Alpes	Directeur de thèse
Hayat BENKHELIFA Maître de conférences, AgroParisTech Université Paris-Saclay	Co-encadrante

Titre : Etude de l'impact couplé du procédé de congélation et des conditions d'entreposage sur la qualité des produits surgelés
Application aux matrices poreuses

Mots clés : Gênoise, Congélation, Stockage, Recristallisation, Microtomographie à rayons X

Résumé : Au cours de la congélation des produits alimentaires, une structure cristalline de glace se développe et continue d'évoluer tout au long de la chaîne du froid notamment durant les étapes de stockage où les produits sont susceptibles de subir des variations de températures. Les phénomènes de cristallisation et de recristallisation vont contribuer à modifier la microstructure des produits et ainsi altérer leur qualité. Dans ce contexte, le principal objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'impact couplé de la congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure d'une génoise surgelée, afin de mieux comprendre les mécanismes de cristallisation et de recristallisation ainsi que la formation et la localisation de glace dans une matrice poreuse.

Deux types de génoises ont été étudiés : une génoise modèle non réactive et une génoise de référence réactive. Leur protocole de fabrication a été validé par une série de mesures de propriétés thermo-physiques (densités, teneur en eau, porosité). Des mesures par DSC ont été réalisées afin de déterminer la température de congélation commençante et la fraction d'eau congelable dans la génoise cuite. Différentes techniques ont ensuite été mises en œuvre afin de caractériser l'évolution de la microstructure des génoises congelées au cours de la chaîne du froid : la cryo-MEB et la micro-tomographie RX. Concernant la microtomographie, deux types d'essais ont été réalisés : (i) des échantillons de génoise modèle ont été congelés à deux vitesses différentes (congélation lente et rapide) puis stockés pendant deux semaines dans des conditions stables ou avec fluctuations de températures. Ces échantillons ont été ensuite visualisés à l'état congelé à très haute résolution en utilisant une cellule thermostatée CellStat installée sur la ligne ANATOMIX du synchrotron Soleil ; (ii) dans le cas de la génoise de référence, l'évolution de la microstructure d'un même échantillon de

gênoise pendant sa congélation et son stockage (avec fluctuations de température) a pu être suivie en continu pendant 6 jours à l'aide de la cellule thermostatée CellDyM installée sur un microtomographe de laboratoire. Dans ce cas, une méthode de traitement d'image spécifique basée sur la corrélation digitale volumique (DVC) a été mise en œuvre pour segmenter les images et suivre l'évolution de la microstructure.

L'ensemble des résultats obtenus a ainsi permis de montrer que la congélation rapide et lente de la génoise modèle donne lieu respectivement (i) à des cristaux de glace petits et grossiers à l'intérieur de la matrice d'amidon et (ii) à des couches de glace plus ou moins épaisses à l'interface des pores. Dans le cas d'une congélation lente, la majorité de la glace se forme à ces interfaces reflétant une plus grande migration d'eau de la matrice vers les pores. Au cours du stockage, la microstructure cristalline évolue quelle que soit la vitesse de congélation initiale et les conditions de conservation. Cependant, les changements de microstructure sont plus importants lorsque les produits sont congelés lentement quelles que soient les conditions de stockage. Par ailleurs, nos résultats montrent que même si les avantages de la congélation rapide sont réduits à la fin de la période de stockage de deux semaines, les produits ont toujours une meilleure qualité que les échantillons congelés lentement. Enfin, les résultats obtenus avec la cellule CellDyM ont permis de mettre en évidence différents phénomènes, comme la rétraction de la matrice poreuse lors de la congélation et du cyclage thermique ainsi que la formation et la croissance des cristaux à l'interface des pores qui sont des sites préférentiels pour la nucléation de la glace. L'ensemble de ces résultats originaux ouvrent de nombreuses perspectives en termes de modélisation et d'optimisation des paramètres de la chaîne du froid pour préserver la qualité des produits.

Title : Study of the combined effect of the freezing process and storage conditions on the quality of frozen products. Application to porous matrices

Keywords : Sponge cake, freezing, frozen storage, Recrystallization, X-rays microtomography.

Abstract : During the freezing of food products, an ice crystalline structure is developed and continues to evolve throughout the cold chain, particularly during the storage stages when the products are likely to be subject to temperature variations. The phenomena of crystallisation and recrystallisation will contribute to modify the microstructure of the products and thus alter their quality. In this context, the main objective of this thesis is to study the coupled impact of freezing and storage conditions on the evolution of the microstructure of a frozen sponge cake, in order to better understand the mechanisms of crystallisation and recrystallisation as well as the formation and location of ice in a porous matrix.

Two types of sponge cake were studied: a non-reactive model sponge cake and a reactive reference sponge cake. Their manufacturing protocol was validated by a series of measurements of thermo-physical properties (densities, water content, porosity). DSC measurements were carried out to determine the freezing point and the fraction of freezable water in the baked sponge cake. Different techniques were then used to characterise the evolution of the microstructure of the frozen sponge cake during the cold chain: cryo-MEB and X-ray microtomography. Concerning microtomography, two types of tests were performed: (i) samples of model sponge cake were frozen at two different rates (slow and fast freezing) and then stored for two weeks under stable or fluctuating temperature conditions. These samples were then visualized in the frozen state at very high resolution using a CellStat thermostat cell installed at the ANATOMIX beamline of synchrotron Soleil;

(ii) In the case of the reference sponge cake, the evolution of the microstructure of the same sponge cake sample during its freezing and storage (with temperature fluctuations) could be followed continuously for 6 days using the CellDyM thermostat cell installed on a laboratory microtomograph. In this case, a specific image processing method based on Digital Volume Correlation (DVC) was implemented to segment the images and follow the evolution of the microstructure.

The results show that rapid and slow freezing of the model sponge cake result in (i) small and coarse ice crystals within the starch matrix and (ii) more or less thicker ice layers at the pore interfaces. In the case of slow freezing, the majority of the ice forms at these interfaces reflecting greater water migration from the matrix to the pores. During storage, the crystalline microstructure changes regardless of the initial freezing rate and storage conditions. However, the microstructure changes are more important when the products are frozen slowly regardless of the storage conditions. Furthermore, our results show that although the benefits of fast freezing are reduced at the end of the two-week storage period, the products still have a better quality than the slow-frozen samples. Finally, the results obtained with the CellDyM cell allowed to highlight different phenomena, such as the shrinkage of the porous matrix during freezing and thermal cycling as well as the formation and growth of crystals at the pore interface which are preferential sites for ice nucleation. All these original results open many perspectives in terms of modelling and optimisation of cold chain parameters to preserve product quality.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier vivement et très sincèrement les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse.

Je remercie tout d'abord l'équipe qui m'a encadré durant ma thèse. Je commencerai par remercier mon directeur de thèse Christian GEINDREAU, professeur à l'Université de Grenoble, son attention particulière depuis le début de ma thèse et son suivi direct de l'avancement du travail. Je tiens également à remercier mes encadrantes ; Hayat BENKHELIFA, Maître de Conférences à l'AgroParisTech et Fatou-Toutie NDOYE ingénieure de recherche à l'INRAE Antony pour leur grand soutien tout au long de la thèse. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude pour leur disponibilité et leur dynamisme. Leur compétence, leur clairvoyance, leur esprit de rigueur et leur enthousiasme m'ont beaucoup appris et donné confiance. Je leur exprime ma vive reconnaissance et je leur dédie également ce travail. Je remercie également Frédéric Flin chargé de recherche à Météo France et Pierre LATIL ingénieur de recherche au CNRS pour leur suivi tout au long du travail expérimental et notamment la partie traitement d'images. Je leur remercie également pour leurs remarques pertinentes et constructives lors de la rédaction de différents rapports de thèse.

J'adresse également mes chaleureux remerciements aux membres de l'unité, qui ont contribué chacun à sa façon, et toujours dans la bonne humeur au bon déroulement de cette étude, que ce soit de manière technique, scientifique, administrative ou amicale : Romuald Hunlede, Elyamine Dahmana, Seydina, Alain Denis, Alain Thomas, Graciela Alvarez, Onrawee LAGUERRE, Pascal Clain, Antony Delahaye et Sylvie CARLINI.

Je remercie enfin les thésards, les stagiaires et toutes les personnes qui m'ont accompagnées tout au long de cette aventure et avec qui j'ai passé des moments agréables au cours de ces années, Jordan, Nada, Yasmine, Véronique, Julie, Emanuel, Mahdjouba, Walid, Somia, Dihia, Tanathép, Daniel, Ahmed, et Estelle. J'ai vécu au sein de cette unité une expérience très enrichissante aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan humain et culturel.

Je remercie vivement les personnes qui ont fait partie de mon Jury. Leurs suggestions et remarques ont contribué à l'amélioration de la version finale de ce mémoire. Je remercie Madame Sylvie CHEVALLIER Ingénieure de Recherche, HDR, ONIRIS Nantes et Monsieur Luc SALVO Professeur, INP GRENOBLE, qui ont assuré la fonction de rapporteurs en apportant une analyse détaillée du manuscrit. Je remercie également le président de jury Monsieur Philippe BOHUON Professeur, Institut Agro Montpellier et monsieur Anh Minh TANG Directeur de Recherche MTE, École des Ponts ParisTech, qui m'a honoré en acceptant d'examiner ce travail.

Un merci tout particulier à mes chers amis Massi, Islem, Dolly, Bouchra, Mimi, Dehbia et Selma. Leur amitié, leur soutien généreux et leur bonne humeur m'ont été indispensables. Je garde pour eux et pour toujours, une place particulière dans mon cœur.

J'exprime enfin mes remerciements à mes chers parents et à mes chers frères et sœurs : Mohamed, Abdallah, Rafik, Amine, Omar et Imène et mes belles sœurs Meriem et Imane ainsi que ma belle-famille et particulièrement mon cher Mari Wassim qui, par leur confiance, leurs encouragements et leur soutien inconditionnel m'ont donné l'énergie et la détermination nécessaires pour le bon déroulement de cette thèse. Je leur dédie ce travail, qu'ils y trouvent toute ma reconnaissance.

Table des matières

Liste des figures	10
Liste des tableaux	16
Nomenclature	18
Introduction générale	22
Chapitre 1 : Etude bibliographique	28
I. Produits alimentaires poreux.....	30
I.1 Généralités sur les milieux poreux.....	30
I.1.1 Porosité.....	30
I.1.2 Surface spécifique	32
I.1.3 Tortuosité	32
I.2 Exemples de milieux poreux.....	32
I.3 Propriétés des produits alimentaires poreux	33
I.3.1 Densité apparente	34
I.3.2 Conductivité thermique λ	34
I.3.3 Diffusivité thermique.....	35
I.4 Produits poreux de boulangerie	36
I.4.1 Produits poreux modèles	36
I.4.2 Génoise.....	37
II. Congélation et stockage des produits alimentaires	40
II.1 Equipements de congélation et de stockage	40
II.1.1 Equipements à air discontinus	40
II.1.2 Equipements à air continu	42
II. 2 Phénomènes de transfert au cours de la congélation	43
II.2.1 Transfert thermique et transfert d'eau au cours de la congélation.....	43
II.2.2 Cas de la congélation d'un produit poreux : phénomènes de diffusion et d'évapo- condensation	44
II.3 Phénomènes de cristallisation lors de la congélation	45
II.3.1 Mécanismes de la cristallisation.....	45
II.3.2 Effet de la vitesse de congélation sur la formation des cristaux.....	48
II.3.3 Effet de la vitesse de congélation sur la qualité de l'aliment.....	50
II.3.4 Paramètres physiques de la congélation.....	50

II.3.5 Cas de la congélation des produits alimentaires poreux.....	52
II.4 Phénomène de recristallisation durant le stockage des produits congelés.....	54
II.4.1 Mécanismes de recristallisation	55
II.4.2 Facteurs affectant la recristallisation dans les produits congelés.....	57
II.4.3 Recristallisation dans les produits alimentaires poreux.....	61
III. Caractérisation de la microstructure des produits congelés.....	62
III.1 Microscopie optique	62
III.2 Microscopie électronique	63
III.3 Imagerie par résonance magnétique	64
III.4 Spectroscopie dans l'infrarouge proche NIR	64
III.5 Microtomographie à rayons X.....	64
III.5.1 Analyses d'images et traitement de données	66
III.5.2 Application de la microtomographie à rayons X à l'étude des produits alimentaires	68
IV. Conclusion de la synthèse bibliographique	69
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	72
I. Formulation et fabrication des génoises.....	74
I.1 Préparation et validation du produit modèle	74
I.2 Préparation des génoises	75
I.2.1 Génoise modèle.....	75
I.2.2 Génoise de référence	76
II. Caractérisation des propriétés thermophysiques des génoises.....	79
II.1 Teneur en eau de la génoise.....	79
II.2 Mesure de densité	80
II.3 Mesure de la température de congélation commençante.....	81
II.3.1 La calorimétrie différentielle à balayage DSC	81
II.3.2 La mesure de cinétique de congélation	83
III. Congélation et stockage des génoises.....	84
III.1 Préparation des échantillons.....	84
III.1.1 Génoise modèle.....	84
III.1.2 Génoise de référence	85
III.2 Congélation des échantillons.....	86
III.2.1 Génoise modèle.....	86
III.2.2 Génoise de référence	87
III.3 Stockage des échantillons.....	87

IV. Caractérisation de la microstructure des génoises.....	88
IV.1 Cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB)	88
IV.2 Microtomographie à rayons X Synchrotron.....	89
IV.2.1 Ligne ANATOMIX	89
IV.2.2 Cellule thermostatée CellStat	90
IV.2.3 Acquisition des images 3D	90
IV.3 Microtomographie à rayons X de laboratoire	91
IV.3.1 Cellule thermostatée CellDyM	91
IV.3.2 Acquisition <i>in situ</i> des images 3D.....	93
IV.4 Principaux traitements d'images mis en œuvre	93
IV.4.1 Images obtenues par μ CT RX synchrotron	93
IV.4.2 Images obtenues par μ CT RX de laboratoire.....	95
V. Conclusion.....	97
Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace	99
Synthèse	101
I. Introduction.....	104
II. Materials and Methods	106
II.1 Samples.....	106
II.1.1 Sponge cake Preparation and Sampling.....	106
II.1.2. Sampling and Freezing.....	107
II.2 Characterization of Thermo-Physical Properties of the Sponge Cake	108
II.2.1 Density.....	108
II.2.2 Water Content.....	109
II.2.3 Differential Scanning Calorimetry Measurements (DSC)	109
II.3 Cryo-SEM Analysis.....	110
II.4 Synchrotron X-ray Micro-Tomography	110
II.4.1 Thermostated Cell	110
II.4.2 3D Image Acquisition.....	111
II.4.3 Image Processing	111
II.4.4. Microstructural Description	114
II.4.5 Statistical Analysis	115
III. Results	115
III.1 Thermophysical Properties of the Model Sponge Cake.....	115
III.1.1 Model Sponge Cake Reproducibility	115

III.1.2 Freezing Point and Freezable Water Content	116
III.2. Microstructural Image Analysis	116
III.3 Quantitative Data Analysis.....	119
III.3.1 Representative Sub-Volume Analysis.....	119
III.3.2 Volume fractions	120
III.3.3 Specific Surface Area (SSA) and Local Thickness	122
III.3.4 Mean Curvature.....	124
IV. Discussion	125
IV.1 Microstructure Characterization.....	125
IV.2 Effect of Freezing Rate on Ice Formation and Location.....	126
V. Conclusions	128
Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle.	130
Synthèse	132
I. Introduction.....	135
II. Materials and methods.....	138
II.1. Sponge cake preparation, sampling and freezing	138
II.2. Frozen storage conditions and analysis time points	139
II.3. Thermo-physical properties of the model sponge cake	140
II.4. Synchrotron X-ray micro-tomography imaging acquisition and processing.....	141
II.4.1. The Thermostated Cell	141
II.4.2. 3D Image acquisition	141
II.4.3. Image processing.....	142
II.4.4. Microstructural description.....	143
II.4.5. Statistical analysis.....	144
III. Results	144
III.1. Qualitative analysis	144
III.1.1. Initial state T0	145
III.1.2. Effect of storage conditions.....	145
III.2. Quantitative analysis	146
IV. Discussion	152
IV.1. Water migration and redistribution	152
IV.2. The coupled effect of freezing rates and frozen storage conditions.....	154

V. Conclusion.....	155
Chapitre 5 : Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.....	156
.....	157
Synthèse	158
I. Introduction.....	161
II. Material and methods	163
II.1 Sponge cake preparation and sampling	164
II.2 Characterization of thermo-physical properties of the sponge cake.....	164
II.2.1 DSC measurements	164
II.2.2 Density.....	165
II.2.3 Water content	166
II.3 Cryo-SEM.....	166
II.4 In situ X-ray micro-tomography	167
II.4.1 Cryogenic cell.....	167
II.4.2 Freezing and thermal cycling.....	168
II.4.3 3D image acquisition	169
II.4.4 Image processing.....	169
II.4.5 Microstructural parameters	172
III. Results and discussion.....	174
III.1 Microstructural observations.....	174
III.2 Porosity and pore sizes	177
III.3 Sample shrinkage	178
III.4 Evolution of the volume fraction of each phase.....	178
III.5 Ice crystal properties	180
III.6 Specific surface areas	182
III.7 Discussion - Physical processes	182
III.7.1 Ice crystals location	182
III.7.2 Ice crystals growth and recrystallization	183
III.7.3 Shrinkage behaviour	185
IV. Conclusion.....	186
Conclusion générale et perspectives.....	188
Références bibliographiques.....	195

Liste des figures

<i>Figure 1 : schéma détaillé montrant les différents types de pores dans une matrice poreuse (Datta 2007).</i>	31
<i>Figure 2 : Exemple d'un milieu poreux : les pores sont en blanc, la matrice solide est en noir (Fu et al. 2021).</i>	32
<i>Figure 3 : Exemples de matériaux poreux : A) papier industriel (Rolland et al. 2007), B) Pierre de sable (Coles et al. 1998), C) Pain (Wang et al. 2007), D) Génoise (Bousquières 2017), E) Billes de silice (Benmesbah 2021), F) Sable (Benmesbah 2021).</i>	33
<i>Figure 4 : Exemples d'aliments obtenus par impression 3D: (A) pâte à biscuits (B) chocolat "Mr. Noir", (C) bonbons colorés (Lipton et al. 2010, Liu et al. 2017).</i>	37
<i>Figure 5: Equipements de congélation : (a) congélateur coffre à froid statique, (b) armoire de surgélation à froid ventilé.</i>	41
<i>Figure 6: Exemple de chambre froide de 6 m³ à température négative (https://www.pesage-mb.com/6272-chambre-froide-negative-complete-a-cheval.html).</i>	41
<i>Figure 7: Exemples de congélateurs par air : (a) congélateur à air ventilé (Magnussen et al. 2008), (b) Tunnel de surgélation (Evans 2008), (c) Lit fluidisé (Evans 2008).</i>	42
<i>Figure 8: Schéma du transfert de chaleur et d'eau pendant la congélation d'un produit alimentaire (Mulot 2019).</i>	44
<i>Figure 9: Phénomènes de diffusion et d'évapo-condensation dans un milieu poreux (Pham 2006).</i>	45
<i>Figure 10: Énergie libre (ΔG) associée à la formation d'un germe stable (Hartel 2001) Avec ΔG_s, énergie libre pour la formation de surface ; ΔG_v, énergie libre pour la formation de volume ; ΔG_c énergie libre critique pour la formation d'un germe et r_c, rayon critique.</i>	47
<i>Figure 11: Distribution des diamètres équivalents des cristaux de glace pour différentes vitesses de congélation (Mulot et al. 2019).</i>	49
<i>Figure 12: Micrographie de la structure cellulaire (filets de saumon, tissu de fraise) affectée par les cristaux de glace (Li et al. 2018).</i>	50
<i>Figure 13: micrographes obtenus par cryoMEB sur de la pâte à pain (a) Echantillon congelé à $-28\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1h, (b) Echantillon congelé pendant 2h dans un congélateur à air pulsé à $-28\text{ }^\circ\text{C}$ et stockés pendant 24h à $-22\text{ }^\circ\text{C}$ (Baier-Schenk et al. 2005).</i>	52
<i>Figure 14: Courbe DSC de la congélation et de la fusion de la mie de pain. Avec une vitesse de refroidissement de $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ et une vitesse de chauffage de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (Chen et al. 2012).</i> ..	53
<i>Figure 15: Mécanisme de recristallisation migratoire (Vicent 2019).</i>	55
<i>Figure 16 : Représentation schématique de l'évolution de la taille des cristaux de glace en fonction de la taille des cristaux (ligne pleine) ou du temps (ligne en pointillé) en cours de</i>	

stockage. *a, b et c* représentent 3 produits alimentaires avec différentes distributions de tailles de cristaux. $K = 2 XCDV^2/kT$ avec *X, C, D, V, k, T* représentant la tension interfaciale, le coefficient de diffusion, le volume molaire, la concentration, une constante cinétique et la température, respectivement. Adaptée de (Dalvi-Isfahan et al. 2019)..... 56

Figure 17 : Micrographes obtenus par microscopie électronique à balayage d'échantillons lyophilisés de tofus congelés par congélation rapide, lente et avec surfusion puis stockés à 0, 7 et 28 jours. La barre représente 250 μm (adapté de Kobayashi et al. (2018))..... 58

Figure 18: Evolution de la vitesse de recristallisation en fonction de la température de stockage et de l'amplitude de fluctuations (adaptée de Ndoye and Alvarez (2015)). 59

Figure 19: Coupes horizontales de pommes de terre congelées observées au microtomographe à rayons X après lyophilisation – Les cristaux sont représentés par les pores (zones noires) créés après lyophilisation et délimités par la matière solide (zones grises). 60

Figure 20: Les quatre composants essentiels d'un système de tomographie par rayons X. Les photons générés par la source traversent l'échantillon, puis capturés par le détecteur. Le processus se répète pour un certain nombre d'angles de rotation et est ensuite reconstruit par calcul pour produire des tomographes.(Vicent 2019). 65

Figure 21: Boîte thermostatée : à gauche, paille en plastique contenant l'échantillon ; au milieu, double enveloppe cylindrique contenant le matériau à changement de phase ; à droite, double enveloppe cylindrique contenant la mousse isolante en polyuréthane (Masselot et al. 2021)..... 66

Figure 22: Histogramme des niveaux d'atténuation (niveaux de gris) obtenus pour de la pomme congelée à -20°C (courbe en pointillés noirs), de la glace pure à -20°C (courbe noire) et du jus de pommes concentré et gélifié à -20°C (courbe grise) (Vicent et al. 2017)..... 68

Figure 23 : Mesure de l'homogénéité de la température dans le four et les génoises : les flèches noires indiquent l'emplacement des thermocouples dans les génoises. Les flèches rouges indiquent l'emplacement des thermocouples placés pour mesurer la température de l'air dans le four..... 78

Figure 24: Suivi de la température dans le four et dans la génoise pendant la cuisson et le refroidissement : les courbes en orange, gris et bleu mesurent l'évolution de la température de l'air dans le four. Les autres courbes représentent l'évolution de température au sein des génoises. 79

Figure 25: Photo d'échantillons de génoise après cuisson : (a) génoise modèle, (b) génoise de référence..... 79

Figure 26: (a) Appareil DSC utilisé pour la mesure de la température de congélation ; (b) creuset d'aluminium utilisé pour l'analyse des échantillons. 81

Figure 27: Protocole DSC (a) génoise modèle ; (b) génoise de référence..... 82

Figure 28: Pics de fusion des génoises obtenus par DSC (a) génoise modèle, (b) génoise de référence..... 83

<i>Figure 29 : Cinétique de congélation de la génoise : (a) génoise modèle ; (b) génoise de référence.....</i>	84
<i>Figure 30: Echantillon de génoise sur le porte-échantillon constitué d'un plot en cuivre et d'un capuchon en PMMA.....</i>	85
<i>Figure 31 : Cinétique de congélation pour les échantillons de génoise modèle : (a) congélation rapide, (b) congélation lente.</i>	87
<i>Figure 32 : (a) Schéma la cellule thermostatée CellStat installée sur la ligne ANATOMIX et(b) de la cellule thermostatée CellStat</i>	91
<i>Figure 33 : (a) Schéma de la cellule thermostatée CellDyM ; (b) La cellule CellDyM installée dans le microtomographe du laboratoire 3SR (RX Solutions, Chavanod, France).....</i>	93
<i>Figure 34 : Coupe μCT RX de : (a) échantillon de génoise modèle avant congélation et (b) échantillon de génoise modèle congelée (les pores en noir, la glace en gris et l'amidon en blanc).....</i>	94
<i>Figure 35: Coupe verticale en niveaux de gris d'un échantillon de génoise congelé.</i>	96
<i>Figure 36: (a) les 3 cartes des composantes du vecteur déplacement, (b) carte des résidus après application de la méthode DVC.</i>	97
<i>Figure 37: (A) Porous model sponge cake (pan dimension $10 \times 6 \times 3 \text{ cm}^3$); (B) Sponge cake sample on its copper sample holder (enclosed with a PMMA cap); (C) Cubic sponge cake sample (6 mm side).....</i>	108
<i>Figure 38: Differential scanning calorimeter protocol.</i>	109
<i>Figure 39: Illustration of the thermostated cell used during the tomographic acquisition: (A) CellStat scheme and (B) CellStat installed on the ANATOMIX Beamline (Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France).</i>	111
<i>Figure 40: Image segmentation procedure.</i>	113
<i>Figure 41: Differential scanning calorimetry curves (DSC) of unfrozen model sponge cake.</i>	116
<i>Figure 42: Cryo-SEM images of fractured sponge cake: (A1) Unfrozen sample; (A2) Zoom on the zone A; (B1) Samples frozen for 24 h in a domestic freezer at $-35 \text{ }^\circ\text{C}$; (B2) Zoom on zone B; (C1,C2) Frozen samples after 1h of sublimation at $-90 \text{ }^\circ\text{C}$ of the images (B1,B2).</i>	118
<i>Figure 43: Synchrotron X-ray horizontal slices (grey level images in the left and segmented images in the right) and 3D visualization of the sample after segmentation: (A1–A3) Unfrozen sponge cake; (B1–B3) Model sponge cake sample frozen at $-17.2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ (fast freezing); (C1–C3) Model sponge cake sample frozen at $-0.3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ (slow freezing). (Air in grey, ice outside the matrix in light blue, ice inside the matrix in dark blue and starch in brown). Each cube is 1 mm a side.</i>	119
<i>Figure 44: Air volume fractions for different sub-volume samples analyzed to determine the representative sub-volume (colored areas represent standard deviations).</i>	120

<i>Figure 45 : Volume fraction evolution along the height of the sample: (A) Vertical slices of grey level images; (B) Porosity profile; (C) Ice volume fraction (without air) profile; (D) Profile of the volume fraction of ice inside the matrix.</i>	<i>121</i>
<i>Figure 46: Measurement of local thickness of ice: (A1) 2D segmented image of sponge cake sample (fast freezing); (A2) Local thickness of ice inside the matrix (fast freezing); (A3) Local thickness of ice inside the matrix (slow freezing); (B1) 2D segmented image of sponge cake sample (slow freezing); (B2) Local thickness of ice outside the matrix (fast freezing); (B3) Local thickness of ice outside the matrix (slow freezing); (A4,B4) Cumulative distribution of local thickness of ice inside the matrix and ice outside the matrix according to the freezing rate.</i>	<i>124</i>
<i>Figure 47: Mean curvature and 3D visualization of sponge cake samples: (A) Sponge cake sample frozen at $-17.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (fast freezing); (B) Sponge cake sample frozen at $\times 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (slow freezing) (cube of $1 \times 1 \times 1\text{ mm}^3$); (C) Mean curvature distributions of a volume of $1 \times 1 \times 1\text{ mm}^3$ regions of interest (ROIs) taken from 16 samples submitted to slow freezing (blue curve). Similarly, the red curve corresponds to ROIs of the same volume taken from 16 fast frozen samples.</i>	<i>125</i>
<i>Figure 48 : Schematic representation of the dynamic change of storage temperatures.</i>	<i>139</i>
<i>Figure 49 : Core temperature kinetic during sponge cake freezing.</i>	<i>140</i>
<i>Figure 50 : CellStat installed on the ANATOMIX Beamline (Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France).</i>	<i>141</i>
<i>Figure 51: X-ray μCT slices of (A) unfrozen and (B) frozen model sponge cake samples. ...</i>	<i>142</i>
<i>Figure 52: Image segmentation procedure.</i>	<i>143</i>
<i>Figure 53: Synchrotron X-ray μCT slices of the labeled 3D images of the frozen sponge cake samples.</i>	<i>146</i>
<i>Figure 54: Volume fractions of (A) air, (B) ice and (C) ice inside the matrix. (A1,B1,C1) for samples obtained in the fast freezing conditions; (A2,B2,C2) for samples obtained in the slow freezing conditions.</i>	<i>149</i>
<i>Figure 55: (A) Specific Surface Area of the air/ice interface $SSA_{\text{air/ice}}$ (B) Specific Surface Area of the ice/starch interface $SSA_{\text{ice/starch}}$. (A1,B1) for samples obtained in the fast freezing conditions and (A2,B2) for samples obtained in the slow freezing conditions.</i>	<i>150</i>
<i>Figure 56 : Cumulative distribution of local thickness of. (1) ice inside the matrix and (2) ice outside the matrix after (A) freezing, (B) 7 days of storage and (C) 14 days of storage, both for stable and fluctuating storage temperatures.</i>	<i>151</i>
<i>Figure 57: Typical ice melting endotherm obtained upon the thawing of frozen sponge cake with a heating rate of $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.</i>	<i>165</i>
<i>Figure 58: (a) Photographs of the experiment, overview of the CellDyM thermostated cell installed in the tomograph cabin (RX Solutions, France) before the experiment, and (b) photograph of the 10 mm high sample before its installation inside CellDyM.</i>	<i>168</i>

<i>Figure 59: Freezing and temperature cycles. The dots show the realised scans, note that they were made at least 30 minutes after a temperature change for thermalisation purposes.</i>	169
<i>Figure 60: Image processing procedure.</i>	170
<i>Figure 61: (a) Vertical slice of the 3D grey level image for scan S36. (b) Zoomed region of the image, which reveals the ice crystals within the sample. (c) Grey levels histogram of the slice that highlights the difficulty to segment the three phases by direct grey level thresholding. (d) Vertical slice of the residue 3D image for scan S36. (e) Zoomed region of the image showing the ice crystals in black. (f) Residue histogram with its Gaussian model for noise. (g) The result label image, and (h) its associated zoomed region.</i>	173
<i>Figure 62: Schematic representation of the sponge cake phases and interfaces.</i>	174
<i>Figure 63 : Cryo-SEM image of a fractured frozen sponge cake.</i>	175
<i>Figure 64 : Vertical slices of some 3D images showing the evolution of the matrix microstructure and the growth of the ice crystals during the experiment.</i>	176
<i>Figure 65: Evolution during the experiment of: (a) the distribution of the equivalent diameters of the pores d_{eq}^{pore}, the class width is 0.1 mm, each scan is represented by a color, (b) the number of pores inside the sample N^{pore}, and (c) the mean equivalent diameter of these pores $\langle d_{eq} \rangle$. The orange shaded areas correspond to the estimated error.</i>	177
<i>Figure 66: Evolution of the sample volume $V_{sample}=V_0$ during the experiment.</i>	178
<i>Figure 67: Vertical profiles of the 3 phases' volume fractions during the experiment: (a) matrix (cake) volume fraction $V_{matrix}=V_0$, (b) air volume fraction (porosity) $V_{air}=V_0$, and (c) ice volume fraction $V_{ice}=V_0$.</i>	179
<i>Figure 68: Evolution during the experiment of the (a) matrix volume fraction $V_{matrix}=V_0$, (b) air volume fraction (porosity) $V_{air}=V_0$, and (c) ice volume fraction $V_{ice}=V_0$.</i>	180
<i>Figure 69: 3D rendering of matrix (yellow) and ice crystals (blue). The length of the edges of the bounding box is 1 mm.</i>	181
<i>Figure 70: Evolution of the granulometry of the ice crystals during the experiment: (a) equivalent diameter distribution (class width: 10 μm), (b) number of ice crystals, and (c) mean ice crystal volume v_{ice}.</i>	181
<i>Figure 71: Evolution during the experiment of the specific surface areas between the 3 phases: air, matrix and ice, $SSA(\text{interface}) = S(\text{interface})/V_0$.</i>	182
<i>Figure 72: Physics of the sponge cake during its freezing and storage.</i>	185

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Types de porosités (Rao et al. 2014).</i>	31
<i>Tableau 2 : Les différentes recettes de génoise dans la littérature (% en masse).</i>	38
<i>Tableau 3: Effet du taux de congélation sur les propriétés sensorielles des haricots verts (Agoulon 2010).</i>	50
<i>Tableau 4: Evolution de la taille et du nombre de cristaux de glace en fonction de la durée de stockage des échantillons de carottes en présence des fluctuations de température (adapté par Vicent et al. (2019).</i>	69
<i>Tableau 5: Formulation de la génoise modèle</i>	75
<i>Tableau 6: Caractéristiques physicochimiques des dérivés de cellulose MC (SGA7C) et HPMC (K250) de la marque METHOCEL™ (The Dow Chemical Company, 2002).</i>	76
<i>Tableau 7: Formulation de la génoise de référence.</i>	77
<i>Tableau 8: Récapitulatif des échantillons de génoise par conditions de congélation et de stockage.</i>	88
<i>Tableau 9: Caractéristiques de la ligne ANATOMIX (Weitkamp et al. 2017).</i>	90
<i>Table 10: Model sponge cake formulation and ingredient densities.</i>	107
<i>Table 11: Model sponge cake properties.</i>	115
<i>Table 12: Mean volume fractions of the different phases for unfrozen, fast and slow freezing.</i>	121
<i>Table 13: Specific surface area SSA (mm^{-1}).</i>	123
<i>Table 14: Number of analyzed samples per condition.</i>	140
<i>Table 15: Sponge cake thermo-physical properties.</i>	140
<i>Table 16: Mean volume fraction of the different phases (air, ice and ice inside) for different conditions.</i>	147
<i>Table 17: Specific Surface Area (mm^{-1}).</i>	147

Nomenclature

Alphabet latin

C	Courbure moyenne	m^{-1}
C_p	Capacité calorifique massique	$J.kg^{-1}.K^{-1}$
d_{eq}	Diamètre équivalent	m
d_{eq}^{ice}	Diamètre équivalent des cristaux de glace	m
ΔG	Différence d'énergie de surface	J
ΔG_c	Energie libre critique	J
ΔG_s	Energie libre pour la formation de surface	J
ΔH_w	Enthalpie de transition totale de la fusion de la glace	$J.g^{-1}$
ΔH_i	Chaleur latente spécifique de la fusion de la glace	$J.g^{-1}$
∇T	Gradient de température	K
f_{min}	Courbure minimale	m^{-1}
f_{max}	Courbure maximale	m^{-1}
F_w	Fraction d'eau congelable	$\%$
k	Vitesse de recristallisation	
L	Longueur rectiligne parcouru par un fluide	m
L_e	Longueur réelle parcourue par un fluide	m
\bar{L}_0	Taille moyenne des cristaux de glace à un temps t	m
$\bar{L}(t)$	Taille moyenne initiale des cristaux de glace	m
M_m	Masse molaire	$kg.mol^{-1}$
m	Masse	kg
m_0	Masse initiale	kg
m_f	Masse finale	kg
N^{Pores}	Nombre de pores	-
n	Paramètre adimensionnel qui dépend de la cristallisation	-
$r(x)$	Carte des résidus	
s	Variable de caractérisation de la diffusion moléculaire	-
$S_{ice/air}$	Surface totale entre la glace et l'air	m^2
S_w	Saturation de l'eau	$\%$
t	Temps	s
T	Température	$^{\circ}C$
T_{CC}	Température de congélation commençante	$^{\circ}C$
T_i	Température initiale	$^{\circ}C$
T_f	Température finale	$^{\circ}C$
T_w	Teneur en eau	$\%$
v	Vitesse de congélation	$^{\circ}C.s^{-1}$
V	Volume	m^3
V_{air}	Volume de l'air	m^3
V_{ice}	Volume total de la glace	m^3
$V_{ice\ inside}$	Volume de la glace intérieure	m^3

$V_{ice\ outside}$	Volume de la glace extérieure	m^3
V_{starch}	Volume de l'amidon	m^3
V_{total}	Volume total de l'échantillon	m^3
v^{ice}	Volume moyen des cristaux de glace	m^3
V^{ice}	Volume des cristaux de glace	m^3

Alphabet grec

α	Diffusivité thermique	$m^2 \cdot s^{-1}$
λ	Conductivité thermique	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$
π	Constante mathématique (= 3,14)	-
ρ	Masse volumique	$kg \cdot m^{-3}$
ρ_{app}	Densité apparente	-
ρ_s	Densité réelle	-
ρ_w	Densité de l'eau	-
σ	Tension de surface	$J \cdot m^{-2}$
φ_i	Fraction volumique de glace/ air ou bien matrice	%
τ	Tortuosité	-

Indices et Exposants

<i>air</i>	air	<i>f</i>	Finale
<i>ice</i>	glace	<i>i</i>	Initial
ice inside	Glace extérieur	<i>min</i>	minimale
ice outside	Glace extérieur	<i>max</i>	maximale
Starch	Amidon	<i>app</i>	Apparente
<i>eq</i>	Equivalent		

Abréviations

MC	Méthylcellulose
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
SSA	Specific Surface Area (surface spécifique)

Instruments & Méthodes de mesure

CellStat	Cellule thermostatée statique
CellDyM	Cell for Dynamic Monitoring (Cellule pour un suivi en dynamique)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimétrie différentielle à balayage)
DVC	Digital Volume Correlation (Corrélation digitale volumique)
SEM/MEB	Scanning Electron Microscopy / Microscope électronique à balayage
TXM	Full-field Transmission X-ray Microscopy (Microscopie à rayons X à transmission plein champ)
μ -CT RX	Computed Tomography, Tomographie à rayon X

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier vivement et très sincèrement les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse.

Je remercie tout d'abord l'équipe qui m'a encadré durant ma thèse. Je commencerai par remercier mon directeur de thèse Christian GEINDREAU, professeur à l'Université de Grenoble, pour son attention particulière depuis le début de ma thèse et son suivi direct de l'avancement du travail. Je tiens également à remercier mes encadrantes ; Hayat BENKHELIFA, Maître de Conférences à l'AgroParisTech et Fatou-Toutie NDOYE ingénieure de recherche à l'INRAE Antony pour leur grand soutien tout au long de la thèse. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude pour leur disponibilité et leur dynamisme. Leur compétence, leur clairvoyance, leur esprit de rigueur et leur enthousiasme m'ont beaucoup appris et donné confiance. Je leur exprime ma vive reconnaissance et je leur dédie également ce travail. Je remercie également Frédéric Flin chargé de recherche à Météo France et Pierre LATIL ingénieur de recherche au CNRS pour leur suivi tout au long du travail expérimental et notamment la partie traitement d'images. Je leur remercie également pour leurs remarques pertinentes et constructives lors de la rédaction de différents rapports de thèse.

J'adresse également mes chaleureux remerciements aux membres de l'unité, qui ont contribué chacun à sa façon, et toujours dans la bonne humeur au bon déroulement de cette étude, que ce soit de manière technique, scientifique, administrative ou amicale : Romuald Hunlede, Elyamine Dahmana, Seydina, Alain Denis, Alain Thomas, Graciela Alvarez, Onrawee LAGUERRE, Pascal Clain, Antony Delahaye et Sylvie CARLINI. Je remercie enfin les thésards, les stagiaires et toutes les personnes qui m'ont accompagnées tout au long de cette aventure et avec qui j'ai passé des moments agréables au cours de ces années, Jordan, Nada, Yasmine, Véronique, Julie, Emanuel, Mahdjouba, Walid, Somia, Dihia, Tanathep, Daniel, Ahmed, et Estelle. J'ai vécu au sein de cette unité une expérience très enrichissante aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan humain et culturel.

Je remercie vivement les personnes qui ont fait partie de mon Jury. Leurs suggestions et remarques ont contribué à l'amélioration de la version finale de ce mémoire. Je remercie Madame Sylvie CHEVALLIER Ingénieure de Recherche, HDR, ONIRIS Nantes et Monsieur Luc SALVO Professeur, INP GRENOBLE, qui ont assuré la fonction de rapporteurs en apportant une analyse détaillée du manuscrit. Je remercie également le président de jury Monsieur Philippe BOHUON Professeur, Institut Agro Montpellier et monsieur Anh Minh TANG Directeur de Recherche MTE, École des Ponts ParisTech, qui m'a honoré en acceptant d'examiner ce travail.

Un merci tout particulier à mes chers amis Massi, Islem, Dolly, Bouchra, Mimi Dehbia et Selma. Leur amitié, leur soutien généreux et leur bonne humeur m'ont été indispensables. Je garde pour eux et pour toujours, une place particulière dans mon cœur.

J'exprime enfin mes remerciements à mes chers parents et à mes chers frères et sœurs : Mohamed, Abdellah, Rafik, Amine, Omar et Imène et mes belles sœurs Meriem et Imane ainsi que ma belle-famille et particulièrement mon cher Mari Wassim qui, par leur confiance, leurs encouragements et leur soutien inconditionnel m'ont donné l'énergie et la détermination nécessaires pour le bon déroulement de cette thèse. Je leur dédie ce travail, qu'ils y trouvent toute ma reconnaissance.

Introduction générale

Une matrice poreuse fait référence à un matériau constitué d'une phase solide et de son complément occupé par un fluide gazeux ou liquide. Se référant à cette définition, les produits alimentaires poreux sont nombreux et comprennent, entre autres, des fruits, des légumes et des mousses mais surtout des produits de boulangerie et de pâtisserie. En s'intéressant plus particulièrement à ce dernier groupe de produits, une étude récente de France Agrimer rapporte que 30% des produits de pâtisserie commercialisés dans les boulangeries et pâtisseries artisanales sont d'origine industrielle et surgelés. Cette étude relève que seul 1% de ces produits sont réellement fait-maison tandis que les 69% restant sont préparés par assemblage de kit (France Agrimer, 2020). La préparation à base de kit met en œuvre notamment la génoise qui constitue l'ingrédient principal de la majorité des pâtisseries confectionnées. Une enquête réalisée auprès des artisans boulangers et pâtisseries en France a révélé que près de 90% des artisans congèlent ou surgèlent la génoise après préparation, ce qui en fait le produit intermédiaire le plus congelé (Anonyme, 2016). Généralement, la génoise est préparée à grande échelle avant d'être congelée. Elle est ensuite distribuée dans les points de vente où elle est stockée avant d'être décongelée pour assemblage. La durée de stockage de la génoise est généralement inférieure à un mois comme l'a également montré l'enquête effectuée auprès des boulangers et pâtisseries (Anonyme, 2016).

La congélation est l'une des méthodes de conservation les plus répandues. Elle consiste à soumettre les aliments à des températures négatives de telle sorte à transformer l'eau liquide en solide, ce qui limite le développement des micro-organismes ainsi que les réactions de dégradation enzymatique. Après congélation, les produits passent par différentes étapes de transport et d'entreposage pour arriver à leur utilisateur final, ce qui constitue la chaîne du froid. La congélation et le stockage sont les étapes clé de cette chaîne du froid. Ils permettent ainsi de préserver les qualités originelles des aliments et de prolonger leur durée de vie. Pour remplir pleinement cet objectif, il est nécessaire de bien maîtriser les paramètres de la chaîne du froid, notamment ceux du procédé de congélation et des conditions de stockage. Un mauvais contrôle de ces paramètres opératoires peut engendrer des dommages irréversibles qui annihileraient les effets attendus à savoir une préservation des qualités organoleptique, nutritionnelle et sanitaire des produits alimentaires. Il est donc important de bien comprendre les mécanismes par lesquels ces paramètres affectent les produits afin de pouvoir jouer sur les leviers de contrôle dans l'intégralité de la chaîne du froid et ainsi limiter leur impact.

D'un point de vue mécanistique, la congélation est gouvernée par le phénomène de cristallisation qui se déroule selon deux mécanismes : la nucléation suivie de la croissance des cristaux de glace. Ces deux mécanismes sont fortement contrôlés par la vitesse de congélation et définissent la microstructure cristalline (nombre, distribution de tailles, localisation et morphologie des cristaux de glace) des produits en cours de congélation. La microstructure ainsi définie est fortement corrélée aux critères de qualité macroscopique des aliments (texture, couleur...). Des cristaux de petite taille auraient tendance à mieux préserver les caractéristiques des aliments comparés aux cristaux de grande taille qui seraient plutôt susceptibles de provoquer des modifications physiques et chimiques qui réduiraient la qualité des produits, une fois décongelés (Mousavi et al. 2007, Mulot et al. 2019). Le stockage, subséquent à la congélation, constitue également un paramètre clé dans l'évolution de la microstructure cristalline initialement définie durant le procédé de congélation. En effet, les différences d'énergie de surface entre les petits et les gros cristaux mettent en œuvre le phénomène de recristallisation qui se manifeste par la croissance des cristaux de glace et la baisse de leur nombre. La recristallisation est systématique en cours de stockage mais est favorisée par les fluctuations de température qui accentuent les modifications

microstructurales. Cette évolution des cristaux de glace engendre des modifications supplémentaires qui sont dommageables pour la qualité des produits. Il apparaît ainsi un impact couplé des mécanismes de cristallisation et de recristallisation sur la microstructure cristalline et par conséquent sur la qualité finale des produits.

Dans le présent travail, on s'intéresse spécifiquement aux matrices poreuses de type génoise, dont la porosité élevée introduit des particularités dans les mécanismes mis en œuvre lors de la congélation et le stockage. Dans les structures poreuses, les transferts thermiques et de masse s'opèrent selon des caractéristiques différentes de celles généralement observées dans les produits denses. Par exemple, l'eau diffuse plus rapidement que dans les produits denses (Pham 2006). Ses spécificités s'observent également lors de la congélation avec le phénomène d'évaporation-condensation qui aurait pour principale conséquence la formation préférentielle des cristaux de glace dans les pores (Baier-Schenk et al. 2005). De nombreux chercheurs se sont penchés sur l'étude de l'impact de la congélation et/ou du stockage sur la qualité des produits de boulangerie et de pâtisserie. Cependant plusieurs points peuvent être soulignés suite à ces études : (i) elles concernent essentiellement la pâte à pain (Baier-Schenk et al. 2005, Yi and Kerr 2009, Ban et al. 2016) et le pain et très peu la génoise (Díaz-Ramírez et al. 2016, Van Bockstaele et al. 2021); (ii) l'effet du couplage conditions de congélation et de stockage a été abordé sous l'angle de l'intégrité de la structure de l'amidon et des réseaux de protéines et/ou des critères de qualité macroscopiques, sans pour autant investiguer la microstructure cristalline (Ribotta et al. 2001, Phimolsiripol et al. 2008, Yi and Kerr 2009, Van Bockstaele et al. 2021). Il ressort de cette analyse un besoin en recherche sur la compréhension du couplage congélation/stockage et de son impact sur le développement de la microstructure cristalline dans les produits poreux de boulangerie et de pâtisserie.

Problématiques technologique et scientifique

L'industrie et l'artisanat de la boulangerie et de la pâtisserie utilisent de plus en plus les technologies de congélation. A l'échelle industrielle, cet intérêt croissant pour les produits de boulangerie congelés est principalement motivé par l'avantage économique d'un processus de fabrication et de distribution centralisé ainsi que par la standardisation de la qualité du produit. Au niveau artisanal, la congélation permet aux professionnels de s'affranchir d'une part conséquente de la production qui réclame beaucoup de temps de préparation. Elle offre également une souplesse sur la gestion des commandes et permet aux professionnels de diversifier les recettes et par conséquent leur offre en magasin. Toutefois, aussi bien les industriels que les artisans ont une mauvaise maîtrise de l'influence des procédés de congélation et des conditions de stockage et de distribution (toute la chaîne du froid) sur le développement de la microstructure cristalline et *in fine* sur la qualité finale des produits.

Une meilleure compréhension des mécanismes qui gouvernent la congélation et le stockage dans les produits poreux est impérative pour répondre à ces enjeux technologiques. Or, il apparaît clairement que les connaissances sur le sujet restent limitées. Cette méconnaissance soulève diverses questions : (i) quelles méthodes robustes et fiables pour caractériser la microstructure cristalline de produits poreux congelés et extraire des informations utiles à l'avancée des connaissances sur les mécanismes mis en œuvre ? (ii) dans quelle mesure le procédé de congélation influe sur la microstructure développée en cours de stockage ? Existe-t-il un effet synergique entre les mécanismes de cristallisation et de recristallisation dans les produits poreux de type génoise ? (iii) Un produit modèle ou simplifié peut-il représenter les caractéristiques d'une génoise congelée et aider à la compréhension des processus physiques qui prennent place en cours de congélation et de stockage ?

Ce travail de thèse se propose de répondre à ces questionnements à travers l'étude de l'impact couplé du procédé de congélation et des conditions de stockage sur la microstructure d'un produit poreux de type génoise. Le principal objectif est de combler le manque de connaissances quant aux mécanismes qui régissent la formation et l'évolution de la microstructure cristalline et ainsi aider à une meilleure maîtrise de la qualité des produits

Méthodologie de travail

Afin d'atteindre les objectifs précités, le travail de thèse a démarré par une étude bibliographique consacrée aux phénomènes de cristallisation et de recristallisation avec un accent particulier sur les matrices alimentaires poreuses. Les méthodes de caractérisation des cristaux de glace ont également été passées en revue, de même que les produits modèles représentatifs des produits alimentaires poreux. Le travail a ensuite concerné la fabrication et la caractérisation d'une génoise modèle (non réactive) afin de vérifier sa reproductibilité notamment en termes de teneur en eau, de porosité et de densité. Dans un premier temps, ce produit modèle a ensuite été utilisé pour étudier l'effet de la vitesse de congélation sur la localisation, la taille et la morphologie des cristaux de glace. Pour cela, deux méthodes complémentaires de caractérisation de la microstructure ont été utilisées : la cryo-microscopie qui est une méthode plutôt qualitative et la microtomographie à rayons X à très haute résolution (synchrotron) qui donne à la fois des informations qualitatives et quantitatives. Les expérimentations ont été réalisées sur des échantillons à l'état congelé grâce à une cellule thermostatée. L'obtention des données quantitatives à partir de la microtomographie à rayons X a notamment nécessité la mise en place d'une méthode de traitement d'image robuste. Dans un second temps, des expérimentations de congélation à différentes vitesses, suivie de stockage à différentes températures et durées ont été effectuées pour étudier l'effet couplé des étapes de congélation et de stockage. La microtomographie à rayons X (synchrotron) ainsi que la méthode de traitement d'image précédemment implémentée ont été appliquées pour caractériser la microstructure. Enfin, le travail s'est intéressé à une génoise réelle de référence, dont la microstructure a été étudiée en dynamique et in situ à l'aide d'une cellule froide couplée à un microtomographe à rayons X de laboratoire.

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres, outre une introduction générale et une conclusion et des perspectives.

Le premier chapitre présente la revue bibliographique sur les produits poreux, les procédés de congélation, les mécanismes de cristallisation et recristallisation qui déterminent la microstructure des produits alimentaires congelés et les méthodes de caractérisation de la microstructure cristalline. Ce chapitre met, notamment, en évidence les besoins en recherche pour une meilleure compréhension des effets combinés de la congélation et du stockage sur la qualité des produits poreux de type génoise.

Le deuxième chapitre décrit dans le détail l'ensemble des matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail de thèse.

Les trois chapitres suivants décrivent les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse sous forme d'articles. Les articles sont rédigés en langue anglaise. Un résumé, en langue française, rappelant les objectifs de travail, la méthodologie expérimentale, les principaux résultats et les conclusions est présenté avant chacun des trois articles.

Le troisième chapitre présente l'étude de l'impact de la vitesse de congélation sur l'évolution de la microstructure d'une génoise modèle. Deux vitesses de congélation ont été étudiées. La microstructure a été analysée en fin de congélation.

Le quatrième chapitre concerne l'étude de l'impact couplé de la vitesse de congélation et des conditions du stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle. Les deux vitesses de congélation étudiées dans le chapitre 3 ont été combinées à quatre conditions de stockage différentes et la microstructure a été caractérisée à trois temps différents au cours du stockage.

Le cinquième chapitre s'intéresse à l'application du couplage congélation/stockage à un produit réel. Pour cette étude, un échantillon de génoise réelle a été caractérisé in situ au cours d'une congélation suivie d'un stockage en dynamique (cyclage thermique).

Pour chacun de ces trois chapitres, les résultats qualitatifs et quantitatifs ont été décrits puis discutés en termes mécanistique.

Pour clore, une conclusion générale récapitule les réponses aux questionnements scientifiques soulevés dans cette introduction. Elle est suivie d'un ensemble de perspectives qui peuvent faire l'objet de travaux futurs.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

L'étude bibliographique a été effectuée en se basant sur plusieurs axes principaux. Dans un premier temps, une présentation des produits poreux alimentaires est faite, avec des informations sur les produits poreux en général, puis les propriétés spécifiques des produits alimentaires poreux et enfin une synthèse des travaux effectués sur les produits poreux de boulangerie. Puis, une seconde partie concerne la congélation et le stockage des produits alimentaires, d'un point de vue équipements, phénomènes de cristallisation et recristallisation, et effets sur les produits alimentaires poreux. Enfin, les méthodes de caractérisation de la microstructure des aliments, notamment congelés, sont présentées et les études spécifiques dans le cas des produits de boulangerie congelés sont décrites.

I. Produits alimentaires poreux

I.1 Généralités sur les milieux poreux

Un milieu poreux est défini comme une matrice solide contenant des espaces vides appelés pores qui peuvent être interconnectés ou séparés. Ces pores assurent l'écoulement des fluides (gaz ou liquide) à travers la matrice poreuse. On distingue deux catégories de milieux poreux : i) Les milieux poreux alvéolaires ou cellulaires considérés comme des espaces solides pleins de trous : ce sont des milieux poreux à grandes porosités comme le calcaire ou le béton. ii) Les milieux poreux granulaires ou pulvérulents considérés comme des espaces vides remplis de grains solides : ce sont des milieux à faibles porosités comme les billes de verre ou les grains de sable (Vodounnou et al. 2016).

Un milieu poreux se caractérise par trois paramètres importants : sa porosité, sa surface spécifique et sa tortuosité. Ces grandeurs jouent un rôle important dans le déroulement des différents phénomènes ayant lieu dans un milieu poreux.

I.1.1 Porosité

La porosité est une propriété géométrique définie par le ratio entre le volume des pores et le volume total de l'échantillon. Elle représente la fraction volumique de l'espace vide ou de l'air dans un matériau (Sahin and Sumnu 2006).

$$\Phi = \frac{V_{vide}}{V_{total}} \quad (1)$$

Trois types de pores peuvent exister dans une matrice poreuse comme le montre la Figure 1 (Datta 2007) :

- Des pores fermés (porosité isolée) où les pores ne participent pas aux écoulements.
- Pores ouverts (porosité connectée) où les pores participent aux écoulements.
- Des pores aveugles dont une seule extrémité est fermée.

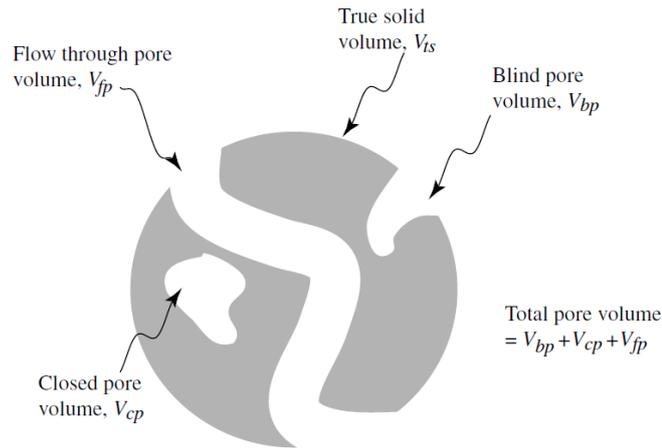


Figure 1 : schéma détaillé montrant les différents types de pores dans une matrice poreuse (Datta 2007).

Le tableau ci-dessous rappelle la définition des différents types de porosités ainsi que leur expression.

Tableau 1 : Types de porosités (Rao et al. 2014).

Type de porosité	Définition	Expression
Porosité des pores ouverts	Fraction volumique des pores connectés à la limite extérieure d'un matériau.	$\frac{\text{Volume des pores ouverts}}{\text{Volume total}}$
Porosité des pores fermés	Fraction volumique des pores fermés à l'intérieur du matériau et non reliés à sa limite extérieure.	$\frac{\text{Volume des pores fermés}}{\text{Volume total}}$
Porosité apparente	Fraction volumique de l'aire totale ou de l'espace vide dans la limite du matériau. Elle correspond à la somme de la porosité fermée et ouverte.	$\frac{\text{Volume de tous les pores}}{\text{Volume total}}$

La porosité des pores ouverts est aussi appelée porosité effective d'un milieu poreux (Koponen et al. 1997).

La connaissance de la répartition de la taille des pores est nécessaire pour assurer un meilleur contrôle des phénomènes de transfert au sein des milieux poreux. Dans le domaine agroalimentaire, on considère en général quatre échelles : l'échelle macroscopique au-delà de 100 μm , l'échelle mésoscopique entre 5 et 100 μm , l'échelle microscopique (entre 0,1-5 μm) et enfin l'échelle nanoscopique pour des tailles inférieures à 100 nm (0,1 μm).

Cette diversité de tailles offre un grand nombre de possibilités au cheminement du fluide au sein du matériau poreux. De façon générale, la présence de pores influence largement et complexifie les phénomènes de transfert de matière et de chaleur dans ces produits (Pham 2006). Plusieurs paramètres sont alors à considérer.

I.1.2 Surface spécifique

Cette grandeur est définie comme le rapport de l'aire de la surface totale des interfaces solide-pores au volume de l'échantillon (Bories et al. 1995). On parle souvent de la surface spécifique accessible qui correspond à la porosité ouverte.

$$SSA = \frac{S_{solide-pores}}{V_{total}} \quad (2)$$

Avec : SSA (m^{-1}) surface spécifique accessible, $S_{solide-pores}$ la surface totale entre le solide et les pores (m^2), V_{total} le volume total de l'échantillon (m^3).

I.1.3 Tortuosité

La tortuosité peut être définie comme le rapport entre le trajet réel L_e parcouru par un élément fluide entre deux points et le trajet en ligne droite entre ces deux mêmes points L (Datta 2007) (Figure 2). La tortuosité est largement utilisée comme un paramètre critique pour prédire les propriétés de transport des milieux poreux.

$$\tau = \frac{L_e}{L} \quad (3)$$

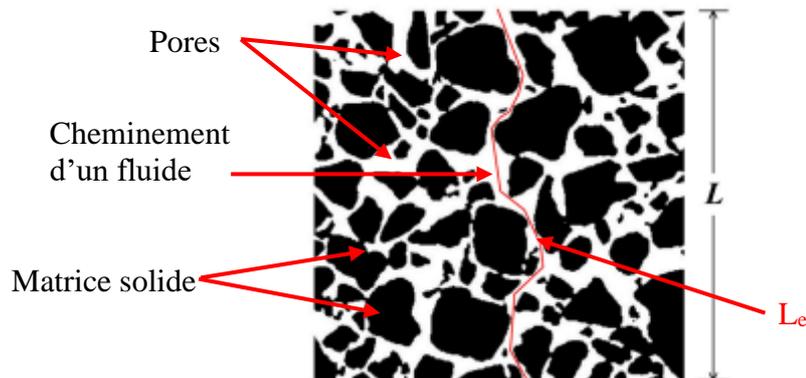


Figure 2 : Exemple d'un milieu poreux : les pores sont en blanc, la matrice solide est en noir (Fu et al. 2021).

I.2 Exemples de milieux poreux

Les milieux poreux sont nombreux à l'état naturel et jouent un rôle primordial dans les processus biologiques (végétaux, bois, peau humaine, cartilage, os...) et naturels (sols, roches poreuses, neige...). Ils interviennent par ailleurs dans diverses applications industrielles (bétons, poudres, mousse métallique, céramique poreuse, ciment, tissu...). Dans l'industrie chimique, certains catalyseurs, largement utilisés, sont des solides microporeux dont on exploite la grande surface interne et la capacité d'adsorption des gaz. Enfin dans le domaine alimentaire, les produits poreux sont divers (fruits, légumes, poudres, mousses, solides alvéolés...) et appréciés pour les qualités qu'ils confèrent au produit (structure et texture). La Figure 3 montre des exemples de produits poreux de nature différente.

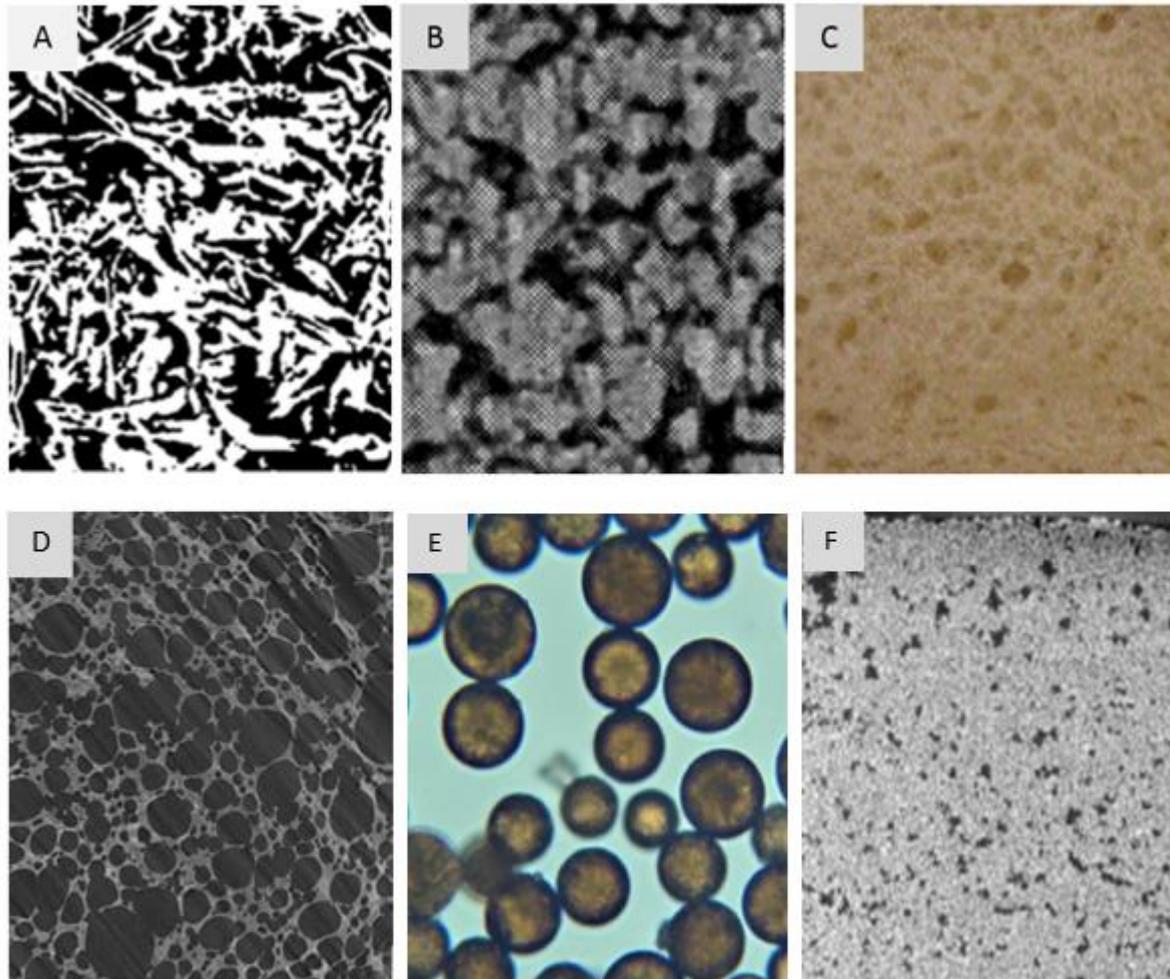


Figure 3 : Exemples de matériaux poreux : A) papier industriel (Rolland et al. 2007), B) Pierre de sable (Coles et al. 1998), C) Pain (Wang et al. 2007), D) Génoise (Bousquières 2017) , E) Billes de silice (Benmesbah 2021) , F) Sable (Benmesbah 2021).

I.3 Propriétés des produits alimentaires poreux

Les produits alimentaires poreux les plus étudiés dans la littérature sont essentiellement les fruits et les légumes (Ni and Datta 1999, Kuroki et al. 2004, Mousavi et al. 2007, Voda et al. 2012, Herremans et al. 2014, Ullah et al. 2014, Joardder et al. 2015) et les produits de panification tels que la pâte à pain et le pain (Baik and Chinachoti 2000, Baier-Schenk et al. 2005, Lucas et al. 2005, Babin et al. 2008, Shehzad et al. 2010, Silvas-García et al. 2014, Akbarian et al. 2016). Certaines études concernent aussi des produits comme la génoise et les cakes (Guillard et al. 2003, Bousquières 2017, Van Bockstaele et al. 2021). Les valeurs de porosité des fruits et légumes (aubergine, navet, pomme et poire) ont été mesurées par microtomographie à rayons X (μ CT-RX) (Nugraha et al. 2019). En moyenne, l'aubergine présente la structure la plus poreuse (41,8% de porosité), suivie du navet (23,3 %), de la pomme (19,7 %) et de la poire (4,0 %). Dans le cas des produits de panification, la porosité est plus importante que celle des fruits et légumes. La gamme de porosité dépend essentiellement du procédé de fabrication et donc de la quantité d'air mise en jeu pendant la préparation de la pâte, du temps de fermentation de la pâte à pain et de la vitesse de mixage

dans le cas des génoises par exemple. Dans la littérature, les valeurs de porosité varient d'un produit à un autre. La valeur de porosité du pain mi-cuit mesurée par Hamdami et al. (2004) est assez importante pouvant atteindre les 76 % pour la croute et 85% pour la mie de pain. Dans le cas de la pâte à pain ; la porosité a été mesurée pendant la fermentation par Shehzad et al. (2010). La porosité moyenne varie de 20% à 80% après 3h de fermentation.

Il est donc difficile de trouver une classification des produits alimentaires poreux selon la gamme de porosité. Néanmoins, Hamdami et al. (2004b) qui ont étudié les transferts dans les milieux poreux comme le pain ont considéré que :

- Lorsque la porosité est inférieure à 50%, le produit est peu poreux.
- Une porosité supérieure à 50% représente un produit à grande porosité.

Les produits alimentaires sont le siège de phénomènes de transferts de chaleur (lors du chauffage ou du refroidissement) et de matière (transport d'eau sous forme liquide ou vapeur notamment). La présence de pores, leur nombre, leur répartition dans la matrice solide ainsi que leur taille vont avoir un rôle important sur ces phénomènes de transferts (Datta 2007).

En outre, les milieux poreux ont également d'autres propriétés qui dépendent de la nature du produit, de sa porosité et ses constituants.

I.3.1 Densité apparente

Dans le cas des produits poreux, on peut mesurer deux sortes de densités. Une densité en présence de l'air appelée densité apparente et une densité sans air dite densité réelle. La densité réelle est mesurée après avoir chassé l'air présent dans le produit poreux (Datta 2007). Dans la plupart des études empiriques, la densité apparente est définie comme une fonction de la porosité, de la densité de l'eau et des solides, et de la saturation en eau (Datta 2007). L'équation (4) représente la densité apparente :

$$\rho_{app} = \rho_s(1 - \Phi) + \Phi S_w \rho_w \quad (4)$$

Avec ρ_{app} et ρ_s sont respectivement la densité apparente et la densité réelle, Φ la porosité (%), S_w saturation de l'eau (%), ρ_w densité de l'eau.

La densité représente un paramètre important pour l'étude d'un produit poreux. D'un côté, elle permet de calculer la porosité moyenne du produit mais elle intervient aussi pour la mesure de la conductivité thermique (Hamdami et al. 2004).

I.3.2 Conductivité thermique λ

La conductivité thermique est une propriété essentielle qui détermine la vitesse de transmission de la chaleur à travers les aliments lors d'un traitement thermique. Elle peut être calculée par le biais de la loi de Fourier:

$$q = -\lambda \nabla T \quad (5)$$

Avec : q la densité de flux de chaleur (W.m^{-2}), λ la conductivité thermique ($\text{W.m}^{-1} \text{K}^{-1}$). T , en Kelvin (K).

La conductivité thermique dépend de la nature du produit, de son état et de sa composition (Hamdami et al. 2003). Elle va aussi dépendre de la température du produit. A titre d'exemple, la conductivité thermique de l'air vaut $\lambda_{\text{air}} = 0,025 \text{ W.m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ à $20 \text{ }^\circ\text{C}$, celle de l'eau est de $\lambda_{\text{eau}} = 0,6 \text{ W.m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ alors que celle de la glace est $\lambda_{\text{glace}} = 2,3 \text{ W.m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ à $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ et est environ quatre fois plus importante que celle de l'eau bien qu'il s'agisse du même matériau mais dans un état différent.

Dans le cas des aliments, la quantité d'eau et d'air influe très fortement sur la valeur de la conductivité. La conductivité thermique des produits poreux a également été mesurée. Dans le cas du pain par exemple, Hamdami et al. (2004) ont mesuré la conductivité thermique pour trois températures différentes 2.5, 15 and 23 $^\circ\text{C}$. Les valeurs obtenues sont comprises entre 0.6 et 0.9 $\text{W.m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. Les mesures faites dans le cas de la génoise, Carson (2014) donnent des valeurs de conductivité comprises entre 0.1 et 0.15 $\text{W.m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

I.3.3 Diffusivité thermique

La connaissance des propriétés thermiques des produits alimentaires poreux ou non poreux est nécessaire pour prévoir, expliquer et optimiser tout processus impliquant un transfert de chaleur, comme la congélation, la décongélation ou encore la cuisson.

La diffusivité thermique représente l'efficacité avec laquelle la chaleur se propage ou diffuse à travers un produit.

Elle est définie à partir de l'équation (6) :

$$\alpha = \frac{\lambda}{\rho C_p} \quad (6)$$

Avec : α la diffusivité thermique exprimé en ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), λ ($\text{W.m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) la conductivité thermique du produit, ρ (kg.m^{-3}) sa densité et C_p ($\text{J.kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) sa capacité calorifique massique.

La diffusivité thermique dépend essentiellement de la teneur en eau, de la température et de la porosité du produit.

La variation de la teneur en eau a un effet sur la valeur de la diffusivité thermique. Tavman et al. (1997) ont remarqué que l'augmentation de la teneur en eau entraîne une légère diminution de la diffusivité thermique

Zanoni et al. (1995) ont étudié la diffusivité thermique du pain en fonction de la porosité. Les auteurs ont établi un lien entre ces deux paramètres. La diffusivité thermique augmente de façon exponentielle avec l'augmentation de la porosité, quand la porosité de la mie de pain

varie de 0 à 79 %, la valeur de la diffusivité thermique double et passe de 25×10^{-8} à $53 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les auteurs ont trouvé que le flux de chaleur est plus élevé dans les milieux poreux à cause de la plus faible chaleur spécifique et de la faible densité, qui interviennent inversement dans la diffusivité thermique.

I.4 Produits poreux de boulangerie

Les produits de boulangerie sont largement consommés et donc produits en grande quantité. De ce fait, l'augmentation de leur durée de vie a toujours représenté un défi pour les artisans et les industries agro-alimentaires. Les produits de boulangeries sont des produits majoritairement poreux dont la porosité varie en fonction de la composition et du procédé de fabrication. Les produits de boulangeries sont très variés (pain, viennoiseries, madeleines, génoises...). Ces produits peuvent être classés selon le procédé d'aération utilisé (Bousquières 2017) :

- Les pâtes levées : qui consiste à utiliser des levures biologiques
- Les pâtes poussées : qui consiste à utiliser des levures chimiques
- Les pâtes montées : qui ne nécessite pas l'utilisation de levure

De nombreuses études à la fois expérimentales et par modélisation ont été effectuées d'une part pour étudier et optimiser l'étape de cuisson et son impact sur l'humidité et la variation du volume (Zanoni et al. 1994, Lostie et al. 2002, Therdthai et al. 2002, Zhang and Datta 2006, Mondal and Datta 2008). D'autre part, d'autres études ont porté sur l'impact des ingrédients sur le développement de la structure alvéolaire et poreuse de ces produits (Baeva et al. 2000, Skrabanja et al. 2001, Gambusí et al. 2007, Cavalcante and Silva 2015, De Lamo and Gómez 2018, Goranova et al. 2019).

La difficulté dans le cas de ces études est de ne pas pouvoir généraliser les phénomènes qui s'y déroulent car ils sont fortement dépendants de la formulation initiale. Plusieurs auteurs se sont alors intéressés à l'étude d'aliments modèles de produits de boulangerie.

I.4.1 Produits poreux modèles

Dans la littérature, des produits poreux modèles ont été développés pour être représentatif d'un produit alimentaire poreux réel de par ses caractéristiques thermophysiques à savoir : la porosité, la teneur en eau, la conductivité thermique, la densité et la viscosité.

Dans le cas du pain, des auteurs ont étudié les éponges cellulósiques en considérant qu'elles sont assimilables à la croûte du pain (de par leur porosité, teneur en eau et distribution des pores) (Hamdami et al. 2004b). Les éponges cellulósiques ont une porosité qui varie entre 59 et 94 % et une teneur en eau entre 35 et 60%. Les auteurs ont réussi à modéliser les phénomènes de transferts de chaleur et de matière pendant la congélation tout en introduisant l'effet de l'évapo-condensation dans les milieux poreux et le taux de formation de glace. Les résultats étaient prometteurs et étaient en adéquation avec les résultats expérimentaux. L'inconvénient dans le cas d'un produit modèle comme les éponges est l'impossibilité de

contrôler les propriétés de ces derniers notamment la porosité qui varie lors de leur fabrication d'un lot d'éponge à un autre.

Certains auteurs se sont intéressés à l'étude de gâteaux telle que la génoise. Bousquière (2017) a réussi à développer une génoise modèle non réactive afin d'éviter les réactions de Maillard et de caramélisation tout en gardant ses fonctionnalités, en remplaçant des ingrédients tels que le sucre et les œufs par des stabilisants alimentaires : Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) et Méthylcellulose (MC). La formulation développée ne contient que de l'eau, de l'amidon et les stabilisants et se rapproche, d'un point de vue viscosité, de la pâte et, d'un point de vue texture, de celle d'une génoise réelle.

D'autres auteurs ont cherché grâce à l'usage des produits issus de l'impression 3D à mettre au point des aliments parfaitement contrôlés et automatisés en forme et en structure. Lipton et al. (2010) ont confectionné de la pâte en impression 3D pour préparer des biscuits. Ils ont réussi à réaliser des formes complexes en utilisant les mêmes ingrédients que ceux des biscuits classiques. D'autres auteurs, ont utilisé l'impression 3D pour fabriquer du chocolat (Liu et al. 2017) comme le montre la Figure 4. Bien que l'impression 3D permette de mieux maîtriser la reproductibilité des caractéristiques du produit à une échelle macroscopique (porosité, densité et teneur en eau...), celle-ci reste difficile à mettre en place et les coûts sont élevés.



Figure 4 : Exemples d'aliments obtenus par impression 3D: (A) pâte à biscuits (B) chocolat "Mr. Noir", (C) bonbons colorés (Lipton et al. 2010, Liu et al. 2017).

I.4.2 Génoise

La génoise est un gâteau largement consommé puisqu'elle sert de base pour beaucoup d'entremets et de produits de pâtisseries. C'est un produit alimentaire poreux, qui est consommé notamment pour sa texture aérée.

Pour répondre à la forte demande, la génoise est généralement préparée en deux étapes, la génoise est d'abord préparée et congelée pour être conservée puis dans un second temps cette dernière est décongelée afin d'être décorée pour la préparation des entremets.

Les recettes de préparation de génoise sont multiples. Dans la littérature, plusieurs formulations de génoise ont été étudiées comme le montre le tableau 2. Les trois ingrédients

Chapitre 1 : Etude bibliographique

essentiels qui composent la génoise sont : la farine de blé, le sucre et les œufs. Il est toutefois possible d'ajouter d'autres ingrédients tels que : la matière grasse, de la levure, du lait ou même des additifs alimentaires.

Tableau 2 : Les différentes recettes de génoise dans la littérature (% en masse).

Auteurs	Farine de blé	Sucre	Œufs			lait	eau	Levure chimique	Matière grasse	Autres (sel...)
			entier	blanc	jaune					
(Baeva et al. 2000)	30,88	25,90	-	29,94	13,28	-	-	-	-	-
(Lostie et al. 2002)	35,00	35,00	30,00	-	-	-	-	-	-	-
(Guillard et al. 2003)	30,3	28,8	29,3	-	-	-	8,5	-	Glycérol 2,4	Sel 0,4 Emulsifiant 0,3
(Ronda et al. 2005)	20,73	20,73	38,86	-	-	-	-	0,69	beurre 17,27	Emulsifiant 1,73
(Olszewski 2006)	19,62	23,98	40,64	-	-	-	-	-	beurre 15,53	Extrait de vanille 0,27
(Pozo-Bayón et al. 2006)	25,12	32,12	45,73	-	-	-	-	-	Palme 4,01	Sel 0,49
(Wilderjans et al. 2013)	29,76	32,14	22,32	-	-	14,29	-	1,49	-	-
(Botosoa et al. 2013)	23,3	20 + 7% De Sirop de glucose	18,5	-	-	Poudre écrémée 1,6	14	1	Palma +colza 14	Sel 0,6

La génoise est un gâteau qui a été largement étudié dans la littérature. Des études ont été effectuées afin de comprendre le rôle des différents ingrédients ainsi que les procédés de fabrication et de cuisson. Bousquière (2017) a étudié les différentes réactions qui se produisent pendant la cuisson de la génoise. Pour le déroulement de son étude, il a étudié deux types de génoise, une génoise réelle de référence et réactive et une génoise modèle non réactive. D'autres études ont porté sur l'encapsulation des arômes dans la génoise et son effet sur la conservation des arômes pendant la préparation et la conservation (Madene 2006).

De même, les transferts de matière et de chaleur pendant la cuisson de la génoise ont été étudiés par plusieurs auteurs (Lostie et al. 2002, Guillard et al. 2003, Roca et al. 2008). Les ingrédients de la génoise jouent un rôle important dans les transferts de chaleur et de matière ainsi que dans sa qualité pendant la cuisson. Des auteurs ont étudié l'effet de certains ingrédients dans la fabrication de génoises tels que : les émulsifiants (Sahi and Alava 2003) et la taille des particules de la farine de blé (Choi and Baik 2013).

La conservation et l'augmentation de la durée de vie de la génoise ont notamment été étudiées. Janjarasskul et al. (2016) ont étudié l'effet de l'emballage sur l'augmentation de la durée de vie de la génoise. D'autres études ont été effectuées pour étudier l'effet des conditions d'aération (vitesse et durée d'aération) sur les propriétés rhéologiques et la taille des bulles de la pâte ainsi que les propriétés du biscuit telles que la texture, la densité et la teneur en eau (Edoura-Gaena et al. 2007).

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Pour mieux la conserver et la produire en grande quantité, la génoise est souvent congelée puis stockée. On s'intéresse alors aux procédés de congélation et de stockage et aux mécanismes qui y ont lieu.

II. Congélation et stockage des produits alimentaires

Dans cette partie, les équipements de congélation et de stockage utilisés dans l'industrie agro-alimentaire vont d'abord être décrits. Puis les mécanismes de cristallisation et de recristallisation qui se produisent dans les aliments lors de ces étapes seront présentés. Enfin la dernière partie concernera plus spécifiquement les études portant sur la congélation et le stockage des produits poreux.

II.1 Equipements de congélation et de stockage

Les équipements de congélation et de stockage peuvent être classés selon leur mode de fonctionnement (fonctionnement discontinu ou continu), ou bien selon le medium de transmission de la chaleur (à air, par contact, cryogénique). Dans le cadre de notre étude, à savoir la congélation et le stockage d'un aliment solide, nous n'allons nous intéresser qu'aux équipements utilisant l'air pour refroidir les aliments, qui sont majoritaires dans ce cas.

Ces équipements utilisent l'air comme medium de transmission de la chaleur. Les produits alimentaires sont placés dans des chambres à circulation d'air par convection naturelle ou forcée. Il existe plusieurs types d'équipements à air : congélateurs à air statique, les congélateurs à froid ventilé ou pulsé, les tunnels de congélation et les congélateurs à lits fluidisés.

II.1.1 Equipements à air discontinus

Ce sont des enceintes ou chambres froides isolées et thermostatées dans lesquelles les produits sont entreposés sur des étagères, des palettes ou sur des chariots. La quantité de produits à traiter est directement liée à la taille de l'enceinte.

Dans le cas des congélateurs à froid statique, l'air est refroidi au contact des évaporateurs et circule naturellement par convection. En l'absence de ventilateurs qui font circuler l'air froid dans ces congélateurs, la congélation des denrées alimentaires est plus lente en raison d'un faible coefficient de transfert de chaleur (inférieur à $10 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$). C'est le cas des congélateurs domestiques (Figure 5a).

Dans le cas des congélateurs à froid ventilé ou pulsé, (Figure 7a) de l'air froid est ventilé sur le produit par des ventilateurs placés à proximité de l'évaporateur. Les vitesses d'air atteignent alors plusieurs mètres par seconde et les coefficients de transferts sont plus élevés (supérieurs à $20 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$). La vitesse de congélation des produits alimentaires est alors plus importante (Nowotny 1987). Pour des quantités réduites de produits à congeler (quelques kilos à quelques dizaines de kilogrammes de produits), les armoires de surgélation sont utilisées (Figure 5b).



Figure 5: Equipements de congélation : (a) congélateur coffre à froid statique, (b) armoire de surgélation à froid ventilé.

Dans le cas du stockage de produits déjà congelés (Nowotny 1987), il s'agit de maintenir les aliments à une température suffisamment basse (réglementairement inférieure à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$), de façon constante et pour une durée qui peut aller de quelques jours à plusieurs mois. A l'échelle domestique, le congélateur à froid statique suffit. A plus grande échelle, des chambres froides (Figure 6) ou des entrepôts frigorifiques à froid ventilé sont utilisés : de l'air froid, pré-refroidi au contact d'évaporateurs, est soufflé à forte vitesse. Compte tenu des dimensions de l'enceinte, la vitesse de l'air chute fortement à proximité des aliments et les coefficients de transfert sont proches de ceux rencontrés en froid statique. Dans tous les cas, il vaut mieux emballer un aliment lors du stockage afin d'éviter son dessèchement au cours du temps compte tenu de l'air relativement sec présent dans l'enceinte.



Figure 6: Exemple de chambre froide de 6 m^3 à température négative (<https://www.pesage-mb.com/6272-chambre-froide-negative-complete-a-cheval.html>).

II.1.2 Equipements à air continu

Les tunnels de congélation (Figure 7b) sont des tunnels dans lesquels les produits passent, soit dans des cartons ouverts, soit directement sur la bande transporteuse (Nowotny 1987), et sont refroidis par de l'air froid et ventilé ($T_{\text{air}} > -30\text{ °C}$ et vitesse d'air élevée). Le temps de passage et le débit de ligne sont réglés de façon à ce que le produit sorte du tunnel à la température souhaitée (inférieure à -18 °C). Comme la longueur est importante, on utilise souvent des congélateurs à spirale. Ces équipements permettent une augmentation de la productivité et sont donc utilisés pour la surgélation de grandes quantités de produits tout en assurant une qualité de produit constante. Ce type d'équipements convient à toutes sortes de produits alimentaires (carcasse de viande, fruits et légumes).

Les tunnels à lit fluidisé (Figure 7c) sont des tunnels dans lesquels de l'air froid est soufflé à forte vitesse à travers une grille métallique sur laquelle sont déposés les aliments. Les aliments sont alors soulevés et séparés les uns des autres, ils sont "fluidisés". L'air sert à la fois de milieu de refroidissement et de milieu de transport ; ainsi, les produits adaptés à la congélation en lit fluidisé sont petits et de taille uniforme (pour faciliter la fluidisation) et ne sont pas susceptibles d'être endommagés par le mélange à grande vitesse qui se produit dans un lit fluidisé. La grande vitesse de l'air et la petite taille du produit permettent généralement d'obtenir des temps de congélation courts (George 1993, North and Lovatt 2006). On facilite ainsi une congélation individuelle des produits (IQF), rapide et on évite le collage des produits entre eux au cours de leur surgélation.

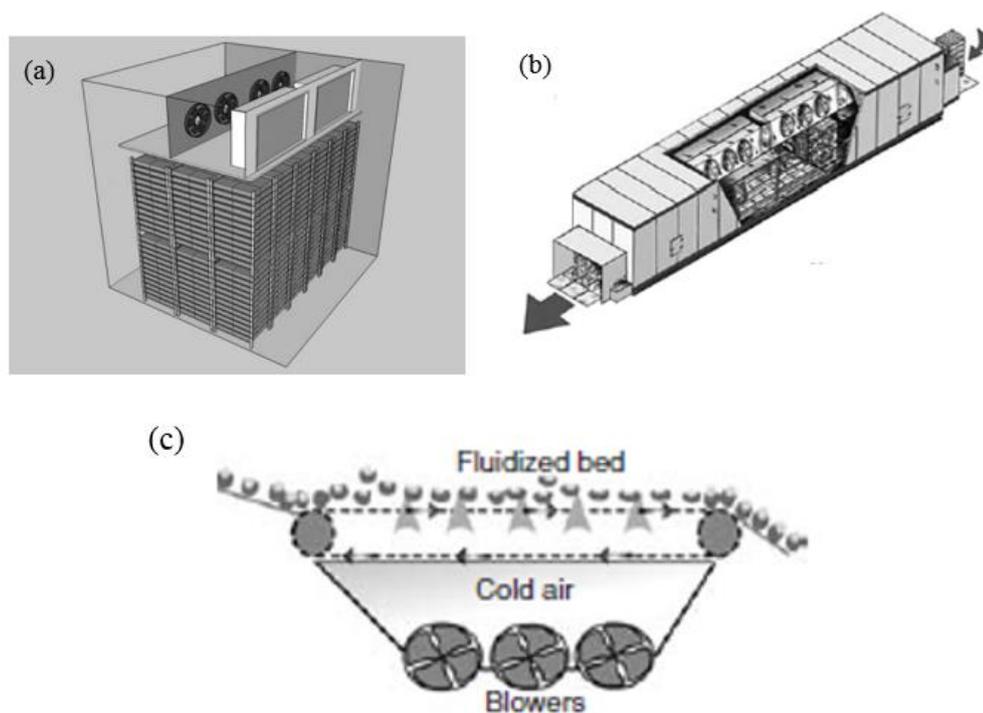


Figure 7: Exemples de congélateurs par air : (a) congélateur à air ventilé (Magnussen et al. 2008), (b) Tunnel de surgélation (Evans 2008), (c) Lit fluidisé (Evans 2008).

II. 2 Phénomènes de transfert au cours de la congélation

Pendant la congélation d'un produit alimentaire plusieurs phénomènes de transferts de chaleur et de masse se produisent à cause de l'abaissement de température du produit.

II.2.1 Transfert thermique et transfert d'eau au cours de la congélation

La congélation est un procédé qui consiste à baisser la température d'un produit alimentaire jusqu'à atteindre des températures négatives. Pendant la congélation, le produit alimentaire passe par deux phases distinctes, une première phase de refroidissement du produit suivie d'une phase de congélation. Cet abaissement de température entraîne un gradient de température entre la surface du produit qui est directement en contact avec l'air ambiant (température négative) et le cœur du produit qui a toujours une température positive. Des transferts de chaleur se produisent entre la surface et le milieu extérieur par convection. Ainsi la température de la surface commence à baisser. La différence de température entre la surface du produit et le cœur crée un flux thermique conductif. Le transfert thermique qui se produit pendant la congélation est toujours accompagné d'un transfert de masse entraînant l'évaporation de l'eau et la déshydratation du produit. La Figure 8 est un schéma (Mulot 2019) proposant d'illustrer de façon simple les transferts de chaleur et d'eau qui se produisent pendant la congélation d'un produit alimentaire. On peut distinguer trois zones distinctes. La première zone est la zone non gelée (zone 1) où l'eau n'a pas commencé à geler car la température n'a pas atteint la température initiale de congélation. Dans cette zone, l'eau continue de se diffuser du noyau vers le front de congélation. La deuxième zone entre le front de congélation et le front de sublimation est la zone partiellement congelée (zone 2). Le front de congélation se déplace vers le centre thermique du produit en augmentant la partie congelée. Dans la zone où la glace commence à se former, l'hypothèse est que la diffusion de l'eau ne se produit plus dans cette zone car le réseau de cristaux de glace empêche la migration de l'eau. La troisième zone est une petite couche déshydratée (zone 3) à la surface du produit due à la sublimation de la glace. Un front de sublimation se déplace lentement de la surface vers le front de congélation : la sublimation des cristaux de glace crée une couche déshydratée poreuse. Dans cette couche déshydratée, la vapeur d'eau diffuse dans l'air des pores jusqu'à la surface du produit.

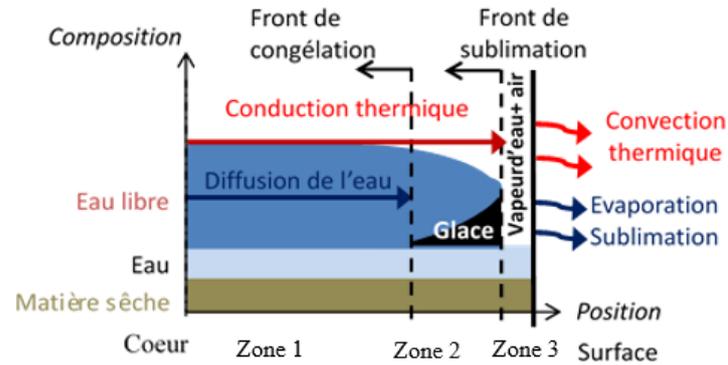


Figure 8: Schéma du transfert de chaleur et d'eau pendant la congélation d'un produit alimentaire (Mulot 2019).

II.2.2 Cas de la congélation d'un produit poreux : phénomènes de diffusion et d'évapo-condensation

Les milieux poreux sont complexes, il est donc difficile de comprendre les phénomènes qui se produisent pendant la congélation. Dans ces milieux, la diffusion de l'eau est beaucoup plus rapide comparée aux produits denses (Pham 2006). Une des caractéristiques d'un milieu poreux est la présence d'au moins deux phases avec des propriétés différentes ; par exemple l'activité de l'eau n'est pas la même dans la matrice solide et dans les pores (l'eau aura tendance à migrer du milieu le plus chargé vers le milieu le moins chargé). Pendant la congélation d'un produit poreux, deux phénomènes se produisent simultanément. La diffusion de l'eau depuis les zones chaudes vers les zones froides et le phénomène d'évapo-condensation. La Figure 9 montre les phénomènes de diffusion et d'évapo-condensation lors de la congélation d'un produit alimentaire poreux. Pendant la congélation d'un produit poreux, l'eau s'évapore des parties internes chaudes de l'aliment et diffuse vers l'extérieur de l'aliment. Lorsque le point de congélation est atteint, la vapeur se condense sous forme de glace.

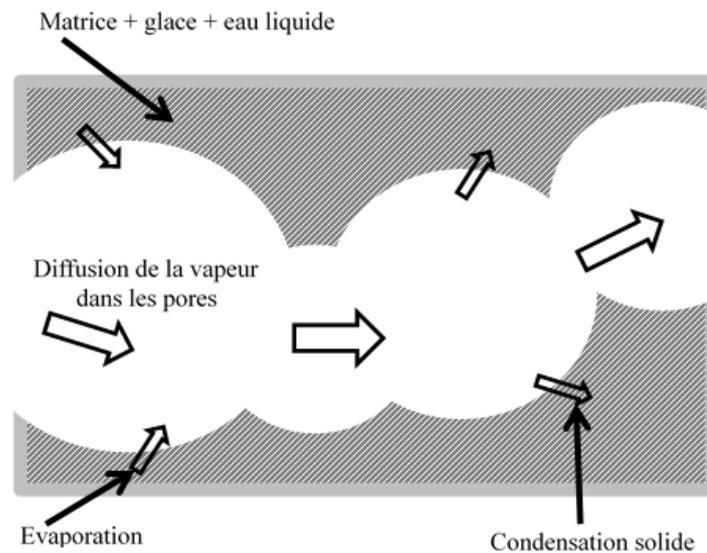


Figure 9: Phénomènes de diffusion et d'évapo-condensation dans un milieu poreux (Pham 2006).

Généralement, les interfaces air-matrices sont des sites favorables à la nucléation et à la formation de la glace (Baier-Schenk et al. 2005, Kontogiorgos and Goff 2006).

II.3 Phénomènes de cristallisation lors de la congélation

Le procédé de congélation permet d'améliorer la conservation des produits alimentaires sur le moyen et le long terme. En effet, ce procédé consiste à transformer l'eau liquide en glace (phénomènes de cristallisation), ce qui limite la disponibilité de l'eau pour le développement de microorganismes et ralentit, de par l'effet de refroidissement, les réactions responsables de la dégradation des aliments. Cependant, la formation de la glace peut aussi endommager la microstructure et les cellules des produits et par conséquent dégrader leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques. Il est donc important de comprendre les différents phénomènes et transformations qui se produisent pendant la congélation afin de mieux les contrôler.

II.3.1 Mécanismes de la cristallisation

Le mécanisme de cristallisation comprend deux étapes ; d'abord la formation de petits nucléi, appelée nucléation. Ensuite, la formation de cristaux de glace stable grâce à la croissance cristalline. Cependant, la nucléation et la croissance des cristaux peuvent également se produire simultanément. En outre, les noyaux initialement formés peuvent également être nombreux, ce qui limite la croissance des cristaux. Par conséquent, l'interaction entre les étapes de croissance et de nucléation définit la distribution de la taille des cristaux (Price 1997, Mersmann 2001).

II.3.1.1 Nucléation

La nucléation correspond à la formation de germes ou de nucléi qui permettront ensuite la croissance cristalline. Dans le cas des produits alimentaires, la nucléation se produit suite à un

refroidissement en dessous du point de fusion, il correspond à l'écart entre la température de nucléation et celle d'équilibre (Hartel 2001).

La nucléation joue un rôle décisif dans la détermination de la forme et de la distribution de taille de cristaux. Ainsi, la compréhension des principes fondamentaux de la nucléation est cruciale pour le contrôle du processus de cristallisation.

On distingue deux types de nucléation, la nucléation primaire et la nucléation secondaire. La nucléation primaire correspond à l'apparition d'une phase cristalline non préexistante en solution. Alors que la nucléation secondaire se produit grâce à des germes qui proviennent des cristaux déjà existant dans la solution (cassures en raison de collisions entre cristaux).

II.3.1.1.1 Nucléation primaire

La nucléation primaire peut être homogène ou hétérogène :

✓ Nucléation primaire homogène

La nucléation primaire est homogène si la solution ne contient pas de particules solides étrangères ou des cristaux déjà existants. Il s'agit donc d'un arrangement spontané des molécules d'eau qui forment des germes ou des nucléi à partir d'un rayon critique. Seuls les germes ayant atteints le rayon critique r_c peuvent croître et donner naissance à des cristaux de glace stables. La détermination du rayon critique dépend de la température. Cette nucléation demande une force motrice importante contrairement à la nucléation secondaire (Kiani and Sun 2011). Cette énergie, appelée énergie libre de Gibbs, correspond à la somme de l'énergie libre nécessaire à la formation de la surface (ΔG_s) et de l'énergie libre pour la formation du volume (ΔG_v). Elle est liée à la libération de la chaleur latente de solidification pendant la congélation. La Figure 10 montre que l'énergie libre maximale est atteinte lorsque le rayon du nucléus est égal au rayon critique. Au-delà de cette taille la croissance cristalline est enclenchée.

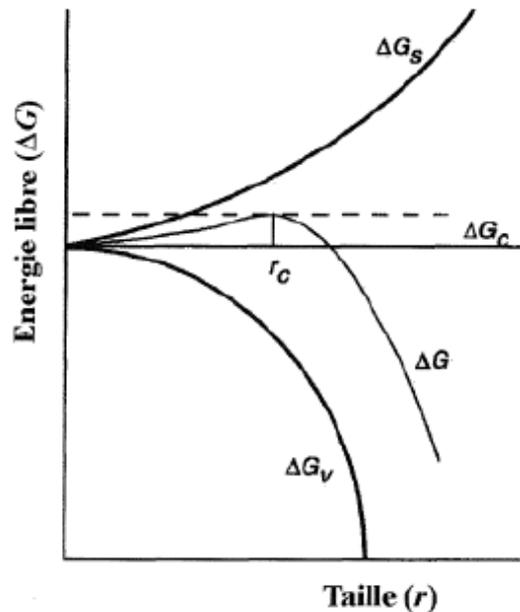


Figure 10: Énergie libre (ΔG) associée à la formation d'un germe stable (Hartel 2001) Avec ΔG_s , énergie libre pour la formation de surface ; ΔG_v , énergie libre pour la formation de volume ; ΔG_c énergie libre critique pour la formation d'un germe et r_c , rayon critique.

- **Nucléation primaire hétérogène**

La nucléation primaire hétérogène implique l'intervention d'un substrat pour générer un nouveau germe, il s'agit de la présence d'une molécule étrangère qui provoque la formation de nucléi. Cette nucléation est la plus courante dans les produits alimentaires du fait que l'énergie d'activation nécessaire pour son déclenchement est plus faible que celle de la nucléation primaire homogène et ce d'autant que le germe présentera plus d'affinité avec le substrat (Puel et al. 2005).

II.3.1.1.2 Nucléation secondaire

La présence de cristaux déjà formés dans un produit peut catalyser à nouveau les phénomènes de nucléation, en provoquant la formation de nouveaux nucléi. Ce processus s'appelle la nucléation secondaire. Il existe plusieurs mécanismes de la nucléation secondaire ; soit par un contact entre des cristaux de glace et des surfaces externes au produit, soit par fractures, soit par une séparation dendritique mais aussi par le contact entre deux cristaux de glace. Ces différents mécanismes peuvent provoquer la dispersion de petits fragments qui vont croître pour former les nucléi (Rawlings et al. 1993). La modélisation et le contrôle de la nucléation secondaire est complexe. Cela peut être dû au fait qu'une série de mécanismes agissent comme des forces motrices de l'activité secondaire (Kiani and Sun 2011).

II.3.1.2 La croissance cristalline

La croissance cristalline est expliquée à l'aide de plusieurs théories : la théorie de l'énergie de surface, de la diffusion-réaction et de la couche d'adsorption (Chernov 1989, Mullin 2001).

La théorie de l'énergie de surface stipule qu'un cristal soumis à une température et une pression constante est en équilibre lorsque son énergie de surface est minimale. De ce fait, la croissance d'un cristal dans un milieu sursaturé est supposée suivre cette affirmation et donc les taux de croissance des faces du cristal sont proportionnels à leurs énergies de surface (Wulff 1901). La théorie de la diffusion-réaction relie la vitesse de croissance du cristal à la différence entre la concentration à la surface du solide et dans la masse de la solution (Noyes and Whitney 1897).

La théorie la plus utilisée est celle de la couche d'adsorption, cette théorie repose sur le fait que, pendant la croissance cristalline, une couche se forme progressivement à travers le cristal. Elle peut également être divisée en trois étapes (Hartel 2001) : les molécules d'eau diffusent vers la surface du cristal et sont ensuite incorporées à la structure cristalline au niveau de la couche limite d'adsorption. Les solutés, eux, migrent en sens inverse vers la phase liquide résiduelle. La chaleur latente est alors libérée à la surface du cristal.

Dans un cadre général, lorsque le nucléus atteint le rayon critique, il se met à croître jusqu'à atteindre un équilibre cristallin. Cette croissance est limitée par deux facteurs :

- La vitesse de libération de la chaleur latente de solidification de l'eau, qui dépend de la vitesse de refroidissement
- La diffusion des molécules d'eau de la phase liquide vers la surface du cristal, qui dépend de la viscosité de la phase liquide. Celle-ci augmente au fur et à mesure de la cristallisation en raison de la cryo-concentration de la solution toujours liquide.

Le nombre et la taille des cristaux formés sont déterminés par la vitesse de nucléation et de croissance. Ces vitesses sont influencées par la vitesse de refroidissement et la concentration des substances présentes dans la solution. Le nombre de nucléi initialement formés limite également la croissance des cristaux.

II.3.2 Effet de la vitesse de congélation sur la formation des cristaux

La vitesse de congélation représente le rapport entre la différence de la température initiale et finale du produit et le temps écoulé pour atteindre la température finale (IIR, 2006).

$$v = \frac{T_f - T_i}{\Delta t} \quad (7)$$

Avec : v vitesse de congélation en ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$), T_f ($^{\circ}\text{C}$) la température finale du produit, T_i ($^{\circ}\text{C}$) sa température initiale et Δt (s) le temps nécessaire pour atteindre la température finale.

Pendant la congélation, la formation des cristaux de glace peut endommager la structure des produits alimentaires, entraînant une perte et une dégradation de la qualité des aliments. Dans la littérature, plusieurs chercheurs ont étudié l'impact des conditions de congélation sur la taille, la morphologie et la distribution des cristaux. Ils ont remarqué qu'une congélation lente conduit à la formation de gros cristaux de glace ainsi qu'une distribution hétérogène dans les

tissus alimentaires peut endommager la structure cellulaire de manière irréversible et donc une réduction des qualités sensorielles et nutritionnelles. Inversement, la congélation rapide entraîne la formation de petits cristaux, réguliers et distribués de façon homogène qui ne cause pas des dommages aux aliments congelés (Mousavi et al. 2005, Muela et al. 2010, Anese et al. 2012, Kaale and Eikevik 2013, van der Sman et al. 2013, Su et al. 2014, Kim et al. 2015, Mok et al. 2015, Ban et al. 2016, Mulot et al. 2019).

La taille des cristaux de glace dépend de la vitesse de congélation. Des résultats similaires ont été obtenus sur des échantillons de steaks hachés. (Mulot et al. 2019) ont étudié la taille moyenne des cristaux de glace lors de la congélation de steaks hachés par microtomographie à rayon X et pour plusieurs vitesses de congélation. La Figure 11 présente la distribution de taille des cristaux de glace pour différentes vitesses de congélation. Comme on peut l'observer sur cette figure, l'augmentation de la vitesse de congélation a permis de réduire la taille des cristaux de glace ; pour des vitesses de congélation supérieures à 3°C/min, la distribution de tailles des cristaux est décalée vers les petites valeurs avec une moyenne de 70-77µm.

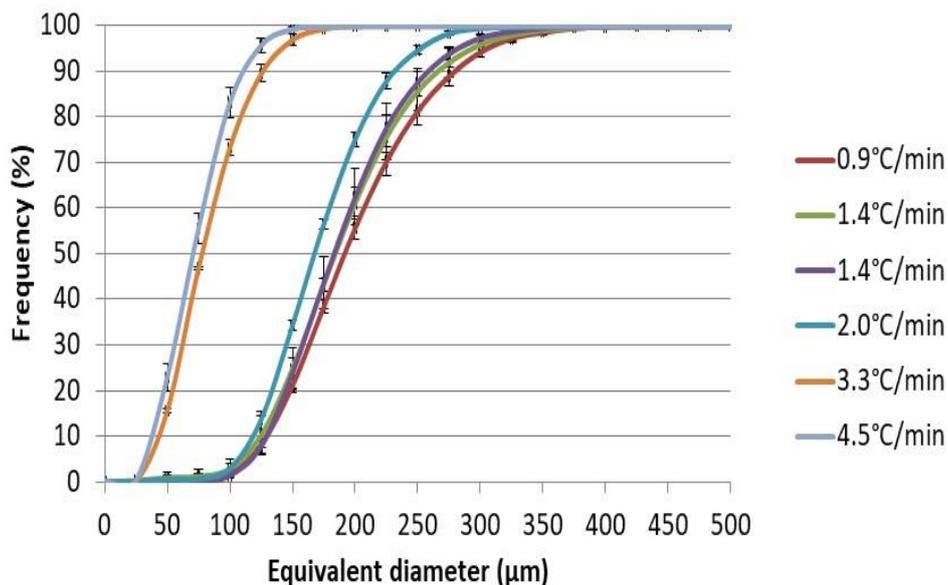


Figure 11: Distribution des diamètres équivalents des cristaux de glace pour différentes vitesses de congélation (Mulot et al. 2019).

La vitesse de congélation a également un impact sur la localisation des cristaux. Une congélation lente favorise la formation des cristaux dans le milieu extracellulaire (Muela et al. 2010) accompagnée de la diffusion de l'eau du milieu intracellulaire et sa déposition sur les cristaux de glace du milieu extracellulaire. Comme le montre la Figure 12, la cristallisation de l'eau dans le milieu extracellulaire entraîne une détérioration cellulaire. En revanche, lors d'une congélation rapide, la cristallisation se produit parallèlement dans les deux milieux intra et extracellulaire (Muela et al. 2010, Kim and Hong 2016).

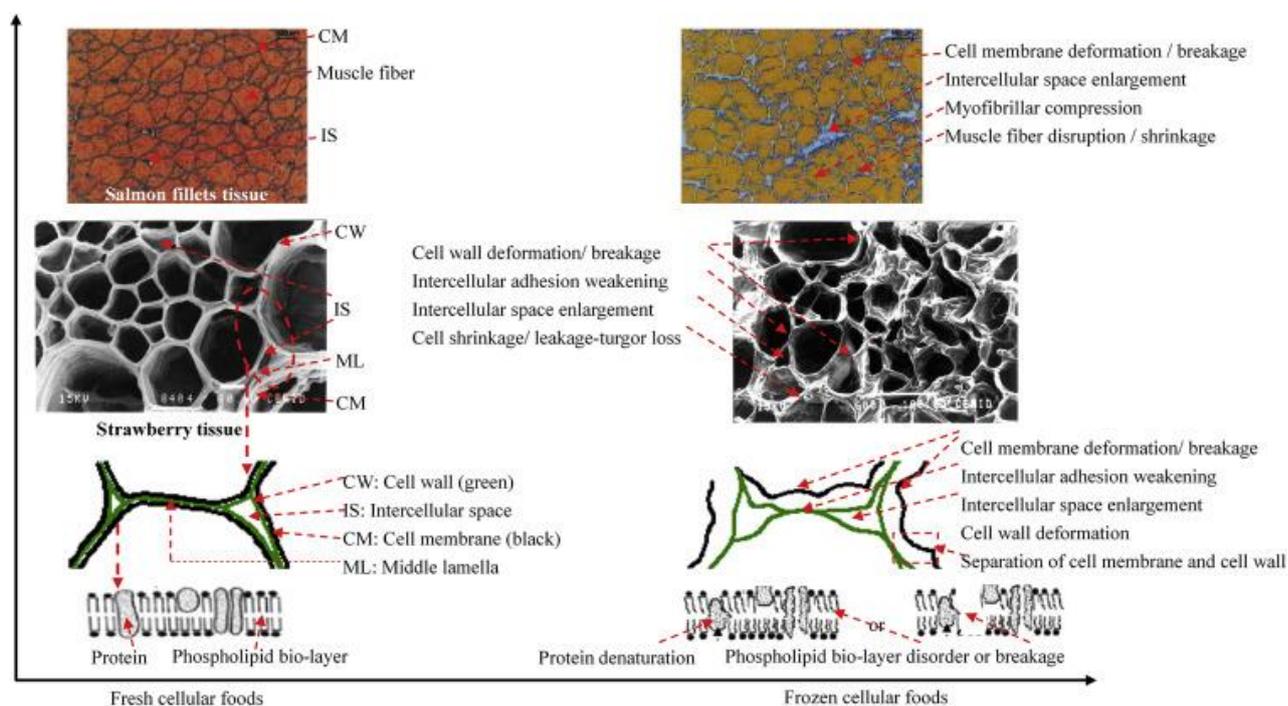


Figure 12: Micrographie de la structure cellulaire (filets de saumon, tissu de fraise) affectée par les cristaux de glace (Li et al. 2018).

II.3.3 Effet de la vitesse de congélation sur la qualité de l'aliment

Toutes les transformations qui se produisent pendant la congélation à l'échelle microscopique (croissance et localisation des cristaux de glace) ont un impact direct sur la qualité du produit alimentaire. (Agoulon 2010) a étudié les différences qualitatives observées entre une surgélation cryogénique à l'azote liquide, une surgélation mécanique ventilée et une congélation non ventilée dans le cas des haricots verts. Le tableau 3 montre que la congélation rapide réduit de façon considérable les pertes des caractéristiques sensorielles des haricots verts.

Tableau 3: Effet du taux de congélation sur les propriétés sensorielles des haricots verts (Agoulon 2010).

Durée nécessaire pour que le cœur atteigne -20°C	Caractéristiques sensorielles du produit cuisiné	Type de congélation
< 30 minutes	Pas de perte de fermeté, couleur et goût préservés	Surgélation cryogénique (azote liquide)
30 minutes-12 heures	Perte de texture, couleur et goût non altérés	Surgélation mécanique, Ventilée
> 12 heures	Perte de texture, couleur et goût dégradés	Congélation non ventilée

II.3.4 Paramètres physiques de la congélation

Pour caractériser un aliment lors de sa congélation, il est important de connaître la température de congélation commençante, ou point de congélation initiale, la notion d'eau libre et d'eau liée, la fraction d'eau congelable ainsi que l'enthalpie mise en jeu.

II.3.4.1 Point de congélation initiale

Le point de congélation initiale ou température de congélation commençante, elle est définie comme la température à laquelle l'aliment commence à congeler. Elle dépend de sa composition et de l'hétérogénéité du système (Hamdami et al. 2004). Le point de congélation commençante est un paramètre important dans la prévision des propriétés thermiques de l'aliment (WANG and KOLBE 1991) lors de sa congélation et essentiel pour déterminer le taux de glace formé. Il est déterminé à partir de la méthode de calorimétrie à balayage différentiel (DSC) (Rao et al. 2014) ou bien par mesure de la cinétique de congélation en utilisant des thermocouples placés au cœur des échantillons pendant leur congélation. La courbe de liquidus est la courbe d'équilibre liquide-solide d'un mélange eau-soluté donnant la température de changement d'état en fonction de la fraction massique de soluté. Elle peut être construite à partir de mesures DSC pour le cas d'un aliment dans lequel on fait varier la fraction de solutés.

Dans le cas d'une solution diluée, la loi de Raoult peut être simplifiée (Mafart 1991) et la température de congélation commençante est calculée directement en utilisant ce qu'on appelle l'équation de l'abaissement cryoscopique.

$$T_{cc} = \frac{1,86}{M_m} m \quad (8)$$

Avec M_m la masse molaire effective du soluté ($\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) et m la masse de soluté (en g) dissoute dans 100g d'eau.

Comme le montre la loi de Raoult, les solutés de faible masse molaire (sels, sucre) ont un effet important sur l'abaissement cryoscopique et donc sur la température initiale de congélation d'un aliment.

II.3.4.2 Eau liée et eau libre

Les produits alimentaires contiennent une quantité d'eau bien définie. Pendant la congélation cette eau se transforme en glace sous l'effet de l'abaissement de température. Cependant, la fraction d'eau congelée après congélation est inférieure à la fraction d'eau initiale. De fait, cette eau liquide peut être divisée en deux types d'eau : eau liée non congelable et eau libre congelable. L'eau liée représente la quantité d'eau non disponible à la congélation dans un produit alimentaire alors que l'eau libre est celle qui est disponible à la congélation. La fraction d'eau congelable est un paramètre important que l'on peut mesurer par DSC. C'est un paramètre important qui doit être pris en compte dans la prédiction des propriétés des aliments congelés (Hamdami et al. 2004).

II.3.4.3 Enthalpie

Dans le cas des produits en cours de congélation, on utilise la notion d'enthalpie de fusion, de solidification ou chaleur latente exprimée en $\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$. Elle correspond à la quantité d'énergie mise en jeu pendant le changement d'état par kg de produit. Comme il est très difficile de

définir la valeur absolue de l'enthalpie, une valeur nulle est généralement définie arbitrairement à -40°C , 0°C ou à une autre température convenable. La chaleur latente correspond à une différence d'enthalpie. Lors de la congélation de l'eau à P_{atm} la chaleur latente de congélation libérée est de 333 kJ.kg^{-1} . Cependant les aliments ne contiennent pas 100% d'eau, l'enthalpie de fusion ou de congélation de l'aliment entier est alors inférieure à celle de la glace pure. Par ailleurs, selon la température finale atteinte en fin de congélation, toute l'eau contenue dans l'aliment et disponible n'est pas entièrement congelée. La mesure de la chaleur latente par calorimétrie (DSC) au cours de la fusion d'un aliment congelé (courbe endotherme) est donc un indicateur de la quantité d'eau congelée pour une température donnée.

II.3.5 Cas de la congélation des produits alimentaires poreux

Plusieurs études ont concerné la congélation des produits poreux de type boulangerie et plus spécifiquement de la pâte à pain et du pain (Zounis et al. 2002, Hamdami et al. 2004, Baier-Schenk et al. 2005, Giannou et al. 2006, Jiang et al. 2008, Phimolsiripol et al. 2008, Chen et al. 2012, Ban et al. 2016).

La particularité des produits poreux congelés est la présence des pores qui sont considérés comme des sites préférentiels pour la nucléation et la formation de glace (Baier-Schenk et al. 2005, Kontogiorgos and Goff 2006, Chen et al. 2012).

La visualisation au cryoMEB des échantillons de pâte à pain par Baier-Schenk et al. 2005 a révélé la présence de cristaux de glace à l'interface air-matrice après la congélation. La Figure 13 montre qu'après une heure de congélation (Figure 13a) et un jour de stockage (Figure 13b), la surface des pores est complètement couverte de cristaux de glace de taille inférieure à $100 \mu\text{m}$.

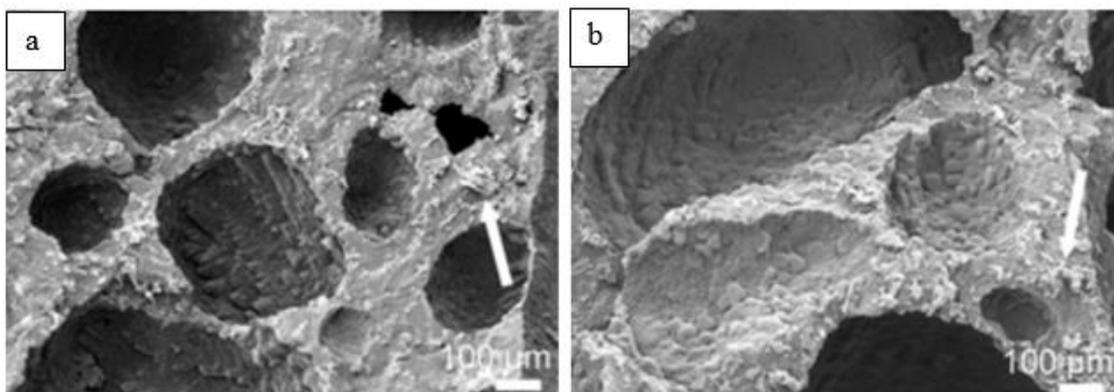


Figure 13: micrographes obtenus par cryoMEB sur de la pâte à pain (a) Echantillon congelé à -28°C pendant 1h, (b) Echantillon congelé pendant 2h dans un congélateur à air pulsé à -28°C et stockés pendant 24h à -22°C (Baier-Schenk et al. 2005).

Une autre méthode utilisée pour étudier la congélation du pain est la DSC (Differential Scanning Calorimetry). La formation et la distribution des cristaux de glace dans le pain congelé ont été étudiées par Chen et al. (2012). Les auteurs ont effectué des analyses DSC

pour des formulations de pain différentes et pour plusieurs vitesses de congélation. Les courbes DSC obtenues révèlent la présence d'une endotherme mineure et d'une endotherme majeure comme le montre la Figure 14. Les auteurs ont considéré que : (i) l'endotherme mineur correspond à la fusion des cristaux de glace situés dans les minuscules pores et capillaires de la matrice gluten-amidon. (ii) l'endotherme majeure est dû à la fusion de gros cristaux de glace logés dans les cellules gazeuses qui forment de gros pores.

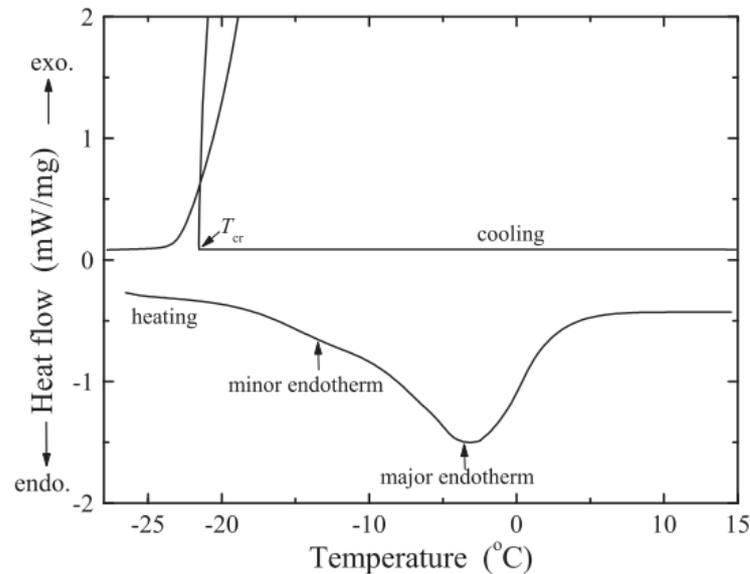


Figure 14: Courbe DSC de la congélation et de la fusion de la mie de pain. Avec une vitesse de refroidissement de 2 C/min et une vitesse de chauffage de 10 °C/min (Chen et al. 2012).

Dans la littérature, plusieurs études portent par ailleurs sur la modélisation des phénomènes de transfert de chaleur et d'humidité en présence du phénomène d'évapo-condensation pendant la congélation des matrices poreuses (De Vries 1958, De Vries 1987, Bouddour et al. 1998, Sun and Hu 2003, Hamdami et al. 2004a, Hamdami et al. 2004b).

Dans le cas d'un produit à forte porosité, Hamdami et al. (2004b) ont développé un modèle pour étudier la congélation d'un échantillon d'éponge cellulosique avec une porosité variant entre 59 et 94 % et une teneur en eau entre 35 et 60%. Les auteurs ont réussi à mettre en évidence la présence d'une importante diffusion vers les zones froides à proximité du front de congélation. Ceci provoque une déshydratation importante de la zone centrale de l'échantillon. Ils ont ainsi réussi à modéliser les phénomènes de transferts de chaleur et de matière pendant la congélation tout en introduisant l'effet de l'évapo-condensation dans les milieux poreux et le taux de formation de glace.

En dehors de la congélation du pain, il existe très peu d'études concernant la congélation de gâteaux dont les génoises. Les seules études concernant la congélation de la génoise s'intéressent principalement au stockage à température négative (Karaoğlu et al. 2008, Díaz-Ramírez et al. 2011, Díaz-Ramírez et al. 2016, Van Bockstaele et al. 2021). Après la congélation, la microstructure du produit alimentaire connaît en effet un certain nombre de

modifications liées notamment au phénomène de recristallisation au cours du temps et à la fluctuation de la température pendant le stockage.

II.4 Phénomène de recristallisation durant le stockage des produits congelés

Le procédé de congélation est suivi de diverses étapes d'entreposage et de transport pour assurer la distribution du produit vers son utilisateur final. Ces étapes successives constituent la chaîne du froid qui est souvent confrontée à des remontées et/ou des fluctuations de températures de manière involontaire ou en raison de contraintes pratiques (période excessive hors des entrepôts, fonctionnement cyclique des machines frigorifiques, panne des machines frigorifiques, panne électrique, etc...) (Moureh and Derens 2000). Ces variations de température définissent l'histoire thermique des produits dans la chaîne du froid et impactent dans une large mesure leur qualité finale. En effet, après congélation, les produits alimentaires ne sont pas complètement inertes. Des phénomènes de migration de l'eau interviennent lors des étapes de stockage et de distribution en raison de l'instabilité des cristaux de glace. Cette migration de l'eau entraîne à la fois des changements biochimiques et physiques. Les modifications biochimiques sont principalement liées aux réactions enzymatiques qui peuvent mener à une perte des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. Les modifications physiques concernent d'une part les phénomènes de sublimation qui impliquent une déshydratation et une perte de masse et d'autre part les phénomènes de recristallisation qui se manifestent par un grossissement des cristaux (Pham and Mawson 1997, Zaritzky 2012). La recristallisation est le phénomène prépondérant au cours du stockage des produits congelés. Elle engendre des modifications au niveau de la microstructure initialement définie lors du procédé de congélation et in fine une réduction de la qualité du produit surgelé.

D'une manière générale, la congélation aboutit à la création d'une phase cristalline contenant des cristaux avec des morphologies et une distribution de tailles hétérogènes (des petits et des gros cristaux de glace). Ce système cristallin est énergétiquement instable et va évoluer dans le temps pour atteindre la stabilité énergétique selon un processus physique connu sous le nom de recristallisation. Cette stabilité énergétique est inversement proportionnelle à l'énergie libre de surface. Or l'énergie libre de surface d'un cristal est également inversement proportionnelle à son rayon de courbure comme le montre l'équation (9).

$$\Delta G = V \sigma \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad (9)$$

Où ΔG représente la différence d'énergie de surface, V le volume spécifique, σ la tension de surface et r_1 , r_2 les rayons de courbure.

Ceci implique que les petits cristaux (faible rayon de courbure) ont des énergies libres élevées et sont moins stables comparés aux gros cristaux (rayon de courbure élevé) qui ont de faibles énergies libres et sont donc plus stables (Pham and Mawson 1997, Zaritzky 2000). Ainsi, pour atteindre la stabilité énergétique, le système cristallin tendrait vers une croissance des gros

cristaux aux dépens des petits. Par ailleurs, les cristaux avec des surfaces convexes (faible rayon de courbure) sont moins stables que ceux avec des surfaces planes ou concaves (rayon de courbure élevé). L'état d'équilibre énergétique peut également être atteint à travers une modification de la conformation du cristal pour donner une structure plus stable avec une minimisation de l'énergie interne du cristal. Cela suppose l'existence de plusieurs mécanismes de recristallisation comme il sera décrit dans la suite. Mais quel que soit le mécanisme, le résultat de la recristallisation est une minimisation de l'énergie libre de surface de toute la phase cristalline et une égalisation du potentiel chimique entre toutes les phases afin que le système atteigne un état d'équilibre (Hartel 1998, Hagiwara et al. 2006). La recristallisation est favorisée dans des conditions où la mobilité des molécules d'eau est importante comme à des températures voisines du point de fusion ou encore en cas de fluctuations de température. Elle peut également prendre place lorsque le stockage est prolongé à température constante. Il existe plusieurs mécanismes de recristallisation.

II.4.1 Mécanismes de recristallisation

Il existe plusieurs mécanismes de recristallisation. Dans la suite de ce paragraphe, seront présentés les mécanismes qui surviennent lors du stockage des produits alimentaires après congélation : la recristallisation migratoire, la recristallisation isomassique et la recristallisation par accréition (Pham and Mawson 1997).

II.4.1.1 Recristallisation migratoire

La recristallisation migratoire, classiquement appelée maturation d'Ostwald en cas de stockage à température constante, fait référence à la tendance des plus gros cristaux à croître au détriment des plus petits. Les molécules d'eau à la surface des petits cristaux ne sont pas aussi solidement liées que ceux à la surface des gros cristaux en raison de leur faible rayon de courbure. Par conséquent, les cristaux de petites tailles ont une tendance à perdre progressivement leurs molécules d'eau qui vont alors diffuser à travers la matrice cryo-concentrée pour aller se déposer à la surface des cristaux de plus grande taille qui vont ainsi grossir et abaisser l'énergie de surface du système cristallin (Fennema et al. 1973, Hartel 1998) comme il est schématisé sur la Figure 15.

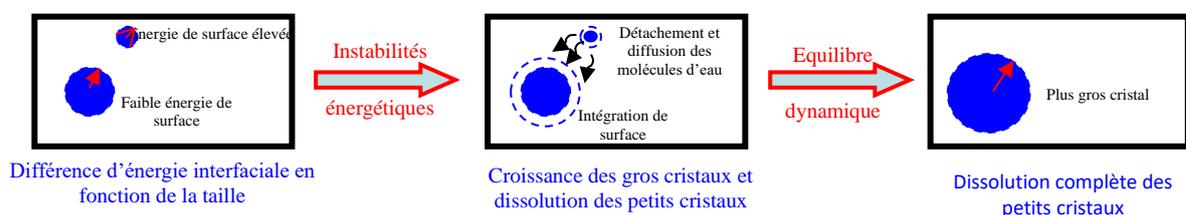


Figure 15: Mécanisme de recristallisation migratoire (Vicent 2019).

Selon la théorie de Lifshitz-Slyozov Wagner (Lifshitz and Slyozov 1961, Wagner 1961), plus communément connu sous le nom de la théorie LSW, établie pour expliquer la maturation d'Ostwald, il existe une taille critique de cristal, en dessous de laquelle les cristaux seraient

susceptibles de fondre. Cela est illustré sur la Figure 16 qui représente l'évolution de la vitesse de croissance des cristaux de glace (da/dt) en fonction de la taille des cristaux et en fonction du temps (Dalvi-Isfahan et al. 2019). La Figure 16 montre bien qu'il existe une taille de cristal, appelée taille critique, pour laquelle il n'y a pas de croissance ($da/dt = 0$) et qui traduit un état d'équilibre. En dessous de cette taille critique, la vitesse de croissance est négative ($da/dt < 0$) correspondant à une fonte des cristaux de glace. Cette fonte peut aboutir à une disparition complète des cristaux, phénomène irréversible étant donné que le système n'a pas l'énergie nécessaire pour initier une nucléation. La Figure 16 montre également une augmentation de la vitesse de croissance des cristaux avec la taille et le temps ($da/dt > 0$), mais aussi qu'il existe une vitesse maximale de croissance correspondant à une taille maximale au-dessus de laquelle la vitesse de croissance des cristaux diminue et tend vers un plateau. La recristallisation migratoire se manifeste par un rétrécissement de la distribution de tailles des cristaux et une hausse de la taille moyenne associée à une baisse du nombre de cristaux.

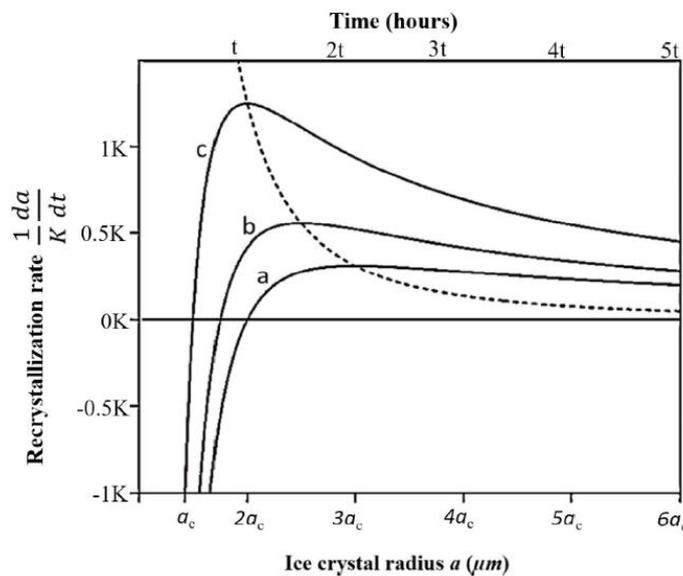


Figure 16 : Représentation schématique de l'évolution de la taille des cristaux de glace en fonction de la taille des cristaux (ligne pleine) ou du temps (ligne en pointillé) en cours de stockage. a, b et c représentent 3 produits alimentaires avec différentes distributions de tailles de cristaux. $K = 2 XCDV^2/kT$ avec X, C, D, V, k, T représentant la tension interfaciale, le coefficient de diffusion, le volume molaire, la concentration, une constante cinétique et la température, respectivement. Adaptée de (Dalvi-Isfahan et al. 2019).

Deux types de mécanisme ont été identifiés en recristallisation migratoire : (i) la fusion-diffusion-regel et (ii) la sublimation-diffusion-condensation selon qu'on soit en phase liquide ou en phase vapeur, respectivement (Flores 1998). Comme mentionné précédemment, la recristallisation peut avoir lieu à température constante et à pression constante. Cependant, la recristallisation migratoire est fortement favorisée par les fluctuations de température et les gradients de pression de vapeur associés. Lorsque la température et/ou la pression de vapeur est élevée, les cristaux les plus petits subissent une fusion/sublimation partielle ou peuvent complètement disparaître. Lorsque la température est de nouveau abaissée (faible pression de

vapeur), on assiste à un regel/condensation au niveau des gros cristaux, favorisant ainsi leur croissance (Fennema et al. 1973). Outre la température et la pression de vapeur, la diffusivité a un grand impact sur la vitesse de recristallisation migratoire. Pour les deux mécanismes cités précédemment (fusion-diffusion-regel et sublimation-diffusion-condensation), la diffusion et le regel ou la condensation constituent les étapes limitantes. La recristallisation migratoire est considérée comme prédominante dans les produits alimentaires et se manifeste par un rétrécissement de la distribution de tailles des cristaux et une hausse de la taille moyenne associée à une baisse du nombre de cristaux.

II.4.1.2 Recristallisation isomassique

Ce type de recristallisation se produit lorsque des cristaux de glace ont des formes irrégulières et plutôt convexes (pointes, bosses, ...) avec un rapport surface/volume plus élevé que celui d'une sphère et de faibles rayons de courbure (Fennema et al. 1973). En d'autres termes, les surfaces irrégulières sont plus instables que les surfaces lisses ou plates et auront tendance à se lisser avec le temps (Hartel 1998). Ces changements s'opèrent au sein d'un même cristal qui va tendre vers des niveaux d'énergie plus faible tout en maintenant sa masse constante. Ce processus résulte en un système cristallin énergétiquement plus stable constitué de cristaux de glace de forme plutôt sphériques. Ce mécanisme de recristallisation est plutôt observé à des températures de stockage élevées (dans la zone de changement de phase) et survient rarement en cas de fluctuations de température (Hartel 1998).

II.4.1.3 La recristallisation par accréation

Ce phénomène se produit lorsque deux cristaux de glace en contact ou très proches fusionnent selon un processus de diffusion en surface. Le point de contact a une énergie de surface élevée d'où la mise en œuvre d'un transfert de molécules d'eau vers le point de contact formant ainsi un pont. Selon le même principe de réduction de l'énergie de surface, ce pont va croître jusqu'à ce que les deux cristaux forment un seul et même cristal. Il en résulte une phase cristalline plus stable à mesure que la taille moyenne des cristaux de glace augmente ainsi qu'une réduction du nombre de cristaux de glace. L'analogie est faite entre la recristallisation par accréation et le mécanisme de cohésion de frittage généralement observé dans le cas de cristaux entourés d'air comme la neige (Colbeck 1997, Hartel 1998). La recristallisation par accréation a été observée par microscopie par (Donhowe and Hartel 1996a) qui ont étudié les phénomènes de recristallisation dans la crème glacée. Il a ainsi été démontré que ce mécanisme est prépondérant dans les systèmes en début de stockage lorsque les cristaux sont en proximité et qu'il laisse place à d'autres mécanismes telle que la recristallisation migratoire lorsque les cristaux deviennent plus distants (Sutton et al. 1994).

II.4.2 Facteurs affectant la recristallisation dans les produits congelés

II.4.2.1 Vitesse de congélation

Comme mentionné précédemment, l'hétérogénéité de tailles des cristaux de glace est le moteur de la recristallisation. Ceci implique que la distribution de tailles de cristaux a un impact important sur la cinétique de recristallisation. Or, il est connu que la distribution de

taille de cristaux en fin de congélation est fortement dépendante de la vitesse de congélation. Une congélation rapide résulte en un système cristallin constitué de nombreux cristaux de petites tailles avec une distribution plutôt homogène. A l'inverse, les produits congelés lentement sont composés de cristaux de grandes tailles en petit nombre et avec une distribution de tailles plutôt hétérogène. Considérant les mécanismes de recristallisation décrits précédemment, il est supposé qu'un système avec une distribution de tailles de cristaux homogène serait moins susceptible de subir une recristallisation, comparé à un système avec une hétérogénéité de tailles (Hartel 1998). Cependant, l'effet couplé des conditions de congélation (notamment la vitesse de congélation) et des conditions de stockage a très peu été étudié. Kobayashi et al. (2018) ont comparé l'évolution de la microstructure par recristallisation de tofu congelé selon trois différentes conditions : congélation avec surfusion, congélation conventionnelle rapide et congélation conventionnelle lente. La congélation avec surfusion permet d'atteindre des degrés de surfusion plus élevés que ceux obtenus par congélation conventionnelle, même rapide, et augmente ainsi la probabilité de nucléation. Les auteurs rapportent qu'après 28 jours de stockage à -5°C , la microstructure des échantillons congelés avec surfusion n'a pas été modifiée tandis que la congélation conventionnelle rapide montre un grossissement des cristaux comme on peut le voir sur la Figure 17 qui représente les micrographes d'échantillons lyophilisés et observés par microscopie électronique à balayage après 0, 7 et 28 jours de stockage. La Figure 17 montre une croissance des cristaux encore plus importante pour la congélation conventionnelle lente.

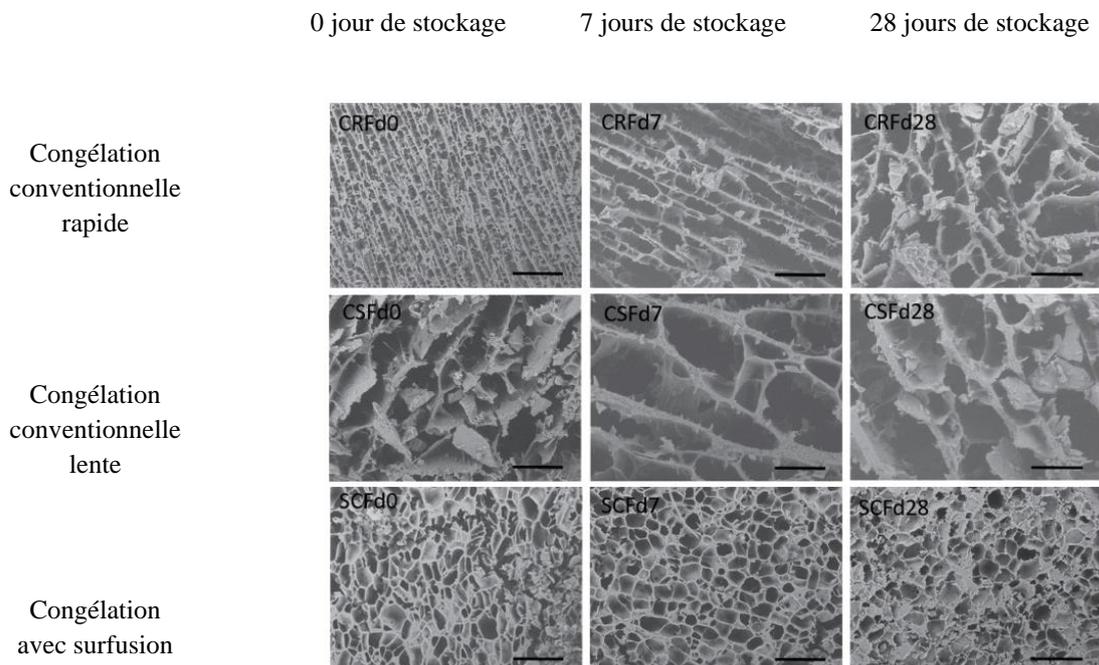


Figure 17 : Micrographes obtenus par microscopie électronique à balayage d'échantillons lyophilisés de tofus congelés par congélation rapide, lente et avec surfusion puis stockés à 0, 7 et 28 jours. La barre représente $250\ \mu\text{m}$ (adapté de Kobayashi et al. (2018)).

II.4.2.2 Température de stockage et fluctuations de température

De nombreuses études ont montré que la recristallisation est favorisée à la fois par une température de stockage élevée (Bevilacqua and Zaritzky 1982, Martino and Zaritzky 1988, Hagiwara and Hartel 1996, Donhowe and Hartel 1996a, Donhowe and Hartel 1996b, Ndoye and Alvarez 2015) et par les fluctuations de température (Syamaladevi et al. 2012, Ullah et al. 2014, Ndoye and Alvarez 2015, Zhao and Takhar 2017, Vicent et al. 2019). Ndoye and Alvarez (2015) ont suivi la croissance des cristaux de glace dans des crèmes glacées stockées à quatre différentes températures (-5°C, -8°C, -12°C et -18°C) et trois amplitudes de fluctuations de température ($\pm 0,1^\circ\text{C}$ correspondant à une température constante, $\pm 0,75^\circ\text{C}$ et $\pm 2,5^\circ\text{C}$) pendant six mois. Ces auteurs ont décrit la recristallisation selon le modèle asymptotique LSW développé (Eq. 10) sur la base de la théorie de Lifshitz-Slyozov Wagner - (Lifshitz and Slyozov 1961, Wagner 1961) évoquée précédemment :

$$\bar{L}(t) = \bar{L}_0 + kt^{\frac{1}{n}} \quad (10)$$

où \bar{L} représente la taille moyenne des cristaux de glace à un temps t donné, \bar{L}_0 est la taille moyenne initiale des cristaux de glace, k représente la vitesse de recristallisation et n un paramètre dépendant du facteur limitant du mécanisme de recristallisation (la diffusion des molécules d'eau ou leur intégration à la surface des cristaux). La dépendance de la recristallisation à la température a été exprimée selon la loi d'Arrhenius et il a ainsi été montré que la cinétique de recristallisation augmente avec la température de stockage mais aussi avec l'amplitude de fluctuations de température (Figure 18). Des résultats similaires avaient été publiés auparavant par Donhowe and Hartel (1996b) qui ont exprimé la dépendance de la cinétique de recristallisation à la température selon la loi d'Arrhenius et la loi de Williams, Landel et Ferry.

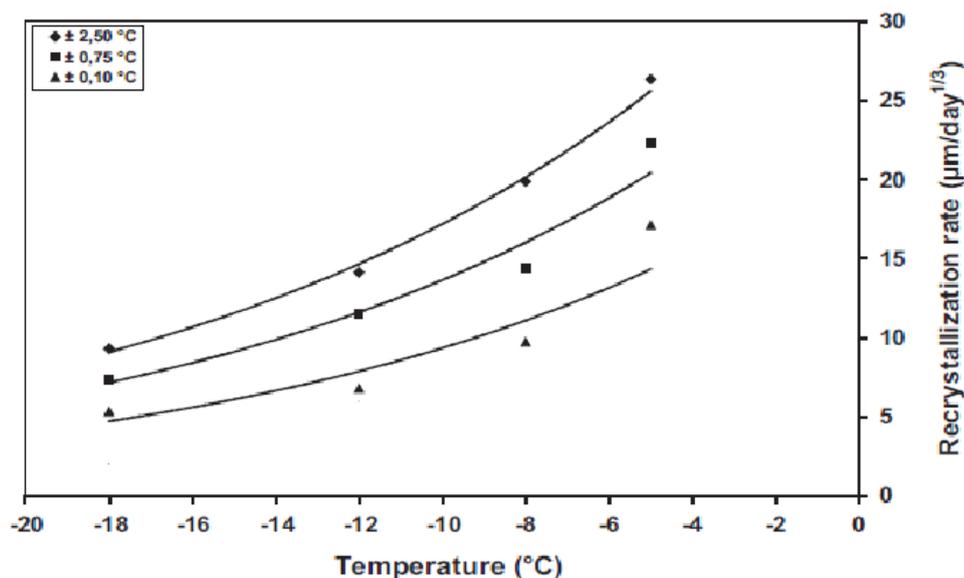


Figure 18: Evolution de la vitesse de recristallisation en fonction de la température de stockage et de l'amplitude de fluctuations (adaptée de Ndoye and Alvarez (2015)).

Zhao and Takhar (2017) ont étudié l'évolution de la microstructure de pommes de terre congelées et stockées sous condition de températures fluctuantes (entre -17 °C et -16 °C, entre -17 °C et -11 °C et entre -17 °C et -7 °C) pendant 2 semaines. Les images obtenues par microtomographie à rayons X (Figure 19) montrent que la croissance des cristaux de glace est d'autant plus importante que les fluctuations sont élevées.

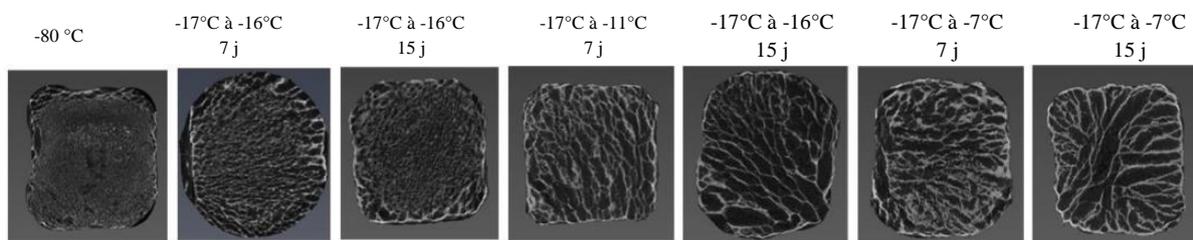


Figure 19: Coupes horizontales de pommes de terre congelées observées au microtomographe à rayons X après lyophilisation – Les cristaux sont représentés par les pores (zones noires) créés après lyophilisation et délimités par la matière solide (zones grises).

II.4.2.3 Durée de stockage

L'effet de la durée de stockage sur la croissance des cristaux de glace par recristallisation dans les produits congelés stockés a été largement étudié (Bevilacqua and Zaritzky 1982, Martino and Zaritzky 1988, Hagiwara and Hartel 1996, Donhowe and Hartel 1996a, Donhowe and Hartel 1996b, Syamaladevi et al. 2012, Ullah et al. 2014, Ndoye and Alvarez 2015, Mercier et al. 2016, Zhao and Takhar 2017, Guo et al. 2018, Mo et al. 2018, Vicent et al. 2019, Vicent et al. 2020). L'ensemble de ces études s'accordent à dire que la recristallisation augmente avec la durée de stockage à température constante ou fluctuante. Un résultat commun concerne également l'augmentation de la taille moyenne des cristaux parallèlement à la réduction du nombre total de cristaux. Certaines études ont modélisé la dépendance de la croissance des cristaux au temps en utilisant le modèle LSW (Eq. 10) précédemment décrit (Martino and Zaritzky 1989, Donhowe and Hartel 1996a, Donhowe and Hartel 1996b, Ndoye and Alvarez 2015). Leurs travaux ont démontré un comportement asymptotique de la croissance des cristaux évoquant une vitesse de recristallisation plus rapide en début de stockage, qui aurait tendance à se réduire avec le temps pour s'établir à un plateau correspondant à une taille moyenne maximale de cristaux. Des études plus récentes ont utilisé des modèles moins simplistes, notamment des modèles couplant les phénomènes de transfert aux bilans de population (Mercier et al. 2016, Vicent et al. 2020).

II.4.2.4 Composition

La composition du produit alimentaire constitue aussi un critère très impactant du phénomène de recristallisation en cours de stockage. Dans le souci de trouver un moyen d'inhiber la recristallisation, il a été démontré que les hydrocolloïdes généralement utilisés en tant que stabilisants dans certains produits telle que la crème glacée, ont le pouvoir de retarder ou de ralentir la recristallisation durant le stockage (Harper and Shoemaker 1983, Hagiwara and Hartel 1996, Sutton et al. 1996, Goff et al. 1999, Bolliger et al. 2000, Patmore et al. 2003, Regand and Goff 2003, Damodaran 2007, Aleong 2008, BahramParvar and Goff 2013,

Gaukel et al. 2014, Ndoye and Alvarez 2015, Zhang et al. 2020, Li et al. 2021). Le mécanisme précis d'action de ces hydrocolloïdes n'a pas encore été complètement élucidé malgré le nombre important de chercheurs qui s'y sont intéressés. Plusieurs mécanismes sont avancés mais sans consensus. Cette absence de consensus peut être expliquée par le fait que le mécanisme mis en œuvre dépend du type de stabilisants, de la concentration en stabilisant et des interactions entre les stabilisants et les autres éléments qui composent l'aliment (mélange de stabilisants, minéraux, sucres, protéines et lipides) (Li et al. 2021). Le mécanisme le plus probable serait lié à une modification des propriétés de diffusion des molécules d'eau au sein de la phase non congelée. Cette modification ferait suite à une augmentation de la viscosité de cette phase qui expliquerait une réduction de la mobilité de l'eau dans la matrice non congelée (Masselot et al. 2020). Certains auteurs avancent une hypothèse sur l'adsorption des stabilisants à la surface des cristaux de glace (Sutton et al. 1996, Gaukel et al. 2014, Li et al. 2021). Ce mécanisme est également soutenu par les études qui se sont intéressées à l'action inhibitrice des certains types de peptides (protéines cryoprotectrices) sur la recristallisation comme il a été rapporté par Dalvi-Isfahan et al. (2019) et récemment confirmé par Bachtiger et al. (2021).

II.4.3 Recristallisation dans les produits alimentaires poreux

Comme il a été évoqué dans les sections précédentes, de nombreuses études ont été réalisées pour caractériser ou mieux comprendre les phénomènes de recristallisation dans les produits alimentaires. L'essentiel de ces études ont porté sur des produits modèles (Martino and Zaritzky 1988, Sutton et al. 1996, Gaukel et al. 2014, Li et al. 2021), la crème glacée (Donhowe and Hartel 1996a, Donhowe and Hartel 1996b, Ndoye and Alvarez 2015, Mercier et al. 2016), les produits carnés (Bevilacqua and Zaritzky 1982, Wang et al. 2020), les poissons et produits de la mer (Syamaladevi et al. 2012, Zhang et al. 2020) ou encore les produits végétaux (Ullah et al. 2014, Zhao and Takhar 2017, Kobayashi et al. 2018, Vicent et al. 2019). Ces travaux ont contribué à apporter de nouvelles connaissances sur l'impact de différents paramètres (température, durée et composition) sur le phénomène de recristallisation et sur la compréhension des mécanismes associés. Il a aussi été démontré un impact du type de produit sur les mécanismes mis en œuvre ou encore la vitesse de recristallisation. Par exemple, Vicent et al. (2019), rapporte des cinétiques de recristallisation dans des échantillons de carottes soumis à des fluctuations de températures plus faibles que celles publiées pour la crème glacée stockée dans des conditions similaires (Donhowe and Hartel 1996b). Cette différence a été attribuée à la présence de cellules dans les carottes qui peuvent constituer une barrière qui ralentirait la croissance des cristaux. En effet, les polysaccharides (cellulose et hémicellulose), pectines et glycoprotéines composant les parois cellulaires constitueraient un réseau qui capterait les molécules d'eau pour former une structure gélifiée. Ce résultat soulève des questions sur les mécanismes de recristallisation dans des produits alimentaires avec des structures particulières tels que les produits poreux.

Cependant, ces produits, notamment les produits de boulangerie, tel que le pain, les viennoiseries ou la génoise, ont été très peu étudiés en ce qui concerne la compréhension des mécanismes de recristallisation. Les rares études évoquant le phénomène de recristallisation

dans les produits alimentaires poreux concernent la pâte à pain ou le pain (Bárcenas et al. 2004, Baier-Schenk et al. 2005, Kontogiorgos and Goff 2006, Chen et al. 2013, Eckardt et al. 2013). Certains de ces auteurs abordent la recristallisation pour expliquer certains changements dans la structure de l'amidon et du réseau de gluten sans pour autant caractériser directement la croissance des cristaux par recristallisation (Bárcenas and Rosell 2006, Chen et al. 2013). Kontogiorgos and Goff (2006) ont couplé la calorimétrie différentielle à balayage et la cryo-microscopie électronique à balayage pour étudier l'effet des conditions de stockage sur la pâte à pain. Les auteurs ont réussi à mettre en évidence une croissance des cristaux de glace dans les macropores et micropores en cours de stockage et ont établi une corrélation entre cette croissance de cristaux et la déstructuration du réseau de gluten. Plus tôt, Baier-Schenk et al. (2005) avaient mis en œuvre la même méthodologie (couplage calorimétrie et microscopie) pour montrer une redistribution de l'eau au sein de la pâte à pain parallèlement à la croissance des cristaux. Ils ont également rapporté que la recristallisation se faisait essentiellement par croissance isomassique. Plus récemment, Eckardt et al. (2013) ont investigué les effets de la température (-8 °C, -16 °C et -19 °C) et de la durée de stockage (2, 3, 5 et 6 mois) sur la microstructure de pâte à pain et de pain congelés. Ils associent une perte d'eau du réseau de gluten à l'augmentation de la recristallisation avec la température et la durée de stockage.

En ce qui concerne la génoise, on ne dénombre que deux études, qui par ailleurs s'intéressent aux effets du stockage sur les critères de qualité (texture, teneur en eau, sensorielle) plutôt que sur l'évolution de la microstructure cristalline par effet de la recristallisation (Díaz-Ramírez et al. 2016, Van Bockstaele et al. 2021). Il apparaît ainsi un besoin en recherche sur les phénomènes de recristallisation dans les produits poreux de boulangerie et en particulier dans les génoises qui représentent un produit couramment congelé et stocké.

III. Caractérisation de la microstructure des produits congelés

La taille, la distribution et la morphologie des cristaux de glace jouent un rôle important dans la définition de la microstructure du produit congelé et sur sa qualité finale. La caractérisation de ces cristaux de glace est un élément clé dans l'étude de la formation et de l'évolution de la microstructure pendant la congélation et le stockage, respectivement. De nombreuses techniques ont été développées et mises en œuvre pour étudier les processus de cristallisation et/ou de recristallisation, et donc de mieux comprendre le lien entre les conditions opératoires et les caractéristiques du produit congelé. Zhu et al. (2019) en ont fait une revue exhaustive notamment sur les développements les plus récents ; Ces techniques permettent d'avoir les données qualitatives et/ou quantitatives nécessaires pour mieux comprendre l'impact de la cristallisation et de la recristallisation sur la qualité des aliments congelés. Il existe de nombreuses techniques permettant l'évaluation de la microstructure cristalline des produits congelés.

III.1 Microscopie optique

La microscopie optique a été la technique la plus communément utilisée pour visualiser la

microstructure de produits congelés (Islam et al. 2015, Parniakov et al. 2016). La plupart du temps, les échantillons sont observés à température ambiante. Les échantillons congelés subissent alors un traitement particulier : ils sont tout d'abord fixés à l'aide d'une solution de Carnoy ou de Clerk (60 % éthanol, 30 % chloroforme et 10 % d'acide acétique). Ils sont ensuite emmenés à la température ambiante et déshydratés. Ils sont alors coupés en fines lamelles après avoir été imprégnés de paraffine et ce de manière à limiter les modifications de structure. Enfin les échantillons sont observés au microscope optique (Sanz et al. 1999, Molina-Garcia et al. 2004, Alizadeh et al. 2007)

L'analyse de la microstructure se fait de façon indirecte car il s'agit d'une visualisation des vides engendrés par la lyophilisation et la déshydratation. Cette technique peut causer des modifications de la microstructure liée essentiellement à l'étape de préparation de l'échantillon et aussi aux dégradations dues à la déshydratation ou lyophilisation de l'échantillon.

III.2 Microscopie électronique

Cette technique utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon dans le but de le visualiser à très haute résolution. Elle est basée sur le signal électrique généré par des électrons incidents à haute énergie frappant la surface de l'échantillon. Il existe deux types de microscopies électroniques :

- La MET (Microscopie Electronique à Transmission) : le faisceau d'électrons traverse l'échantillon et produit un rayonnement qui est transcrit en une image en niveau de gris. La technique nécessite des échantillons d'épaisseur très fine pour permettre la traversée des électrons (Zhu et al. 2019).
- La MEB (Microscopie Electronique à Balayage) : à la différence de la MET, le faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon. Les rayonnements réfléchis dépendent de la topologie de la surface et sont transcrits également en images en niveau de gris mais avec des reliefs (Dalvi-Isfahan et al. 2019). Elle permet d'avoir des grossissements d'objet allant de 10 à 300000 (Zhu et al. 2019).

Pour des observations à température ambiante, les deux techniques nécessitent une préparation complexe des échantillons mettant en œuvre des opérations de coloration chimique, de fixation et d'enrobage métallique pour améliorer le contraste et rendre les surfaces conductrices. Pour les produits congelés, les échantillons doivent être lyophilisés auparavant, si le froid ne peut être maintenu pendant la durée de l'observation (Tu et al. 2015). Cependant, la lyophilisation des échantillons peut modifier la microstructure des produits congelés et affecter les résultats. Pour éviter d'introduire ces artefacts de mesure, la cryoMEB est une technique alternative puisqu'elle comporte un système de refroidissement qui permet d'imager des échantillons congelés à température négative, voire de les congeler progressivement dans l'appareil. Pour cela l'échantillon est d'abord fixé dans l'azote liquide avant d'effectuer la cryofracture. Il est ensuite introduit dans le cryoMEB pour son analyse. Cette technique a été largement utilisée pour caractériser la microstructure de produits congelés tels que des pommes (Chassagne-Berces et al. 2009), des cerises (Kong et al. 2017),

des steaks hachées (Mulot et al. 2019) ou des sorbets (Masselot et al. 2021). La cryoMEB a aussi été utilisée pour évaluer les modifications dans les réseaux de gluten et dans les granules d'amidon dans de la pâte à pain congelée (Yi and Kerr 2009) ou du pain congelé (Bárceñas and Rosell 2006).

Outre les étapes de préparation qui peuvent introduire des artefacts de mesure et leur caractère chronophage, les techniques de microscopie ne donnent accès qu'à des informations en 2D qui dépendent fortement du plan observé. Par conséquent, elles ne permettent pas d'avoir des informations quantitatives sur la totalité des volumes étudiés. D'autres techniques non invasives et fournissant des informations en 3D sont de plus en plus utilisées pour évaluer les impacts des conditions opératoires de congélation et de stockage sur la microstructure de l'aliment.

III.3 Imagerie par résonance magnétique

La technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ne nécessite pas une préparation préalable de l'échantillon. Elle consiste à quantifier la mobilité relative des molécules d'eau dans l'échantillon (Grenier 2003). Cette méthode a été utilisée pour étudier la cristallisation et caractériser les transitions de phases pendant la congélation et la décongélation de l'aliment.

III.4 Spectroscopie dans l'infrarouge proche NIR

Cette technique est basée sur l'absorption sélective de la lumière NIR de différentes longueurs d'ondes (700-2500nm) par des groupes contenant de l'hydrogène. Cette technique non invasive permet d'avoir des informations sur la taille, la morphologie et la composition chimiques des échantillons (Sun 2010, Liu et al. 2017, Cheng et al. 2018).

Cette technique a été utilisée pour analyser des produits alimentaires congelés. Chen et al. (2012) ont ainsi montré que la taille des cristaux de glace impacte la déformation structurale des produits congelés. Comme les cristaux de glace sont de tailles différentes, les spectres d'absorption sont différents et donc la déformation de la structure peut être reflétée de manière synergique par les spectres.

III.5 Microtomographie à rayons X

La microtomographie à rayons X (μ CT RX) est une méthode non invasive qui permet la visualisation 3D de la structure des objets, sans avoir généralement besoin d'une préparation spécifique de l'échantillon. Elle consiste à émettre des rayons X qui traversent un échantillon en rotation ; ces rayons sont atténués en fonction de la densité locale, de l'épaisseur de l'échantillon et du numéro atomique du matériau (Sasov and Dyck 1998). Le principe de mesure est schématisé sur la Figure 20 adaptée de (van Dalen et al. 2013), Vicent (2019). Cette technique fournit ainsi des représentations numériques 3D des échantillons analysés, ouvrant la voie à une multitude d'informations quantitatives, notamment des propriétés microstructurelles (Pinzer et al. 2012, van Dalen et al. 2013, Kobayashi et al. 2015, Vicent et al. 2017, Mulot et al. 2019, Vicent et al. 2019, Haffar et al. 2021, Masselot et al. 2021), des

propriétés physiques (Calonne et al. 2014), des modélisations de processus physiques complexes (Flin et al. 2003).

La résolution à laquelle l'échantillon est scanné joue un rôle important dans la qualité des images obtenues, mais s'obtient généralement au détriment du champ de vue imagé. Les microtomographes de laboratoire sont configurables puisque la position de l'échantillon peut être modifiée soit en le rapprochant du détecteur, soit en le rapprochant de la source de rayons X. Dans le premier cas, le champ de vue est augmenté tout en sacrifiant la résolution et il sera possible de voir la totalité de l'échantillon. Dans le second cas, il s'agit de choisir une région d'intérêt à scanner et la résolution spatiale est alors plus importante (Masschaele et al. 2013).

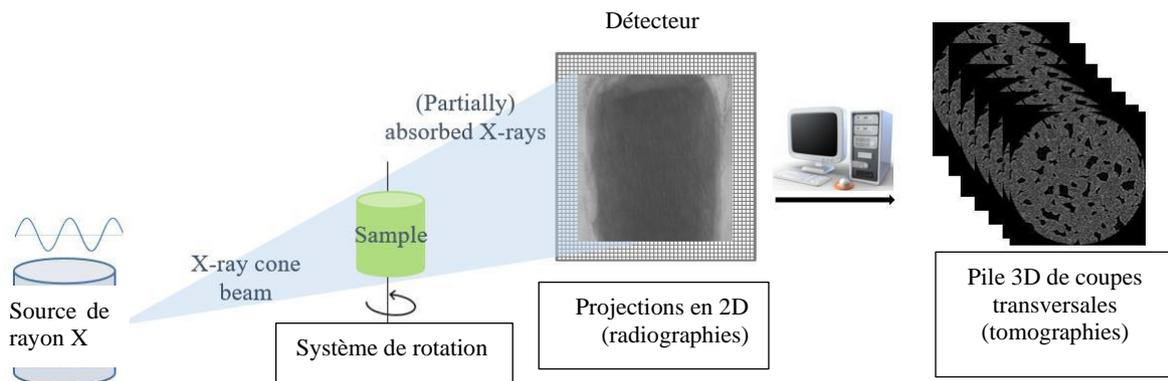


Figure 20: Les quatre composants essentiels d'un système de tomographie par rayons X. Les photons générés par la source traversent l'échantillon, puis capturés par le détecteur. Le processus se répète pour un certain nombre d'angles de rotation et est ensuite reconstruit par calcul pour produire des tomographies. (Vicent 2019).

La microtomographie peut être utilisée pour étudier des échantillons congelés sans aucune préparation ni fixation chimique avec un dispositif de maintien au froid (Pinzer et al. 2012, Medebacha et al. 2013, Calonne et al. 2015, Vicent et al. 2016, Guo et al. 2018, Mulot et al. 2019, Masselot et al. 2021). Les appareils de microtomographie à rayons X utilisés dans les laboratoires sont constitués d'un tube à rayons X. Il s'agit d'un tube à vide à haut potentiel dans lequel se produit un faisceau de rayons X de forme conique (Hsieh 2009). L'utilisation d'un tomographe de laboratoire nécessite certaines caractéristiques de l'échantillon pour effectuer des analyses en haute résolution et obtenir des images de bonne qualité. L'échantillon doit être de petite taille pour pouvoir le rapprocher de la source de rayons X mais assez grand pour qu'il soit représentatif. Dans les cas des études effectués par Mulot et al. (2019) sur les steaks hachés, des échantillons cylindriques ont été analysés à température négative. Le système utilisé a permis de scanner les échantillons à une résolution d'environ 9 μ m. Le même système (Figure 21) a été utilisé par Masselot et al. (2021).

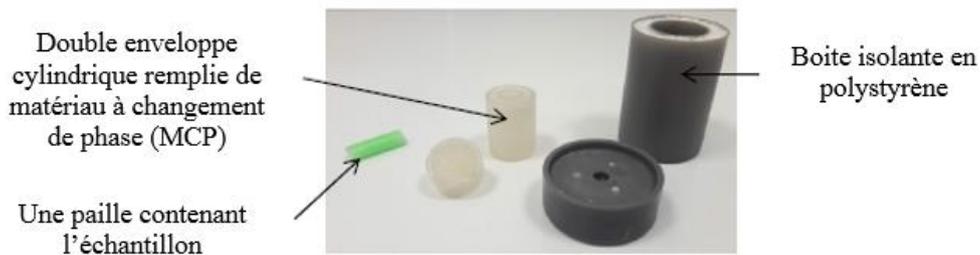


Figure 21: Boîte thermostatée : à gauche, paille en plastique contenant l'échantillon ; au milieu, double enveloppe cylindrique contenant le matériau à changement de phase ; à droite, double enveloppe cylindrique contenant la mousse isolante en polyuréthane (Masselot et al. 2021).

Il existe d'autres tomographes offrant une plage de taille de voxels plus importante, à savoir les systèmes de tomographie synchrotron, tels que le Synchrotron SOLEIL de Gif-sur-Yvette et à l'European Synchrotron Radiation Facility de Grenoble. Les faisceaux synchrotron sont connus pour leur qualité d'image et leur très haute résolution allant généralement de 20 nm jusqu'à 20 μm . De plus, le faisceau parallèle émis est utile pour la détection des bords dans les matériaux à faible atténuation, car il exploite la différence du coefficient de réfraction lorsque le faisceau traverse l'échantillon (Stevenson et al. 2003).

La dernière étape des analyses microtomographiques permet de récupérer des coupes 2D sur toute la hauteur de l'échantillon. Des logiciels de reconstruction sont utilisés pour reconstruire le volume 3D de l'échantillon scanné. Afin de pouvoir visualiser les coupes obtenues en niveaux de gris, il existe des algorithmes de reconstruction qui calculent le coefficient d'atténuation local à chaque position du voxel. L'algorithme de rétroprojection filtrée est l'algorithme le plus utilisé car les calculs sont moindres et le nombre de radiographies capturées est relativement élevé.

III.5.1 Analyses d'images et traitement de données

L'imagerie 3D permet l'obtention d'une quantité importante de données et de radiographies qui nécessitent un traitement afin de pouvoir extraire les informations désirées et de quantifier les différents résultats. L'analyse des images de microtomographie permet d'extraire plusieurs informations : les propriétés volumétriques (fractions volumiques) de différentes phases présentes dans le produit et la distribution de taille (Guo et al. 2017, Vicent et al. 2017, Mo et al. 2018, Mulot et al. 2019, Vicent et al. 2019, Masselot et al. 2021), les propriétés de formes et de structures tel que les rayons de courbures (Flin et al. 2004, Haffar et al. 2021).

Le traitement d'images passe d'abord par le choix d'un volume d'intérêt afin de réduire le volume de données à traiter et donc de réduire le temps de calcul. Le choix d'un volume à étudier dans l'échantillon permet aussi d'éviter les bords qui peuvent être endommagés lors de l'échantillonnage. La deuxième étape dans le traitement des images est la segmentation : cette étape permet la séparation des différentes phases présentes dans le matériau en se basant sur les niveaux de gris. Ainsi les phases sont séparées et donc l'extraction des caractéristiques

d'intérêt devient possible. La segmentation peut se faire de façon manuelle ou bien de façon automatique sur la base des histogrammes de niveaux de gris des différentes phases. (Vicent et al. 2017) a développé une méthode de segmentation manuelle basée sur les niveaux d'atténuation des matériaux de référence, comme le montre la Figure 22 dans le cas des échantillons de pommes congelées. Les niveaux d'atténuation des rayons X des matériaux de référence (glace et jus de pomme concentré) ont été obtenus avec les mêmes paramètres d'acquisition que sur la pomme congelée à -20°C (courbe en pointillés noirs). L'histogramme des niveaux de gris de la glace pure à -20°C est représenté par la courbe noire et celui du jus de pommes concentré et gélifié à -20°C (représentant la matrice non congelée et cryo-concentrée de la pomme congelée) par la courbe grise. La quantification des radiographies μCT n'est généralement possible qu'après la segmentation.

L'extraction des caractéristiques d'intérêt se fait soit grâce à la différence de niveaux de gris entre les constituants du matériau, soit selon la morphologie, par exemple, en calculant les rayons de courbures. Cette méthode présente un inconvénient, celui de considérer que les distributions des histogrammes sont bimodales et de nature gaussienne ce qui est rarement le cas. Le choix de la méthode de segmentation adéquate dépend donc principalement de la nature du produit étudié et de la qualité des images obtenues.

Une fois les images traitées et analysées, il est possible d'extraire un grand nombre de paramètres et de caractéristiques. L'exploitation des données expérimentales obtenues après reconstruction nécessite un traitement par le biais de logiciels d'analyses d'images tels que ImageJ (Image Processing and Analysis in Java), Octopus (XRE), Mimics (Materialise), ou AVIZO et Amira (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (Walter et al. 2010). L'analyse qualitative des images μCT permet de connaître la morphologie 3D de l'échantillon étudié. De plus, les résultats quantitatifs de l'analyse 3D permettent l'obtention d'informations sur la structure globale de l'échantillon alimentaire, les fractions volumiques des sous-composants, la surface de tout objet d'intérêt, l'épaisseur de la structure, les paramètres de taille des pores et des objets, ainsi que leur nombre et leurs caractéristiques morphologiques (Russ 2004). Ainsi, une multitude de données quantitatives peuvent être fournies à toute étude qui utilise ces ensembles de données 3D et ces méthodes d'analyse.

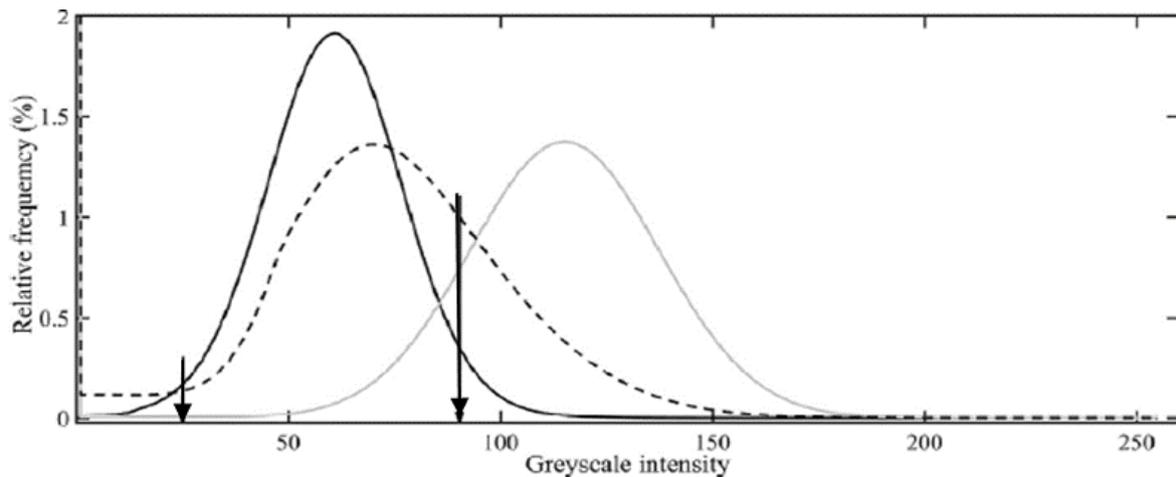


Figure 22: Histogramme des niveaux d'atténuation (niveaux de gris) obtenus pour de la pomme congelée à -20°C (courbe en pointillés noirs), de la glace pure à -20°C (courbe noire) et du jus de pommes concentré et gélifié à -20°C (courbe grise) (Vicent et al. 2017).

III.5.2 Application de la microtomographie à rayons X à l'étude des produits alimentaires

La μCT à rayons X a été largement utilisée dans le domaine médical, la biologie mais aussi dans de nombreux autres domaines scientifiques. Cette technique semble être très prometteuse quant à l'étude de la microstructure des produits alimentaires. Une large gamme de produits a été étudiée : la viande (Kobayashi et al. 2015, Mulot et al. 2019, Wang et al. 2020), les légumes et les fruits (van Dalen et al. 2013, Ullah et al. 2014, Zhao and Takhar 2017), la crème glacée (Pinzer et al. 2012, Guo et al. 2017, Mo et al. 2018, Masselot et al. 2021), le pain (Babin et al. 2008, Besbes et al. 2013, Demirkesen et al. 2014).

Les auteurs se sont intéressés à l'étude des produits surgelés et donc à l'impact des conditions de congélation et de stockage sur l'évolution de la microstructure. Mulot et al. (2019) ont utilisé cette méthode pour étudier l'impact des conditions opératoires de congélation sur la microstructure des steaks hachés après congélation. L'impact de la vitesse de congélation a été étudié. La croissance des cristaux de glace est limitée dans le cas de la congélation rapide, ce qui conduit à la formation d'un grand nombre de petits cristaux de glace répartis dans la matrice de façon homogène. La congélation lente conduit quant-à-elle à la formation de gros cristaux de glace distribués de façon hétérogène dans la matrice puisque dans ce cas, les nucléis disposent de suffisamment de temps pour évoluer. D'autres études ont porté sur l'impact des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de produits congelés. Vicent et al. (2019) ont ainsi étudié l'évolution de la microstructure des carottes congelées et stockées sous température fluctuante pendant 2 mois. Les auteurs ont remarqué que la taille des cristaux de glace continue d'évoluer pendant le stockage en présence de fluctuations de température alors que le nombre de cristaux diminue (Tableau 4) et ont attribué ces modifications au phénomène de recristallisation.

Tableau 4: Evolution de la taille et du nombre de cristaux de glace en fonction de la durée de stockage des échantillons de carottes en présence des fluctuations de température (adapté par Vicent et al. (2019).

Durée de stockage (jours)	Gamme de la taille des cristaux de glace (μm)	Diamètre équivalent moyen (μm)	Nombre de cristaux de glace
0	20-590	246 ± 16	1890 ± 80
7	20-815	342 ± 13	1650 ± 60
14	20-940	394 ± 19	1450 ± 100
30	20-1170	525 ± 28	940 ± 120
60	20-1450	578 ± 28	670 ± 160

Pour ce qui est des produits poreux de boulangerie, la μCT RX a été largement utilisée pour caractériser la structure poreuse de pâte de pain ou de pain (Chevallier and Le Bail 2012, Chevallier et al. 2014, Rzigue et al. 2016, Germishuys 2021).

Ces produits ont une structure assez complexe et donc la microtomographie à rayons X est un bon outil pour obtenir des données microstructurales. Demirkesen et al. (2014) ont utilisé la μCT à rayons X pour étudier l'effet des stabilisants (hydrocolloïdes) et de mélanges de stabilisants sur la structure de la mie de pain sans gluten. Il a été démontré que l'ajout de stabilisants est efficace pour former une structure poreuse de la mie de pain similaire à la structure de la mie de pain témoin en termes d'hétérogénéité avec beaucoup de vides.

Cependant, les applications aux produits poreux de boulangerie congelés sont inexistantes, à notre connaissance. Or il apparaît que la technique revêt un potentiel pour l'étude de la microstructure à la fois poreuse et cristalline de ces produits. En effet, elle pourrait aider à visualiser et quantifier la porosité et les cristaux de glace dans les produits poreux de boulangerie, telle que la génoise congelée. Ces données pourraient aider à mieux comprendre les interactions entre les procédés (congélation et stockage) et les microstructures développées et in fine la qualité des produits. Il apparaît ainsi utile de développer une méthodologie robuste et fiable pour appliquer la μCT RX à l'étude de la génoise congelée.

IV. Conclusion de la synthèse bibliographique

La majorité des études de la littérature sur les produits alimentaires concernent les produits non poreux ou bien avec une faible porosité tels que les produits carnés, les fruits et légumes. Peu d'études sont dédiées aux produits alimentaires très poreux et plus particulièrement aux produits de boulangerie et pâtisseries. La majorité concerne le pain ou la pâte à pain. Pourtant, certains, comme la génoise, sont la base d'une grande partie des pâtisseries fabriquées et consommées.

Leur usage est tel qu'ils passent, pour la majorité, par une étape de congélation et de stockage, avant leur utilisation et la préparation du produit finalisé. Mais ces étapes ont fait l'objet de peu d'études et elles concernent une fois de plus le pain et la pâte à pain pour cette catégorie de produits alimentaires très poreux.

Pourtant les phénomènes de transfert de masse et de chaleur qui se produisent au cours de la congélation et du stockage dans de tels produits sont particuliers. La présence de pores au sein de la structure a un rôle prépondérant dans de tels transferts et dans la formation et le maintien de la microstructure finale. Cette microstructure est définie principalement par la distribution des cristaux de glace en taille et en localisation au sein du produit. De plus, il est connu, de façon générale, que les paramètres du procédé de congélation, et notamment la vitesse de congélation, détermine la distribution de tailles des cristaux de glace et donc la mise en place de la microstructure de l'aliment congelé. Les conditions de stockage, et en particulier le niveau de température, la durée et stabilité de la température jouent ensuite sur la modification de cette microstructure par recristallisation. Au cours de la vie d'un aliment dans la chaîne du froid, plusieurs histoires thermiques peuvent être rencontrées. Etudier la qualité du produit final nécessite de suivre cette histoire thermique et de comprendre l'interaction des différents maillons qui la compose. Dans le cas des produits surgelés, les étapes de congélation et de stockage sont des étapes clés. Quelques études, peu nombreuses, ont concerné l'une ou l'autre de ces étapes mais jamais, à notre connaissance, le couplage de ces deux maillons.

La complexité des produits alimentaires poreux, et notamment la présence d'ingrédients fortement réactionnels, qui dans le cas des produits de boulangerie et pâtisseries modifient fortement leur structure au cours de la cuisson, rend difficile leur étude et la généralisation des phénomènes observés. Certains auteurs ont privilégié des formulations simples ou sont allés jusqu'à la préparation d'aliments modèles permettant de reproduire les caractéristiques à étudier mais en limitant la réactivité et la variabilité de la matière première. Dans le cas de la génoise, l'étude de Bousquière (2017) est particulièrement intéressante par la mise en place, notamment, d'un modèle de génoise non réactif et de caractéristiques contrôlées.

A la lecture de ces travaux bibliographiques, nos travaux ont cherché à mettre en place des essais permettant de caractériser et de mieux comprendre les effets couplés des étapes de congélation et de stockage sur un produit poreux modèle de type génoise. Pour cela, notre étude s'est focalisée sur la fabrication contrôlée de cette génoise modèle, la détermination des paramètres thermophysiques qui la caractérisent et la caractérisation de la microstructure avant et après congélation et stockage. La vitesse de congélation, la durée, la température et les conditions de stockage ont été étudiés afin de mieux comprendre les phénomènes de migration d'eau, de formation et de modification des cristaux de glace au sein du matériau poreux. Deux équipements de congélation ont été utilisés pour permettre une vitesse lente et une vitesse rapide et deux congélateurs ont permis de faire varier les conditions de stockage.

Pour la caractérisation des produits, il est nécessaire d'utiliser un ou des outils puissants permettant de suivre à la fois de façon qualitative et quantitative la taille et la localisation des objets qui composent cette microstructure (pores et cristaux). Ces outils doivent permettre une visualisation à une échelle suffisamment résolue, allant du micron, voire sub-micronique, jusqu'à la centaine ou les centaines de microns. Ces mesures doivent par ailleurs pouvoir être effectuées sans modifier le produit, à savoir en le maintenant à l'état congelé au cours de la mesure. Pour notre étude, il est apparu, à la lecture des travaux antérieurs, que la cryomicroscopie électronique à balayage (cryo-MEB) est un outil puissant et à très haute

résolution permettant de voir les objets à des échelles très faibles, mais limitée à la visualisation d'une surface fracturée. La microtomographie à rayons X (μ CT RX) est une méthode suffisamment résolue pour permettre la visualisation de l'objet en 3D et la quantification de la microstructure. Pour notre étude, cette méthode a été associée à l'utilisation d'une platine permettant de maintenir l'échantillon à l'état congelé pendant la mesure (Calonne et al., 2014). L'un des défis dans ce travail est de pouvoir accéder à des images en 3D avec un contraste suffisant au sein de la génoise permettant de différencier les pores, la glace et la matrice et avec une résolution spatiale allant de l'échelle submicronique à plusieurs centaines de microns et une résolution temporelle acceptable. L'utilisation d'une source synchrotron pour les rayons X permet alors de fournir des radiographies de qualité exceptionnelle en termes de contraste et de résolution. Dans le cas de la ligne ANATOMIX du synchrotron SOLEIL, cet instrument fonctionne dans une gamme d'énergie photonique suffisamment basse, adaptée à l'imagerie de produits peu denses et peu absorbants comme les produits biologiques et alimentaires. Mais l'utilisation d'un tel équipement est limité dans le temps et ne permet donc pas des campagnes de mesure nombreuses, ce que permet par contre, mais avec une moins bonne résolution, l'équipement de laboratoire.

Notre étude s'est donc focalisée sur la caractérisation des génoises modèles après congélation et stockage pour des conditions couramment rencontrées dans la pratique (vitesse de congélation ; conditions et durées de stockage), par cryo-MEB et μ CT RX sur la ligne ANATOMIX du synchrotron SOLEIL. Par ailleurs une génoise réelle de référence a aussi été fabriquée pour comparaison et le suivi de sa congélation au cours du temps et du cyclage thermique a pu être effectué au sein d'un équipement de microtomographie de laboratoire muni d'une cellule thermostatée.

Dans le chapitre suivant, les méthodes de fabrication des génoises, de caractérisations thermophysiques et d'imagerie sont décrites.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Ce chapitre introduit les matériels et méthodes utilisés dans le cadre de ce travail de thèse pour étudier l'influence de la congélation et du stockage sur les propriétés microstructurales de produits alimentaires poreux de type boulangerie. Dans un premier temps, nous présentons le produit retenu pour cette étude : la génoise. Les conditions de congélation et de stockage, ainsi que la préparation des échantillons sont détaillées dans la seconde section. Les méthodes mises en œuvre pour caractériser les propriétés thermo-physiques des génoises sont ensuite présentées. Enfin, la dernière section présente les outils mis en œuvre pour caractériser la microstructure des génoises congelées, à savoir les dispositifs de microtomographie à rayons X (de laboratoire et de type synchrotron) ainsi que les cellules thermostatées et la cryoMEB. Les principes de traitement et d'analyse d'image 3D associés sont aussi présentés.

I. Formulation et fabrication des génoises

I.1 Préparation et validation du produit modèle

Dans le cadre de ce projet de recherche, deux formulations de génoise ont été étudiées : une génoise modèle et une génoise dite de référence. Dans les deux cas, il s'agit de maîtriser la formulation et la fabrication de ces produits poreux afin de mieux pouvoir les caractériser par la suite. En effet dans le cas des produits du commerce, la formulation n'est jamais parfaitement connue et la notion de lot introduit une variabilité. Par ailleurs, par la maîtrise du procédé, l'objectif est ici de s'assurer le plus possible de la reproductibilité du produit obtenu.

Une génoise modèle a été d'abord fabriquée puis analysée. Cette dernière contient majoritairement de l'eau, de l'amidon de maïs et de petites quantités d'hydrocolloïdes (Bousquière 2017). Tous les ingrédients réactifs ont été supprimés (absence de sucre, d'œuf et de matière grasse) et remplacés par des ingrédients qui permettent l'obtention d'une génoise avec des caractéristiques de porosité et de densité similaires à celles de la génoise réelle. En effet, durant la cuisson, plusieurs transformations et réactions chimiques ont lieu dans les génoises classiques (réaction de Maillard, caramélisation des sucres, gélatinisation de l'amidon, évaporation, formation de la croûte et coagulation du blanc d'œuf). La teneur en eau avant cuisson est de l'ordre de 40% et après cuisson elle est autour de 30%. Une grande partie de cette eau est contenue dans le réseau d'amidon et est chimiquement liée au sucre. La quantité d'eau disponible pour la congélation est faible. Il est alors difficile d'étudier la formation des cristaux et des pores dans une structure aussi complexe. Le choix de la génoise modèle est aussi justifié par sa teneur en eau plus importante permettant de suivre plus facilement les cristaux de glace formés lors de la cristallisation.

La deuxième formulation est une formulation de génoise classique simplifiée, dite de référence dans la suite du document. Cette formulation contient de la farine, du sucre, de l'œuf et une plus faible quantité d'eau.

Pour valider le choix de ces deux formulations, des préparations de génoise ont été effectuées afin de déterminer les paramètres opératoires permettant d'avoir une structure alvéolaire de reproductible.

Génoise modèle : le protocole de fabrication de la génoise modèle a été établi par Bousquières (2017). Ce protocole n'a pas été modifié. Par contre, plusieurs préparations de génoise ont été nécessaires pour s'assurer de la reproductibilité de certains paramètres tels que la porosité, la teneur en eau, la densité de la pâte et la densité de la génoise cuite. Ces mesures ont été effectuées systématiquement pour chaque préparation et seront décrites dans les sections suivantes.

Génoise de référence : la mise au point du protocole de préparation de la génoise de référence a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les vitesses de battage des ingrédients ont été validées en testant plusieurs vitesses et en comparant la quantité d'air contenue dans la génoise cuite. Certaines étapes étant faites manuellement, le protocole de fabrication a ensuite été automatisé afin d'éviter une trop grande variabilité. Des mesures de porosité, de teneur en eau et de densité ont également été effectuées pour chaque préparation afin d'étudier leur reproductibilité, ce qui a permis de valider le protocole de fabrication adopté.

I.2 Préparation des génoises

I.2.1 Génoise modèle

La génoise modèle étudiée est une génoise non réactive qui ne contient ni sucre, ni œufs. Comme évoqué précédemment, cette génoise modèle a été développée par Bousquières (2017). La formulation de cette génoise contient les ingrédients suivants :

- De l'amidon de maïs (Cargill, Minneapolis, MN, USA), stocké dans une chambre froide à 5°C.
- De la méthylcellulose (MC) (Dow Chemical, Midland, MI, USA), type SGA7C, stockée dans des seaux en plastique à température ambiante.
- De l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) (Dow Chemical, Midland, MI, USA), type K250M, stocké dans des seaux en plastique à température ambiante.
- De l'eau ultra-pure.

Les quantités nécessaires pour la préparation de la génoise modèle sont récapitulées dans le Tableau 4:

Tableau 5: Formulation de la génoise modèle

Ingrédients	Quantité (% w/w)
K250M (HPMC)	0.35
SGA7C (MC)	0.46
Eau	62.64
Amidon de maïs	36.55

La génoise modèle est préparée en deux étapes distinctes :

1. La première étape consiste à préparer la solution à base de dérivés de cellulose : les deux stabilisants (MC et HPMC) sont mélangés, puis de l'eau ultra-pure préalablement chauffée à 80°C est ajoutée afin d'assurer une meilleure dispersion des dérivées de cellulose. La solution est ensuite laissée sous forte agitation pendant 90 minutes à température ambiante. Elle est ensuite placée au réfrigérateur à 5°C pendant 12 heures, toujours sous forte agitation afin de permettre une hydratation complète des stabilisants. Le tableau 6 montre les caractéristiques physicochimiques des stabilisants utilisés. Comme les températures d'hydratation optimales sont inférieures à 10°C pour le MC et 30°C pour le HPMC il est important de préparer la solution la veille de la fabrication de génoise pour une meilleure hydratation.

Tableau 6: Caractéristiques physicochimiques des dérivés de cellulose MC (SGA7C) et HPMC (K250) de la marque METHOCEL™ (The Dow Chemical Company, 2002).

Grade	Nom commercial	Viscosité moyenne en mPa.s à 2% dans l'eau	Température d'hydratation optimale	Type et température de formation du gel
SGA	SG A7C	700	< 10 °C	Très ferme / 38-44 °C
K	K250M	250 000	< 30 °C	Mou / 70-90°C

2. Pour préparer la pâte, la solution de dérivés de cellulose (MC et HPMC) d'une part, et l'amidon, d'autre part sont d'abord remis à température ambiante. Puis la solution de dérivés cellulosiques est mélangée pendant 10 minutes à l'aide d'un robot (KitchenAid, modèle 5KSM150, Benton Harbor, MI, USA) réglée à la vitesse maximale (10). La vitesse est réduite à 2 et l'amidon tamisé est ajouté progressivement à la mousse pendant 1 min 15s pour éviter la formation de grumeaux. Ensuite, le mélange est agité à la vitesse 2 pendant 2 min pour obtenir la pâte.

Une fois la pâte prête, 60 g de pâte sont versés dans des moules en aluminium (10x6x3 cm³) et cuits dans un four électrique (Whirlpool, Benton, IL, USA) pendant 30 minutes à 170°C.

Après la cuisson, les génoises sont refroidies à température ambiante pendant 45 minutes (humidité relative ambiante RH= 50-60%). Elles sont ensuite emballées individuellement dans des sacs en plastique étanches et scellées avant d'être stockées dans un réfrigérateur à 5°C.

I.2.2 Génoise de référence

La recette de la génoise de référence étudiée est une formulation simple sans matière grasse ni levure. Les ingrédients utilisés sont :

- De la farine (farine de blé, Tarwebloem T55, Germany),
- Du sucre (Sucre en poudre, Daddy, France),
- Des œufs (Carrefour Bio, France)

- De l'eau ultrapure.

Le Tableau 7 présente les proportions des différents ingrédients cités précédemment.

Tableau 7: Formulation de la génoise de référence.

Ingrédients	Pourcentage (% w/w)
Farine	25
Sucre	25
Blanc d'œuf	30
Jaune d'œuf	15
Eau	5

Cette recette permet d'avoir une génoise assez aérée (recette simplifiée). La préparation de la génoise se fait en trois étapes à l'aide d'un robot de cuisine (Masterchef Gourmet QA510110, Moulinex, France) :

1. Le jaune d'œuf est d'abord homogénéisé pendant 10 secondes, puis le sucre est incorporé et mélangé au jaune d'œuf pendant 10 minutes et 12 secondes, ensuite la farine blanche tamisée est versée progressivement pendant 2 minutes et 12 secondes et enfin l'eau est ajoutée et mélangée pendant 1 minute. Toutes ces opérations de mélange sont effectuées à la vitesse maximale de rotation du robot de cuisine. Le mélange est ensuite réservé.
2. Puis le blanc d'œuf est battu seul à l'aide du même robot de cuisine à vitesse maximale afin de monter le blanc en neige.
3. Enfin, le blanc d'œuf est progressivement incorporé au premier mélange à l'aide d'un batteur plat à faible vitesse.

Pour la cuisson de la génoise, 50 g de pâte sont versés dans des moules en aluminium (10x6x3 cm³) puis les moules sont placés dans un four (Arianna LED Bakerlux, Unox) à 170°C pendant 20 min. Après cuisson, les génoises sont refroidies pendant une heure à température et humidité ambiante.

Afin de s'assurer de l'homogénéité de la température dans le four, une préparation témoin a été effectuée et des thermocouples de type T (TC SA, Dardilly, France - Précision de $\pm 0,01$ °C), préalablement étalonnés, ont été placés à différents endroits dans le four. Des thermocouples ont aussi été disposés au centre des génoises et à trois positions différentes dans la génoise centrale (au centre et sur les côtés) comme le montre la Figure 23.

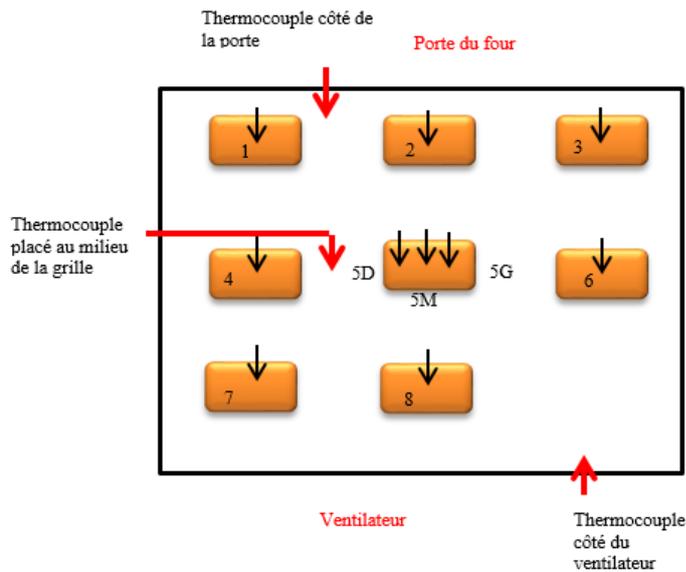


Figure 23 : Mesure de l'homogénéité de la température dans le four et les gâteaux : les flèches noires indiquent l'emplacement des thermocouples dans les gâteaux. Les flèches rouges indiquent l'emplacement des thermocouples placés pour mesurer la température de l'air dans le four.

La Figure 24 représente les courbes d'évolution de la température dans le four et au sein de la gâteaux pendant la cuisson et le refroidissement. La température dans le four semble homogène quel que soit l'emplacement (à côté de la porte, du ventilateur ou au centre de la grille de cuisson). Quant à la température au sein des différentes gâteaux, elle est similaire entre gâteaux. Les légères différences de température relevées peuvent être liées à l'emplacement des thermocouples dans la gâteaux et aussi à l'évolution de la microstructure pendant la cuisson. L'étape de refroidissement des gâteaux nous a permis de définir le temps nécessaire pour que le cœur des gâteaux atteigne la température ambiante. Le temps obtenu est égal à une heure.

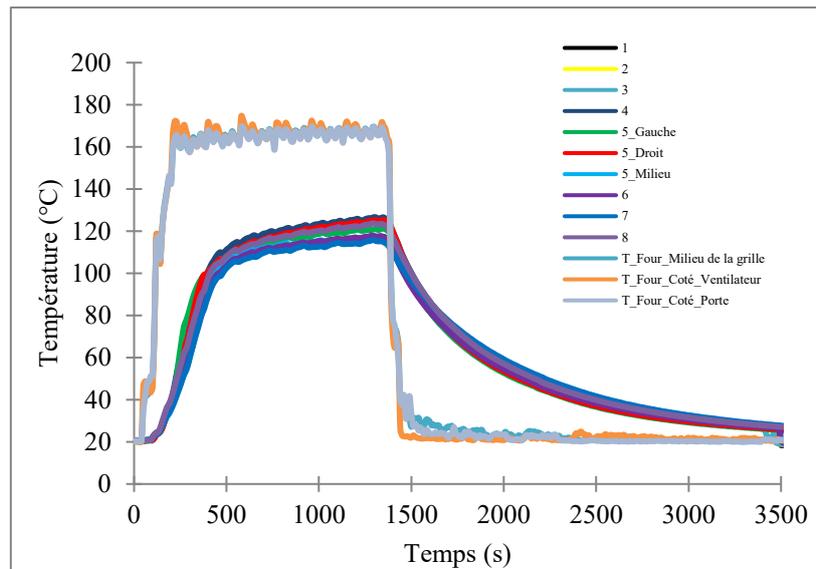


Figure 24: Suivi de la température dans le four et dans la génoise pendant la cuisson et le refroidissement : les courbes en orange, gris et bleu mesurent l'évolution de la température de l'air dans le four. Les autres courbes représentent l'évolution de température au sein des génoises.

La Figure 25 montre les deux types de génoise préparées après cuisson : la génoise modèle (Figure 25a) et la génoise de référence (Figure 25b). Les deux génoises ont une structure poreuse dans laquelle on voit clairement la présence de macropores. La porosité globale des deux génoises a été mesurée soit par le rapport de densité apparente et densité réelle ou bien déterminée par microtomographie RX pour les deux types de génoise. Cette porosité varie entre 55 et 60 % quel que soit le type de génoise.

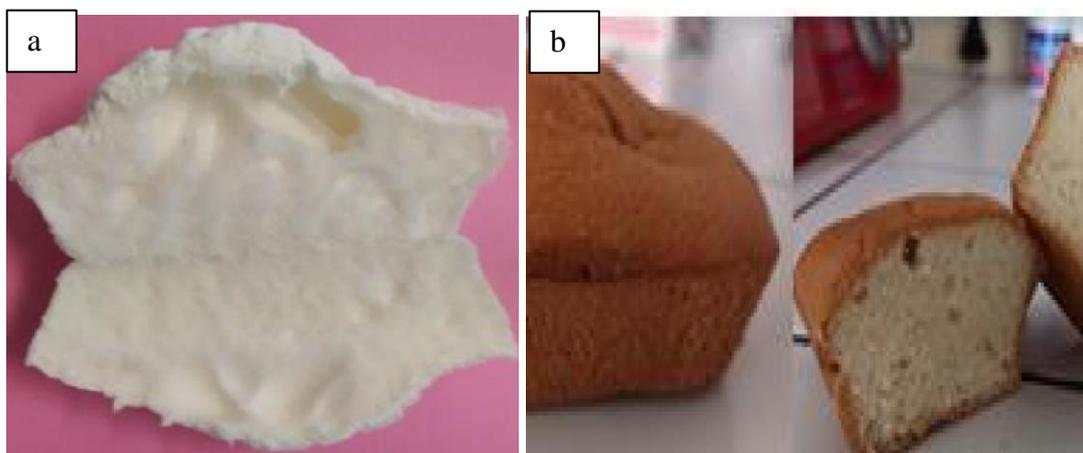


Figure 25: Photo d'échantillons de génoise après cuisson : (a) génoise modèle, (b) génoise de référence.

II. Caractérisation des propriétés thermophysiques des génoises

II.1 Teneur en eau de la génoise

Pour les mesures de teneur en eau, 3 génoises ont été utilisées pour découper 5 échantillons de mie de dimensions similaires ($6 \times 5 \times 2 \text{ cm}^3$). Chaque échantillon est ensuite pesé à l'aide d'une balance de précision (AE 163, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA, précision de 10^{-4}

g) pour obtenir la masse initiale m_0 (environ 22 g). L'échantillonnage a été effectué dans une cellule à température et humidité contrôlées (20 °C, HR = 80 %). Cette opération a été réalisée pour les deux types de génoise (modèle et référence)

Les échantillons pesés sont ensuite placés dans une étuve (Termaks TS4057, Bergen, Norvège) à 105 °C. Pour la génoise de référence, les échantillons sont pesés une première fois après 24 heures dans l'étuve puis à intervalle de temps régulier jusqu'à obtention d'une masse constante correspondant à la masse finale m_f (environ après 72 heures). Pour la génoise modèle, la procédure utilisée est basée sur la norme NF V03-707 qui consiste à laisser les échantillons dans l'étuve à 105°C pendant 90 minutes et de peser juste après pour obtenir la masse finale (m_f).

La différence entre les masse initiale m_0 et masse finale m_f représente la quantité d'eau évaporée durant l'étuvage. La teneur en eau de la génoise est ensuite déterminée selon l'équation (11) :

$$X_w = \frac{m_0 - m_f}{m_0} * 100 \quad (11)$$

Avec X_w est la teneur en eau de l'échantillon de génoise, m_0 est la masse (kg) de l'échantillon humide (masse initiale) et m_f est la masse (kg) de l'échantillon desséché (masse finale). La teneur en eau moyenne a été calculée à partir de cinq répétitions.

Une procédure similaire a été utilisée pour déterminer la teneur en eau de la pâte à génoise (modèle et référence).

II.2 Mesure de densité

La densité de la pâte, la densité apparente de la génoise ainsi que sa densité réelle ont été mesurées systématiquement après chaque préparation, et ce, pour les deux types de génoise (modèle et référence).

Après préparation de la pâte, 100 mL de celle-ci est prélevé dans une éprouvette et pesée (AE 163, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA, précision de 10⁻⁴ g). La densité de la pâte est alors déterminée en faisant le rapport de la masse sur le volume. La mesure est réalisée en 2 répétitions.

Pour la mesure de densité apparente de la génoise, des échantillons de mie de forme parallélépipédique sont également préparés dans la cellule à conditions contrôlées (20 °C ; HR = 80 %). Ces échantillons sont d'abord pesés (AE 163, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA, précision de 10⁻⁴ g ; environ 20 g par échantillon), puis leurs dimensions sont déterminées (environ 5x5x2 cm³) avec un pied à coulisse afin de calculer leur volume. La densité apparente est obtenue en faisant le rapport masse sur volume. Pour chaque essai, cinq répétitions sont effectuées pour obtenir une valeur moyenne.

Par la suite, ces échantillons sont compactés par le biais d'une machine sous vide (Foodsaver, V2860, Newell Brands, Atlanta, GA, USA) afin de chasser l'air contenue dans les pores (ouverts). Les nouvelles dimensions sont alors mesurées pour déterminer la densité réelle de la génoise. Une fois de plus cinq répétitions sont réalisées pour chaque essai.

II.3 Mesure de la température de congélation commençante

La mesure de température de congélation commençante a été déterminée par deux méthodes : par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par suivi de la cinétique de congélation. Ces deux méthodes sont présentées dans les sections suivantes.

II.3.1 La calorimétrie différentielle à balayage DSC

La DSC est une technique d'analyse thermique qui permet une analyse à la fois qualitative et quantitative des transitions thermiques. Les températures de congélation des deux types de génoise ont été mesurées dans un premier temps par calorimétrie différentielle en utilisant l'appareil DSC 1 STARE System (Mettler-Toledo, Columbus, Etats-Unis) présenté sur la Figure 26. L'appareil DSC permet de varier la température dans une plage comprise entre -150°C et 700°C avec une précision donnée par le constructeur de $0,02^{\circ}\text{C}$. Cet appareil contient une cellule de contrôle de température qui utilise de l'azote liquide et de l'air comprimé pour refroidir les échantillons et des résistances électriques pour les chauffer. Après chaque acquisition, le traitement des données est fait avec le logiciel STARE Evaluation (Mettler-Toledo, Columbus, Etats-Unis).

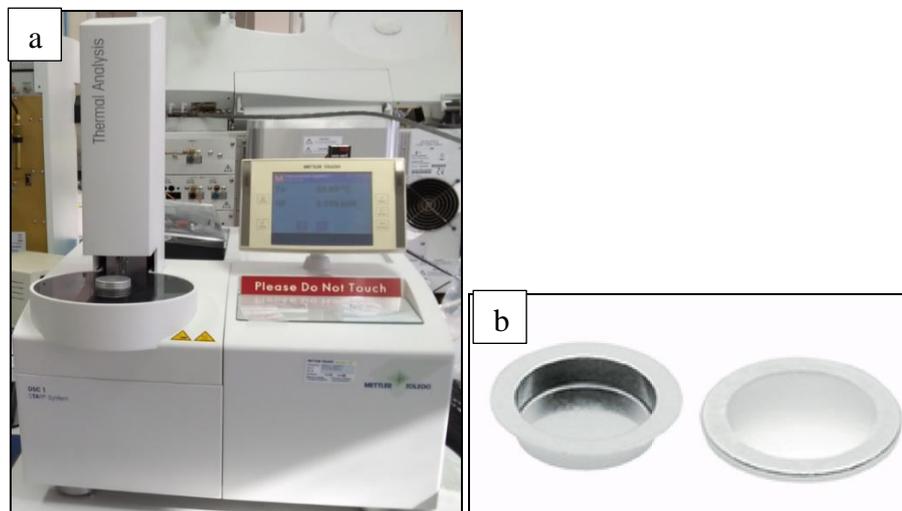


Figure 26: (a) Appareil DSC utilisé pour la mesure de la température de congélation ; (b) creuset d'aluminium utilisé pour l'analyse des échantillons.

Pour chaque mesure, environ 9 mg de génoise ont été prélevés dans la mie et mis dans un creuset en aluminium. L'échantillonnage a été fait dans les mêmes conditions contrôlées évoquées précédemment (cellule à une température de 20°C et une humidité relative de 80 %). La génoise étant un produit poreux, les échantillons ont été tassés avant d'être scellés dans les creusets afin de chasser l'air et favoriser les transferts thermiques. Pour éviter la perte

d'eau avant la mesure, les creusets contenant les échantillons de génoise ont été filmés et conservés au réfrigérateur à 5°C. Chaque échantillon a été placé dans l'appareil DSC juste avant son analyse. Six répétitions ont été effectuées.

Deux protocoles de mesure ont été adoptés selon la formulation de génoise :

Génoise modèle : pour chaque analyse, l'échantillon est d'abord équilibré à 25 °C pendant 10 minutes, puis refroidi à -40 °C à 10 °C min⁻¹, et enfin maintenu à -40 °C pendant 10 minutes avant d'être chauffé à nouveau à 25 °C à 5 °C min⁻¹ comme le montre Figure 27a.

Génoise de référence : pour chaque analyse, l'échantillon a été refroidi de 20°C à -40°C à 10 °C min⁻¹, puis maintenu à -40°C pendant 10 min, ensuite l'échantillon a été réchauffé à 20°C à 1 °C min⁻¹ et enfin, il a été maintenu à 20°C pendant 5 min. La Figure 27b montre le protocole DSC utilisé pour l'analyse.

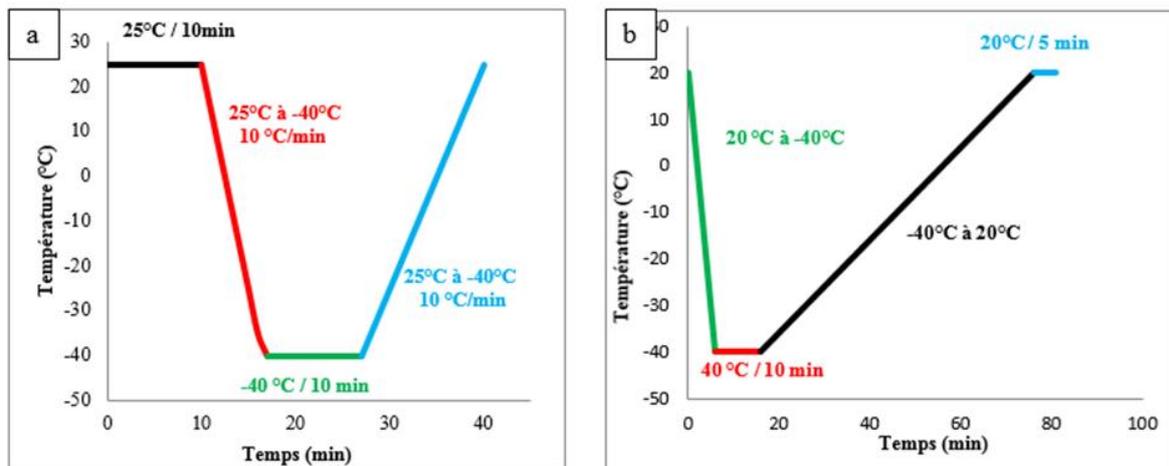


Figure 27: Protocole DSC (a) génoise modèle ; (b) génoise de référence.

Les mesures DSC permettent l'obtention de deux pics: un pic de congélation et un pic de fusion traduits par l'évolution du flux de chaleur mis en jeu pendant le cycle thermique en fonction de la température. Le pic de cristallisation étant variable en DSC du fait de la présence du phénomène de surfusion (Masselot 2020), la détermination de la température de congélation commençante se fait grâce à la courbe de fusion montrée sur la figure 28 qui est plutôt et répétable pour un même produit de même composition. L'interprétation des courbes DSC (pic endothermique de fusion) fournit des informations essentielles :

- **La fraction d'eau congelable $F_w(\%)$** : l'aire sous la courbe de fusion représente la quantité de chaleur absorbée pendant la fonte de la glace. Cette valeur permet la détermination de la quantité d'eau congelable par le biais de l'équation (12) :

$$F_w(\%) = \frac{\Delta H_w}{\Delta H_i * T_w} * 100 \quad (12)$$

Avec ΔH_w est l'enthalpie de transition totale de la fusion de la glace dans l'échantillon

de génoise, ΔH_i est la chaleur latente spécifique de la fusion de la glace (334 J g^{-1}) et T_w (%) est la teneur totale en eau dans l'échantillon.

- **La température de congélation commençante (T_{cc})** : elle représente le point d'intersection de la tangente de la courbe de fusion avec la ligne de base extrapolée (voir Figure 29)

La Figure 28 montre les pics de fusion pour la génoise modèle (Figure 28a) et la génoise de référence (Figure 28b). On remarque que les pics de fusion pour les deux génoises sont largement décalés. Le pic de fusion de la génoise modèle commence à environ $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à atteindre une température de pic à $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ environ, alors que celui de la génoise de référence commence à environ $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ pour une température de pic de fusion d'environ $-10 \text{ }^\circ\text{C}$. Les températures de congélation commençante sont, de ce fait, très différentes : on obtient une température de $-0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ environ pour la génoise modèle contre une température qui avoisine $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pour la génoise de référence. La principale raison de cette différence est la composition des deux génoises qui est très différente aussi bien en teneur en eau (pratiquement 2 fois plus importante pour la génoise modèle - 60%) qu'en sucre (principal responsable de l'abaissement cryoscopique). Les résultats DSC permettent de calculer la fraction d'eau congelable (équation 12) Pour la génoise modèle, la fraction d'eau congelable est d'environ 40% contre seulement 2.15% pour la génoise de référence. Cette grande différence peut être expliquée par la différence en teneur en eau initiale mais surtout par la présence de sucre qui peut se lier à l'eau dans la génoise de référence.

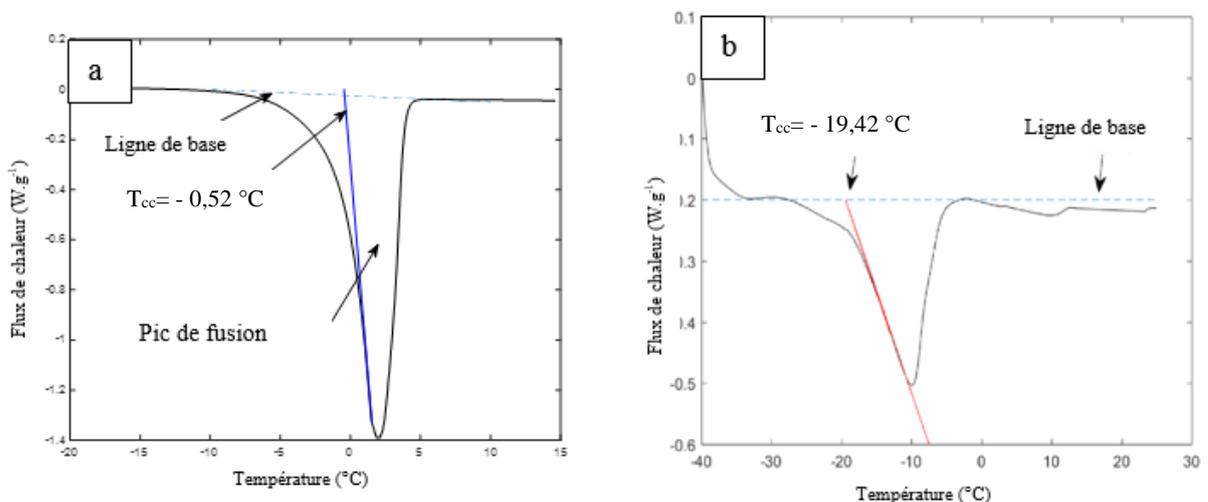


Figure 28: Pics de fusion des génoises obtenus par DSC (a) génoise modèle, (b) génoise de référence.

II.3.2 La mesure de cinétique de congélation

Le suivi de l'évolution de la température dans la génoise pendant la congélation a été effectué dans le but de déterminer la température de congélation commençante. Des génoises entières ainsi que des échantillons de génoise ont été instrumentés avec des thermocouples de type T (TC SA, Dardilly, France - Précision de $\pm 0,01 \text{ }^\circ\text{C}$) préalablement étalonnés avant d'être

placées dans le congélateur. L'enregistrement de la température se fait avec une centrale (Picolog TC-08, Pico Technology, Cambridgeshire, UK) connectée à un ordinateur. La température de congélation commençante (T_{cc}) est généralement considérée comme le point de démarrage du palier de changement de phase. La Figure 29 représente l'évolution de la température de congélation des deux types de génoise étudiées : génoise modèle (Figure 29a) et la génoise de référence (Figure 29b). Pendant la congélation, la température de la génoise diminue progressivement. Théoriquement lorsque la glace commence à se former, on observe un changement de pente sur la courbe de température. Ce changement de pente correspond au démarrage de la congélation. Mais très souvent il se produit le phénomène de surfusion (que nous avons observé la majorité du temps dans le cas de la génoise): la température diminue en dessous de la température de congélation commençante jusqu'à une valeur suffisamment basse pour former le premier cristal. Ensuite la cristallisation se propage dans le milieu, elle libère de la chaleur et on assiste à une remontée de la température (pic de surfusion) jusqu'à la valeur d'équilibre de changement d'état. On peut alors choisir comme température de congélation commençante, la température de résorption de la surfusion. Elle sera moins précise et différente que celle obtenue grâce au pic de fusion en DSC.

La cinétique de congélation d'un produit est fortement dépendante de sa composition et de sa teneur en eau. La comparaison des deux graphes montre que dans le cas de la génoise modèle riche en eau (environ 60% d'eau), le plateau de congélation est bien identifié, et la température de congélation commençante est proche de 0 ($T_{cc} = -1,27 \pm 0,18 \text{ } ^\circ\text{C}$). Concernant la génoise de référence, le plateau de congélation est quasi absent, ce qui rend difficile la détermination de la température de congélation commençante. Cette dernière est beaucoup plus basse ($T_{cc} = -16,62 \pm 1,13 \text{ } ^\circ\text{C}$) que celle de la génoise modèle.

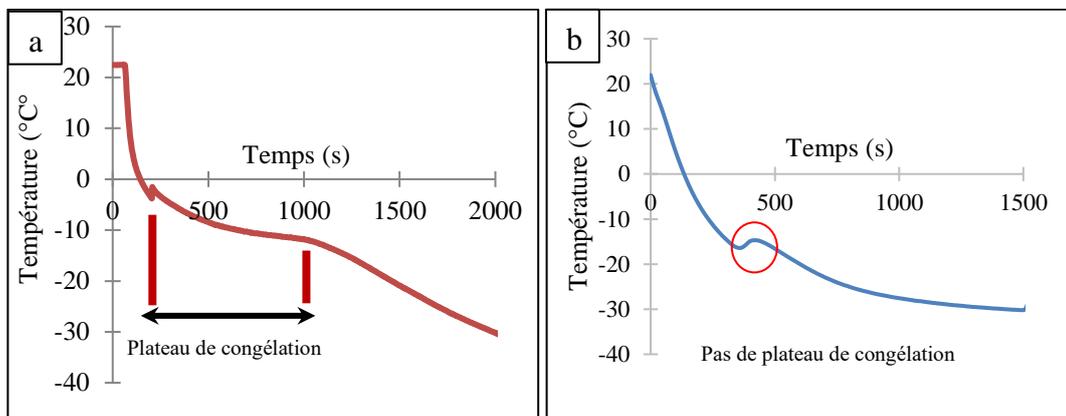


Figure 29 : Cinétique de congélation de la génoise : (a) génoise modèle ; (b) génoise de référence.

III. Congélation et stockage des génoises

III.1 Préparation des échantillons

III.1.1 Génoise modèle

Dans le cas de la génoise modèle, les échantillons sont préparés pour être congelés et stockés avant la mesure par microtomographie RX au synchrotron (voir section suivante). Pour cela,

une cellule froide permettant de maintenir le produit à l'état congelé pendant la mesure a été utilisée (CellStat). Cette cellule (Figure 30) est décrite plus en détail dans la section IV.2.2. Elle comprend notamment un porte-échantillon constitué d'un plot en cuivre, sur lequel est déposé l'échantillon puis recouvert par un capuchon en Polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Des échantillons cubiques de 6 mm de côté ont été découpés dans la mie de la génoise puis placés sur le porte échantillon en PMMA-cuivre de la cellule. Les échantillons ont été découpés dans les mêmes conditions contrôlées décrites précédemment (20°C et 80% HR). Une pastille en polystyrène de 5 mm est placée entre l'échantillon et le support en cuivre afin d'améliorer l'homogénéité de la température entre le haut et le bas de l'échantillon. Une goutte de vaseline a été utilisée pour fixer l'échantillon sur le polystyrène, qui était lui-même fixé au support en cuivre à l'aide d'une pâte de fixation (Pattex, Henkel, Allemagne). La même pâte a été utilisée pour sceller l'échantillon dans son capuchon en PMMA, isolant ainsi l'échantillon de l'environnement extérieur et évitant sa déshydratation (Figure 30).

Pour cette campagne expérimentale, 44 échantillons ont été préparés pour étudier différentes conditions de congélation et de stockage détaillées dans la section II.2.

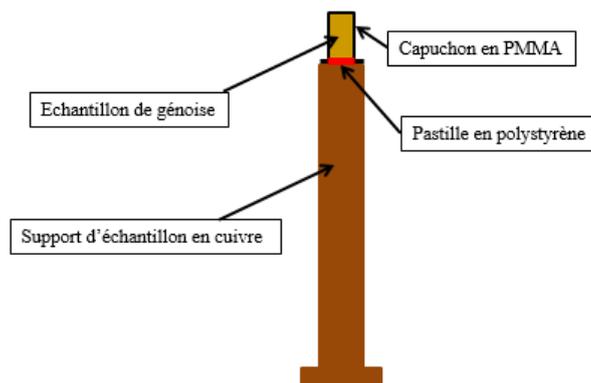


Figure 30: Echantillon de génoise sur le porte-échantillon constitué d'un plot en cuivre et d'un capuchon en PMMA.

III.1.2 Génoise de référence

Dans le cas de cette génoise, des échantillons ont été imagés à l'aide d'un microtomographe RX de laboratoire avec une platine thermostatée (CellDyM, voir section IV.3.). La préparation des échantillons a été effectuée le jour de l'expérience. Un échantillon cylindrique (diamètre : 9,8 mm, hauteur : 10 mm) a été extrait dans la mie de génoise à l'aide d'une carotteuse montée sur une fraiseuse. L'échantillonnage a été effectué dans une chambre froide à 5°C. L'échantillon a ensuite été stocké sur un porte échantillon scellé à une température de 5°C afin d'assurer sa stabilité thermo-hygroscopique avant son installation sur la cellule thermostatée (décrite dans la section IV.3).

III.2 Congélation des échantillons

III.2.1 Génoise modèle

Pour la congélation des échantillons, deux types de congélateurs ont été utilisés : un congélateur statique horizontal (coffre - Electrolux ECM30132W, Stockholm, Suède), de dimensions internes LxlxH: 113x43x62 cm et un congélateur vertical à air ventilé (armoire de surgélation BONNET, Gastro Biostore Turbo Air, Mitry-Mory, France), de dimensions internes LxlxH: 54x73x58 cm.

Dans le cas du congélateur statique horizontal (Figure 5a), la convection est naturelle, les transferts sont lents : ce congélateur est utilisé pour congeler à vitesse lente et stocker les génoises. La température au sein de ces congélateurs est homogène.

Dans le cas de l'armoire de surgélation (Figure 5b), il s'agit d'un congélateur vertical doté d'un ventilateur permettant d'accélérer la baisse de température dans le congélateur et d'homogénéiser la température. La vitesse de refroidissement des produits est importante et permet de congeler les produits plus rapidement.

Pour la congélation des échantillons, deux vitesses de congélation ont été appliquées :

- Congélation rapide ($17,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) à l'aide de l'armoire de surgélation
- Congélation lente ($0,3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) à l'aide du congélateur statique horizontal.

Les deux congélateurs étaient réglés à $-35 \text{ }^\circ\text{C}$. Pour chaque processus de congélation, un thermocouple calibré de type T (TC SA, Dardilly, France - Précision de $\pm 0,01 \text{ }^\circ\text{C}$) préalablement étalonné, a été placé au centre d'un échantillon de référence afin de mesurer l'évolution de la température pendant la congélation. Le thermocouple était relié à un système d'acquisition de données (Picolog TC-08, Pico Technology, Cambridgeshire, UK) connecté à un ordinateur. Deux exemples d'enregistrements obtenus lors de la congélation sont présentés sur la Figure 31. 22 échantillons ont été réalisées pour chaque vitesse de congélation.

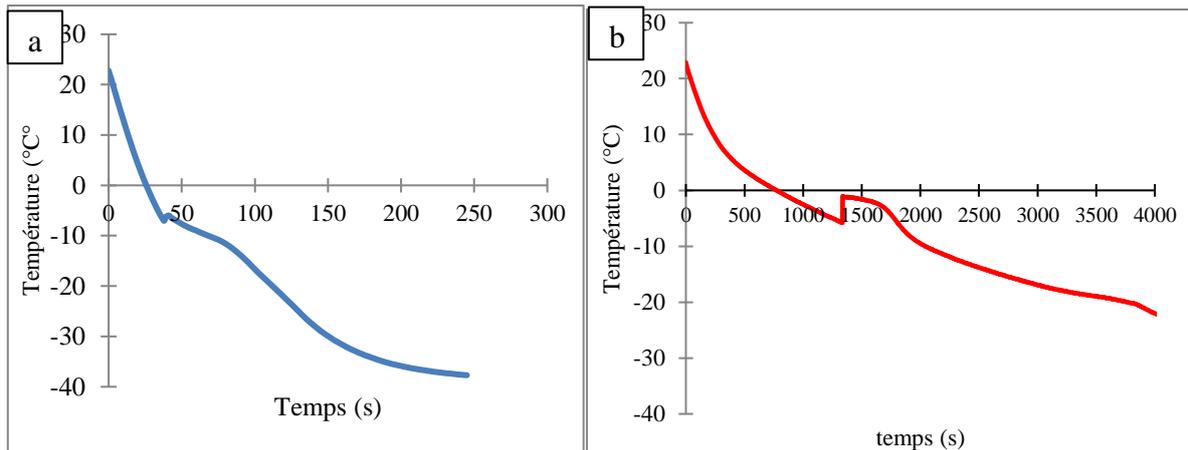


Figure 31 : Cinétique de congélation pour les échantillons de génoise modèle : (a) congélation rapide, (b) congélation lente.

III.2.2 Génoise de référence

Concernant les expériences effectuées sur la génoise de référence, la congélation de l'échantillon a été effectuée directement (*in situ*) dans la cellule CellDyM (Figure 33a) décrite dans la section IV.3. L'échantillon initialement stabilisé à 5 °C a été congelé jusqu'à la température de -30 °C à une vitesse de congélation d'environ -15 °C min⁻¹.

III.3 Stockage des échantillons

Génoise modèle : comme indiqué dans le paragraphe précédent sur la préparation des échantillons, dans le cas des mesures au synchrotron, 44 échantillons ont été préparés. Ces échantillons ont d'abord été congelés selon deux conditions de congélation différentes (congélation rapide et lente). Puis, 2 conditions de stockage ont été étudiées : un stockage avec fluctuations de température (-20 °C/-5 °C) et un stockage à une température stable (-20 °C). Les durées de stockage étudiées sont 0, 7 et 14 jours de stockage (Tableau 8).

- Pour 14 jours de stockage, 16 échantillons ont été préparés dont 8 ayant subi une congélation rapide et 8 autres une congélation lente. Après congélation, 4 échantillons de chaque condition de congélation ont été stockés dans un congélateur coffre (Electrolux ECM30132W, Stockholm, Suède) à -20 °C pour un stockage sans fluctuations de température. Les autres échantillons ont été stockés dans un second congélateur similaire à -20 °C pendant 23h et déplacés dans un troisième congélateur à -5 °C pendant 1h tous les jours, afin de réaliser les fluctuations de température.
- Pour 7 jours de stockage, le même protocole a été appliqué. C'est-à-dire pour les 4 conditions de stockage (congélation lente avec et sans fluctuations et congélation rapide avec et sans fluctuations), 4 répétitions ont été effectués.
- Pour 0 jour de stockage, 4 échantillons pour chaque condition de congélation (congélation rapide et lente) ont été préparés et congelés un jour avant l'expérience.

Tableau 8: Récapitulatif des échantillons de génoise par conditions de congélation et de stockage.

	Congélation rapide		Congélation lente	
	Stockage stable	Stockage fluctuant	Stockage stable	Stockage fluctuant
T14	4	4	4	4
T7	4	4	4	4
T0	4		4	

Génoise de référence : comme indiqué dans la section précédente, la génoise de référence a été directement congelée à -30°C dans la cellule thermostatée CellDyM (Figure 33a). Après congélation, l'échantillon a été soumis à un cyclage thermique, toujours dans la cellule CellDyM. Sept cycles de températures entre -30°C et -20°C ont ainsi été réalisés avec une vitesse de remontée et d'abaissement de température de $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, pendant 6 jours sans interruption (Figure 59 dans le chapitre 5, p163). Ce cyclage thermique simule les fluctuations de température auxquelles les produits peuvent être soumis durant le stockage.

Les niveaux de fluctuation de température ont été choisis sur la base des résultats obtenus par mesure DSC (Figure 28) et cinétiques de congélation (Figure 29). Dans le cas de la génoise modèle, sur la figure 28a, on voit bien que le changement de phase (glace/eau) commence à environ -10°C et se termine à environ 4°C . Une fluctuation de températures entre -20°C et -5°C permet bien d'être dans la zone de changement de phase pour favoriser les phénomènes de recristallisation. Pour la génoise de référence, les fluctuations de température sont comprises entre -30°C et -20°C ce qui correspond à l'intervalle de température dans lequel le changement de phase se produit comme le montre la figure 28b.

IV. Caractérisation de la microstructure des génoises

La microstructure des génoises a été caractérisées selon trois méthodes différentes: (i) par cryo-MEB, (ii) par $\mu\text{CT RX}$ de laboratoire et (iii) par $\mu\text{CT RX}$ à très haute résolution (synchrotron). Les caractérisations par $\mu\text{CT RX}$ ont été réalisées en utilisant des cellules cryogéniques (CellStat et CellDyM) initialement développées pour caractériser la neige. Ces différentes techniques et les traitements d'images associés sont présentés dans les sections suivantes.

IV.1 Cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB)

Les analyses par cryo-MEB ont été réalisées à la plateforme d'imagerie de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS, Paris, France). Des échantillons congelés et non congelés ont été analysés.

Avant observation, les échantillons passent par une étape de préparation qui consiste en un prélèvement suivi d'une cryofracture. Pour le prélèvement, la génoise (congelée ou non congelée) est immergée dans un bain d'azote liquide où elle subit une première fracture grossière pour prélever un petit morceau (environ 1 cm de côté) en son centre. Le morceau

d'intérêt fracturé est ensuite positionné et fixé sur un porte échantillon en forme d'étau. Un outil de transfert (Leica VTC 100®, Wetzlar, Allemagne), composé d'une chambre à -120°C qui vient se fixer sur le bain d'azote liquide est ensuite utilisé pour récupérer l'étau portant l'échantillon. Puis, cet outil est fixé sur une chambre de cryofracture (Leica ACE600®, Wetzlar, Allemagne), sous vide (10^{-6} mbar) et à -120 °C, dans laquelle l'échantillon, toujours sur l'étau, est transféré. Dans cette chambre, munie d'une fenêtre de visualisation, une lame est envoyée sur l'échantillon qui se fracture de manière nette à l'impact de celle-ci. A l'aide du même outil de transfert, l'échantillon fracturé est finalement transféré dans le cryo-MEB (Zeiss GeminiSEM 500®, Oberkochen, Allemagne) où la température est de -120°C et la pression de 1.6×10^{-6} mbar, pour visualisation. Les échantillons ont été observés à deux tensions d'accélération (3 kV ou 0,790 kV) en utilisant deux détecteurs différents : (i) Electrons Secondaires (SE2) pour des grossissements allant de x13 à x100 et (ii) InLens pour des grossissements allant de x100 et x5000, correspondant à une résolution spatiale comprise entre 22,33 nm et 8,59 μ m.

Les échantillons congelés ont d'abord été observés à -120 °C puis après la température de l'enceinte est remontée à -90 °C pendant 15 min ou 1h avant de redescendre à -120 °C. Cette remontée en température engendre la sublimation superficielle des cristaux de glace présents dans l'échantillon. Il est alors de nouveau observé dans des conditions identiques à la première étape. Ceci permet de mieux mettre en évidence les cristaux et leur localisation.

Il n'a pas été nécessaire de métalliser la surface des échantillons au cours de la préparation car le contraste obtenu à l'image était suffisant.

Ce protocole a été utilisé pour visualiser les deux types de génoise (modèle et référence). Dans le cas de la génoise de référence, les échantillons ont été congelés préalablement au laboratoire de l'UR FRISE (INRAE, Antony, France) à une vitesse de 0,35 °C/min dans un petit congélateur statique (CURTISS, CA600, France), de dimensions internes LxlxH: 53x52x59 cm, réglé à -35°C. Les échantillons ont ensuite été transportés dans une boîte isolée en polystyrène expansé remplie de neige carbonique ($T = -80^{\circ}\text{C}$) afin de les figer et d'éviter de les décongeler durant le transport. Pour la génoise de référence, le même congélateur a été transporté à l'IBPS (Paris, France). Les échantillons ont alors été congelés sur place selon les mêmes conditions que la génoise de référence (0,35 °C/min et -35 °C).

La cryo-MEB est une méthode qui permet d'obtenir des images en 2D avec une résolution suffisamment bonne pour être comparé avec les acquisitions en 3D et en température négative qui seront effectuées par μ CT RX.

IV.2 Microtomographie à rayons X Synchrotron

IV.2.1 Ligne ANATOMIX

La ligne ANATOMIX (Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France) est une ligne de lumière utilisée pour faire de la tomographie à rayons X de type synchrotron. Elle fonctionne à une échelle micro et nanométrique, en contraste d'absorption et contraste de phase

(Weitkamp et al. 2017). Les lignes de faisceaux telles qu'ANATOMIX offrent une large gamme de tailles de voxels (de 30 nm à 20 μm) avec une gamme d'énergies comprises entre 5 et 50 keV particulièrement adaptées aux matériaux de faible densité, tels que les aliments (Weitkamp et al. 2017). Il est possible d'installer des équipements spéciaux pour effectuer des études *in situ* pour appliquer des conditions opératoires spécifiques, par exemple visualiser un échantillon congelé à l'aide d'une cellule thermostatée permettant de maintenir une température négative. Le tableau 9 récapitule les caractéristiques de la ligne ANATOMIX.

Tableau 9: Caractéristiques de la ligne ANATOMIX (Weitkamp et al. 2017).

Caractéristiques	
Source des rayons X	Ondulateur
Gamme d'énergie (keV)	5 à 50
Taille de faisceau max (mm^2, h x v)	40 x 10
Taille de voxel min (nm)	30 (TXM) ; 500 (other)
Spectre	filtré 'Blanc'
Mode de faisceau	Mono cristal, multicouche

IV.2.2 Cellule thermostatée CellStat

La ligne ANATOMIX, combinée avec la cellule thermostatée CellStat (Figure 32a) ont été utilisées pour analyser et étudier l'impact des conditions de congélation et de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle.

CellStat (Flin et al. 2011, Calonne et al. 2014) est une cellule froide composée d'un module Peltier, qui maintient une température régulée en bas du porte-échantillon en cuivre comme le montre la figure 32b. Une circulation continue d'air sec et froid entre le porte-échantillon en cuivre et les chambres en PMMA de la cellule homogénéise les températures dans les chambres et empêche la formation de givre (provenant de la condensation de la vapeur d'eau ambiante). En outre, la circulation de l'eau dans l'échangeur de chaleur inférieur permet de dissiper la chaleur générée par le module Peltier. Le système peut pivoter sur 360°, permettant ainsi l'acquisition des scans.

IV.2.3 Acquisition des images 3D

Pour la caractérisation des échantillons de génoise, le module Peltier a été réglé à une température de $-36\text{ }^\circ\text{C}$. Puis les échantillons congelés, déjà montés sur leur support en cuivre et stockés dans un congélateur domestique (réglé à $-30\text{ }^\circ\text{C}$), ont été placés sur la cellule thermostatée (Figure 32a). Après 5 min de thermalisation, le premier scan est lancé. Quatre scans ont été réalisés pour chaque échantillon à différentes hauteurs (avec un léger chevauchement entre les scans). La hauteur totale du volume scanné est d'environ 5 mm avec un diamètre d'environ 1,3 mm. Les acquisitions ont été effectuées avec un faisceau polychromatique filtré ("blanc") avec un pic centré à environ 30 keV, optimisé par rapport à la distance échantillon-détecteur (30 mm) et à la taille du voxel de 0,65 μm . 2000 projections ont été réalisées sur 180° pour une durée totale d'acquisition d'environ 5 min.

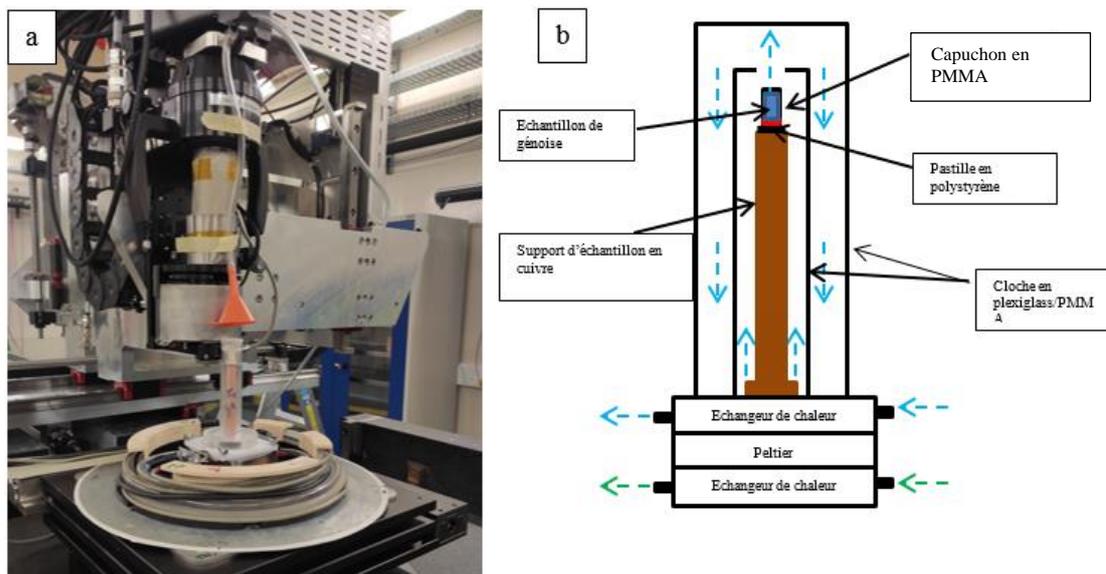


Figure 32 : (a) Schéma la cellule thermostatée CellStat installée sur la ligne ANATOMX et(b) de la cellule thermostatée CellStat

IV.3 Microtomographie à rayons X de laboratoire

Le microtomographe à rayons X de laboratoire (2007 version of the current "EasyTom XL Micro", RX Solution, Chavanod, France) utilisé est situé au laboratoire de l'UMR 3SR (Université Grenoble Alpes, Grenoble INP, CNRS, Grenoble, France). C'est un appareil qui permet de visualiser la microstructure 3D d'un échantillon quelconque. Cet appareil est constitué d'une grande cabine de radioprotection, d'une platine de rotation creuse à large ouverture (Figure 33b). Le système est équipé d'un tube à rayons X de 150 kV avec une taille de foyer permettant d'atteindre des résolutions de 5 μm .

Cet appareil a été utilisé pour étudier, *in situ*, la congélation et l'effet d'un cyclage thermique sur la génoise de référence à l'aide d'une cellule thermostatée (CellDyM) (Calonne et al. 2014).

IV.3.1 Cellule thermostatée CellDyM

La cellule thermostatée CellDyM (Figure 33a) présente les caractéristiques suivantes :

- **Un système de production et de régulation du froid :** Ce système est constitué principalement de deux modules Peltier strictement identiques qui imposent les températures voulues aux bornes de l'échantillon par conduction à travers des barreaux de cuivre (système de conduction) et les échangeurs de chaleurs associés. Les températures des échangeurs de chaleur sont mesurées à l'aide de sondes de température et régulées par des modules Peltier. Ceux-ci sont continuellement refroidis grâce à une circulation d'eau à travers d'autres échangeurs de chaleur afin d'évacuer la

chaleur générée par les Peltier. Chacun des blocs Peltier est alimenté en permanence par une faible surpression d'air sec pour éviter la condensation de la vapeur d'eau.

- **Un système de conduction** : Il est constitué d'un cylindre en aluminium inséré entre deux barreaux de cuivre. Ces derniers sont reliés à la partie froide des échangeurs de chaleur. Le porte échantillon en aluminium peut contenir un échantillon de génoise de 1 cm de diamètre et de 1 cm de hauteur et conduit le froid le long des côtés latéraux de l'échantillon. Cette conduction latérale assure un gradient de température homogène au sein de l'échantillon. Le porte-échantillon relie mécaniquement les deux cylindres de cuivre et est en contact avec les côtés latéraux de l'échantillon. Cette pièce maîtresse est réalisée en PMMA, dont l'avantage est de présenter une faible absorption linéaire aux rayons X et de maximiser ainsi le contraste des images des échantillons à faible absorption. Cependant, il présente l'inconvénient de ne pas empêcher les échanges thermiques par radiation avec l'extérieur et de ne pas être un bon conducteur thermique. Alternativement, il peut être fabriqué en aluminium, ce qui permet une assez bonne conductivité thermique avec les cylindres de cuivre supérieur et inférieur et empêche les transferts radiatifs. Dans ce cas, l'atténuation linéaire plus élevée des rayons X affecte le contraste dans les échantillons de faible absorption. Après quelques essais préliminaires, le porte-échantillon en aluminium a été utilisé pour le présent travail car la distribution de la glace dans l'échantillon était plus homogène que l'expérience réalisée avec le porte-échantillon en PMMA.
- **Un système de vide qui isole l'échantillon de l'extérieur** : ce système permet d'isoler thermiquement l'échantillon étudié et d'éviter la formation de givre pendant l'expérience. Il s'agit d'un cylindre en plexiglass de 4,4 cm qui entoure le porte échantillon. L'étanchéité de la chambre à vide est assurée par des joints toriques, qui relient les extrémités en plexiglas aux échangeurs de chaleur, et par des joints toriques entre le porte-échantillon en aluminium et les colonnes en cuivre, qui isolent l'échantillon de génoise. Le vide est assuré par 2 pompes en série : 1 turbo moléculaire (qui tourne avec l'échantillon et le reste de la cellule) et une pompe à membrane installée à l'extérieur de la cabine du tomographe pour éviter le réchauffement de l'air, et reliée à la pompe turbo moléculaire par un tube à vide flexible.

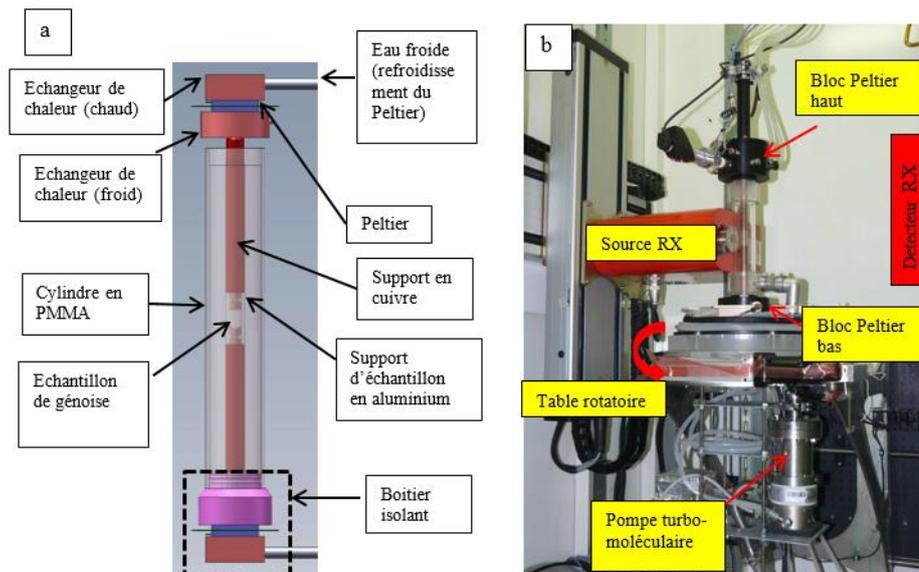


Figure 33 : (a) Schéma de la cellule thermostatée CellDyM ; (b) La cellule CellDyM installée dans le microtomographe du laboratoire 3SR (RX Solutions, Chavanod, France)

IV.3.2 Acquisition *in situ* des images 3D

Lors de l'acquisition des images, une tension du tube à rayons X de 65 kV et une intensité de courant de 115 A ont été utilisées. Une taille de voxel de 7,5 micron a été fixée en fonction des dimensions de la cellule cryogénique (figure 34a). La durée totale d'acquisition des images était de 2 heures 10 minutes. Ces paramètres ont été choisis comme le meilleur compromis entre la qualité de l'image (contraste air/glace/gâteau) et la durée de l'acquisition qui empêche une éventuelle évolution de l'échantillon pendant l'acquisition. Un total de 37 scans (2 avant congélation) a été effectué sur les 6 jours du cyclage thermique pour suivre l'évolution de la microstructure. Les scans n'ont pas été réalisés à intervalle de temps régulier pour des questions pratiques. Le suivi de l'évolution des cristaux de glace a été fait sur un même échantillon.

Le logiciel X-Act 2 (RX Solutions) a été utilisé pour reconstruire le volume 3D en utilisant l'algorithme classique de rétroprojection filtrée.

IV.4 Principaux traitements d'images mis en œuvre

Les méthodes de traitement d'image mises en œuvre pour exploiter les images obtenues par μ CT RX sont récapitulées dans les paragraphes suivants. Pour chaque génoise une méthode adaptée a été mise en œuvre :

IV.4.1 Images obtenues par μ CT RX synchrotron

▪ Reconstruction du volume

Les acquisitions μ CT RX permettent d'avoir des coupes 2D (radiographies) sur toute la hauteur de l'échantillon scanné. Les radiographies obtenues ont été reconstruites à l'aide du

logiciel PyHST2 (Mirone et al. 2014) et le filtre Paganin (Paganin et al. 2002) qui utilise les franges d'interférence pour augmenter le contraste entre les phases dans un échantillon (Paganin et al. 2002). La reconstruction permet d'obtenir un volume 3D de l'échantillon de génoise modèle à analyser. Le volume d'analyse résultant était de : $2048 \times 2048 \times 2048$ vx (correspondant à 1,3 mm de côté).

▪ Segmentation des images μ CT à l'aide du logiciel Fiji

Les trois constituants de la génoise congelée sont l'air, la glace et l'amidon (Figure 34). Le bon contraste obtenu entre ces trois phases facilite leur séparation par seuillage des niveaux de gris. Dans notre cas, pour mieux cerner l'effet des conditions de congélation et de stockage, quatre phases ont été segmentées à chaque fois : l'air, la glace à la périphérie des pores, la glace dans la matrice, et l'amidon. Dans la suite, le terme matrice sera utilisé pour indiquer la glace (hors glace dans les pores) + l'amidon.

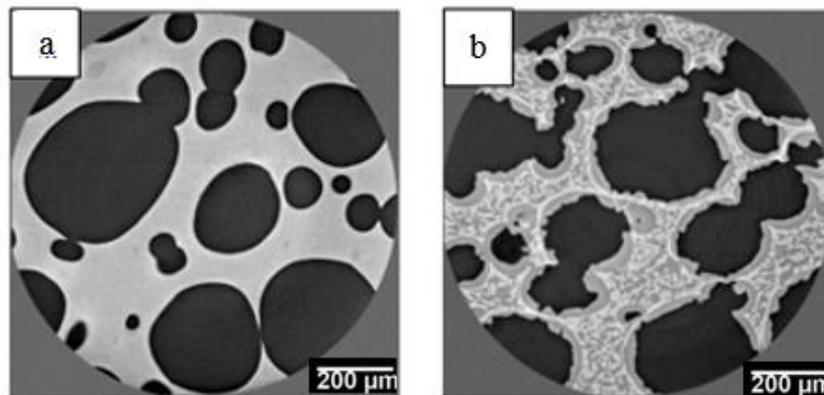


Figure 34 : Coupe μ CT RX de : (a) échantillon de génoise modèle avant congélation et (b) échantillon de génoise modèle congelée (les pores en noir, la glace en gris et l'amidon en blanc)

Dans un premier temps, les phases air, glace et amidon sont séparées par seuillage du niveau des gris. Puis une opération de fermeture 3D sur la phase matrice a été effectuée. Cette phase intermédiaire est constituée de la glace dans la matrice et de l'amidon. Enfin la phase de glace a été segmentée en deux phases différentes en fonction de la localisation des cristaux de glace en utilisant les opérations logiques (not/and) : (i) la glace à l'intérieur de la matrice, qui est principalement en contact avec l'amidon, et (ii) la glace à l'extérieur de la matrice, qui est principalement en contact avec l'air et située à la surface des macropores de la génoise (Figure 40 dans le chapitre 3, p108).

▪ Calcul des propriétés microstructurales

La microstructure de la génoise a été caractérisée par plusieurs paramètres tels que : les fractions volumiques de chaque phase, la surface spécifique (SSA) des interfaces, les épaisseurs locales de la glace et les rayons de courbures moyens de la glace à l'interface avec l'air :

- **Fractions volumiques** : Après la segmentation des différentes phases, le volume de chaque phase est calculé à l'aide d'un simple comptage de voxels. Ces valeurs de volumes ont été utilisées pour calculer les fractions volumiques.

La porosité : la fraction d'air par rapport au volume total

$$\varphi_{Air} = \frac{V_{air}}{V_{total}} \quad (13)$$

La fraction de glace dans la matrice (sans air)

$$\varphi_{glace \text{ dans la matrice}} = \frac{V_{glace}}{V_{glace} + V_{amidon}} \quad (14)$$

La fraction de glace à la périphérie des pores:

$$\varphi_{glace \text{ à la périphérie des pores}} = \frac{V_{glace \text{ à la périphérie des pores}}}{V_{glace}} \quad (15)$$

- **La surface spécifique (SSA)** : elle est définie par le ratio entre la surface totale d'une interface entre deux phases sur le volume total de l'échantillon. Elle a été calculée à l'aide de MorpholibJ (Legland and Arganda-Carreras 2016) d'une part, pour les interfaces glace et air, et d'autre part, pour les interfaces glace et amidon.
- **Les épaisseurs locales** : Les épaisseurs locales de la glace à l'intérieur et à l'extérieur de la matrice ont été calculées. L'épaisseur locale représente le diamètre de la plus grande sphère à un point donné qui peut tenir à l'intérieur de l'objet et contenant le point donné (Dougherty and Kunzelmann 2007). Ce paramètre est calculé par l'algorithme de transformation de la distance euclidienne de Saito-Toriwaki. Cet algorithme a été implémenté en tant que plugin pour Fiji.
- **Les courbures moyennes** : chaque point d'une surface 3D est caractérisé par deux courbures principales f_{min} et f_{max} , qui correspondent respectivement à la valeur maximale et minimale de la courbure en ce point. Les courbures moyennes C (exprimées en m^{-1}) sont obtenues selon l'équation (16) :

$$C = \frac{f_{min} + f_{max}}{2} \quad (16)$$

Une courbure négative, nulle et positive correspond à des formes concaves, plates et convexes, respectivement.

IV.4.2 Images obtenues par μ CT RX de laboratoire

- **Segmentation des images μ CT**

Cette partie est décrite en détails dans le chapitre 4 (p164)

Le traitement des images 3D a nécessité plusieurs opérations. Tout d'abord, les mouvements de corps rigide ont été éliminés. L'axe de l'échantillon cylindrique analysé a été placé verticalement (les deux rotations impliquées étaient inférieures à $0,5^\circ$) au centre de l'image, la troisième rotation (rotation dans le plan) n'a pas été modifiée puisqu'elle est restée constante pendant l'expérience. De plus, la tranche horizontale située en bas de l'image 3D a été utilisée comme référence pour corriger le déplacement vertical. Cette opération comprenait également le lissage classique nécessaire à la segmentation des images 3D.

Les deux phases principales, à savoir la matrice (génoise) et l'air, étaient clairement identifiables et leurs intensités de niveau de gris étaient assez bien séparées comme le montre la Figure 35. La segmentation de l'air, de la matrice et de la glace n'était pas triviale et seul l'air a été segmenté par un seuillage en niveaux de gris.

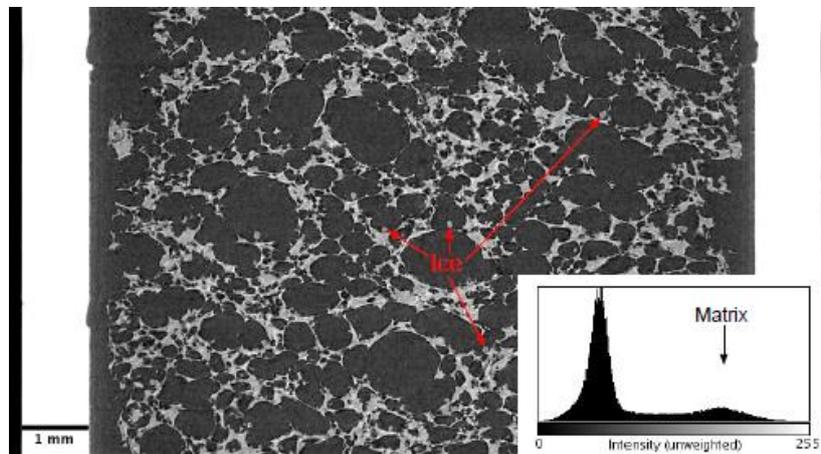


Figure 35: Coupe verticale en niveaux de gris d'un échantillon de génoise congelé.

Par la suite, la corrélation volumétrique digitale (DVC) a été mise en œuvre pour détecter les cristaux de glace dans les images 3D. Selon Buljac et al. (2018), le principe de la DVC est le suivant : pour deux images 3D à corréler, désignées par $f(x)$ (supposée être l'image de référence) et $g(x)$ (l'image déformée), où f et g sont les niveaux de gris à chaque emplacement de voxel x , la DVC repose sur l'hypothèse de base selon laquelle un simple changement de position des voxels, désigné par un déplacement $u(x)$, peut amener les deux images à une coïncidence parfaite telle que

$$g(x + u(x)) = f(x) \quad (17)$$

Dans ce travail, le logiciel YaDICs avec une méthode DVC régularisée par éléments finis a été utilisé pour corréler les images 3D acquises pendant l'expérience (Seghir et al. 2014). Les images 3D ont d'abord été binées, ce qui a conduit à une taille de voxel de $15 \mu\text{m}$. Cela réduit considérablement le coût de calcul de la DVC tout en maintenant une résolution acceptable. Pour la corrélation des images, un scan a été choisi comme scan de référence. Nous avons utilisé pour cela le second scan à l'état congelé car (i) la déformation de l'échantillon, due à la

congélation, est trop importante pour que la corrélation soit "bonne" et (ii) le premier scan à l'état congelé est de mauvaise qualité car l'échantillon a bougé pendant l'acquisition entraînant une image "floue".

Ainsi, outre les trois composantes du vecteur déplacement $u(x)$, le logiciel fournit la carte résiduelle de la corrélation $r = g - f$. Sur cette carte résiduelle, un niveau de gris $r(x) = 0$ indique que la corrélation est parfaite, un niveau de gris $r(x) > 0$ représente des objets qui ont disparu comme par exemple des voxels clairs qui deviennent plus sombres comme lorsqu'un matériau se fissure. Enfin, un niveau de gris $r(x) < 0$ représente une partie de l'image qui est apparue, c'est-à-dire des voxels sombres qui sont devenus plus clairs, ou dans le cas présent, lorsque des cristaux de glace apparaissent dans les pores de la matrice. Les cartes résiduelles obtenues présentent une bonne corrélation moyenne entre les images et les cristaux de glace sont clairement visibles sur les cartes résiduelles 3D (en noir dans la Figure 36). Ensuite, les images de résidus 3D ont été utilisées pour segmenter la phase de glace par un seuil de niveau de gris global. Le niveau de seuil a été fixé de telle sorte qu'aucun voxel appartenant à l'erreur de corrélation ne soit pris dans la phase de glace.

Pour cette segmentation, il n'a pas été nécessaire de faire une distinction entre la glace à l'intérieur de la matrice et celle dans les pores.

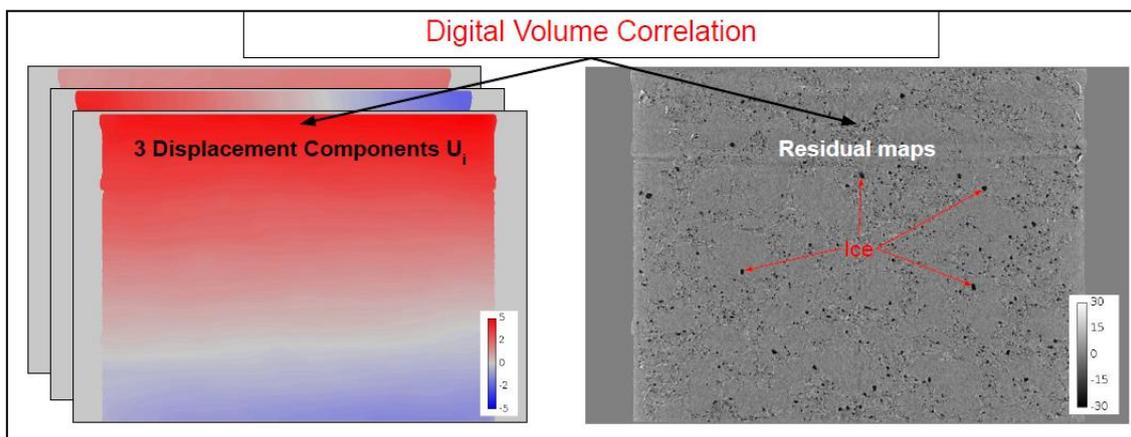


Figure 36: (a) les 3 cartes des composantes du vecteur déplacement, (b) carte des résidus après application de la méthode DVC.

▪ Calcul des propriétés microstructurales

Pour la génoïse de référence seulement les fractions volumiques (φ_{Air} , φ_{glace} dans la matrice et φ_{glace} à la périphérie des pores) et les SSA ($SSA_{air/glace}$ et $SSA_{glace/amidon}$) (décrites précédemment) ont été calculés.

V. Conclusion

Dans ce chapitre toutes les étapes de formulation et de préparation des échantillons ont été décrites ainsi que les outils et méthodes mis en œuvre pour caractériser leurs propriétés

thermophysiques (densités et teneur en eau), leurs températures de congélation commençante (DSC et cinétique de congélation) et leurs propriétés microscopiques (CryoMEB et μ CT). Les méthodes ont été utilisées pour étudier l'impact du procédé de congélation et du stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle et de la génoise de référence. Ces résultats sont présentés dans les trois chapitres suivants. Ces chapitres sont présentés sous forme d'article, par conséquent on y retrouve en partie une description des outils et méthodes présentés dans ce chapitre 2.

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

Synthèse

Article publié dans FOODS “3D Characterization of Sponge Cake as Affected by Freezing Conditions Using Synchrotron X-ray Microtomography at Negative Temperature”

I. Objectif de l'étude

Comme il a été mentionné dans le chapitre 1 (synthèse bibliographique), la congélation des produits alimentaires a largement été étudiée dans la littérature. Il s'agit principalement des produits carnés et des produits végétaux. Cependant, une étude bibliographique approfondie a montré que la congélation des produits alimentaires poreux de type boulangerie a été peu étudiée et que les études déjà réalisées se sont intéressées à la congélation de la pâte à pain et du pain. En outre, ces études n'ont pas étudié l'effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace dans le produit. Or, il est connu que la vitesse de congélation a une influence sur le phénomène de cristallisation et *in fine* sur la qualité finale des produits. Le travail présenté dans ce chapitre a donc pour principal objectif d'étudier l'impact de la vitesse de congélation sur l'évolution de la microstructure d'une génoise modèle.

II. Matériels et méthodes

Dans le cadre de ce travail, la congélation d'une génoise modèle, i.e. non réactive, a été étudiée. Le protocole de fabrication de cette génoise modèle a été validé par une série de mesures des propriétés thermo-physiques telles que : la densité de la pâte ; les densités apparente et réelle de la génoise cuite, la teneur en eau et la porosité moyenne. Des mesures par DSC ont aussi été réalisées afin de déterminer la température de congélation commençante et la fraction d'eau congelable dans la génoise cuite.

Des échantillons de génoise ont ensuite été congelés à deux vitesses de congélation différentes : (i) une congélation rapide à $17\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ effectuée dans une armoire de surgélation (ii) une congélation lente à $0.3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ effectuée dans un congélateur coffre. La microstructure de ces échantillons de génoise a ensuite été analysée à l'état congelé d'une part par cryo-MEB et d'autre part par microtomographie (μCT) à rayons X à très haute résolution (0.65 micron/pixel) en utilisant la cellule cryogénique CellStat montée sur la ligne ANATOMIX du synchrotron SOLEIL.

Les images 3D obtenues ont été seuillées afin de séparer les différentes phases contenues dans la génoise à savoir l'air, la glace, la matrice (amidon). Concernant la phase glace, il est apparu pertinent de la séparer en deux : la glace présente sur la périphérie des macropores (ice outside) et la glace au sein de la matrice (ice inside). Après seuillage, différents paramètres microstructuraux ont été évalués à partir des images 3D comme les fractions volumiques des différentes phases, les surfaces spécifiques, les épaisseurs locales de la glace et les courbures moyennes.

III. Résultats

La génoise modèle présente une microstructure alvéolaire (type mousse) similaire à une génoise réelle avec une porosité moyenne de l'ordre de 56% et une teneur en eau de l'ordre de 60%. Les mesures par DSC ont montré que le point de congélation est de -0.52 ± 0.09 °C et que la fraction volumique d'eau congelable dans la génoise cuite est de $44 \pm 5.3\%$.

Les observations au cryo-MEB ont permis de visualiser une distribution de taille de pores très variable. En effet, les images cryoMEB ont révélé la présence de nanopores dans la matrice qui forme les macropores. Ces deux réseaux poreux sont a priori connectés. Ces images ont permis aussi d'observer la présence de cristaux de glace à la fois dans la matrice mais aussi à la périphérie des macropores. Bien que les images 2D obtenues au cryoMEB ne permettent pas de faire de la quantification, les résultats qualitatifs obtenus sont importants et nécessaires pour comprendre et décrire la microstructure de la génoise étudiée.

L'analyse quantitative des images obtenues par μ CT à rayons X (Ligne ANATOMIX) a mis en évidence l'impact de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace dans les échantillons de génoise congelés. La congélation rapide favorise la formation de cristaux de glace de petite taille à l'intérieur de la matrice, distribués de façon homogène. Elle favorise de plus la formation d'une couche de glace mince à l'interface air-matrice dans les macropores. La congélation lente favorise quant à elle la formation d'épaisse couches de glace dans les macropores et la glace est répartie de manière hétérogène, à la fois en localisation et en taille, à l'intérieur de la matrice d'amidon. D'un point de vue quantitatif, les images 3D ont montré que pour la congélation rapide, 69 % de la glace formée lors de la congélation se forme à l'intérieur de la matrice alors que pour la congélation lente, près de 60 % de la glace présente dans l'échantillon se forme à l'interface air-matrice.

Ces différences dans la formation des cristaux de glace et leur localisation peuvent s'expliquer d'un point de vue mécanistique par les phénomènes de nucléation et de croissance ayant lieu au sein d'un matériau poreux. En effet ces phénomènes dépendent à la fois de la résistance thermique mais aussi de la diffusion de l'eau congelable au sein du produit. Dans le cas de produit très poreux, comme c'est le cas pour cette génoise modèle, la mobilité et la distribution de l'eau congelable doivent être considérées au sein de la matrice mais aussi au sein des pores. Quand la congélation est rapide, le produit est refroidi rapidement, un gradient important de pression de vapeur saturante apparaît et le sous-refroidissement local important conduit à la formation de nombreux nucléi avec une faible taille critique. De plus, cette vitesse rapide combinée avec une température basse ralentit la diffusion de l'eau ce qui tend à limiter la croissance des nucléi et conduit à de petits cristaux. La microstructure de la génoise n'évolue donc pas considérablement.

Inversement, dans le cas de la congélation lente, le refroidissement du produit se fait lentement et le gradient de température est faible. Le mécanisme de nucléation est alors limité car la taille critique pour l'obtention de nucléi stable est importante. Il se forme donc

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

initialement peu de cristaux, mais ceux-ci ont le temps de croître grâce à la diffusion de l'eau et son incorporation au sein des cristaux existants. Si l'on considère la diffusivité thermique de l'air dans les pores, elle est plus élevée (de plus de 1000 fois) que celle de la matrice de la génoise : le refroidissement de la matrice de la génoise est alors plus lent que celui de l'air des pores, la diffusion de l'eau depuis la génoise vers les pores est ainsi favorisée. Celle-ci est suivie par l'évaporation de cette eau à la paroi des pores puis de sa condensation solide quand la température de congélation commençante est atteinte : la croissance est favorisée au détriment de la nucléation dans ce cas, conduisant à une couche de glace épaisse à l'interface air-matrice.

IV. Conclusion

La technique mise au point a permis de pouvoir caractériser de façon fiable et répétable la microstructure d'un aliment poreux à l'état congelé, et ceci à une résolution suffisamment haute (0,65 μm) pour pouvoir quantifier les objets d'intérêt à cette échelle. La présence de la glace, son épaisseur et sa localisation par rapport aux pores et à la matrice de la génoise ont permis de mettre en évidence les transferts de chaleur et de matière qui se produisent dans de tels aliments selon la vitesse de congélation. La maîtrise de la vitesse de congélation est donc un paramètre clé pour préserver la qualité des aliments congelés. La méthode et la technique proposées pourraient être généralisées à l'étude de la congélation d'autres aliments poreux et peuvent être étendues à l'étude de l'impact des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure. En effet, les aliments congelés subissent de nombreux changements pendant le stockage congelé en raison de la durée de stockage et des fluctuations de température.

Il convient de signaler, qu'à notre connaissance, ce type de résultats n'a jamais été publié dans la littérature pour la congélation de produits poreux de boulangerie.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a été publié dans le journal **FOODS : "3D Characterization of Sponge Cake as Affected by Freezing Conditions Using Synchrotron X-ray Microtomography at Negative Temperature"**

I. Introduction

Sponge cake is one of the most consumed cakes in France. This cake is used as a base for the preparation and the assembly of a large variety of entremets/desserts. The shelf life of this cake becomes a necessity for the bakery industry to face the increasing demand on the retail market. According to a survey on the freezing of pastry products carried out among pastry craftsmen in 2016, sponge cake is the most widely used frozen cake in France. The preparation of sponge cake is divided into two steps: baking and freezing, then thawing and decorating. However, the quality of the sponge cake after thawing can be damaged. Frozen products are likely to undergo physico-chemical changes that could alter their quality. These changes are caused by the evolution of the microstructure (pores and ice crystals size and morphology) during the freezing process due to the formation and growth of ice crystals (crystallization). These modifications influence to a large extent the physical, textural and organoleptic properties of the food resulting in quality deterioration (Le Bail et al. 2005, Lucas et al. 2005).

During food freezing, heat and mass transfer occurs between the cold surface and the core, due to temperature and water vapor pressure gradients. It is well known that the freezing rate substantially influences the formation of the microstructure and the subsequent product quality. Thus, fast freezing favors numerous and small ice crystals that lead to low quality changes while slow freezing leads to bigger and fewer crystals that are likely to result in greater deterioration of the quality of frozen products (Mulot et al. 2019). Beyond food products, freezing rate is also related to quality attributes of freeze-dried pharmaceutical products, particularly to protein denaturation (Kasper and Friess 2011, Arsiccio and Pisano 2020). Freezing rate was also found to be critical in the case of cryopreservation of live tissues (Whaley et al. 2021). Indeed, freezing may damage lipids and proteins and impair cell function and structure.

In the case of porous foods, microstructure includes the presence of pores whose size, number, connectivity and surface play an important role on the heat and water transfer and thus on ice crystallization phenomena. Indeed, vapor diffusion is also present in the pores. The supersaturated vapor is condensed into ice when the freezing point is reached leading to the evapo-condensation phenomena. Understanding these physical phenomena at this scale is not obvious. The few existing works have mainly focused on the effect of freezing rate on quality attributes such as rheology, textural specific volume, baking, staling properties (Silvas-García et al. 2014, Akbarian et al. 2016) or thermophysical properties (Hamdami et al. 2004, Hamdami et al. 2004, Hamdami et al. 2004). These works tried to relate these properties to the microstructure developed during the freezing process without characterizing this microstructure and the mechanisms involved at the ice crystal and pore scale. In addition, these works are dedicated to bread dough or part-baked bread, and no studies about cake or sponge cake were found in the literature.

In the specific case of sponge cake, the freezing is performed after baking. The classical

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

recipe for a sponge cake consists of 25% wheat flour, 25% sugar, 45% eggs and 5% water (Bousquières 2017). During baking, several transformations and chemical reactions occur, including the Maillard reaction, caramelization of sugar, starch gelatinization, evaporation, crumb formation and coagulation of egg white. The water content is nearly 40% before baking and about 30% after baking. A major part of this water is contained in the starch gel and is chemically bounded to the sugar. The amount of free water available for freezing is small. Studying the formation of ice crystals and pores in such a complex structure is not easy. A non-reactive model sponge cake has been developed by Bousquières et al. (Bousquières et al. 2017) where reactive ingredients (flour proteins, sucrose and eggs) were replaced by cellulose derivatives. Several ratios of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and methylcellulose (MC) were added to native corn starch and water so as to obtain similar apparent viscosity and density of the batter before baking and homogeneity of the crumb cellular structure after baking. Water content of the model sponge cake is higher (70% versus 40% for the real sponge cake); however, the freezing of such a model sponge cake has yet to be studied.

Another limitation for the study of the frozen microstructure is the use of reliable tools. Understanding the microstructure of frozen sponge cake requires a high-resolution technology that allows the visualization of micropores and small ice crystals at negative temperature. Various techniques were used to study crystallization and microstructure evolution during freezing process like microscopy and calorimetry (Ban et al. 2016, Masselot et al. 2021). Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) is an imaging method with high resolution that has been used to study frozen food, such as meat (Ngapo et al. 1999, Mulot et al. 2019). This technique requires an important preparation of the samples and therefore may induce structural modifications. Furthermore, cryo-SEM is a 2D technique that provides incomplete information about the 3D microstructure of the studied sample. Differential scanning calorimetry was used to characterize the thermophysical properties (freezing point, thermal conductivity) of frozen porous food products. However, this method does not provide information about the evolution of the microstructure.

X-ray micro-computed tomography (X-ray μ -CT) has been proven to be a reliable method to characterize the 3D microstructure of frozen products (Marcellini et al. 2016, Mulot et al. 2018, Vicent et al. 2019, Masselot et al. 2021). This non-invasive technology makes it possible to follow the dynamics of ice crystal formation and evolution during and after freezing. X-ray μ -CT has been used to study the crystallization of freeze-dried food samples at ambient temperature (Mousavi et al. 2005, Kobayashi et al. 2014, Ullah et al. 2014, Zhao and Takhar 2017). However, the study of the microstructure evolution of frozen food is possible in a reliable way only if the sample was preserved from any modification (Kobayashi et al. 2014). Several techniques were developed to this end in order to directly analyze frozen food at a negative temperature. Calonne et al. (2014) used a thermostated cell (CellStat) mounted on the rotating stage of an X-ray microtomograph to investigate the microstructure of snow samples. Ice cream 3D visualization was performed using X-ray microtomography coupled with a two-stage solid-state Peltier cooling system in order to study crystallization in

ice cream at negative temperature (van Dalen et al. 2009). More recently, Vicent et al. (2017) developed a new method based on the attenuation coefficient of each constituent of the product and characterized the ice crystals and the 3D microstructure of frozen apple using a cooling stage. Recently, this technique was successfully applied (Mulot et al. 2019, Masselot et al. 2021) to analyze meat (Mulot et al. 2019) and sorbets (Masselot et al. 2021) directly after freezing. These authors used a thermostated box to keep the sample at frozen state during imaging but maintaining the frozen state of the sample during acquisition was limited by time (20 min. maximum). The voxel size was also limited and almost reached 9 μm .

Imaging complex materials with several phases at a high resolution and sufficient contrast may require the use of a synchrotron beamline for microtomography (Guo et al. 2017). In the case of conventional laboratory tomographs that use conical X-ray beams, sponge cake samples must be small enough to be close to the X-ray source but large enough so that they do not crumb. To overcome these space constraints, synchrotron X-ray tomography may be employed. Beamlines such as ANATOMIX (Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France) offer a wide range of voxel size (from 20 nm to 20 μm), photon energies between 5 and 50 keV that are particularly adaptable for low density materials, such as foods, and a versatile environment to install the experiment' peripherals (Weitkamp et al. 2017).

The purpose of this paper is to study the effect of the freezing rate on the microstructure of a model sponge cake using cryo-SEM and X-ray μCT at high spatial resolution. The samples were scanned at frozen state using the thermostated cell CellStat (Calonne et al. 2014) combined with the ANATOMIX synchrotron beamline. Cryo-SEM and $\mu\text{-CT}$ image visualization allowed for a qualitative analysis of the ice formation and location in the porous structure. An image analysis method based on grey level was used to segment the three phases of the frozen samples: air, ice and cake matrix. Volume fractions of each phase, ice local thickness and shape characterization were determined and discussed according to the freezing rates.

II. Materials and Methods

II.1 Samples

II.1.1 Sponge cake Preparation and Sampling

The model sponge cake was prepared using the following formulation, which contains water, starch and stabilizers (Bousquières et al. 2017):

- Native corn starch (Cargill, Minneapolis, MN, USA), stored in glass bottles at 5 °C;
- Methylcellulose (MC) (Dow Chemical, Midland, MI, USA), type SGA7C, stored in a plastic box at room temperature;
- Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (Dow Chemical, Midland, MI, USA), type K250M, stored in a plastic box at room temperature;
- Ultrapure water.

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

The quantities of each ingredient used for the preparation of the sponge cake are summarized in Table 10. The densities are shown for water and native corn starch (Yousif et al. 2012). By neglecting the effect of stabilizers on the batter density, the theoretical batter density was calculated from water and starch data (Table 10) and was found to be equal to 899 (kg/m³).

Table 10: Model sponge cake formulation and ingredient densities.

Ingredients	Quantity (% w/w)	Density (kg/m ³)
K250M (HPMC)	0.35	/
SGA7C (MC)	0.46	/
Water	62.64	1000
Starch	36.55	766

Model sponge cakes are prepared in two steps: (i) preparation of the cellulose derivatives solution and (ii) preparation and baking of the dough.

Both stabilizers were first mixed and then ultrapure water previously heated to 80 °C was added; the hot water allows a better dispersion of the stabilizers. The solution was then left under strong agitation for 90 min at room temperature. Finally, the solution was placed in a refrigerator at 5 °C for 12 h, under strong agitation in order to allow a complete hydration of the stabilizers to take place.

For the preparation of the dough, the cellulose derivatives solution and the starch were first brought to room temperature. Then the cellulose derivatives solution was whipped for 10 min at speed 10 using a robot (kitchenAid, model 5KSM150, Benton Harbor, MI, USA). The speed was reduced to 2 and the sifted starch was added gradually to the foam for 1 min 15 s to avoid clump formation. After, the mixture was whipped for 2 min to obtain the dough.

For each experiment, 60 g of dough was poured into aluminium molds (10 × 6 × 3 cm³) and baked in an electric oven (Whirlpool, Benton, IL, USA) for 30 min at 170 °C. For each preparation, a 100 mL of batter was used to measure batter sponge cake density.

After baking, the sponge cakes were left at room temperature for 45 min (ambient relative humidity RH = 50–60%). They were then individually wrapped in waterproof plastic bags and sealed before being stored in a refrigerator at 5 °C.

II.1.2. Sampling and Freezing

For the experiment, cubic samples (of 6 mm side) (Figure 37C) were cut in the crumb and placed in PMMA-copper sample holders (Figure 37B). The sample and the copper holder were separated by a polystyrene pellet of 5 mm, to improve the homogeneity of the

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

temperature between the top and the bottom of the sample. A droplet of petroleum jelly was used to fix the sample to the polystyrene, which was itself attached to the copper holder using a fixing paste (Pattex, Henkel, Germany). The same paste was used to seal the sample in its PMMA cap, thus insulating the sample from the cell chambers and avoiding water diffusion from the core to the surface.

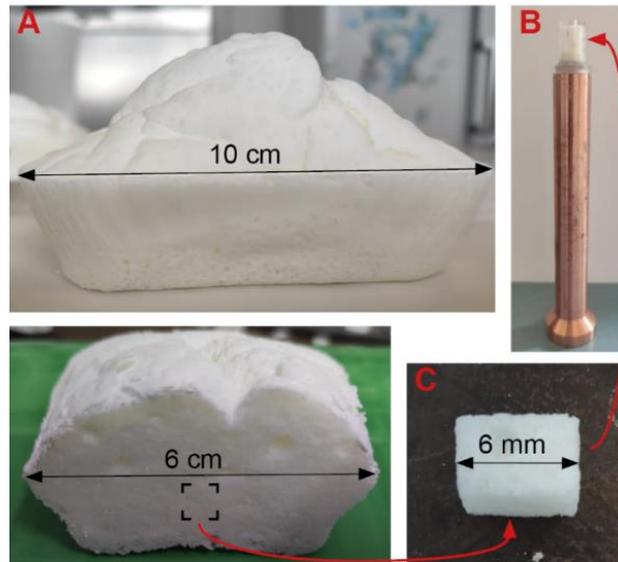


Figure 37: (A) Porous model sponge cake (pan dimension $10 \times 6 \times 3 \text{ cm}^3$); (B) Sponge cake sample on its copper sample holder (enclosed with a PMMA cap); (C) Cubic sponge cake sample (6 mm side).

The sampling was performed in controlled conditions at a temperature of $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and air humidity of 80% in order to avoid moisture loss.

Two freezing rates were applied: (i) fast freezing ($17.2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) using an air blast freezer and (ii) slow freezing ($0.3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) using a horizontal static freezer. Both freezers were set at $-35 \text{ }^\circ\text{C}$. For each freezing process, a calibrated type T thermocouple was placed in the center of one reference sample in order to measure temperature evolution during freezing. The thermocouple was attached to a data system (Picolog TC-08, Pico technology, Cambridgeshire, UK) connected to a computer. Four replicates were made for each freezing rate. Samples were directly frozen on the copper sample holder.

II.2 Characterization of Thermo-Physical Properties of the Sponge Cake

II.2.1 Density

After batter preparation, the density was determined by weighing (AE 163, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA, precision 10^{-4} g) 100 mL of dough using a measuring cylinder. Two replicates were performed.

After baking, five replicates ($5.5 \times 5 \times 2 \text{ cm}^3$) were sampled and weighed (about 20 g), then the apparent density was calculated. In order to determine the density of the model sponge cake without air (real density), the same sample was compacted using a vacuum sealing

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

machine (Foodsaver, V2860, Newell Brands, Atlanta, GA, USA) to remove the air from the pores, and the new dimensions were measured to calculate the new volume.

II.2.2 Water Content

Five replicates with dimension size of $6 \times 5 \times 2$ cm³ were cut and weighed (about 22 g). Then, the water content was determined according to the NF V03-707 standard by weighing (AE 163, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA, precision 10⁻⁴ g) them before and after drying in an oven (Termaks TS4057, Bergen, Norway) set at 105 °C for 90 min. The water content was calculated according to Equation (18):

$$X_w = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100 \quad (18)$$

where X_w is the water content of the sponge cake sample, m_0 is the mass (kg) of the wet sample and m_f is the mass (kg) of the dried sample.

II.2.3 Differential Scanning Calorimetry Measurements (DSC)

Differential scanning calorimeter (DSC 1 STARe System, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) was used to determine the freezing point and the freezable water content. The heat flows and temperature were measured with an accuracy of 0.02 μW and 0.02 °C, respectively. For this experiment, six samples of about 9 mg were cut in controlled conditions of temperature at 20 °C and air humidity of 80% and then placed in an aluminum pan hermetically sealed. For each analysis, the sample was cooled in the pan from 20 °C to -40 °C at 10 °C/min, then held at -40 °C for 10 min, after that, the sample was heated back to 20 °C at 1 °C/min and finally, it was held at 20 °C for 5 min. Figure 38 shows the DSC protocol used for the analysis.

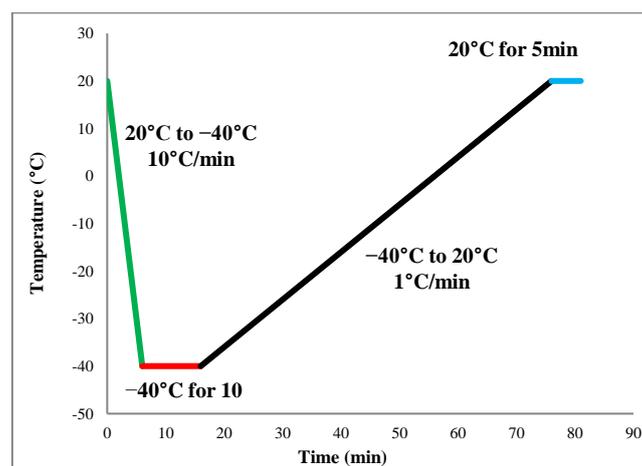


Figure 38: Differential scanning calorimeter protocol.

The endothermic ice melting peak obtained, permits to determine the peak temperature (T_p) and the onset temperature (T_o), which represents the freezing point. Six replicates were

measured.

The freezable water F_w (%) content is calculated using Equation (19) (Liu et al. 2019):

$$F_w \% = \frac{\Delta H_w}{\Delta H_i \times T_w} \times 100 \quad (19)$$

where ΔH_w (J/g) is the total transition enthalpy of ice fusion in the sponge cake sample, ΔH_i (J/g) is the specific latent heat of fusion of ice (334 J/g) and T_w (%) is the total water content in the sample.

II.3 Cryo-SEM Analysis

For a better interpretation of the μ -CT images, a cryo-SEM experiment was carried out (Electron Microscopy Facility, IBPS, Paris, France). Both frozen and unfrozen samples were analyzed. In order to avoid thawing during transportation, the samples were frozen on site at -35 °C at a rate of 0.35 °C/min in a small static freezer. Sampling and fracture were directly performed in liquid nitrogen. Fractured surfaces were observed using cryo-SEM (GeminiSEM 500, Zeiss, Oberkochen, Germany) at -120 °C, the pressure in the equipment was 1.6×10^{-4} Pa. The accelerating voltage was 3.00 kV or 0.790 kV and the accessible magnification range was from $\times 13$ to $\times 500,000$. Frozen samples were first observed at -120 °C then after partial sublimation at -90 °C for 15 min and 1h.

II.4 Synchrotron X-ray Micro-Tomography

II.4.1 Thermostated Cell

CellStat (Calonne et al. 2014) is a cold cell composed of a Peltier module, which maintains a regulated temperature at the bottom of the copper sample holder described in Section 2.1.2 (Figure 39A). A continuous dry and cold air circulation between the copper sample holder and the plexiglass chambers of the cell homogenizes the temperatures in the chambers and prevents the formation of frost (from the condensation of the room water vapor). In addition, water circulation in the lower heat exchanger allows the dissipation of heat generated by the Peltier module. The system can rotate 360° for single half acquisition modes (Figure 39B).

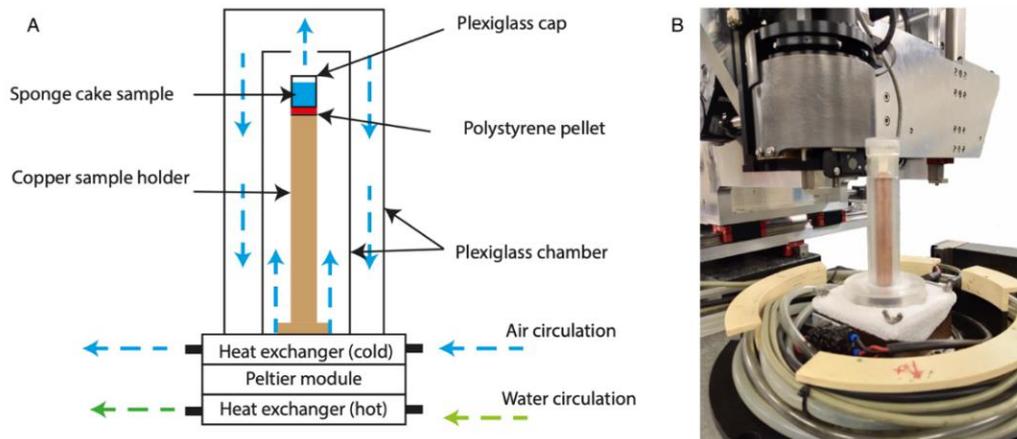


Figure 39: Illustration of the thermostated cell used during the tomographic acquisition: (A) CellStat scheme and (B) CellStat installed on the ANATOMIX Beamline (Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France).

II.4.2 3D Image Acquisition

The X-ray microtomography collections were carried out at the beamline ANATOMIX of the Synchrotron SOLEIL (France). The system was operated with a filtered polychromatic (“white”) beam at a central photon energy of 30 keV, optimized with respect to the sample to detector distance (30 mm) and the voxel size of 0.65 μm . 2000 projections were taken over 180° for a total scan time of about 5 min.

CellStat was installed in the ANATOMIX hutch and cooled down to -36°C . Then the frozen samples, already mounted on their copper holder and stored in a domestic freezer (maintained at -30°C), were placed on the thermostated cell (Figure 39B). After 5 min of thermalization, the first scan was launched. Finally, 4 scans were acquired for each sample at different heights (with an overlap between the scans). The total height of the scanned volume is about 5 mm while its diameter is about 1.3 mm.

II.4.3 Image Processing

The $\mu\text{-CT}$ acquisitions were reconstructed in 3D volumes using PyHST2 software (Mirone et al. 2014) and using the phase contrast Paganin filter (Paganin et al. 2002). The resulting volume of analysis was $2048 \times 2048 \times 2048$ vx (corresponding to 1.3 mm side).

The three constituents of the frozen model sponge cake: air, ice and starch are represented by well separated grey levels in the 3D images as shown by the histogram in Figure 40.

The segmentation of these three phases was then simply realized by grey level threshold. By performing a 3D closing operation on the starch phase, it was then possible to create the closed starch phase. This intermediate phase is a “filled” version of the starch phase (Figure 40). The structuring element connects the objects that are closer than its radius into one continuous object. In this work, the optimal radius was 16 voxels. In the following sections, the term matrix will be used to denote the completely closed starch phase with embedded ice

crystals.

Finally, the ice phase was segmented into two different phases based on ice crystal location by the mean of logical operations (not/and): (i) the ice inside the matrix (starch + ice inside), defined as the intersection of the ice phase and the starch phase, which is mainly in contact with the starch, and (ii) the ice outside the matrix, which is mainly in contact with the air and located at the surface of the macro-pores of the sponge cake (Figure 40).

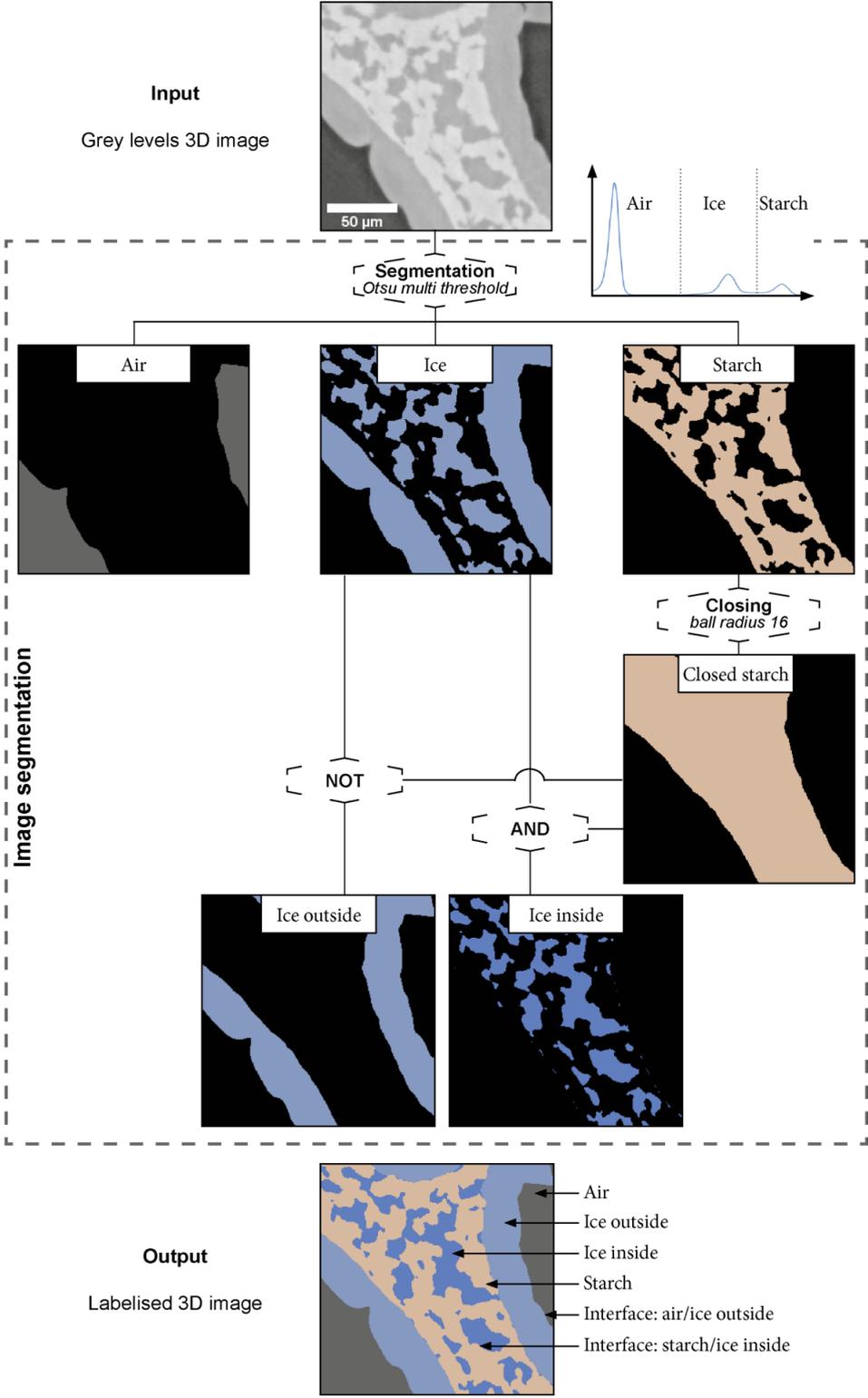


Figure 40: Image segmentation procedure.

II.4.4. Microstructural Description

In this study, the microstructure is characterized by:

- The volume of each phase, using a simple voxel counting: $V_{air}, V_{ice} = V_{ice\ inside} + V_{ice\ outside}, V_{starch}$, the total volume of the sample is $V_{total} = V_{air} + V_{ice} + V_{starch}$. The volume fraction for each phase is then calculated:

The porosity:

$$\varphi_{Air} = \frac{V_{air}}{V_{total}} \quad (20)$$

The ice fraction in the solid phase (without the air):

$$\varphi_{Ice\ in\ the\ solid\ phase} = \frac{V_{ice}}{V_{ice} + V_{starch}} \quad (21)$$

The volume fraction of ice outside:

$$\varphi_{Ice\ outside} = \frac{V_{ice\ outside}}{V_{ice}} \quad (22)$$

- The specific surface area (SSA) is defined by the total surface area of an interface between two phases per the total volume of the sample. It was calculated using MorpholibJ (Legland et al. 2016) on the one hand, for ice and air interfaces, and, on the other hand, for ice and starch interfaces.
- The local thickness of ice inside and outside was computed: it represents the diameter of the largest sphere at a given point that can fit inside the object and containing the given point (Schindelin et al. 2012). This parameter is calculated by the Saito-Toriwaki Euclidean distance transformation algorithm (Hildebrand and Rügsegger 1997). This algorithm has been implemented as a plugin for Fiji.
- The mean curvature: each point of a 3D surface is characterized by two principal curvatures f_{min} and f_{max} , which correspond to the maximum and minimum value of the curvature at that point, respectively. The mean curvatures C (m^{-1}) represent a useful descriptor to characterize the surface shapes (Wang et al. 2012, Martoia et al. 2017).

$$C = \frac{f_{min} + f_{max}}{2} \quad (23)$$

The sign of the mean curvature indicates the shapes of ice structures. Negative, zero and positive curvature correspond to concave, flat and convex shapes, respectively. In practice, the mean curvatures were obtained using the method proposed by (Flin et al. 2004, Flin et al. 2005). See also (Calonne et al. 2014, Haffar et al. 2021) for additional information.

II.4.5 Statistical Analysis

A statistical analysis (ANOVA) was performed to study the significant effect of the freezing rate on sponge cake microstructure evolution during freezing. The Tukey Kramer test for multiple range comparisons ($p < 0.05$) was used to identify the difference between the measured mean values for volume fractions and SSA.

III. Results

III.1 Thermophysical Properties of the Model Sponge Cake

III.1.1 Model Sponge Cake Reproducibility

Preliminary preparations of the model sponge cake were carried out in order to verify the reproducibility. The selected properties to compare were the density of batter, the density of sponge cake with air (apparent) and without air (real). These properties were systematically measured for each preparation to ensure their reproducibility and the validity of the model sponge cake. Table 11 shows the average values of the properties of the model sponge cake.

Table 11: Model sponge cake properties.

Batter Theoretical Density (kg/m ³)	Batter Measured Density (kg/m ³)	Cake Real Density (kg/m ³)	Cake Apparent Density (kg/m ³)	Porosity (%)	Water Content after Baking (%)
899	694 ± 2.2	645 ± 20	392 ± 15	56 ± 2	60 ± 1.5

Table 11 shows that the batter measured density is significantly lower than the theoretical one (see Section 2.1.1). During batter preparation, the ingredients are whipped. Air is incorporated in the mix. Thus, the batter measured density includes a fraction of air explaining this lower density value for the batter. During baking, the batter undergoes many physico-chemical changes. These transformations are characterized by cellulose gelation, starch gelatinization, water evaporation and volume expansion of the air due to pore formation, leading to a strong expansion of the cake. In Table 11, the apparent density after baking (392 ± 15 kg/m³) is thus significantly lower than density before baking (694 ± 2.2 kg/m³). Considering the cake real density even after compaction, a fraction of air seems to still be trapped in the cake since this density of 645 kg/m³ is lower than both measured (694 kg/m³) and theoretical (899 kg/m³) batter densities. This fraction of air, probably contained into the closed pores, does not seem to be extracted during compaction. The mean porosity value mentioned in Table 11 was then calculated considering the ratio between the cake apparent density (containing air) and the batter theoretical density (without air).

Concerning water content, the amount of water used in the preparation is about 75% (64% of ultrapure water and 11% for the starch humidity). After baking, about 60% of this water is still present in the cake. The low standard deviations obtained for porosity and water content after baking confirm the reproducibility of the model sponge cake preparation and validate its use as a model porous food.

III.1.2 Freezing Point and Freezable Water Content

The amount of freezable water in model sponge cake was measured using DSC. The samples were directly frozen into the instrument. A typical thermogram of melting is shown in Figure 41. It shows that ice melting started at around $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ and that the endothermic ice fusion peak was obtained at around $0.65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The freezing point represented by the onset temperature was measured by determining the intersection between the tangent and the extrapolated baseline. In the case of this study, the freezing point was $-0.52 \pm 0.09\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the ice fusion peak temperature was $1.98 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. The amount of latent heat of fusion absorbed during ice melting was determined by the integral between the heat flow signal and the virtual baseline. The ice melting enthalpy measured was $124 \pm 15\text{ J g}^{-1}$. This result was used to calculate the freezable water content using Equation (19). The amount of freezable water was found to be $62 \pm 7.5\%$ (w/w), equivalent to a volume fraction of ice of about $44 \pm 5.3\%$.

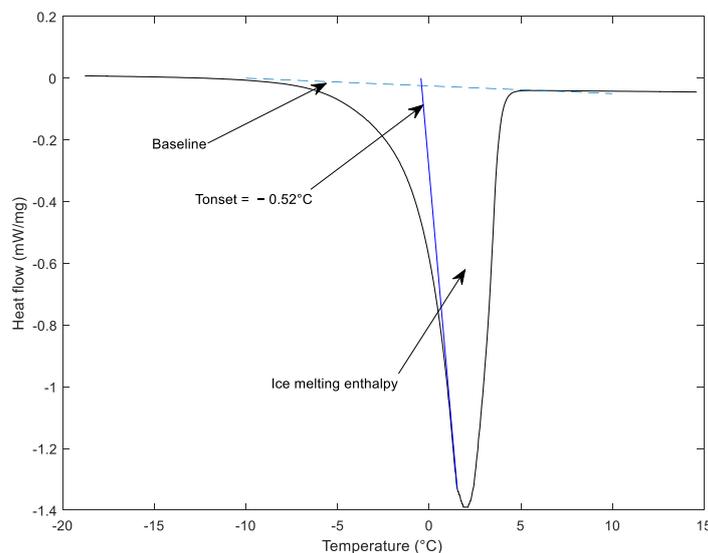


Figure 41: Differential scanning calorimetry curves (DSC) of unfrozen model sponge cake.

III.2. Microstructural Image Analysis

Qualitative Analysis

- Ice formation and location

Cryo-SEM was used to visualize the microstructure of model sponge cake before and after freezing (Figure 42). Figure 42(A1,A2) show micrographs of unfrozen samples at magnification of $\times 100$ and $\times 5000$, respectively. They reveal a highly porous microstructure. In these images, the presence of micropores (Figure 4(2A1)) and nanopores (Figure 42(A2)) can be noticed in macropores walls. These images also show that the air phase is highly connected. No crystal form is visible and the surface of the pores is smooth and regular.

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

Figure 42(B1,B2,C1,C2) represent frozen samples of model sponge cake before and after 1 h of sublimation at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Figure 42(B1,B2) show the formation of ice crystals all over the pore walls, partially embedded into the starch phase and protrude into the pores. The ice crystals' length varies between 20 and 100 μm . Sublimation is used to ensure that these specific objects present inside the starch phase and at the pore walls can be reliably identified as ice crystals (Figure 42(C1,C2)). The presence of ice inside the starch phase and at the pores' walls is therefore confirmed using this cryo-SEM imaging.

- Effect of freezing rate

Figure 43 presents synchrotron X-ray microtomography images of horizontal slices and 3D representations obtained for unfrozen sample (Figure 43(A1–A3)), for fast frozen samples (Figure 43(B1–B3)) and for slow frozen samples (Figures 43(C1–C3)) before (Figure 43(A1,B1,C1)) and after phase segmentation (Figure 43(A2–C3)).

In Figure 43(A1–A3) no crystalline form is observed and only two materials can be distinguished: the air voids in dark grey and a continuous solid phase (with brightness grey levels) probably consisting of starch, water and hydrocolloids blend. On the other hand, 2D images of the model sponge cake after freezing displayed in Figure 43(B1,C1) clearly shows the presence of a third phase with intermediate grey levels and objects with prismatic/crystalline forms (with sizes and shapes comparable to those obtained during the cryo-SEM observations) that were identified as ice crystals.

Based on the segmentation procedure described on Figure 40, four different phases can be distinguished on the segmented images (Figure 43(A2, B2, C2)): air voids (pores in grey), ice outside the matrix (in light blue), ice inside the matrix (in dark blue) and the starch phase (in brown).

The comparison between Figure 43B,C provides an overview of the effect of the freezing rate on the ice formation (location and size). In the case of fast freezing (Figure 43B), ice formation occurs mainly in the matrix. Ice seems to be evenly distributed, with a fine and homogeneous size. Some cuboid shaped ice crystals and a thin layer of ice are formed at the matrix-air interface. On the other hand, slow freezing (Figure 43C) leads to larger ice crystals with a less homogeneous distribution inside the matrix phase than that observed with fast freezing. Moreover, Figure 43C shows the formation of a thick layer of ice at the interface between the air and matrix unlike the very thin layer obtained for fast freezing.

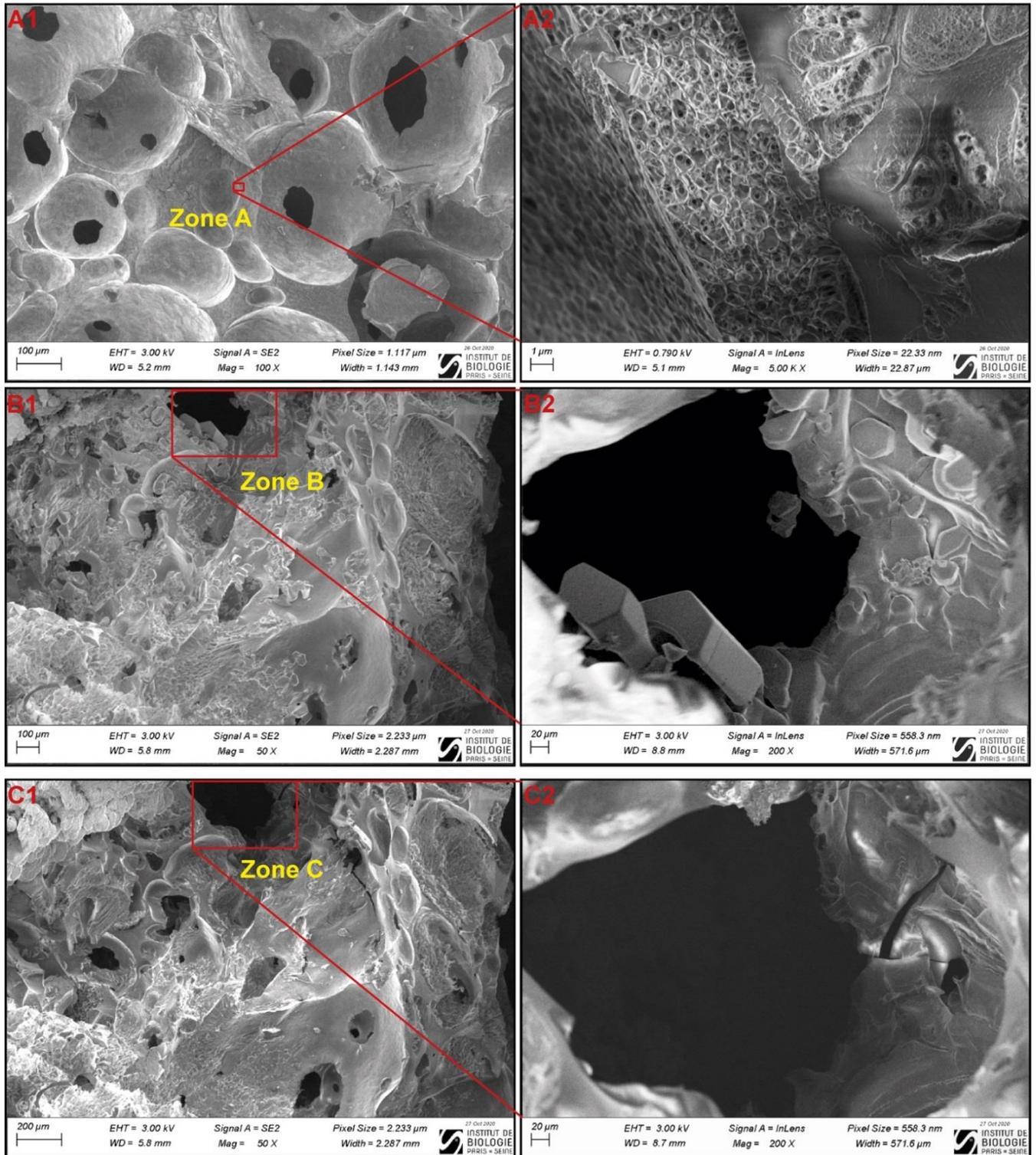


Figure 42: Cryo-SEM images of fractured sponge cake: (A1) Unfrozen sample; (A2) Zoom on the zone A; (B1) Samples frozen for 24 h in a domestic freezer at $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$; (B2) Zoom on zone B; (C1,C2) Frozen samples after 1h of sublimation at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ of the images (B1,B2).

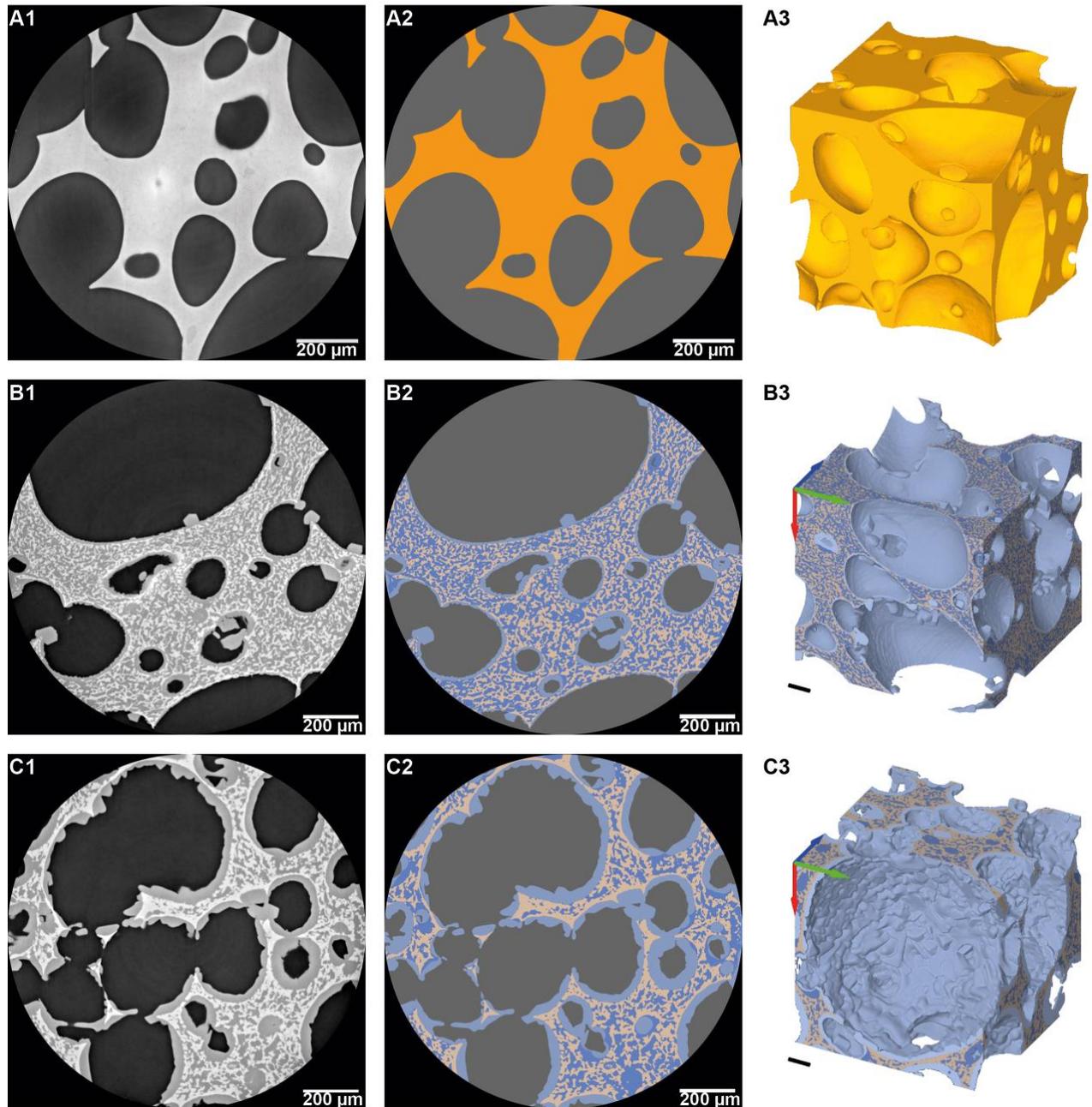


Figure 43: Synchrotron X-ray horizontal slices (grey level images in the left and segmented images in the right) and 3D visualization of the sample after segmentation: (A1–A3) Unfrozen sponge cake; (B1–B3) Model sponge cake sample frozen at $-17.2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (fast freezing); (C1–C3) Model sponge cake sample frozen at $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (slow freezing). (Air in grey, ice outside the matrix in light blue, ice inside the matrix in dark blue and starch in brown). Each cube is 1 mm a side.

III.3 Quantitative Data Analysis

III.3.1 Representative Sub-Volume Analysis

The high porosity (about 60%) and the presence of large pores (about 1 mm in Figure 43(B1) for example) question the size of the volume that needs to be analyzed for a reliable estimation of the air content.

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

For this reason, mean air volume fraction was calculated for seven different sub-volumes with sizes from $400 \times 400 \times 400$ vx to $2400 \times 2400 \times 2400$ vx (Figure 44), for both a fast and a slow freezing sample (filled dots in Figure 44). The dashed lines represent the average value of the four cropped scans ($1500 \times 1500 \times 1500$ vx avoiding boundary effects) and the shaded area is \pm the standard deviation over these four scans.

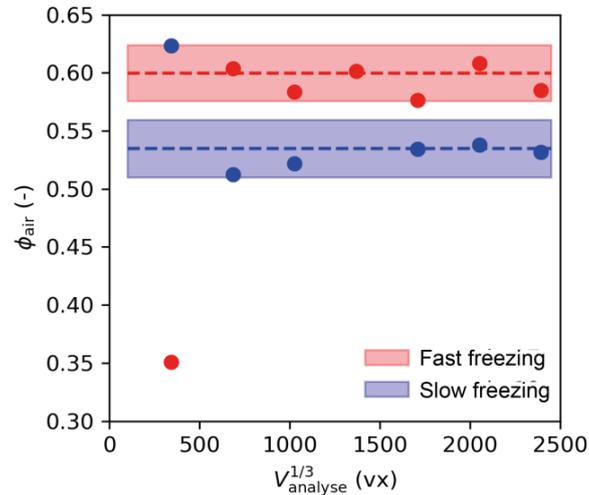


Figure 44: Air volume fractions for different sub-volume samples analyzed to determine the representative sub-volume (colored areas represent standard deviations).

The mean air volume fractions obtained from the μ -CT image analysis of sub-volumes between $700 \times 700 \times 700$ vx and $2400 \times 2400 \times 2400$ vx were around 60% and 54% for fast freezing and slow freezing, respectively, as shown in figure 44. These values are in line with the porosity value determined from apparent and real densities measurements (Table 11).

Furthermore, Figure 44 shows no statistical difference between the mean air volume fractions calculated from the sub-volumes higher than $700 \times 700 \times 700$ vx. This result indicates that a sub-volume varying from $700 \times 700 \times 700$ vx to $2400 \times 2400 \times 2400$ vx can reliably be considered as a representative elementary volume for further quantitative analysis. In the following sections, the volumes of the different phases, V_{air} , V_{starch} , V_{ice} and $V_{\text{ice inside}}$ were calculated using the average of 16 volumes with sizes $1500 \times 1500 \times 1500$ vx. This latter was selected as the representative volume to provide quantitative data of the microstructure of frozen model sponge cake.

III.3.2 Volume fractions

As mentioned above, three different phases (air, ice and starch) were segmented based on the grey level contrast as described in Section 2.4.3 (Figure 40), in order to perform quantitative analyses. Figure 45 shows vertical slices in the grey level of samples after fast and slow freezing, respectively (Figure 45A), the corresponding vertical profiles of the porosity (Figure 45B), the volume fraction of ice (without air) (Figure 45C) and the volume fraction of ice inside the matrix (Figure 45D). Table 12 shows the mean volume fractions measured for the

different phases: air, starch and ice for both operating conditions: fast and slow freezing.

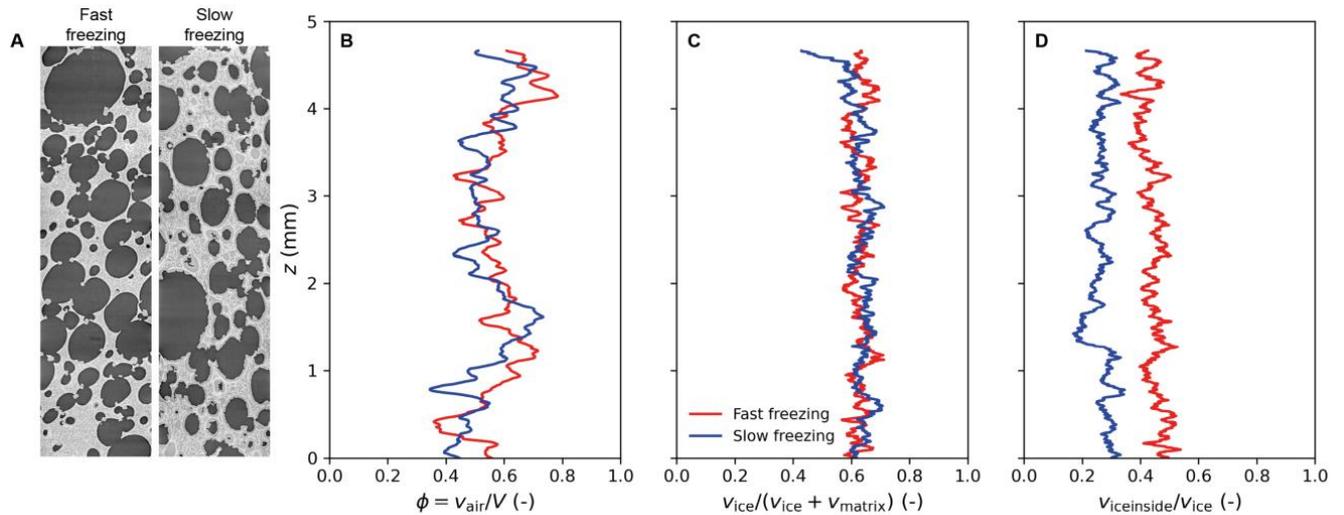


Figure 45 : Volume fraction evolution along the height of the sample: (A) Vertical slices of grey level images; (B) Porosity profile; (C) Ice volume fraction (without air) profile; (D) Profile of the volume fraction of ice inside the matrix.

Table 12: Mean volume fractions of the different phases for unfrozen, fast and slow freezing.

Freezing Rate	Volume Fraction of Air (%)	Volume Fraction without Air (%)				
		Total Fraction	Ice	Ice Inside the Matrix	Ice Outside the Matrix	Starch
Unfrozen	63 ± 6^a	/	/	/	/	/
Fast freezing	62 ± 6^a	62 ± 3^c	43 ± 3^d	19 ± 3^f	38 ± 2^h	
Slow freezing	57 ± 6^b	63 ± 1^c	25 ± 5^e	38 ± 5^g	37 ± 1^h	

For each column, different letters indicate significant differences between values within a single column, $p < 0.05$.

- Porosity

The porosity for both unfrozen and frozen model sponge cakes was measured. Figure 45B shows the vertical porosity profiles of frozen model sponge cakes. A relative heterogeneity of air content along height can be observed. The porosity profiles are between 40 and 80%, revealing the multiple scale and the natural variations of the porosity. Considering the mean air fractions in Table 12, the unfrozen sponge cake contains about $63 \pm 6\%$ of air. This value is close to the one obtained from the density determination shown in Table 11 ($56 \pm 2\%$). One can thus consider that the μ -CT imaging provides reliable quantitative information about the sponge cake porosity. The mean volume fraction of air is $62 \pm 6\%$ for the fast freezing cake and $57 \pm 6\%$ for the slow freezing cake (Table 12), showing a significant difference based on the statistical study ($p < 0.05$). The slight difference between these fractions can be explained

by the local heterogeneity of air content in each sample. Nevertheless, in the case of the slow freezing cake, the presence of a thick layer of ice on the pore walls significantly reduces the equivalent diameter of pores and hence the air volume fraction (Figure 43C). This can be explained by the air volume fraction being systematically lower in the case of slow freezing rate.

- Ice volume fractions

Considering the profile of the ice volume fraction (without air) shown in Figure 45C, it can be noticed that the ice content is homogeneously distributed along the sample's height regardless of freezing rate. In addition, the mean total ice volume fractions in Table 12 show that the total ice volume fraction is quite similar for both freezing rates (about 60%). It can be noticed that this value is higher than the ice volume fraction measured using DSC (44%). Indeed, the calorimetry measurements depend on several parameters, particularly in the case of sponge cake in which the water distribution may be heterogeneous. Consequently, the initial amount of water in one sample depends on the sampling location even if, in our case, special care was taken during sampling in order to make sure to sample the different replicates in the same area. In addition, the samples used in DSC are extremely sensitive to the ambient conditions and may undergo dehydration during handling due to their small size (nearly $3 \times 3 \times 2$ mm³), even if they were prepared in a controlled (temperature and humidity) atmosphere.

According to Figure 45D and Table 12, the mean volume fraction of ice inside the matrix obtained for fast freezing is significantly ($p < 0.05$) higher (quite twice) than the one found for slow freezing. This ice located inside the matrix corresponds to almost two thirds of the total ice formed in the case of fast freezing. Inversely, for slow freezing, two thirds of the total ice are mainly formed at the air-matrix interface, showing a significant difference ($p < 0.05$) compared to fast freezing. These quantitative results are consistent with the observations described in Figure 43.

III.3.3 Specific Surface Area (SSA) and Local Thickness

Table 13 shows the SSA values of, on one hand, the interface of ice with the air and, on the other hand, the interface between ice and starch phases for both fast and slow freezing (see Figure 40). It can be noticed that there is no significant difference ($p < 0.05$) between the SSA for the air-ice outside the matrix interface, for both freezing rates. Indeed, an ice layer is always present on macropore walls even if this layer is significantly thicker at a low freezing rate as shown on Figure 43. On the other hand, the SSA value for ice inside the starch matrix interface (see Figure 43) is almost two times more important for fast freezing, where ice is mainly formed inside the matrix, than for slow freezing, as shown in Tables 12 and 13. The statistical analysis shows a significant difference between fast and slow freezing.

Table 13: Specific surface area SSA (mm^{-1}).

Freezing Rate	Interface Air—Ice Outside the Matrix	Interface Ice Inside the Matrix—Starch
Fast freezing	8.4 ± 1.5^a	52.6 ± 12.9^b
Slow freezing	8.0 ± 1.0^a	31.9 ± 11.4^c

For each column, different letters indicate significant differences between values within a single column, $p < 0.05$.

Figure 46 shows the local thickness (see Section 2.4.4) of ice inside (A2 and A3) and outside the matrix (B2 and B3) for both fast and slow freezing, respectively. The largest ice local thicknesses appear with yellow and white colors while the smallest tend to purple and blue. The cumulative distributions of the ice local thickness diameters are plotted in Figure 46(A4,B4) for ice inside and ice outside the matrix.

Comparing Figure 46(A2) and Figure 46(A3), it can be seen that the local thickness values of ice inside the matrix were smaller (mainly blue and purple spots in Figure 46(A2) for fast freezing than the values obtained for slow freezing (more red, yellow and even white spots in Figure 46(A3)). This result was confirmed by the ice distribution displayed in Figure 46(A4). Indeed, the curves of cumulated ice volume show a more homogeneous distribution for fast freezing compared to slow freezing. For fast freezing, 95% of the population of ice inside the matrix is below $20 \mu\text{m}$ against $45 \mu\text{m}$ for slow freezing. The larger standard deviations for slow freezing that can be seen in Figure 46(A4) also reflect greater population heterogeneity of ice crystal sizes inside the matrix.

Regarding ice outside the matrix, Figure 46(B2) shows few local thicknesses for fast freezing while in Figure 46(B3), nearly the whole pore walls was lined with colored spots (large thicknesses) for slow freezing. Figure 46(B4) confirms this result. In fact, almost 80% of the local thicknesses of ice outside the matrix were below $10 \mu\text{m}$ for fast freezing, whereas 80% of the local thicknesses were above $20 \mu\text{m}$ for slow freezing. The large standard deviations obtained for the large size of fast freezing local thicknesses can be explained by the presence of some individual ice crystals at the pore walls (Figure 46(A1,B2)).

Based on these results, it can be concluded that the slow freezing leads to:

- The migration of half the ice content to the pores' interface with a thick layer of ice ($20\text{--}30 \mu\text{m}$)
- A characteristic size of the ice inside the matrix of the same order ($20\text{--}25 \mu\text{m}$)

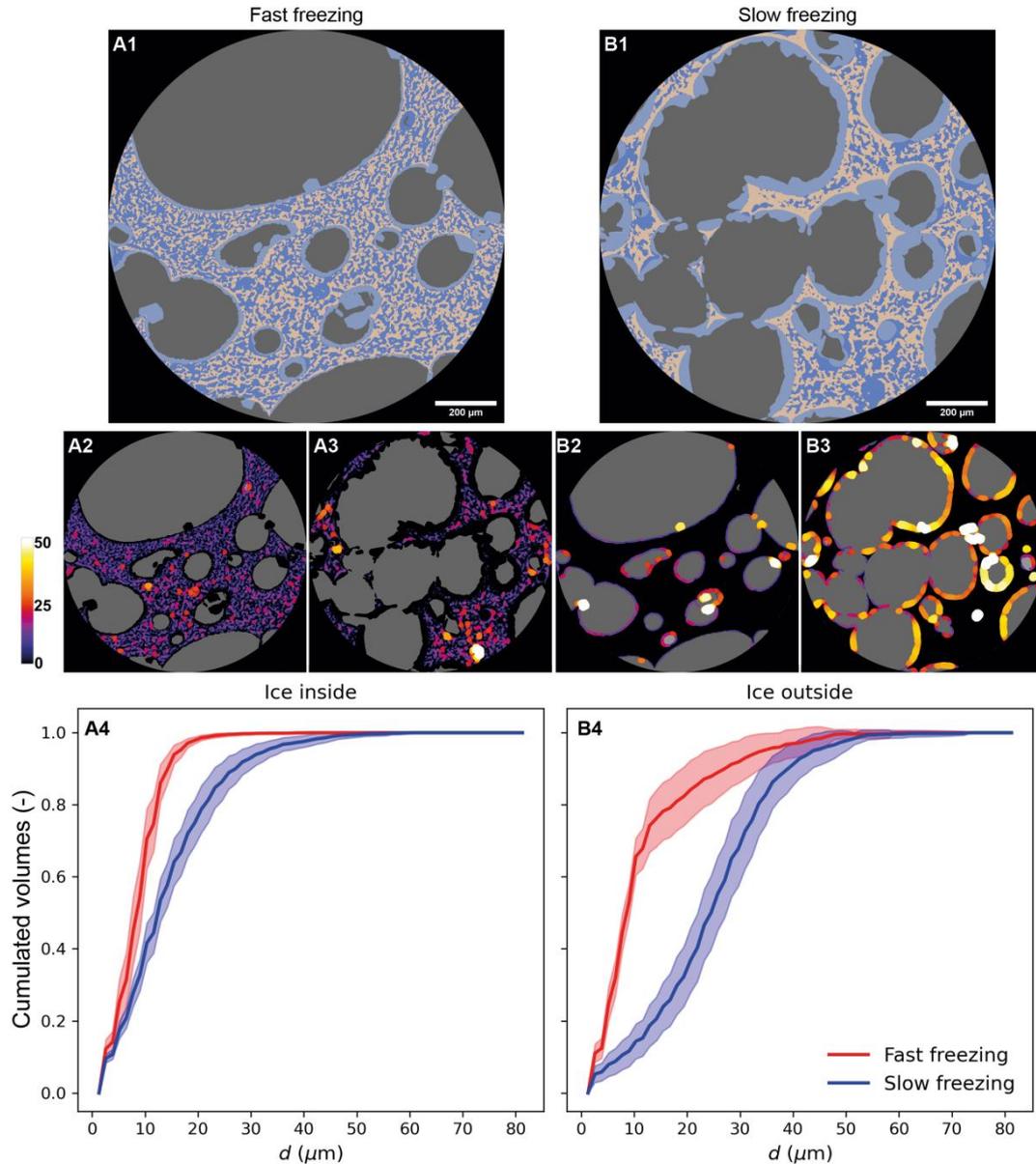


Figure 46: Measurement of local thickness of ice: (A1) 2D segmented image of sponge cake sample (fast freezing); (A2) Local thickness of ice inside the matrix (fast freezing); (A3) Local thickness of ice inside the matrix (slow freezing); (B1) 2D segmented image of sponge cake sample (slow freezing); (B2) Local thickness of ice outside the matrix (fast freezing); (B3) Local thickness of ice outside the matrix (slow freezing); (A4,B4) Cumulative distribution of local thickness of ice inside the matrix and ice outside the matrix according to the freezing rate.

III.3.4 Mean Curvature

Shape characterization was also investigated by calculating the mean curvature in each point of the ice surface for both freezing conditions. 3D visualizations of the frozen model sponge cake samples are shown in Figure 47A,B for fast and slow freezing. The green, yellow and red colors illustrate concave, flat and convex shapes, respectively. The difference between the two freezing rates is obvious in this figure. In the case of the fast freezing, Figure 47A shows

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

a smooth texture, it is globally flat and concave except for the presence of some individual and convex ice crystal shapes. On the contrary, for the slow freezing (Figure 47B), the texture seems to be rough and ice covers the pore walls. Convex, concave and flat surfaces are visible on the walls.

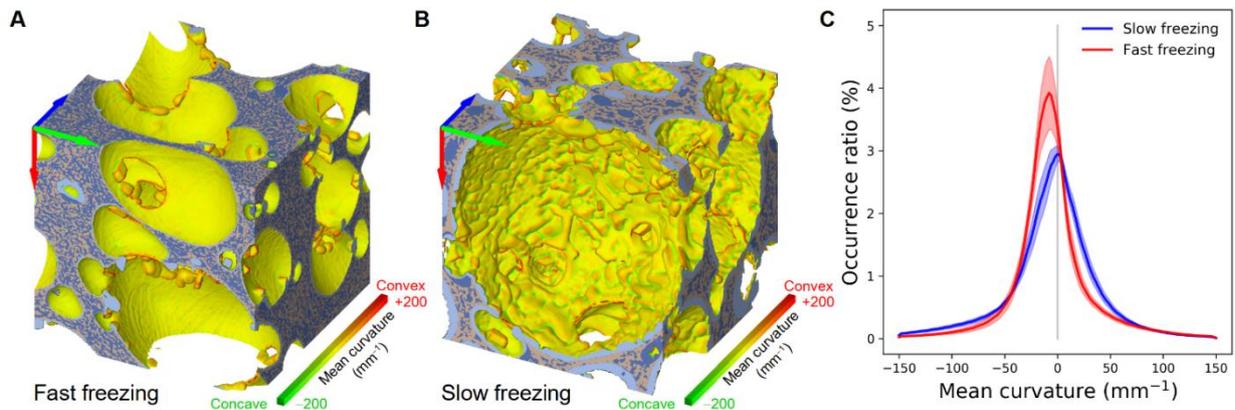


Figure 47: Mean curvature and 3D visualization of sponge cake samples: (A) Sponge cake sample frozen at $-17.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (fast freezing); (B) Sponge cake sample frozen at $\times 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (slow freezing) (cube of $1 \times 1 \times 1\text{ mm}^3$); (C) Mean curvature distributions of a volume of $1 \times 1 \times 1\text{ mm}^3$ regions of interest (ROIs) taken from 16 samples submitted to slow freezing (blue curve). Similarly, the red curve corresponds to ROIs of the same volume taken from 16 fast frozen samples.

Figure 47C shows the mean curvature distributions of a volume of $1 \times 1 \times 1\text{ mm}^3$ regions of interest (ROIs) taken from 16 samples submitted to slow freezing (blue curve). Similarly, the red curve corresponds to ROIs of the same volume taken from 16 fast frozen samples. The curves are expressed in terms of occurrence ratio, showing the ratio in percentage of the ice surface area exhibiting a mean curvature situated in a particular range of values over the total surface area of the ice agglomerate. The main conclusions from mean curvature comparison (fast and slow freezing) are:

- For fast freezing, the curve is much steeper and high with negative curvature values representing the pore curvatures (e.g., a curvature of -2 mm^{-1} corresponds to a pore diameter of 1 mm). The prismatic ice crystals are characterised by rather flat surface. The graph C in Figure 47 shows that the amount of such surface is of the same order for slow and fast freezing
- For slow freezing, the curve is centred at zero and is much wider. This corresponds to a significant proportion of strong curvatures (concave or convex), which means that the surface is rough with several indentations and bumps.

IV. Discussion

IV.1 Microstructure Characterization

Sponge cake samples were visualized using two different imaging techniques (X-ray μ -CT and cryo-SEM). Qualitatively, synchrotron X-ray μ -CT images provide substantial information about distribution and size of pores (Figure 43). It shows high porosity with a

heterogeneous size distribution of macro and microporosity randomly distributed (Figure 43A). The effect of freezing rate can also be described by comparing the fast freezing and slow freezing on the 2D images and 3D visualization (Figure 43B,C). It is noticeable that fast freezing favors the formation of smaller ice particles evenly distributed inside the matrix with the deposition of a thin layer of ice at the air-matrix interface. On the contrary, slow freezing results on the formation of a thick layer of ice in the air-matrix interface and the presence of large ice particles randomly distributed inside the matrix. However, it is worth mentioning that the spatial resolution of 0.65 μm does not allow more detailed information about the presence of nanoporosity and nanoparticles. Indeed, the cryo-SEM imaging, with a high spatial resolution allowing a magnification of 5000 \times , clearly shows the presence of nanopores in the wall of macropores of the unfrozen sponge cake (Figure 42(A1,A)2). This nanopore network means that the porosity is highly connected. The cryo-SEM imaging provides access to useful information about the sponge cake microstructure at this scale. Nevertheless, the cryo-SEM technique gives only 2D information about the product; therefore, it is not possible to quantitatively analyze the pores and the ice with this technique.

It was made possible by using synchrotron imaging and applying robust segmentation between the different phases. The volume fractions, the ice local thickness and the shape characterization were obtained. But the results must be analyzed considering that the calculated air volume fraction was underestimated since the presence of nanopores could not be detected at a resolution of 0.65 μm and were thus considered as starch.

IV.2 Effect of Freezing Rate on Ice Formation and Location

Images displayed on Figure 43 and obtained thanks to synchrotron X-ray μ -CT analyses show ice crystal formation after freezing and evidence different microstructures according to the freezing rate. For fast freezing, a fine and homogeneous microstructure was obtained. Conversely, the microstructure resulting from slow freezing was rather coarse and heterogeneous. This result is in line with the well-known effect of freezing rate on solid food products: fast freezing leads to numerous and small ice crystals while slow freezing results in large and fewer ice particles (Baier-Schenk et al. 2005, Pham 2006, Ullah et al. 2014). Mechanistically, nucleation and growth of ice crystals are controlled by both the thermal resistance and the diffusion of the freezable water into the product.

In the case of highly porous food, such as the model sponge cake considered in this work, the mobility and distribution of freezable water is highly constrained by the porosity. In addition to heat transfers, the performance of freezing in such products is principally related to the dynamics of water and ice in both the starch matrix and the pores. This phenomenon is evidenced in Figure 43 where ice at the pore walls can be seen according to the freezing rate. Indeed, a fast freezing rate led to the formation of a thin layer of ice in the pore walls while a thick layer was obtained for slow freezing. In order to reliably assess the effect of freezing rate on ice formation and location, the ice phase was separated into two different parts: ice inside the matrix and ice outside the matrix. This information is, indeed, a key parameter to

Chapitre 3 : Effet de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace

highlight the difference between fast freezing and slow freezing rate. Ice volume fractions described in Table 12 show that ice was mainly formed inside the matrix for fast freezing (almost 2/3 of the total ice fraction) while most of the ice was located outside the matrix for slow freezing (almost 2/3 of the total ice fraction). These results were confirmed by the SSA and local thickness values presented in Table 13 and Figure 46, respectively. The SSA between ice inside the matrix and the starch is twice less important for the slow freezing rate compared to the fast freezing rate. This result reflects the larger ice crystals formed inside the matrix when the model sponge cake is frozen at a low rate. On the other hand, it is worth noting that SSA values of ice air outside the matrix interface are similar for both freezing rates, meaning a similar pore wall covering by ice layer.

However, the higher local thicknesses described for low freezing rate (Figure 46(B3,B4)) shows that more ice was formed inside the pores when the sample was frozen slowly. Low freezing rate favors the migration of water towards the pores where it crystallizes as evidenced by the volume fractions and the high local thicknesses described in Table 12 and Figure 46(B3,B4), respectively. As mentioned above, the physics of ice formation and distribution during freezing of porous food is highly related to the structural porosity. During freezing, a temperature gradient is applied inside the product. This gradient can lead to moisture migration and water evaporates from the warmer side (matrix) and diffuses through pores due to vapor pressure gradient. This vapor condenses into ice when the freezing point is reached. This phenomenon is called evaporation–condensation. It is also admitted that in the presence of pores, water diffusion is accelerated during freezing inside the product (Pham 2006). When fast freezing is applied, the product cools quickly, a high vapor pressure gradient occurs and the local high super-cooling leads to the formation of numerous ice nuclei with a small critical size. Furthermore, the fast freezing rate combined with the low temperature slows down water diffusion resulting in limited growth of nuclei and small ice crystals. Therefore, the diffusive phenomena are limited by the fast freezing rate and the microstructure of the sponge cake does not considerably evolve. On the contrary, during slow freezing, the product cooling is slow and the temperature gradient is low. The nucleation mechanism is limited, due to the high critical size necessary for stable nuclei. This reduces the number of initial ice crystals. At the same time, the low freezing rate favors crystal growth by water diffusion from the liquid phase to the crystal surface and the incorporation of water molecules to the crystal. Considering the thermal diffusivity of the air inside the pores that is much higher (nearly 10^{-5} m²/s) than the one of the sponge cake matrix (around 10^{-8} m²/s), water has more time to diffuse through the matrix and to evaporate inside the pores. Once the pores' surface reaches the freezing point, the water vapor inside the pores condenses at the pores' surface. Ice growth is favored over ice nucleation leading to a thick ice layer at the air–matrix interface.

The formation of ice at the pore walls have been already demonstrated by Baier-Schenk et al. (2005), who studied ice formation respectively during bread dough and wheat dough freezing. They noticed that ice formation and growth occurred preferentially in pores sites. Chen et al. (2012) studied ice crystal formation and distribution in wheat flour using DSC. They noticed

the presence of two endotherms on the DSC curve regardless of freezing rate. The authors admitted that the minor endotherm corresponds to the melting of ice in the small pores within the gluten-starch matrix and the major endotherm to the melting of ice in large pores.

Overall, the freezing rate has a significant impact on the texture of the product. Indeed, the formation of ice inside the pores and in the air–matrix interface can cause the deterioration of the starch granules and of the gluten network in the case of bread (Berglund et al. 1991, Gelinis et al. 1999, Zounis et al. 2002, Baier-Schenk et al. 2005, Baier-Schenk et al. 2005). These modifications are as important as the ice crystals are large, meaning that they are favored by slow freezing rates. The ruptured gluten network retains gas poorly, hence reducing the loaf volume. The water migration toward the ice crystals and to the crust also promotes the degelatinization of starch and increases the firmness of breadcrumb (Baik and Chinachoti 2000). Ice formation and growth can damage the pores or merge two adjacent small pores to create a greater one. This affects the microstructure of the sponge cake and hence reduces its quality.

V. Conclusions

In this research, a porous model food was analyzed to understand the impact of freezing rate on the microstructure evolution during freezing. Two imaging methods (X-ray μ -CT and cryo-SEM) were used in this study in order to visualize the microstructure of model sponge cake. A thermostated cell initially developed to study snow was placed on the ANATOMIX synchrotron beamline to analyze the model sponge cake sample at negative temperature and at high resolution. Both methods show the formation of ice at the air-matrix interface and inside the matrix but in different proportions. These results highlight the impact of freezing rate on ice formation and location:

- For fast freezing, 69% of the ice formed during freezing is formed inside the matrix with a homogeneous distribution of small ice crystals;
- For slow freezing, almost 60% of the ice present in the sample is formed at the air-matrix interface; thick ice layers are visible in the pores and the ice is heterogeneously distributed in size and location inside the starch matrix.

The obtained results are of considerable interest and may help to better understand the heat and mass transfer that occur during porous food freezing. Controlling the freezing rate is a key parameter to preserve food quality.

The proposed method and technique can be extended to study the impact of storage conditions on the microstructure evolution. It is important to mention that frozen foods undergo many changes during frozen storage due to storage duration and temperature fluctuations.

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle.

Synthèse

Article à soumettre dans *Journal of International Refrigeration* "Investigating the influence of freezing rate and frozen storage conditions on a model sponge cake using Synchrotron X-rays microtomography"

I. Objectif de l'étude

L'étude bibliographique menée en début de ce travail a démontré le besoin en connaissances sur l'impact combiné de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur la microstructure des produits poreux de type génoise. Ainsi, ce chapitre cherche à répondre à deux des questions scientifiques posées dans l'introduction de ce travail de thèse: (i) dans quelle mesure le procédé de congélation influe sur la microstructure développée en cours de stockage ? (ii) existe-t-il un effet synergique entre les mécanismes de cristallisation et de recristallisation dans les produits poreux de type génoise? Il s'inscrit dans la continuité du chapitre précédent couplant les deux vitesses de congélation précédemment étudiées à deux conditions différentes (avec et sans fluctuations de température) de stockage sur une durée de deux semaines pour étudier l'évolution de la microstructure cristalline de la génoise modèle par μ CT RX.

II. Matériels et méthodes

La génoise modèle étudiée est identique à celle présentée dans le chapitre 3. Comme dans le chapitre précédent, des échantillons de génoise ont ensuite été congelés à deux vitesses de congélation différentes : (i) une congélation rapide à $17\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ effectuée dans une armoire de surgélation et (ii) une congélation lente à $0.3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ effectuée dans un congélateur coffre. Ces échantillons ont été stockés pendant 0, 7 et 14 jours. Une première moitié de ces échantillons a été stockée dans des conditions stables à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et une deuxième moitié dans des conditions de températures fluctuantes à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 23h puis à $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1h chaque jour. L'ensemble de ces échantillons a ensuite été caractérisé à l'état congelé par μ CT RX à très haute résolution (0.65 micron/pixel) en utilisant la cellule cryogénique CellStat montée sur la ligne ANATOMIX du synchrotron SOLEIL. Les images 3D obtenues ont été seuillées afin de séparer les différentes phases contenues dans la génoise à savoir l'air, la glace (glace à l'intérieur et glace à l'extérieur de la matrice) et la matrice (amidon) afin de quantifier différents paramètres microstructuraux comme les fractions volumiques des différentes phases, les surfaces spécifiques et les épaisseurs locales de la glace.

III. Résultats

Les résultats concernant l'influence de la vitesse de congélation sur la microstructure initiale de la génoise congelée, i.e. avant stockage, ont déjà été présentés et discutés dans le chapitre précédent. Après congélation, les échantillons congelés rapidement et lentement ont été stockés dans deux conditions différentes (températures stables et fluctuantes) pendant deux semaines.

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

- En congélation rapide, les images 3D obtenues ont montré que la morphologie et la taille de la glace semblent évoluer avec le temps de stockage et que cette évolution est plus sensible pour une température de stockage stable que pour une température fluctuante. L'analyse quantitative des images 3D montre que la fraction volumique de la glace à l'intérieur de la matrice reste stable au cours du temps tandis que la SSA glace/amidon diminue. Ces résultats montrent un grossissement des cristaux, accompagné d'une conservation de la masse dans la matrice. Le phénomène de recristallisation peut expliquer la croissance des cristaux mais il semble se faire selon une redistribution locale de l'eau dans la matrice d'amidon et une quasi absence d'échange d'eau entre la matrice et les pores qui expliquerait la conservation de masse. Les résultats obtenus ont aussi montré que la croissance des cristaux de glace avec le temps de stockage est plus prononcée pour un stockage stable que pour des conditions de stockage fluctuantes. Ce résultat, qui n'est pas intuitif et contraire à ce qui est connu, peut être lié aux transferts de chaleur au sein de la génoise, notamment au sein de la matrice amidon, dont la température semble peu affectée au cours des fluctuations imposées. Ces fluctuations semblent avoir plus d'effet sur l'évolution de la glace à l'intérieur des pores, dont l'épaisseur augmente avec la durée de stockage, probablement par recristallisation selon un mécanisme de sublimation-diffusion-condensation.
- Dans le cas d'une congélation lente, les images 3D semblent montrer très peu d'évolution de la microstructure avec le temps de stockage pour les deux conditions de stockage. Cependant d'un point de vue quantitatif, les résultats obtenus montrent (i) une diminution de la fraction volumique de glace à l'intérieur de la matrice lorsque la durée de stockage augmente pour une température de stockage stable ou fluctuante, (ii) une diminution de la SSA glace/amidon avec le temps de stockage pour les deux conditions de stockage et, (iii) une augmentation de la SSA air/glace pour les deux conditions de stockage. Ces résultats reflètent à la fois la croissance des cristaux de glace à l'intérieur de la matrice d'amidon et l'augmentation de la surface de la couche de glace à l'interface des pores. Ces résultats peuvent s'expliquer par (i) une migration de l'eau de la matrice vers les pores où elle se dépose sur les cristaux de glace déjà présents (phénomène de sublimation-diffusion-condensation) ou par (ii) une redistribution locale de l'eau dans la matrice par des phénomènes de recristallisation conduisant à un grossissement des cristaux de glace. La redistribution locale à l'intérieur de la matrice d'amidon semble être plus importante lors d'un stockage à température stable tandis que la migration de l'eau de la matrice vers les pores semble prédominante dans le cas de conditions de stockage fluctuantes.

Si on s'intéresse maintenant aux effets couplés vitesse de congélation – condition de stockage, les résultats obtenus ont montré que la microstructure cristalline évolue quelle que soit la vitesse de congélation initiale et les conditions de conservation. Cependant, les changements de microstructure (croissance des cristaux de glace) sont plus importants lorsque les produits sont congelés lentement quelles que soient les conditions de stockage. Le couplage d'une congélation rapide avec de mauvaises conditions de stockage (températures fluctuantes) conduit à des cristaux de glace plus petits et une microstructure moins endommagée que la combinaison d'une congélation lente avec de bonnes conditions de stockage (températures

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

stables). Comme déjà évoqué, la croissance de la glace par recristallisation selon des mécanismes de redistribution locale de l'eau est favorisée dans les échantillons congelés rapidement tandis que la migration de l'eau s'ajoute à la redistribution locale dans les échantillons congelés lentement, expliquant les changements plus importants observés dans ces derniers. En outre, une congélation rapide mène à une population de cristaux plus homogène que celle obtenue par congélation lente. Cette homogénéité de tailles de cristaux de glace implique un système relativement stable d'un point de vue énergétique qui peut limiter la recristallisation et par conséquent expliquer les changements microstructuraux plus faibles lorsque la génoise est congelée rapidement. Selon les conditions utilisées dans cette étude, les avantages de la congélation rapide sont réduits à la fin de la période de stockage de deux semaines, mais les produits ont toujours une meilleure qualité que les échantillons congelés lentement.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous présentons pour la première fois, à notre connaissance, des résultats montrant l'effet combiné des conditions de congélation et de stockage sur l'évolution de la microstructure d'un produit alimentaire poreux. L'ensemble des résultats obtenus ont montré que la microstructure évolue quelle que soit la vitesse de congélation et les conditions de stockage (stable ou avec fluctuations). Ces évolutions se traduisent en général par un grossissement des cristaux de glaces présents dans la matrice d'amidon ou bien à la surface des pores, et sont plus marqués après une congélation lente. Ces changements résultent principalement de phénomènes de recristallisation par redistribution locale de l'eau dans la matrice dans le cas d'une congélation rapide, auxquels s'ajoute une migration locale de l'eau dans le cas d'une congélation lente. Ces résultats montrent l'importance des paramètres de la chaîne de froid sur la microstructure du produit, et par conséquent sur sa qualité finale.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre fait l'objet d'un projet d'article qui sera bientôt soumis dans **Journal of International Refrigeration** : « **Investigating the influence of freezing rate and frozen storage conditions on a model sponge cake using Synchrotron X-rays microtomography.** »

I. Introduction

Sponge cakes are used as a base product in the manufacture of a wide variety of desserts. To meet the high demand of the market, large quantities are produced, but sponge cakes have a limited shelf life due to physicochemical changes and microbial deterioration. Therefore, sponge cakes are frozen just after baking and stored until their distribution in retail stores where they are thawed and decorated. Freezing and frozen storage have the advantage to preserve the sponge cake quality and to extend their shelf life. However, the evolution of the microstructure (pore and ice crystal size and morphology) subsequent to the formation and growth of ice crystals could induce physicochemical changes that could impair the sponge cake quality.

During freezing, the temperature of the product is lowered and water is transformed into ice crystals thanks to crystallization (nucleation and ice crystal growth). The freezing rate controls the crystallization mechanism which consequently determines the ice crystal number, size and distribution through the matrix. Many authors reported that fast freezing leads to the formation of a large amount of small ice crystals evenly distributed in the matrix. Unlike fast freezing, slow freezing leads to the formation of bigger ice crystals that can damage the microstructure of the food (Mousavi et al. 2005, Ban et al. 2016, Mulot et al. 2019). In the case of porous food, a recent study performed on model sponge cake has shown that fast freezing leads to the formation of the majority of ice inside the matrix while slow freezing results in ice mostly formed at the pore surface (Zennoune et al. 2021).

In subsequent frozen storage, the microstructure of frozen food continues to evolve especially for long term storage. This evolution is due to ice recrystallization: the system tends naturally to lower the surface free energy of the whole ice phase by ice crystal resizing and redistribution. Larger and shape-regular ice crystals, which are thermodynamically more stable are favored at the expense of small and shape-irregular ice crystals. This leads to an increase of the average size of ice crystals and to a decrease of their number (Donhowe and Hartel 1996, Hartel 1998, Hagiwara et al. 2006). Several recrystallization mechanisms were identified. Among them, migratory recrystallization also named Ostwald ripening is recognized as one of the most prominent in frozen foods. Ostwald ripening is characterized by the gradual detachment of water molecules from the surface of smaller ice crystals, followed by water molecules diffusion and redeposition onto large ice crystals. Consequently, small ice crystals tend to disappear while larger ones become bigger (Pronk et al. 2005). Others recrystallization mechanisms that can take place in frozen foods are isomass recrystallization (rounding of edges and sharp features of ice crystals with irregular shape to minimize their surface free energy) and accretive recrystallization (merging of two crystal in close proximity to form one large crystal). Isomass recrystallization results in crystals with more regular shape while keeping their number. Accretive recrystallization leads to an increase of ice crystal size and a reduction of ice crystal number, like migratory recrystallization (Hartel, 2018). Ice recrystallization occurs slowly during long-term frozen storage at constant temperature but is greatly enhanced by temperature fluctuations as it is often encountered in

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

the cold chain. Therefore, it is of great importance to properly control the temperature during storage and distribution in order to maintain the quality of the frozen products and to minimize product losses.

In porous foods, the presence of air influences to a large extent the crystallization and recrystallization phenomena. Indeed, freezing and frozen storage involve simultaneously heat and water transfer, which are highly related to pore number, size, connectivity and surface. Pham (2006) reported in his review that mass diffusion is accelerated by the presence of pores. During freezing, conductive heat transfer is driven by the temperature gradient between the cold surface and the product core and diffusive water transfer by the water vapor pressure gradient between the surrounding air and the product surface. When porous foods are frozen, these gradients are also created at the pore scale resulting in water diffusion from the matrix towards the pores where water evaporates. Once the freezing point is reached, the supersaturated water vapor condenses into ice at the pore surface while liquid water crystallizes mainly into the matrix. This phenomenon is commonly called evapo-condensation (Pham 2006). This mechanism is in line with the recent findings of Zennoune et al. (2021) who reported ice formation in both pores and matrix during model sponge cake freezing. Formation of ice crystals is accompanied by both volumetric expansion and sponge cake dehydration that may alter the porous microstructure, which is highly related to the product quality.

During frozen storage of porous foods, concomitant heat and water transfers still occur. It is mainly characterized by recrystallization phenomena (Ostwald ripening) where both melting diffusion-refreezing for the liquid phase and sublimation diffusion-condensation for the vapor phase take place in the matrix and in the pores, respectively. It results in ice crystal growth and further microstructural changes that may ultimately deteriorate the product quality. It is obvious that the final quality of the frozen product is related to the coupling of both freezing and frozen storage processes. Even though the close relationship between porous/crystalline microstructural changes and the quality of frozen porous products was established (Bárcenas et al. 2004, Baier-Schenk et al. 2005, Yi and Kerr 2009, Díaz-Ramírez et al. 2016), a detailed understanding of the mechanisms implemented at pore and ice crystal scale during a combined freezing and frozen storage process is still needed. The rare studies reported in the literature have focused on either freezing (Lucas et al. 2005, Chen et al. 2012) or frozen storage (Chen et al. 2013, Eckardt et al. 2013). Furthermore, these studies were devoted to bread. Silvas-García et al. (2014) have investigated the coupled effect of freezing rate and storage time on bread dough stability and bread quality without characterizing the microstructure. To our knowledge, the literature does not report any study describing the combined effect of freezing and frozen storage on the microstructural changes of porous foods and particularly of sponge cake. Very few works were conducted on frozen sponge cake (Díaz-Ramírez et al. 2016, Van Bockstaele et al. 2021, Zennoune et al. 2021). Díaz-Ramírez et al. (2016) have shown a correlation between microstructure changes and quality attributes of sponge cake stored at -23°C during 6 months. Recently, Van Bockstaele et al. (2021) have rather investigated sensory and textural properties of frozen sponge cake stored at short-term

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

period. The first work investigating the effect of freezing rate on porous and crystalline microstructure of frozen sponge cake was reported by Zennoune et al. (2021). The authors succeeded in characterizing the evolution of pores and ice crystals in a model sponge cake using Synchrotron X-ray microtomography on products at frozen state.

Imaging methods could be useful and reliable for the assessment and understanding of the microstructure of frozen products. Microscopy has long been the most commonly used technique to visualize the effect of freezing and frozen storage on the structure of food products (Bevilacqua et al. 1979, Esselink et al. 2003, Baier-Schenk et al. 2005, Vicent et al. 2019). It includes light microscopy, which requires a very thin sample of the food product and several preliminary chemical preparation steps (fixing, coating, staining) in order to enhance the contrast (Alizadeh et al. 2007, Anese et al. 2013). Transmission and scanning electron microscopy offer higher resolution than light microscopy but also require intensive sample preparation such as freeze-drying for contrast enhancement. These preliminary preparation steps are tedious and likely to alter the microstructure of the product resulting in measurement artefacts. More reliable results can be obtained using cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM), which involves less cumbersome and damaging preparation steps (Chassagne-Berces et al. 2009, Mulot et al. 2019). Cryo-SEM was used to study porous foods like bread dough and bread (Bárceñas and Rosell 2006) and model sponge cake (Zennoune et al. 2021). However all these microscopy methods provide 2D images which depend on the selected cutting plan. In addition, these 2D images do not afford sufficiently quantitative information that are representative of the entire volume of the product studied.

3D imaging techniques such as X-ray micro-computed tomography (X-ray μ -CT) can overcome these limitations. X-ray μ -CT is a reliable method based on the measurement of the X-rays attenuation which depends on the material characteristics (density, thickness and atomic number). The technique has become of interest and is increasingly used to visualize and quantify the characteristics of frozen food products (Mousavi et al. 2005, Ullah et al. 2014, Vicent et al. 2016, Mulot et al. 2019, Masselot et al. 2021). However, most of the studies have focused on the visualization of frozen foods at ambient temperature after freeze-drying (Mousavi et al. 2007, van Dalen et al. 2013, Kobayashi et al. 2014, Zhao and Takhar 2017). These studies assumed that voids created after freeze-drying represent ice crystals. But, freeze-drying may imply shrinkage, which is likely to modify the microstructure, resulting in inconclusive results (Voda et al. 2012). Freeze-drying could be avoided when the product is scanned at frozen state. This is possible when using a cooling stage, as illustrated by several works on frozen food products (van Dalen et al. 2009, Pinzer et al. 2012, Medebacha et al. 2013, Vicent et al. 2017, Mulot 2019, Vicent et al. 2019, Masselot et al. 2021), and other porous frozen products as snow (Calonne et al. 2014, Calonne et al. 2015) or ice particles (Haffar et al. 2021, Haffar et al. 2022). In this way, the non-invasive and non-destructive nature of the X-ray μ -CT method can be fully claimed. However, these works were performed using laboratory scale X-ray μ -CT, which cannot always offer sufficiently contrasted images and high resolution for a category of products such as sponge cake. Indeed, sponge cake has a complex microstructure comprising both macropores and micropores requiring high

resolution for a consistent and complete characterization. Recently, Zennoune et al. (2021) studied the effect of freezing rate on the microstructure of a frozen model-based sponge cake. The authors used a thermostated cell (CellStat) (Calonne et al. 2014) with a synchrotron beamline (ANATOMIX, Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France (Weitkamp et al. 2017)). They demonstrated that the use of synchrotron can greatly enhance the visibility and discrimination of low contrasted materials in addition to high resolution, allowing to detect better small features (ice crystals and micropores).

This paper aims to study the combined impact of freezing rate and frozen storage conditions on the microstructure of a model sponge cake using X-ray μ CT at high spatial resolution. The samples were frozen at two different freezing rates and each of them were stored for two weeks at two different conditions (with and without temperature fluctuations). The model sponge cake samples were scanned using the ANATOMIX synchrotron beamline coupled with the thermostated cell CellStat to allow observation at frozen state. The three phases (air, ice and cake matrix) of the frozen samples were segmented using an image processing method previously developed by Zennoune et al. (2021). The coupled effect of freezing rate and frozen storage was then discussed based on volume fractions of each phase, ice local thickness, ice location and shape characterizations.

II. Materials and methods

II.1. Sponge cake preparation, sampling and freezing

The model sponge cake was prepared using the formulation developed by Bousquières (2017) as described by Zennoune et al. (2021). The main ingredients are:

- Native corn starch (Cargill, Minneapolis, MN, USA): 36.55 % (water content about 11%);
- Methylcellulose (MC) (Dow Chemical, Midland, MI, USA), type SGA7C, 0.46 %;
- Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (Dow Chemical, Midland, MI, USA), type K250M: 0.35 %;
- Ultrapure water: 62.64 %.

Aluminum molds ($10 \times 6 \times 3$ cm³) were filled with 60 g of dough and then baked in an electric oven (Whirlpool, Benton, IL, USA) for 30 min at 170 °C. After baking, the sponge cakes were left at room temperature for 45 min before being wrapped in waterproof plastic bags and sealed to be stored in a refrigerator at 5 °C until the sampling step.

For the imaging experiments, cubic samples (of 6 mm side) were cut in the crumb and placed in sample holders made with polymethyl methacrylate (PMMA) and copper (Figure 50) before freezing and storage. This sampling was performed in a thermo-hygrosopic chamber at 20 °C and 80% of relative humidity to avoid sponge cake dehydration during handling.

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

The prepared samples, mounted on their sample-holders, were frozen in the lab (FRISE, INRAE, Antony, France), before the imaging experiments, at two different freezing rates:

- Fast freezing (17.2 °C min^{-1}) using an air blast freezer,
- Slow freezing (0.3 °C min^{-1}) using a static chest freezer

II.2. Frozen storage conditions and analysis time points

For both freezing conditions (see Table 13), the frozen samples were stored under two thermal conditions, before the imaging experiments:

- Stable storage at $-20 \pm 0.1\text{ °C}$: using a static chest freezer equipped with an electronic temperature controller with one set point (Eliwell WM961, Villeneuve la Garenne, France). The samples were placed into a 3 cm thick expanded polystyrene box for insulation in order to attenuate the temperature fluctuations related to the on/off operation of the refrigeration system.
- Fluctuating storage between $-20 \pm 0.1\text{ °C}$ and $-5 \pm 0.01\text{ °C}$: using two different static chest freezers. The samples were held during 23 hours in the first freezer, set at $-20 \pm 0.1\text{ °C}$ and then moved to the second freezer set at $-5 \pm 0.01\text{ °C}$ for 1 hour each day during a two-week storage duration. The fluctuating storage temperature is schematized in Figure 48.

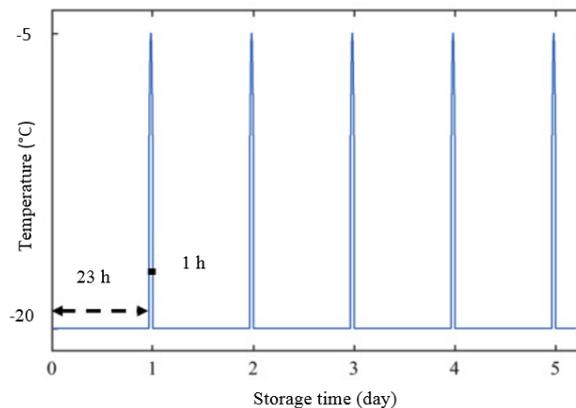


Figure 48 : Schematic representation of the dynamic change of storage temperatures.

The stable storage temperature condition intends to reproduce perfectly controlled storage conditions of frozen foods in a cold room or in a freezer with no door opening. By contrast, the fluctuating storage was designed to make it possible to study the effect of poor practices that can be encountered through the cold chain. At -5 °C , the sponge cake is still in the phase change plateau as can be seen in the freezing curve shown in Figure 49 and is likely to melt partially. Consequently, the scenario of dynamic change of storage temperature between -20 °C and -5 °C may allow to accelerate moisture migration and ice redistribution (Vicent et al. 2019).

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

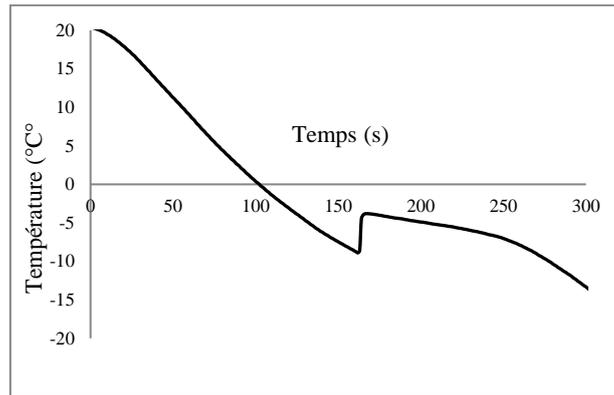


Figure 49 : Core temperature kinetic during sponge cake freezing.

As summarized in Table 14, combining the two freezing rates and the two storage conditions give rise to four different thermal history scenarios. Three analysis time points were set: just after freezing (T0), after 7 days of storage (T7) and after 14 days of storage (T14). Analysis at T0 were performed for each freezing rate. Four replicates were performed for each scenario and each analysis time point, corresponding to a total of 40 samples as shown in Table 14.

Table 14: Number of analyzed samples per condition.

Duration (days)	Fast freezing at 17.2 °C min ⁻¹		Slow freezing at 0.3 °C min ⁻¹	
	Stable storage at -20°C	Fluctuating storage between -20°C and -5°C	Stable storage at -20°C	Fluctuating storage between -20°C and -5°C
T14	4	4	4	4
T7	4	4	4	4
T0	4		4	

II.3. Thermo-physical properties of the model sponge cake

The thermo-physical properties of the model sponge cake are summarized in Table 15. All the properties were determined as described by Zennoune et al. (2021). The authors have verified the reproducibility of the model sponge cake based on its thermo-physical properties (porosity, density and water content). They reported that the sponge cake prepared in this way, can be considered as a model product that represents porous products.

Table 15: Sponge cake thermo-physical properties.

Sponge cake apparent density (kg/m ³)	Porosity (%)	Water content (%)	Freezing point (°C)	Freezable water content (%)
392 ± 15	56 ± 2	60 ± 1.5	- 0.52 ± 0.09	44 ± 5.3

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

The porosity of the sponge cake before freezing was calculated based on the density values (apparent density and batter theoretical density without air, which was found to be equal to 899 kg/m^3) as explained by Zennoune et al. (2021). The mean value of 56 % is close to that found by Roca et al. (2006), where porosities were between 52 % and 86 %. One must keep in mind that porosity of a sample is the combination of the bakery process and the randomness of the sampling. During baking, sponge cake dough containing initially 75 % of water loses nearly 20 % of its moisture content. Indeed, the water content measured after baking was about 60%, but the freezable water was about 44 % as shown by DSC measurements (Zennoune et al. 2021)..

II.4. Synchrotron X-ray micro-tomography imaging acquisition and processing

II.4.1. The Thermostated Cell

The thermostated cell CellStat, initially developed for snow (Calonne et al. 2014, Haffar et al. 2021) was used to analyze the frozen microstructure of model sponge cake samples under the Synchrotron X-ray μ CT environment constraints (Figure 50). It helps to maintain the sample at the frozen state thanks to (i) a Peltier module, set at a temperature of $-36 \text{ }^\circ\text{C}$, on which the copper sample holder is placed, (ii) to a continuous dry and cold air circulation around the sample and (iii) to a heat exchanger for heat dissipation at the warm side of the Peltier module. Additional details are available in the works of Haffar et al. (2021) and (Zennoune et al. 2021). The samples were stored in a freezer, which was set at $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ and placed close to the experimental setup, thus ensuring nearly constant thermal conditions.

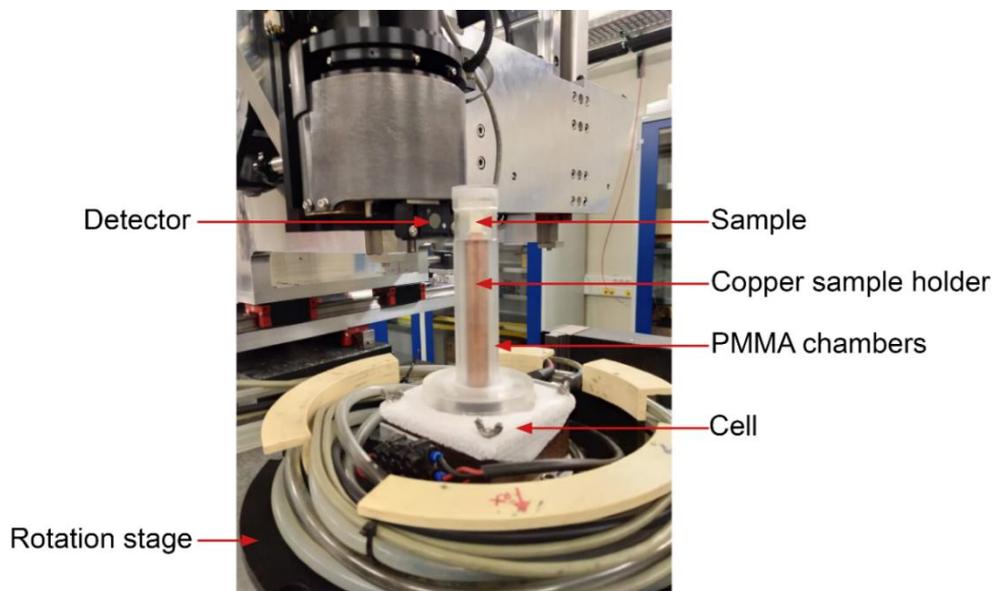


Figure 50 : CellStat installed on the ANATOMIX Beamline (Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France).

II.4.2. 3D Image acquisition

The X-ray microtomography acquisition was carried out at the beamline ANATOMIX of the Synchrotron SOLEIL (France) during three days. The system operation conditions were

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

optimized as previously described by Zennoune et al. (2021) in order to have a good contrast between the sponge cake constituents at the voxel size of $0.65 \mu\text{m}$. A filtered polychromatic “white” beam was used with an energy peak of 30 keV and a sample to detector distance of about 30 mm. Finally, 2000 projections were taken over a 180° rotation for a total scanning time of about 5 min. For each sample, four scans were acquired at different heights giving a total scan height of 5 mm for a diameter of about 1.3 mm. Figure 51 shows the typical reconstructed slices of an unfrozen sample (Figure 51A) and a frozen sample (Figure 51B). In that second case, the three components or phases, i.e. air (in black), ice (in grey) and starch (in light grey), are clearly visible.

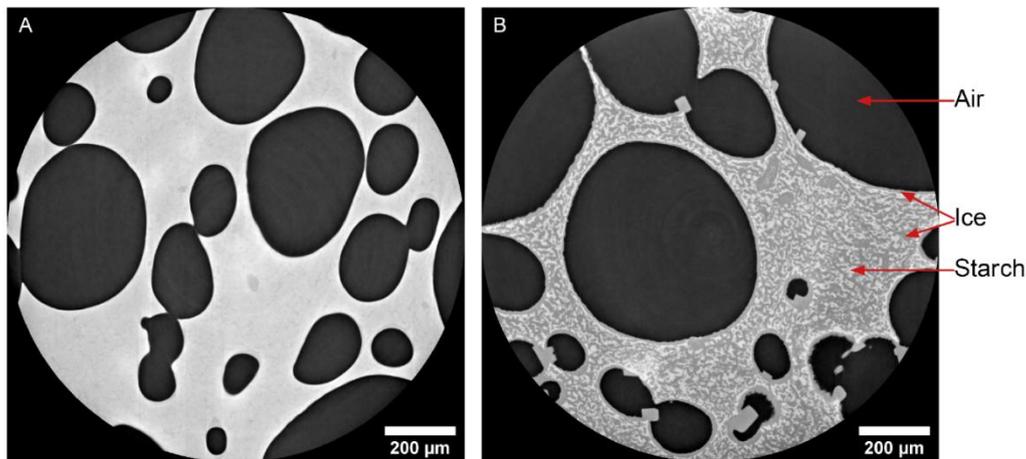


Figure 51: X-ray μCT slices of (A) unfrozen and (B) frozen model sponge cake samples.

II.4.3. Image processing

Images were processed according to the methodology described by Zennoune et al. (2021). Firstly, the 3D volumes of size $2048 \times 2048 \times 2048$ vx (corresponding to $1.3 \times 1.3 \times 1.3 \text{ mm}^3$) were first reconstructed with PyHST2 software using the phase contrast enhancement (Paganin et al. 2002). The images were then segmented using the procedure resumed in Figure 52. It is based on the global grey level threshold of the 3 phases (air, ice, starch) thanks to the good X-ray attenuation contrast between the constituents. This segmentation is followed by a combination of morphological and logical operations to distinguish:

- The ice volume which is mainly at the air interface (called “ice outside” the matrix)
- The ice volume which is mainly blended with the starch phase (called “ice inside” the matrix).

The result of the procedure is then a labeled 3D image as depicted in Figure 52, which can be used to compute microstructural descriptors.

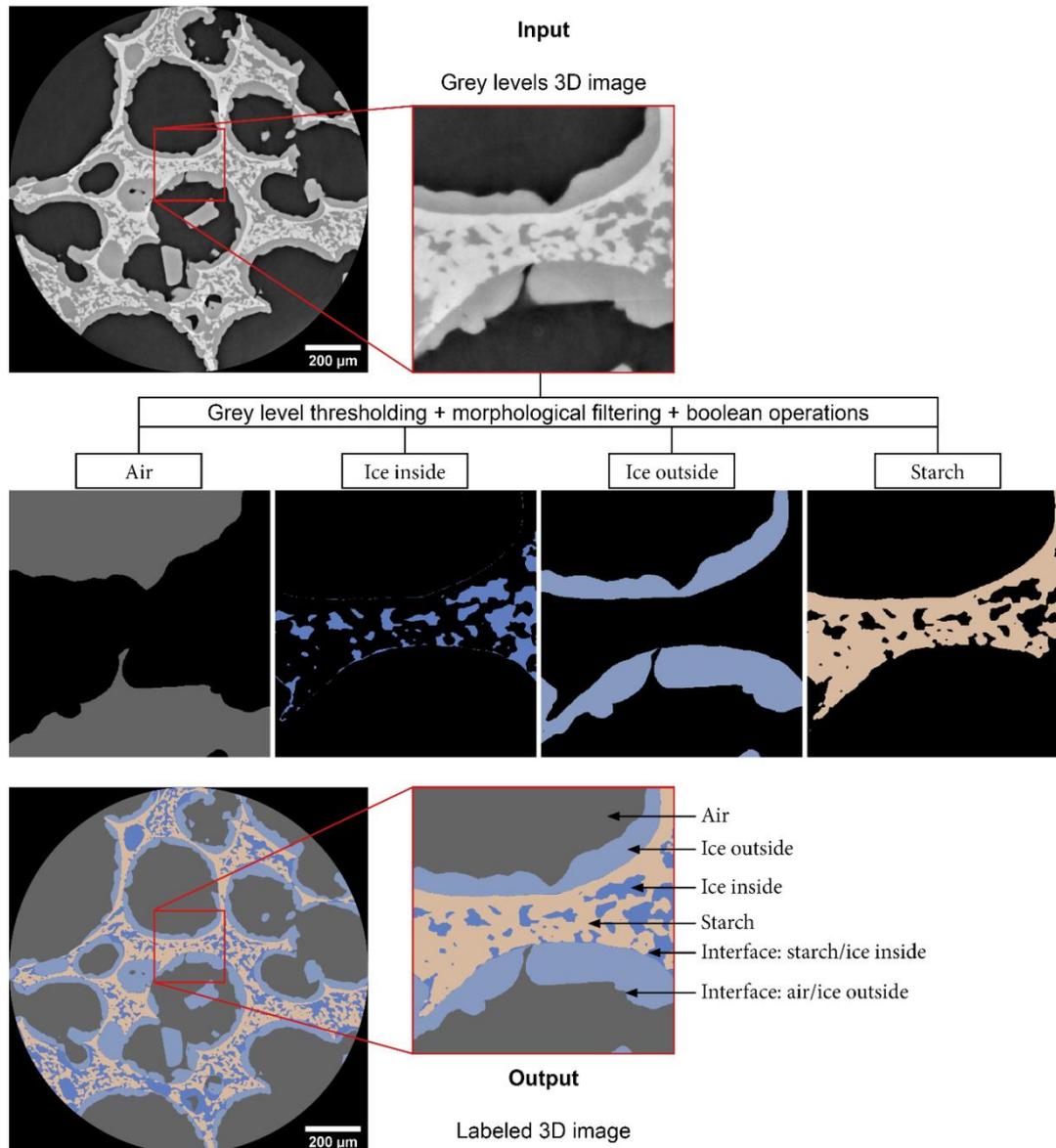


Figure 52: Image segmentation procedure.

II.4.4. Microstructural description

To describe the microstructure of the different samples, the following parameters were computed from 3D labeled images:

- The air volume fraction or porosity :

$$\varphi_{Air} = \frac{V_{air}}{V_{total}} \quad (24)$$

where $V_{total} = V_{air} + V_{ice} + V_{starch}$ is the total analyzed volume, V_{air} , $V_{ice} = V_{ice\ inside} + V_{ice\ outside}$ and V_{starch} are the volumes of air, ice, ice inside and outside the matrix, and starch, respectively. They are calculated using a classical voxel counting algorithm.

- The ice fraction in the solid phase (without the air),

$$\varphi_{Ice} = \frac{V_{ice}}{V_{ice} + V_{starch}} \quad (25)$$

- The volume fraction of the ice inside ,

$$\varphi_{Ice\ inside} = \frac{V_{ice\ inside}}{V_{ice} + V_{starch}} \quad (26)$$

- The specific surface area (SSA) of the ice/air interface, defined as

$$SSA_{ice/air} = \frac{S_{ice/air}}{V_{total}} \quad (27)$$

where $S_{ice/air}$ is the surface area of the air/ice interface (Figure 52) and is computed using the dedicated *air/ice* tool in (Legland et al. 2016).

- The specific surface area (SSA) of the ice/starch interface, defined as

$$SSA_{ice/starch} = \frac{S_{ice/starch}}{V_{total}} \quad (28)$$

where $S_{ice/starch}$ is the surface area of the air/starch interface (Figure 52).

- The local thickness distributions of ice inside and outside the matrix (Schindelin et al. 2012). It represents the diameter of the largest sphere at a given point that can fit inside the object and containing the given point. It depicts the characteristic dimensions of the ice phases (inside and outside).

II.4.5. Statistical analysis

A statistical analysis (ANOVA) was performed to study the significance of the combined effect of freezing rate and frozen storage conditions on model sponge cake microstructure evolution during freezing and storage. The Tukey Kramer test for multiple range comparisons ($p < 0.05$) was used to identify the difference between the measured mean values for volume fractions and SSA.

III. Results

III.1. Qualitative analysis

Figure 53 presents synchrotron X-ray microtomography images (horizontal slices) of the model sponge cake (air in grey, ice outside the matrix in light blue, ice inside the matrix in dark blue and starch in brown) obtained after fast freezing (Figure 53A) and slow freezing (Figure 53B). It shows typical microstructure evolution of model sponge cake with storage duration for the four storage scenarios applied (fast freezing/stable storage, fast freezing/fluctuation storage, slow freezing/stable storage; slow freezing/fluctuating storage).

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

III.1.1. Initial state T0

Figures 53A1 and 53B1 describes microstructures obtained just after freezing (T0) at fast and slow freezing, respectively. It can be seen that:

- Fast freezing leads to small ice objects homogeneously distributed inside the matrix and a thin layer of ice that is formed at the air interface;
- Slow freezing leads to a thick ice layer at the air interface and larger ice objects heterogeneously distributed inside the matrix.

The physical phenomena that led to such microstructure were explained by Zennoune et al. (2021). Both nucleation and ice crystal growth are controlled by the freezing rate through heat transfer (thermal resistance) and moisture transfer (freezable water diffusion). In addition, the high porosity of the model sponge cake affects water mobility and ice distribution during freezing. On one hand, the fast freezing rate favors the creation of ice nuclei with low critical size but limits the water diffusion for ice crystal growth and towards the pores, leading thus to the formation of numerous small ice crystals, especially inside the matrix. On the other hand, during slow freezing, the nucleation phenomenon is limited due to the high critical size of nuclei, but water has enough time to diffuse through the matrix and towards the pores, resulting in fewer large ice crystals inside the matrix and a thick ice layer at the pores walls.

III.1.2. Effect of storage conditions

In the case of fast freezing, Figures 53 A1-3 show the typical microstructures of samples after 0, 7 and 14 days of stable storage, respectively. Figures 53A5-6 show typical microstructures obtained in the fluctuating storage conditions for 7 and 14 days of storage duration, respectively. The comparison between these figures shows that:

- The ice and starch objects are coarser at T7 and T14 than at T0 for both stable and fluctuating storage conditions
- The ice layer at the air/matrix interface is thicker at T7 and T14 than at T0,
- There are no visible significant differences of the microstructure between stable and fluctuating storage

In the case of slow freezing, Figures 53B1-5 bring the following comments:

- The ice and starch object are coarser at T7 and T14 than at T0 for both stable and fluctuating storage conditions
- The ice layer at the air/matrix interface is slightly thicker at T7 than at T0 and T14,
- Visually, there are no significant differences of the microstructure between stable and fluctuating storage.

All these results could be explained by ice redistribution and water migration during storage as it will be discussed in section IV. However, it is worth noting that the qualitative analysis requires a complementary quantitative characterization in order to establish reliable conclusions.

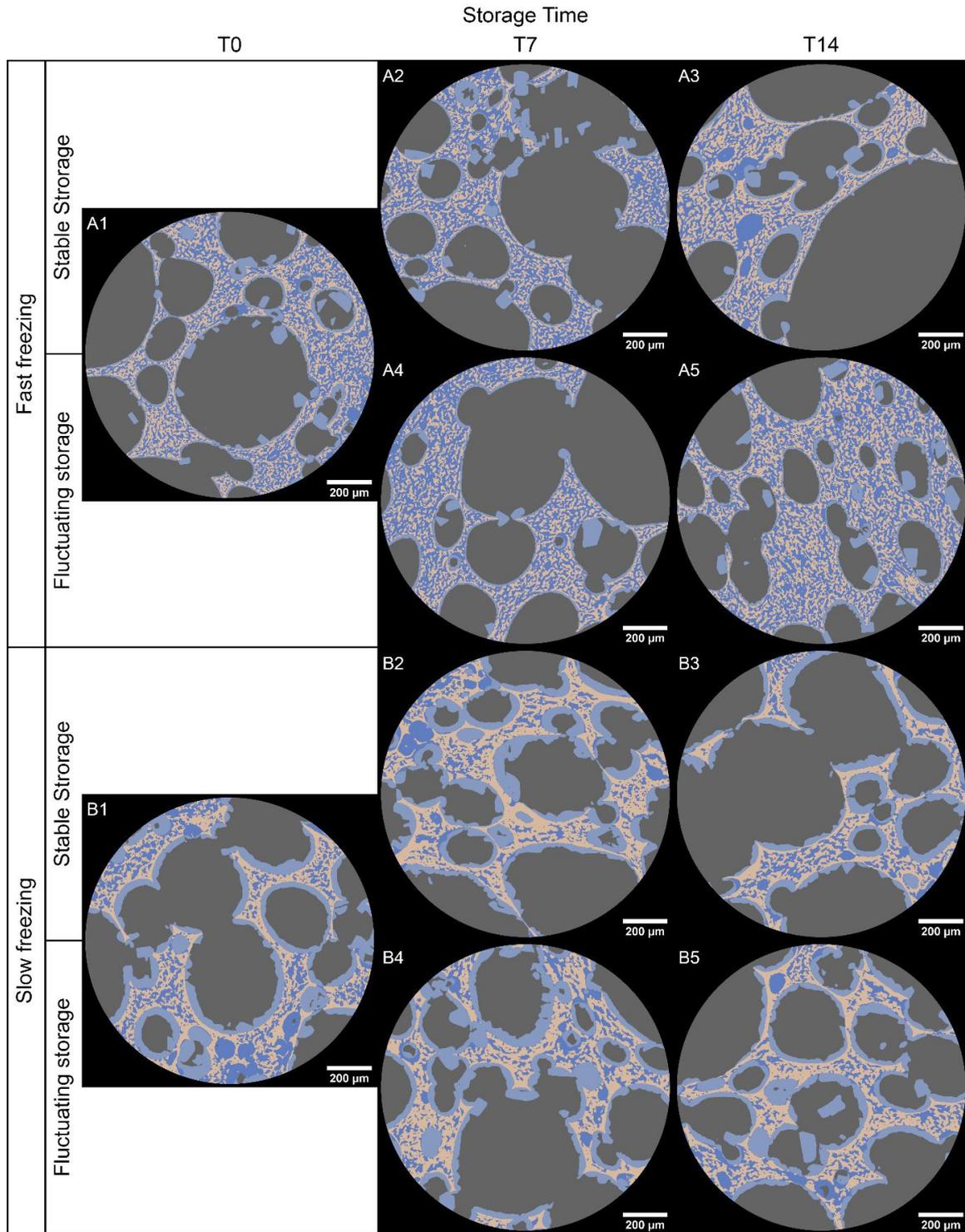


Figure 53: Synchrotron X-ray μ CT slices of the labeled 3D images of the frozen sponge cake samples.

III.2. Quantitative analysis

Table 15 and 16 summarized the volume fractions and SSA values computed from the 3D images, respectively, for the different conditions. These results are also plotted on the Figures 54 and 55. Figure 56 presents the local thickness distribution of ice for the different storage

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

conditions. The standard deviations of the distributions, represented by the shaded areas in Figure 56, are getting wider with the storage duration. This may represent an increasing heterogeneity between and within the samples with increasing storage duration.

Overall, table 16 shows significant differences ($p < 0.05$) between air volume fractions according to freezing rate, storage condition and storage duration. This can be related to the evolution of the ice layer or ice crystals dimensions at the pore interface. Nevertheless, $SSA_{ice/air}$ values displayed in Table 17 rather increase showing an increase of the ice layer size in the pores. This increase in size should result in a decrease of the air volume fraction with the storage time, contrary to what can be seen in Table 16. Another explanation may be local heterogeneity of the initial porosity of the sample as shown by Zennoune et al. (2021). Indeed, the authors reported that the model sponge cake has a multiple scale porosity that is heterogeneously distributed, making the sample porosity greatly dependent on the sampling location. Nevertheless, it is noteworthy that the air volume fractions obtained by image analysis and presented in Table 17 are in line with the porosity value ($56 \pm 2 \%$) determined by experimental measurements.

Table 16: Mean volume fraction of the different phases (air, ice and ice inside) for different conditions.

Storage conditions	Duration	Fast freezing			Slow freezing		
		Air	Ice	Ice inside	Air	Ice	Ice inside
/	0	61 ± 3^a	61 ± 0.1^a	43 ± 1^a	54 ± 2^a	63 ± 0.1^a	24 ± 0.1^a
Stable storage	7	59 ± 7^b	62 ± 0.2^a	41 ± 2^a	62 ± 2^b	63 ± 0.2^a	24 ± 5^b
	14	64 ± 3^c	62 ± 0.1^a	42 ± 2^a	66 ± 4^c	63 ± 0.2^a	21 ± 1^c
Fluctuating storage	7	62 ± 2^d	61 ± 0.1^a	42 ± 0^a	53 ± 4^d	64 ± 1^a	27 ± 3^d
	14	64 ± 4^e	62 ± 0.2^a	41 ± 1^a	62 ± 3^e	64 ± 0.1^a	21 ± 0.1^e

For each column, different letters indicate significant differences between values within a single column, $p < 0.05$

Table 17: Specific Surface Area (mm^{-1}).

Storage conditions	Duration	Fast freezing		Slow freezing	
		$SSA_{air/ice}$	$SSA_{ice/starch}$	$SSA_{air/ice}$	$SSA_{ice/starch}$
/	0	8.0 ± 0.7^a	50.0 ± 8.4^a	7.7 ± 0.9^a	27.0 ± 2.6^a
Stable storage	7	8.6 ± 2.1^b	45.2 ± 12.9^b	8.5 ± 2.9^b	23.4 ± 6.1^b
	14	7.4 ± 1.5^c	38.6 ± 8.2^c	8.0 ± 1.7^c	18.6 ± 4.7^c
Fluctuating storage	7	8.4 ± 0.4^d	48.5 ± 5.3^e	7.7 ± 0.7^d	26.6 ± 1.7^d
	14	8.9 ± 0.9^e	46.3 ± 4.9^f	8.7 ± 0.4^e	21.2 ± 3.9^e

For each column, different letters indicate significant differences between values within a single column, $p < 0.05$

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

On the other hand, a significant difference for the air/ice and ice/starch SSA values is shown in Table 17, showing microstructure evolution and ice redistribution during frozen storage.

For the fast freezing samples:

- Table 17 and Figure 55A1 show that the $SSA_{air/ice}$ exhibit values between 7.4 mm^{-1} (stable storage - T14) and 8.9 mm^{-1} (fluctuating storage - T14). In the case of a fluctuating storage the $SSA_{air/ice}$ increases significantly with the storage duration. This increase of the $SSA_{air/ice}$ can be due to an increase of the roughness of the ice layer induced by the ice crystal resizing and/or redistribution at the air/ice interface. This seems to be confirmed by the evolution of the local thickness of the ice outside presented in Figure 56. Indeed, we can observe on Figures 56 A2, B2 and C2, in the case of a fluctuating storage, that the local thickness of the ice outside increases with the storage duration: the local thickness of 99% of ice is below $47 \mu\text{m}$, $63 \mu\text{m}$ and $70 \mu\text{m}$ at time T0, T7 and T14, respectively. By contrast, in the case of a stable storage, the $SSA_{air/ice}$ decreases with the storage duration, which is consistent with the local thickness evolution (Figures 56 A2, B2 and C2).
- The $SSA_{ice/starch}$ ranges between 50 mm^{-1} (for T0) and 38.6 mm^{-1} (stable storage - T14) (see Table 17 and Figure 55B). The $SSA_{ice/starch}$ values tend to decrease with the storage duration regardless the storage conditions: stable or fluctuating. This decrease, which is more pronounced in the case of the stable condition, reflects probably a growth of the ice crystals. Indeed, in the case of a stable storage Figures 56 A1, B1 and C1 show that the local thickness of the ice inside is below $30 \mu\text{m}$ for 99.9% and for 95.5% of the ice volume at T0 and T14 respectively. These results confirm a slight increase of the dimensions of the ice within the matrix. Water migration towards pores is less likely to explain the decrease of $SSA_{ice/starch}$ because ice volume fractions of ice
- inside the matrix remain constant during storage, for both stable and fluctuating conditions (Table 16).

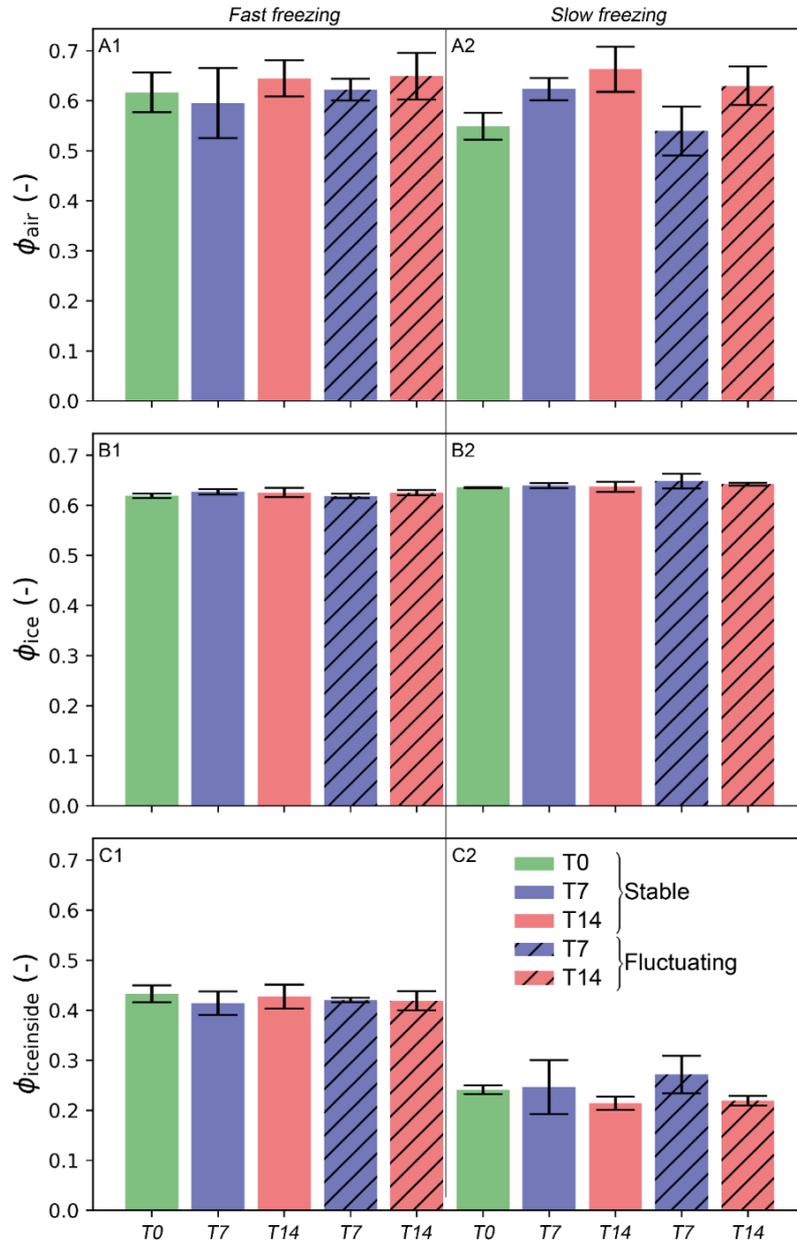


Figure 54: Volume fractions of (A) air, (B) ice and (C) ice inside the matrix. (A1,B1,C1) for samples obtained in the fast freezing conditions; (A2,B2,C2) for samples obtained in the slow freezing conditions.

For slow freezing samples:

- The $SSA_{air/ice}$ ranges between 7.7 mm^{-1} (stable storage - T14) and 8.7 mm^{-1} (fluctuating storage - T14) (see Table 17 and Figure 55 A2). As for the fast freezing samples, the $SSA_{air/ice}$ decreases with the storage duration in the case of a storage with temperature fluctuations and slightly increases in the case of a stable temperature storage.
- The $SSA_{ice/starch}$ values varie between 27 mm^{-1} (for T0) and 18.1 mm^{-1} (stable storage - T14). (see Table 17 and Figure 55 B2). As for the fast freezing samples, the $SSA_{ice/starch}$ values tend to decrease with the storage duration whatever the storage

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

conditions. This decrease is, once again, more pronounced in the case of the stable condition and corresponds to an increase of the ice crystals size, even if this increase is not well marked on the local thickness values in Figure 56 A1, B1 and C1.

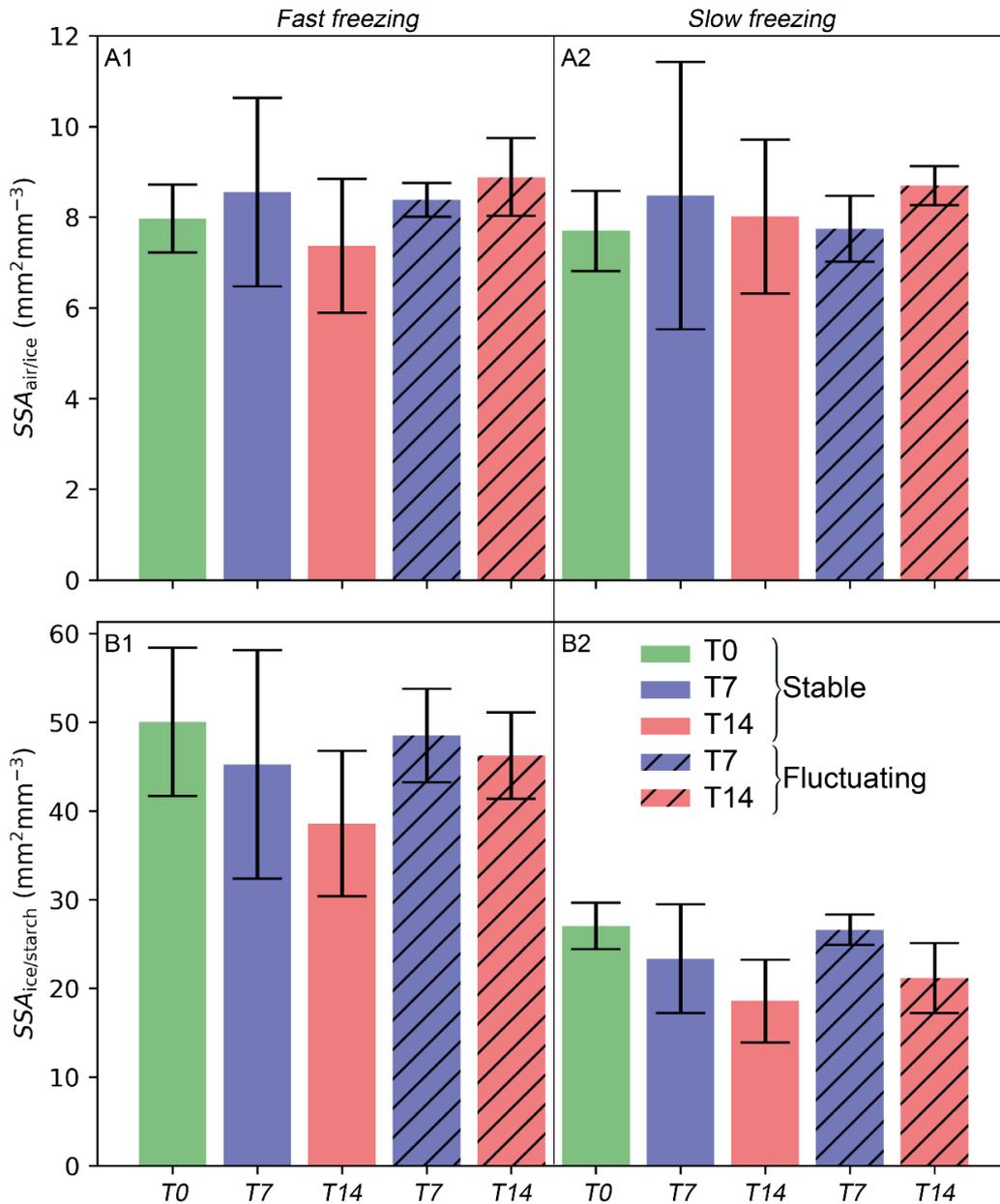


Figure 55: (A) Specific Surface Area of the air/ice interface $SSA_{air/ice}$ (B) Specific Surface Area of the ice/starch interface $SSA_{ice/starch}$. (A1,B1) for samples obtained in the fast freezing conditions and (A2,B2) for samples obtained in the slow freezing conditions.

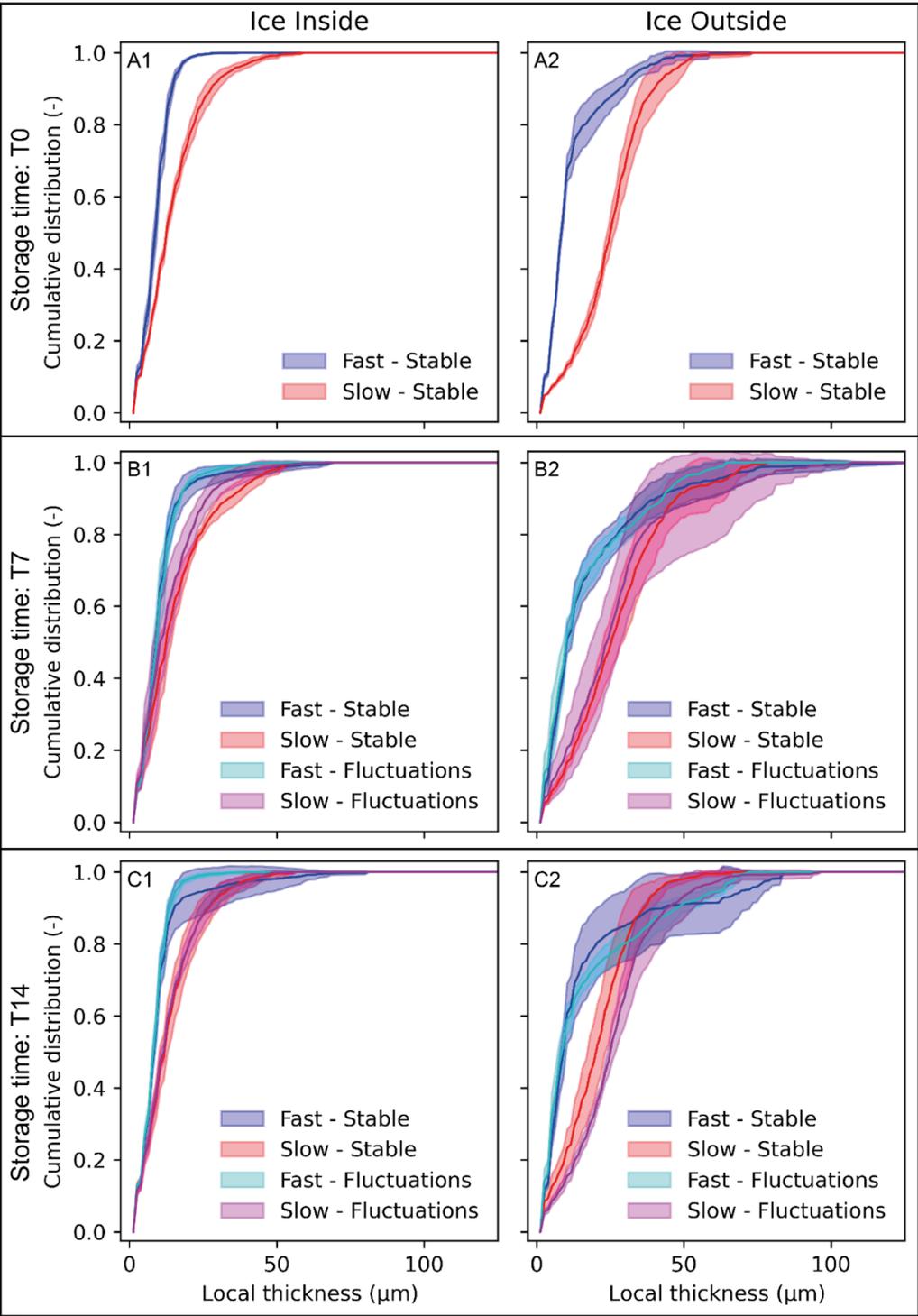


Figure 56 : Cumulative distribution of local thickness of (1) ice inside the matrix and (2) ice outside the matrix after (A) freezing, (B) 7 days of storage and (C) 14 days of storage, both for stable and fluctuating storage temperatures.

IV. Discussion

IV.1. Water migration and redistribution

Sponge cake samples were visualized using Synchrotron X-ray μ CT. The samples were first frozen at two different freezing rates (fast and slow freezing). Figures 54A1 and 54B1 clearly evidenced that the freezing rate has an impact on ice formation and location. Fast freezing leads to the formation of numerous small ice crystals homogeneously distributed inside the matrix and to a thin ice layer at the pore walls while slow freezing leads to the formation of bigger ice crystals heterogeneously distributed and to a thick ice layer at the pore surface. In addition, volume fractions of ice inside the matrix (43 ± 1 % for fast freezing and 24 ± 0 % for slow freezing) and $SSA_{ice/starch}$ (50.0 ± 8.4 mm⁻¹ for fast freezing and 27.0 ± 2.6 mm⁻¹ for slow freezing) displayed in Table 16 and Table 17, respectively, highlights a second finding. Indeed, it shows that ice was mainly formed inside the matrix when the product was frozen fastly whereas it was largely located inside the pores for slow freezing. These findings were previously reported by Zennoune et al. (2021) who argued that the performance of freezing in such highly porous products is related to both heat transfer phenomena and to the dynamics of water and ice in both the starch matrix and the pores, whose presence strongly constrains the mobility and the distribution of water.

After freezing, both fast and slow frozen samples were stored at two different conditions (stable and fluctuating temperatures) during two weeks.

For fast frozen samples, comparison of images of Figures 54A1 reveals that both ice morphology and size seem to evolve with storage time, even though ice distribution inside and outside the matrix seem to be the same. Moreover, this evolution is more noticeable for stable storage temperature than for fluctuating temperature. These observations are in line with the evolutions of both the volume fractions of the ice inside the matrix (Table 16) and the $SSA_{ice/starch}$ (Table 17). As a matter of fact, ice inside volume fractions did not vary significantly with storage time and storage temperature conditions ($p < 0.05$) while the $SSA_{ice/starch}$ significantly decreases with storage time whatever the storage condition ($p < 0.05$). These results show that ice migration from the starch matrix towards the pores is limited or inexistent under these conditions. Instead, a local redistribution of water within the starch matrix seems to happen, resulting in crystal enlargement accompanied by mass conservation. This result may be explained by recrystallization phenomena whose driving force is the differences in the stability of ice crystals based on size differences. In the case of fast freezing, the crystalline system is mainly constituted of small crystals, which have high free surface energy and are energetically unstable. Therefore, the system will tend towards a lower energy state by forming larger ice crystals that are more stable. Given the evolution of the ice inside the starch matrix, several recrystallization mechanisms may occur. These include, at first, recrystallization by accretion when two crystals are close enough to form a bridge and then grow into a single crystal. Then, Ostwald ripening may happen involving

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

water molecules of the small ice crystals to detach gradually from the ice crystal surface and diffuse through the matrix before deposition on larger ice crystals.

Still in the case of fast freezing, it is noteworthy that the growth of ice crystal size inside the matrix, with storage time is more pronounced for stable storage than for fluctuating storage condition. Indeed, Table 16 shows a high decrease of the $SSA_{ice/starch}$ for stable storage (about -23% from T0 to T14) compared to that for fluctuating storage (about -7% from T0 to T14). This result is confirmed by the local thickness analysis. In fact, measured local thicknesses of ice inside the matrix show a larger increase of ice crystal size for stable storage than for fluctuating storage condition. Nevertheless, this result is not intuitive, knowing that it is well recognized that temperature fluctuations promote recrystallization and therefore crystal growth (Donhowe and Hartel 1996a, Donhowe and Hartel 1996b, Ndoye and Alvarez 2015). An explanatory statement might be related to the heat transfers inside the starch matrix. Indeed, the fluctuation duration (1h at -5°C) may not be sufficient to affect significantly the microstructure inside the starch matrix. On the other hand, the fluctuating storage temperature seems to affect the evolution of ice outside the starch matrix (ice inside the pores). The local thicknesses of ice outside the matrix exhibit a noticeable increase with storage duration for fluctuating storage condition, while the evolution is less remarkable for stable storage condition (Figure 56B2 and C2). This trend is supported by the evolution of the $SSA_{air/ice}$, which are larger for fluctuating storage, compared to stable storage conditions (Table 16). These results reveal an increase of the ice layer at the pore interface. Local water redistribution and ice resizing rather than ice migration, keeping in mind that no variation of ice volume fraction was observed (Table 16), can plausibly explain this ice size increase. Contrary to starch matrix, temperature fluctuations may favor recrystallization by a sublimation-diffusion-condensation mechanism leading to larger ice crystal size and to a more stable state.

In the case of slow freezing, visual observations on the Figures 54B1 – B5 show no discernible difference in the microstructure evolution with storage time for both stable and fluctuating storage scenarios. These observations are not in line with the changes of the volume fractions of ice crystals inside the matrix (Table 16), of the $SSA_{ice/starch}$ (Table 16) and of the local thicknesses (Figure 56) during storage for both storage conditions. Volume fractions of ice inside the matrix decreased significantly ($p < 0.05$) when the storage duration increase for stable as well as for fluctuating storage temperatures. Moreover, the $SSA_{ice/starch}$ exhibit large decreases with storage time both for stable (nearly -30 % from T0 to T14) and fluctuating (around -20 % from T0 to T14) conditions. In addition, the increase of $SSA_{air/ice}$ values both for stable (about + 4 % from T0 to T14) and for fluctuating (around +13 % from T0 to T14) reveals ice size increase at the pore interfaces. These results reflects, at the same time, ice crystals growth inside the starch matrix and ice layer increase at the pore surface. On another note, these results are underpinned by the increase of local thicknesses with storage time both inside and outside the matrix, even though the trend is less clear for fluctuating storage scenario. Two hypotheses can be put forward to explain these findings: (i) a migration of water from the matrix to the pores where it is deposited on the existing ice layer by

sublimation-diffusion-condensation phenomenon; (ii) a local redistribution of water in the matrix through recrystallization phenomena (mainly migratory recrystallization) leading to an enlargement of the ice crystals. The first hypothesis may explain both the decrease of ice volume fractions inside the matrix and the increase of the ice characteristic size in the pores. The second hypothesis can plausibly explain the ice crystal growth inside the starch matrix. Local redistribution inside the starch matrix seems to be more important at stable temperature storage while water migration from the matrix towards the pores appears to be predominant in the case of fluctuating storage conditions. Chen et al. (2013) reported that during long-term storage significant water redistribution was noticed. This redistribution was accompanied with ice recrystallization and growth. Same results was found by Eckardt et al. (2013) who studied bread and dough and Kontogiorgos and Goff (2006) who studied flour-water mixture. In both cases, the authors explained ice crystal growth by recrystallization resulting on the microstructure destruction.

IV.2. The coupled effect of freezing rates and frozen storage conditions

As mentioned previously, fast and slow freezing of the model sponge cake give rise to small and coarse ice crystals inside the starch matrix, respectively. At the same time, plus or less ice layer are formed at the pore interfaces according to the freezing rate. In the case of slow freezing, the majority of the ice are formed at these pore interfaces reflecting a greater water migration from the matrix towards the pores. During frozen storage, the crystalline microstructure evolves regardless the initial freezing rate and the storage conditions. However, the microstructure changes are more significant when the products are slow-frozen as evidenced by the SSA values inside and outside the starch matrix (Table 17). For stable storage conditions, $SSA_{ice/starch}$ value decreases by 23 % for fast freezing while this decrease is 30 % for slow freezing. For fluctuating storage temperature, the trend is the same but the difference is more important with a decrease of only 7 % for fast freezing against 20 % for slow freezing. This means that when the same storage conditions are applied, ice crystals grow more in sponge cake frozen at slow freezing rate. This result is confirmed by the local thickness values depicted in Figure 56. For both ice locations (inside and outside the matrix), local thickness sizes are always higher for slow freezing than for fast freezing and for the three time points (T0, T7 and T14). As mentioned above, local water redistribution and ice resizing by recrystallization mechanism are favored in fast frozen samples while water migration is added to the local redistribution in slow frozen samples, explaining the greater changes observed in the latter. It is noteworthy that coupling fast freezing with poor storage conditions (fluctuating temperatures) leads to smaller ice crystals and a less damaged microstructure than combining slow freezing with good storage conditions (stable temperatures). This result can be explained by the fact that fast freezing initially leads to a more homogeneous ice crystal population than slow freezing. It is well known that homogeneous population is energetically more stable than heterogeneous population and therefore is less likely to undergo ice recrystallization (Hartel 1998, Kobayashi et al. 2018).

Chapitre 4 : Effet couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure de la génoise modèle

Moreover, it is important to point out that microstructural changes affect the texture of the sponge cake and consequently their quality. This impact is as marked as the size of the ice crystals is high. According to the conditions used in this study, the benefits of fast freezing are reduced at the end of the two-week storage period, but the products still have a better quality than slow-frozen samples. To our knowledge, such results about the combined effect of freezing and frozen storage conditions are reported for the first time. The combined effects of freezing rate and storage time and temperature on the quality of frozen porous foods was studied for bread dough and bread (Yi and Kerr 2009, Eckardt et al. 2013) and for sponge cake (Díaz-Ramírez et al. 2016, Van Bockstaele et al. 2021). However, none of these works has investigated pore and ice crystal evolutions as impacted by the coupled freezing and frozen storage processes.

V. Conclusion

Freezing and frozen storage of sponge cake have an impact on ice formation and growth which can cause undesirable changes into the product. In this article, the impact of freezing rate and storage conditions on ice formation and location was studied. The μ CT image analysis leads to a conclusion that the ice volume fraction obtained after freezing is conserved during frozen storage, whatever the storage conditions. However, ice redistribution and relocation occur during storage depending on both initial freezing and frozen storage conditions. It was shown that fast freezing rate causes less microstructural changes, regardless the storage conditions, even though the microstructure continues to evolve during frozen storage, due to ice migration and recrystallization.

Before this study, the mechanism of ice formation in porous foods according to the freezing process, as well as the mechanism of pore and ice crystal evolution during frozen storage were poorly understood. This work is an important step forward, but further investigations are still needed. For example, the impact of temperature fluctuations was not clearly evidenced, especially inside the starch matrix. It would be of interest to study the impact of more aggressive fluctuations to bring a better knowledge of the influence of temperature fluctuation. In addition, it would be useful to formalize the link between the evolution of the microstructure and the classical quality criteria such as texture.

The freezing process and the frozen storage are the main components of the frozen cold chain. A better understanding of the mechanisms involved during these two steps would be very useful for a better control of microstructure and induced quality changes of frozen products throughout the cold chain.

Chapitre 5 : Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

Synthèse

Article accepté dans Journal of Food Engineering “X-ray microtomography of ice crystal formation and growth in a sponge cake during its freezing and storage”

I. Objectif de l'étude

Dans le chapitre précédent, une génoise modèle non réactive a été étudiée. Les effets de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur la formation et la localisation de la glace ont été mis en évidence et quantifiés à partir d'images 3D obtenues en microtomographie à rayons X en « statique », c'est-à-dire à différents temps de stockage. Dans ce chapitre, une génoise réelle réactive de formulation simplifiée (farine, sucre, œuf et eau) a été étudiée. Les effets de la congélation et des conditions de stockage sur la microstructure ont cette fois-ci été quantifiés par microtomographie à rayons X en « dynamique », *i.e.* au cours d'un cycle de température imposé, afin de suivre en temps réel la formation et l'évolution des cristaux de glace.

II. Matériels et méthodes

Dans le cadre de ce travail, une génoise réelle réactive de formulation simplifiée a été fabriquée au laboratoire. Elle est composée de : 25% de farine de blé, 25% de saccharose, 30% de blanc d'œuf 15% de jaune d'œuf et 5% d'eau. Le protocole de fabrication est similaire à celui présenté dans les chapitres précédents. Ce protocole a ensuite été validé en vérifiant la reproductibilité pour un lot de génoises de différentes propriétés thermo-physiques telles que : la densité de la pâte ; les densités apparente et réelle de la génoise cuite, la teneur en eau et la porosité moyenne. Des mesures calorimétriques (DSC) ont aussi été réalisées afin de déterminer la température de congélation commençante et la quantité d'eau congelable.

Des échantillons de génoises non congelées et congelées ont été visualisés par cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB) afin d'observer la microstructure de la génoise à l'aide d'un outil à haute résolution.

Un échantillon de génoise non congelé a ensuite été placé dans la cellule cryogénique CellDyM positionnée sur la platine d'un microtomographe à rayons X de laboratoire. L'échantillon a d'abord été scanné avant congélation puis congelé directement dans la cellule. Des fluctuations de température ont été imposées (entre - 30 °C et - 20 °C) tout au long des 7 cycles thermiques effectués. L'évolution de la microstructure ainsi que la formation des cristaux de glace ont été visualisées en temps réel. L'expérience a duré 6 jours, pour un total de 37 scans de plus de 2 heures chacun.

La série d'images 3D obtenues sur un même échantillon à une résolution de 7.5 microns/pixel a ensuite été analysée. Un traitement original des images basé sur la méthode de corrélation digitale volumique (DVC) a été mis en place afin de segmenter les différentes phases puis de quantifier les changements de porosité ainsi que la formation et la croissance des cristaux de

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

glace au cours du temps. Cette analyse a permis de quantifier un certain nombre de paramètres microstructuraux tels que : la fraction de l'air (porosité), de la glace et de la matrice ainsi que la surface spécifique (SSA). L'évolution du nombre de cristaux et de pores, de leur diamètre équivalent et de leur distribution de taille a aussi pu être quantifiée pendant toute la durée de l'expérience.

III. Résultats

La génoise présente une microstructure alvéolaire avec une porosité moyenne de l'ordre de 57% et une teneur en eau de l'ordre de 30%. Les mesures de DSC ont montré que le point de congélation est de l'ordre -21°C.

La visualisation de la microstructure par cryo-MEB a permis de mettre en évidence la présence des cristaux. Ceux-ci sont partiellement incrustés dans la paroi et ressortent à la surface des pores. Leur taille est de l'ordre de 20 μm . Ils devraient donc pouvoir être visibles en microtomographie avec la résolution spatiale choisie.

L'analyse des images 3D obtenues par microtomographie durant les cyclages thermiques a montré que :

- Concernant les pores, lors de l'étape de congélation, l'échantillon subit une rétraction de l'ordre de 4 à 6%. Au cours des sept cycles de réchauffement/refroidissement, cette rétraction est quasi stable et oscille entre 5 % et 8 %. Le nombre total de pores augmente mais leur taille moyenne diminue, signifiant que de nouveaux pores sont formés mais de petite taille.
- Concernant les cristaux, de nombreux cristaux semblent se former initialement, du fait du sous refroidissement important, mais ces cristaux sont petits (autour de 30 μm au départ) et croissent lentement. Les cristaux observés semblent majoritairement à l'interface des pores qui sont des sites préférentiels pour la nucléation de la glace. Cette nucléation semble liée aux transferts couplés de chaleur et d'humidité qui ont lieu lors de la congélation des aliments poreux connus sous le nom de phénomènes d'évapo-condensation. Au cours des cycles thermiques, la taille de ces cristaux augmente quasi-linéairement jusqu'à atteindre des valeurs de l'ordre de 150 μm . Par ailleurs leur nombre augmente puis atteint ensuite un plateau. Ceci peut être expliqué par le cyclage imposé à des températures proches de la température de fusion des cristaux (-21 °C) qui favorise les phénomènes de recristallisation (avec fonte ou sublimation de petits cristaux) avec redistribution de l'eau préférentiellement vers les pores pour grossir les cristaux à la paroi.

IV. Conclusion

Pour la première fois à notre connaissance, l'évolution de la microstructure d'un même échantillon de génoise pendant sa congélation et son stockage a pu être suivie et quantifiée en

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

temps réel pendant 6 jours à l'aide de la tomographie aux rayons X. Une méthode de traitement d'image basée sur la corrélation d'images volumiques (DVC) a été mise en œuvre pour segmenter les images obtenues et suivre l'évolution de la microstructure, notamment la formation et la croissance des cristaux de glace qui est favorisé par le cyclage thermique.

Dans un futur proche, cette expérience, longue et complexe, devra être répétée afin de confirmer les résultats et de prendre en compte la variabilité des produits alimentaires. Les résultats obtenus ouvrent la voie à de futures modélisations pour caractériser l'impact de la congélation et du stockage congelé sur la microstructure et la qualité de la génoise. De plus, la méthodologie proposée, qui permet d'étudier les changements microstructuraux d'un même échantillon induits par des chargements thermiques complexes, pourrait être appliquée sur d'autres produits poreux congelés.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a été accepté dans **Journal of Food Engineering: "X-ray microtomography of ice crystal formation and growth in a sponge cake during its freezing and storage"**

I. Introduction

Freezing technologies are widely used by the pastry industry in order to preserve the products and to extend their shelf life. This is particularly the case for sponge cake, which is the base of several pastries and one of the most common frozen cake. It is usually produced in large quantities at industrial scale or in pastries following a two stage process: (i) at first, the product is baked and frozen in a factory; (ii) then, after a storage period, it is thawed, prepared and garnished just before the sale in retail stores or in artisanal pastries. This process makes it possible to produce large quantities and to distribute the product over an extended period to distant locations. However, the quality of the thawed sponge cake can be deteriorated by undesirable physico-chemical changes taking place during freezing and frozen storage, resulting in a reduction of consumer acceptance and in economic losses for the industry (Owen and Van Duyne 1950).

It is established that these changes are closely related to ice crystals which are formed during the freezing process and which evolve during the frozen storage due to recrystallization (Le Bail et al. 2011). In food freezing, heat transfer is always coupled with mass transfer. A temperature gradient appears between the cold surface and the core inducing a conductive heat transfer. Concomitantly, a water vapour pressure gradient between the surrounding air and the food surface occurs leading to a diffusive water transfer from the core to the surface and thus to water evaporation. During the freezing of porous foods at atmospheric pressure, this vapour diffusion is also present in the pores and is the main mass transfer mechanism (Pham 2006). When the freezing point is reached, the liquid water is converted into ice. Inside the pores, the supersaturated vapour also condenses into ice. This mechanism is called evapo-condensation. After freezing, ice recrystallization occurs during storage. It involves metamorphic changes of ice crystals to minimize the surface free energy of the entire crystal phase. Small ice crystals, which have a large excess of surface free energy and therefore are thermodynamically unstable tend to lower their energy level in favor of large ice crystals. The net result is the disappearance of small crystals by melting or sublimation and the growing of large crystals leading to the decrease in crystal number and the increase of the average ice crystal size. Ice recrystallization may occur according to several mechanisms such as isomass rounding, accretion or migratory (also called Ostwald ripening) (Fennema 1973, Cook and Hartel 2010). Among these mechanisms, Ostwald ripening which involves a melting-diffusion-refreezing process is the most prominent in frozen foods and in case of temperature cycling (Hartel 1998, Ndoye and Alvarez 2015, van Westen and Groot 2018). This phenomenon that involves changes in number, size, shape and location of the ice crystals occurs at constant temperatures, but is accelerated by fluctuating temperatures that are often inevitable through the cold chain due to the on/off operation of the refrigerating equipment or to poor practices (temperature abuse) (Zaritzky 2010).

Many efforts have been focused on the relationships between the structural quality of frozen/thawed baked products and the re-arrangement of both the starch granules and the

gluten network that may be impaired by ice crystals formation and growth. Most of these studies concerned bread (Bárcenas et al. 2003, Hamdami et al. 2004, Bárcenas and Rosell 2006, Mandala et al. 2008, Mandala et al. 2009, Eckardt et al. 2013). A few were related to cakes (Karaoğlu et al. 2008, Gómez et al. 2011) and to sponge cake (Díaz-Ramírez et al. 2016), the composition of which is different from that of bread and would therefore be likely to react to freezing and frozen storage differently. In opposition, the mechanisms by which ice crystals evolving at local scale interact with the development of the structure of frozen/thawed baked product are scarcely described and thus not fully elucidated. The rare studies that exist also concern bread, especially part-baked bread (Lucas et al. 2005, Lucas et al. 2005, Chen et al. 2012, Chen et al. 2013), but to our knowledge, no study has been carried out about sponge cake. This lack of work can be explained by the complexity of the experimental evaluation of the local dynamics of water and ice during freezing of such porous media. Nuclear magnetic resonance imaging (MRI) was used to locally assess physical changes that take place during the pre-chilling and freezing of par-baked bread (Lucas et al. 2005). The methodology enabled to perform a continuous and non-invasive monitoring of the process, but the MRI signal was not detectable after the beginning of the crystallization. Moreover MRI signal analysis do not provide the ice crystal size and distribution. More recently, Chen et al. (2012) used differential scanning calorimetry (DSC) to investigate the effect of freezing rates on the formation and distribution of ice crystals upon the freezing of fresh breadcrumb. The authors have estimated the mean ice crystals sizes in small and large crumb pores (with sizes ranging from nanometer to millimeter) using the endotherm curve obtained by DSC and the modified Gibbs-Thomson equation. They report smaller ice crystals in small crumb pores. But both ice crystals in small and large crumb pores have sizes in the nanometer range (5 - 18 nm), far below the size of bulk ice which should be in the micrometer range or even larger. They argued that the DSC procedure (isothermal stage at -30 °C for 10 min.) used in their work did not afford enough time to make possible water migration and, consequently, the growth of ice crystals. Indeed, the formation and growth of ice crystals are highly correlated with the water distribution and migration that may be constrained by the starch/gluten network and the crumb porosity.

From the above literature review, it is obvious that the methodologies used to characterize the dynamics of ice crystals formation and growth during freezing of porous food such as bread do not provide a satisfactory quantitative assessment. Techniques that are more reliable are still needed to improve the understanding of the complex mechanisms taking place at this microscopic scale, particularly into such porous frozen foods. The potential of X-ray micro-computed tomography (X-ray μ CT) as a reliable methodology to visualize and quantify the 3D microstructure of frozen foods with a nondestructive approach was recently showed (Vicent et al. 2017). X-ray μ CT generates 3D images reconstructed from multiple radiographs acquired from different angles around a sample. X-ray μ CT images reflect the sample with different grey level depending on the X-ray attenuation properties of the different components. Since commercial μ CT devices are adapted for ambient temperature imaging and not equipped with thermostated stage, specific tools have been developed to maintain the

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

samples at frozen state during imaging. Vicent et al. (2017) developed a new X-ray μ CT based methodology that enables to image frozen foods at the frozen state ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), thanks to a cooling stage made with phase change material. This methodology provided valuable insights into the microstructural changes in frozen minced beef as affected by the freezing rate (Mulot et al. 2019), in frozen carrots upon storage with fluctuating temperature (Vicent et al. 2019) and in fresh ice sorbet after freezing (Masselot et al. 2021). However, the cooling stage used in these works does not allow analysing the frozen sample more than 20 minutes, thus making in-situ monitoring of the water/ice crystals dynamics during an extended period impossible. Moreover, it does not allow dynamic monitoring of temperature in order to perform thermal cycling that may mimic temperature fluctuations occurring through the cold chain. Guo et al. (2018) successfully applied in situ synchrotron X-ray μ CT to investigate dynamic microstructural changes of ice cream subjected to thermal cycling, using a cooling stage specially designed to operate between ambient temperatures to $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A similar cooling stage was used by Calonne et al. (2015) in a laboratory scale X-ray μ CT apparatus to dynamically monitor the metamorphism of snow. The advantage of this cooling stage, named Cell for Dynamic Monitoring (CellDyM), is to allow precise setting of the temperature at the top and the bottom of the sample using Peltier coolers. An aluminium sample holder was used allowing a vertical heat conduction and a subsequent uniform temperature within the sample. But all overmentioned studies concerned non porous foods or systems containing a high water fraction and with ice crystals already formed. In the specific case of sponge cake, the water content is low and is trapped in a porous starch/gluten matrix. Following the formation and growth of ice crystals, as well as the evolution of pore structure into such a complex microstructure is really challenging.

The principal purpose of the present study was to apply a dynamic X-ray μ CT based methodology to assess the local physical changes taking place into sponge cake upon freezing and subsequent storage at fluctuating temperatures. To this end, the CellDyM cooling stage developed by Calonne et al. (2015) for snow was used to subject sponge cake samples to freezing and thermal cycling directly inside the X-ray CT apparatus. Scans were performed at different times during 6 days-period of analysis. An image analysis strategy based on Digital Volumetric Correlation (DVC) (Buljac et al. 2018) was implemented to quantify porosity changes and ice crystals formation and evolution. CryoSEM analysis was also performed to obtain high resolution imaging and to qualitatively compare the microstructure obtained with cryo-SEM and μ CT image visualization.

II. Material and methods

A specific sponge cake formulation and preparation protocol was defined and optimized (see section 2.1) to ensure reproducible cakes in terms of thermophysical properties (density, water content and freezing point) (see section 2.2).

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

II.1 Sponge cake preparation and sampling

Sponge cakes were home made using the following formulation: 25 % (w/w) wheat flour (farine de blé, Tarwebloem T55, Germany) , 25 % (w/w) sucrose (powdered sugar, Daddy, France), and eggs (Carrefour Bio, France): 30 % (w/w) egg white, 15 % (w/w) egg yolk, and 5% (w/w) of pure water.

These ingredients were purchased from local supermarket.

The batter was prepared using a kitchen food processor (Masterchef Gourmet QA510110, Moulinex, France) into two steps:

1. First, egg yolk was homogenized for 10 s, then sugar was incorporated and blended for 10 min 12 s , afterwards sifted wheat flour was gradually poured over 2 min 12 s and finally water was added and blended for 1 min. All these blending operations were performed at maximal speed rotation of the kitchen food processor. The mixture is then left;
2. Egg whites got beaten separately using the same food processor at high speed. Finally, the beaten egg whites were gradually incorporated into the first mixture using a beater at low speed. Next, a batch of nine pieces of sponge cake was prepared by pouring 60 g of batter in each rectangular aluminium pan (10x6x3 cm) and baked in an electrical oven (Arianna LED Bakerlux, Unox) for 20 minutes at 170 °C.

After baking, the nine sponge cakes were allowed to cool at ambient temperature for 45 minutes (ambient relative humidity RH=50-60 %). They were then individually packaged in impermeable plastic bags and sealed before storage in a fridge at 5 °C (for about 7-10 days). In order to make sure that all samples have similar thermal history during baking and cooling, preliminary tests were performed using temperature sensors to record cakes temperatures. Among the nine sponge cakes prepared for this study, eight were used for DSC, density and water content measurements. According to the reproducibility of these measurements on the sponge cakes (see section 2.2), it was reasonably assumed that the latter one, which was used for X-ray tomography analysis, presents similar properties.

For X-ray μ CT analysis, a sample (diameter = 9.8 mm and height = 10 mm) was extracted from the cake crumb in a cold room (-5 °C, RH=20 %) using a core drill mounted on a milling machine. The sample was transported in a sealed container at -5 °C before its installation in the cooling stage CellDyM, which ensures the needed thermo-hygroscopic stability (Figure 58).

II.2 Characterization of thermo-physical properties of the sponge cake

II.2.1 DSC measurements

The freezing point and the freezable water content were calculated using differential scanning calorimeter (DSC 1 STARe System, Mettler-Toledo, Columbus, USA). The heat flows and

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

temperature were measured on three replicates with an accuracy of $0.02 \mu\text{W}$ and $0.02 \text{ }^\circ\text{C}$ respectively. For each analysis, a sponge cake sample of approximately 9 mg was placed in an aluminum pan and hermetically sealed. For each scan, the sample was first equilibrated at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min, then cooled to $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ at $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, then after an isothermal holding stage at $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min, the sample was heated back to $25 \text{ }^\circ\text{C}$ at $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. The onset temperature (T_o) and the peak temperature (T_p) were determined from the endothermic ice melting peak using the STARe Evaluation software (Mettler-Toledo, Columbus, USA). T_o represents the freezing point. It is defined as the intersection point between the baseline and the inflexion tangent at the beginning of the melting peak. A typical thermogram of melting is shown in Figure 57. It shows that ice melting started when the temperature reached $-30 \text{ }^\circ\text{C}$; the endothermic ice melting peak was obtained at around $-10 \text{ }^\circ\text{C}$.

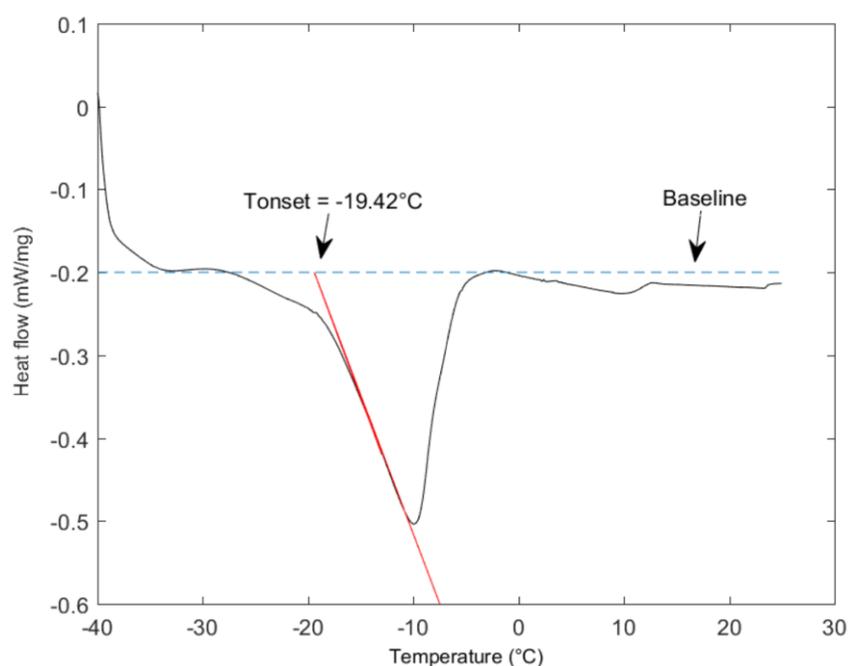


Figure 57: Typical ice melting endotherm obtained upon the thawing of frozen sponge cake with a heating rate of $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

T_o measured from the ice melting endotherm was about $-21 \text{ }^\circ\text{C}$ for sponge cake samples. Based on these DSC results, the thermal cycling during the microtomographic analysis was set between $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ and $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, corresponding to the temperature range of the phase change into the sponge cake. This temperature range mimics the thermal fluctuations encountered during frozen storage.

II.2.2 Density

The theoretical density of batter (in kg/m^3) was first determined by considering the proportions and densities of each ingredient. The density of wheat flour, sucrose, egg white and egg yolk were measured by weighing (Mettler AE 163, precision 10^{-4} g) 10 mL of each ingredient using a measuring cylinder (three replicates). The theoretical density of batter obtained was then $941 \pm 3 \text{ kg}/\text{m}^3$. Then, the density of batter was measured by weighing 100

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

mL of batter (two replicates) in a measuring cylinder. The measured average density of batter was equal to $700 \pm 2 \text{ kg/m}^3$. In fact, air was incorporated in the batter during whipping explaining this lower value of density.

The apparent density of the sponge cake was calculated by weighing (about 19 g) a parallelepiped-shaped ($5.5 \times 5.1 \times 2.5 \text{ cm}^3$) sample previously cut in the sponge cake crumb. Four replicates were measured. In order to determine the density of the sponge cake without air (real density), the same samples were compacted using a vacuum sealing system (Foodsaver, V2860) to remove the air from the pores, before measuring the new dimensions for calculating the new volume. The mean apparent density and the real density of sponge cake were equal to $405 \pm 18 \text{ kg/m}^3$ and $684 \pm 29 \text{ kg/m}^3$ respectively. The real density is close to the density of batter ($700 \pm 2 \text{ kg/m}^3$) but lower than the theoretical density of batter ($941 \pm 3 \text{ kg/m}^3$). Even after compaction, a fraction of air seems to be still present and trapped in the cake. The amount of air present inside the sponge cake was then calculated considering the ratio between the apparent density ($405 \pm 18 \text{ kg/m}^3$) and the batter theoretical density ($941 \pm 3 \text{ kg/m}^3$). The value of the mean porosity of the sponge cake equals $57 \pm 2 \%$.

II.2.3 Water content

Five samples ($6 \times 5.8 \times 2.2 \text{ cm}^3$) from different sponge cakes were cut and weighed (about 24 g). Then the water content of the samples was determined by weighing (Mettler AE 163, precision 10^{-4} g) before and after complete dehydration in an oven (Themarks TS4057) set at $105 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 hours. Water content is calculated as follow:

$$X_w = \frac{m_0 - m_f}{m_0} * 100 \quad (30)$$

where X_w is the water content of the sponge cake sample, m_0 is the mass (kg) of the wet sample and m_f is the mass (kg) of the dried sample. The average water content was calculated from five replicates and was equal to $30.50 \pm 1.7 \%$.

II.3 Cryo-SEM

Analysis cryo-SEM measurements were carried out in an external laboratory equipped with scanning electron microscopy (Electron Microscopy Facility, IBPS, Paris, France), in order to compare imaging results to those obtained with the microtomographic method. Both previously frozen and unfrozen samples were analyzed. Fracture was performed in liquid nitrogen. Fractured surfaces were observed using cryo-SEM (GeminiSEM 500, Zeiss) at $-120 \text{ }^\circ\text{C}$, the pressure in the equipment was $1.6 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. The accelerating voltage was 3.00 kV or 0.790 kV and the accessible magnification range was from x13 to x500 000. Frozen samples were first observed at $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ then after partial sublimation at $-90 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min.

II.4 In situ X-ray micro-tomography

II.4.1 Cryogenic cell

CellDyM is a cryogenic cell that allows the sample to be monitored by time-lapse X-ray μ CT with a scanner operating at room temperature (Calonne et al. 2015). The geometrical arrangement of the cell enables a 360° rotation during a tomographic acquisition (Figure 58). CellDyM gives the possibility to precisely impose the temperature (about +40 to -40 °C) at the top and bottom of the sample (minimal thermal gradient lower than 3 °C/m) with copper cylinders while its lateral sides are thermally insulated from the outside using a vacuum chamber. The sample holder mechanically links the two copper cylinders and is in contact with the lateral sides of the sample. This key part can be made of poly methyl methacrylate (PMMA), whose advantage is to have low X-ray linear absorption and then maximize the images contrast of low X-rays absorption samples. However, it has the drawbacks not to fully prevent from thermal radiative exchange with the outside and it is not a good thermal conductor. Alternatively, it can be made of aluminum, which allows a rather good thermal conductivity with the top and bottom copper cylinders and prevents thermal radiative transfers. In this case, the higher linear X-ray attenuation impinges the contrast within the sponge cake sample. After some trials, the aluminum sample holder appeared as the best compromise for this experiment.

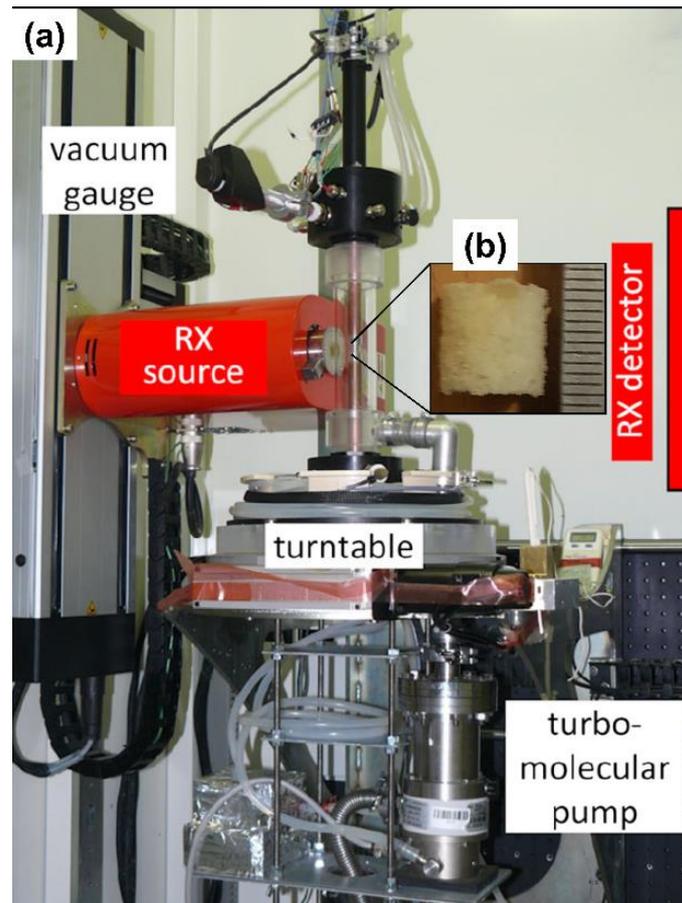


Figure 58: (a) Photographs of the experiment, overview of the CellDyM thermostated cell installed in the tomograph cabin (RX Solutions, France) before the experiment, and (b) photograph of the 10 mm high sample before its installation inside CellDyM.

II.4.2 Freezing and thermal cycling

Figure 59 shows the temperature applied to the sample with respect to the time, where the dots represent when the X-ray μ CT scans (noted S_i) were performed. The scans were acquired at least 30 minutes after the thermal loading to prevent the blurring of the 3D images due to the induced sample movement during acquisition. Then, after two scans (S_0 and S_1) in the initial state at $5\text{ }^\circ\text{C}$, the sample was frozen at $-30\text{ }^\circ\text{C}$ with a cooling rate of about $-15\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ (S_2). It was then warmed up at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ and cooled at $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 7 times at the same temperature rate ($+ \text{ or } - 5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). These values were measured at the cooling modules and not directly within the sample, consequently the temperatures and the cooling rate may be slightly lower. These temperature oscillations were simulating the possible temperature fluctuation during frozen food handling and storage. The whole experiment took about 6 days and all the 37 scans, hereafter noted S_i with $i \in [0; 37]$, were not equally spaced in time (Figure 59) due to experimental and practical reasons.

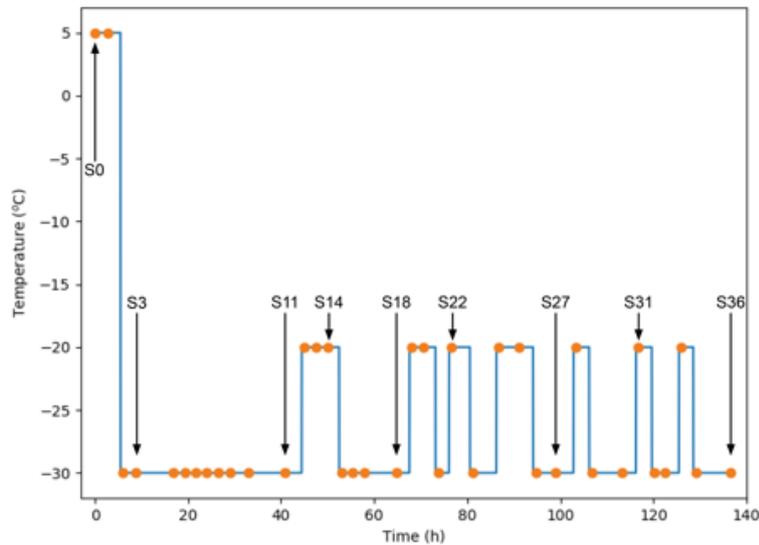


Figure 59: Freezing and temperature cycles. The dots show the realised scans, note that they were made at least 30 minutes after a temperature change for thermalisation purposes.

II.4.3 3D image acquisition

The sample was placed in CellDyM cell, which was previously installed in the tomograph cabin (RX Solutions, France) and the temperature was set to 5 °C. The system was operating at a X-ray tube voltage of 65 kV and a current intensity of 115 μ A. A voxel size of 7.5 μ m was set according to the dimensions of the cryogenic cell (Figure 58). The total scanning time was set at 2 hours 10 min (1440 radiographies on a 360° rotation) for one acquisition. These parameters were chosen as the best compromise between image quality (air/ice/cake contrast) and scan duration that prevents possible sample evolution during the acquisition. X-Act 2 software (RX Solutions, France) was used to reconstruct the 3D volumes using the classical filtered back-projection algorithm and applying ring artefact filter.

II.4.4 Image processing

The 3D image processing involved several operations summarized in Figure 60:

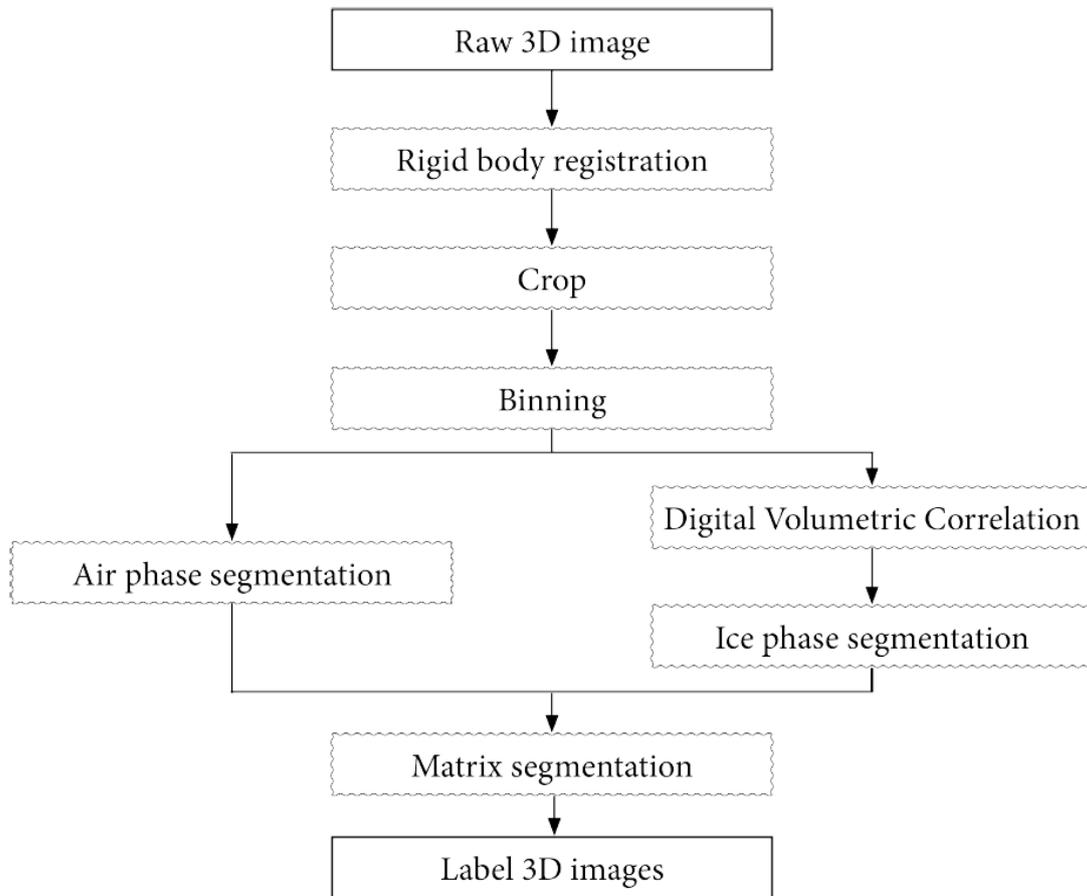


Figure 60: Image processing procedure.

Registration. All the 3D images (i.e. 37 in total), were registered in order to define and follow the same volume of analysis inside the aluminium sample holder between the two copper cylinders (Figure 61 (a)). The registration was done by setting vertical the axis of the aluminium cylinder.

Crop. All the 3D images (i.e. 37 in total), were cropped to exclude the copper cylinders absorption artefacts (Figure 61 (a)). Consequently, the height and the volume of the analyzed sample were $H = 7.9 \text{ mm}$ and $V_0 = 593 \text{ mm}^3$.

Binning. A $2 \times 2 \times 2$ binning was applied to all the 3D images leading to a voxel size of $15 \mu\text{m}$ and reducing the overall number of voxels by 8 to optimize subsequent images processing, such as the digital volume correlation step.

Air segmentation. The air phase was segmented using a global grey level threshold. As shown by the grey levels histogram (Figure 61 (c)), the segmentation of air, matrix and ice was not trivial. However, the grey levels of the air phase are fairly well described by a Gaussian distribution and are expected to be constant during the experiment (no density change). The grey level threshold was chosen such that, statistically, the major part of the voxels belonging

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

to the air phase are selected. It corresponds to the right part of the Gaussian curve fitted on the air grey levels (Figure 61 (c)). If the cake matrix grey levels are described by a Gaussian distribution, the total grey level histogram still exhibits a non negligible number of voxels with intermediate grey levels. These voxels can at least be related to both the ice crystals (Figure 61 (b)) and the partial volume effects of the matrix, i.e. the voxel that are at the interface of the cake matrix and the air have intermediate grey levels which is a well known artefact (Glover and Pelc 1980). Even if it was possible to visually distinguish the ice crystals, an acceptable segmentation was not achievable for two reasons: (i) the poor grey level contrast between the matrix and ice, and (ii) some similar morphological characteristics of the ice and matrix (small and narrow). Subsequently, Digital Volumetric Correlation (DVC) has been implemented to detect the ice crystals in the 3D images.

Digital Volume Correlation (DVC). This technique is widely used in mechanics of materials to measure the deformations of a sample that has been mechanically loaded (Lenoir et al. 2007, Roux et al. 2008, Hild et al. 2011, Pierron et al. 2013), but also to detect cracks (Limodin et al. 2011, Leplay et al. 2013, Wang et al. 2016). According to Buljac et al. (2018), the principle of DVC is the following: suppose two 3D images denoted as $f(x)$ (assumed to be the *reference* image) and $g(x)$ (the deformed image), where f and g are the grey levels at each voxel location x . For the two 3D images to be correlated, DVC rests on the basic assumption that upon a mere change in the position of voxels, defined by a displacement field $u(x)$, the two images can be brought to perfect coincidence such that $g(x + u(x)) = f(x)$. Although this equation appears trivial at first glance, its resolution is not, and presents a number of common issues discussed in Buljac et al. (2018). In the present work, the YaDICs software (Seghir et al. 2014) with a Finite Element Regularized DVC method was used to correlate the 3D images acquired during the experiment.

In the following, the S3 image (at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) was used as the reference 3D image and was then correlated to the other 3D images (S4 to S36). It was not possible to use S0, S1, and S2 as reference images for two reasons: (i) the sample deformation between S1 (or S0) and S2, *i.e.* when the sample was frozen (Figure 59), was too important and thus DVC did not work, and (ii) the S2 image was a bit blurred due to sample evolution during the acquisition.

Ice segmentation. Besides the three components of the displacement vector $u(x)$, the software provides the residual map of the correlation $r(x) = g(x) - f(x)$ (Figure 61 (d)). On this residual map, a grey level $r(x) = 0$ indicates that the correlation is perfect, a grey level $r(x) > 0$ represents a part of the image that has disappeared, e.g. bright voxels that became darker like when a crack occurs. Lastly, a grey level $r(x) < 0$ represents a part of the image that has appeared, *i.e.* dark voxels that became brighter, or in the present case, when ice crystals appear in pores of the matrix. The obtained residual maps mainly exhibits a good average correlation between the images with

$$\langle r(x) \rangle = 1/V \int r(x) dv \approx 0 \quad (31)$$

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

As shown by the grey level histogram plotted in Figure 61 (f). Ice crystals are clearly visible on the 3D residual maps (in black in Figure 61 (d) and (e)) and in the histogram (Figure 61 (f)) represented with grey values below -10.0. Indeed, the offset between the Gaussian fit that models the correlation residue of the random noise (which is function of the acquisition, the image's reconstruction and the data processing), and the $r(x)$ data highlights that objects have appeared during the experiment. Consequently, the obtained 3D residue images have been used to segment the ice phase using a global grey level threshold. The threshold level was set such that no voxel belonging to the correlation error is taken into the ice phase. The ice phase was thus segmented as all the voxels with grey values lower than -10.0 (Figure 61(f)) and errors were estimated using two more threshold values (-12.0 and -9.0).

Matrix segmentation. The matrix (cake) phase was segmented as the remaining volume.

This image processing leads to 3D images where the 3 phases of the sample are labelled, *i.e.* 3D images with artificial grey levels that represent each phase, here $f(x) = 0$ outside the region of interest (ROI), $f(x) = 1$ for air, $f(x) = 2$ for ice and $f(x) = 3$ for the remaining voxels that belong to the matrix phase (respectively in white for air, yellow for matrix and blue for ice in Figure 61 (g) and (h)).

II.4.5 Microstructural parameters

Several microstructural parameters have been computed from the 3D labelled images in order to characterize the evolution of the microstructure induced by the thermal loading:

Porosity / ice volume fraction / matrix volume fraction. These three parameters were computed using a standard voxel counting algorithm. The porosity, the ice volume fraction, the matrix volume fraction are defined as $V_{air}=V_0$, $V_{ice}=V_0$ and $V_{matrix}=V_0$ respectively, where V_{air} , V_{ice} and V_{matrix} are the volume of each phase and V_0 is the initial volume of the sample (Figure 62). All these quantities are computed using the initial volume of the sample V_0 as reference (Lagrangian quantities). As will be shown later, the sample volumes change during the experiment due to the matrix shrinkage (Section 3.4), so the current volume of the sample is smaller than the initial one.

Specific surface areas. The surface areas of the interfaces, $S_{matrix/air}$, $S_{ice/matrix}$, $S_{ice/air}$ have been computed using the MorphoLibJ tools (Legland et al. 2016) on the labelled 3D images. It was then possible to estimate the corresponding Specific Surface Areas (SSA) defined as $SSA = S(\text{interface})/V_0$ (Figure 62) and expressed in mm^{-1} .

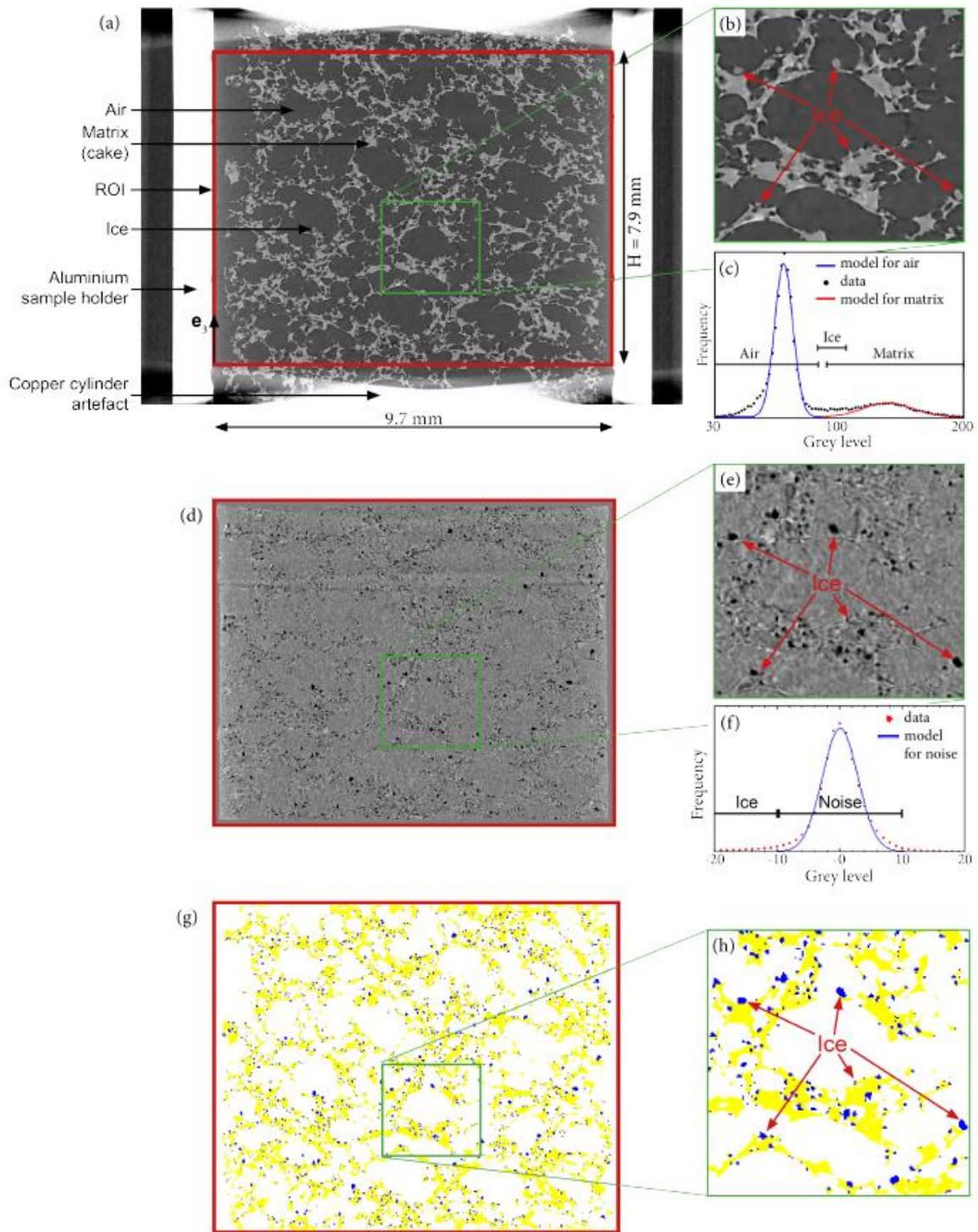


Figure 61: (a) Vertical slice of the 3D grey level image for scan S36. (b) Zoomed region of the image, which reveals the ice crystals within the sample. (c) Grey levels histogram of the slice that highlights the difficulty to segment the three phases by direct grey level thresholding. (d) Vertical slice of the residue 3D image for scan S36. (e) Zoomed region of the image showing the ice crystals in black. (f) Residue histogram with its Gaussian model for noise. (g) The result label image, and (h) its associated zoomed region.

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

Ice crystals and pore granulometry. Using a typical connected component analysis, performed with the MorphoLibJ library it was possible to compute the granulometry of the ice crystals, i.e. to count the ice crystals Nice in the 3D image and to compute their characteristic dimension defined here as the equivalent diameter of an ice crystal (the diameter of a sphere with the same volume as the particle):

$$d_{eq}^{ice} = 2 \sqrt[3]{\left(\frac{3}{4\pi}\right) V^{ice}} \quad (32)$$

With V^{ice} its volume. According to the resolution after the binning operation, the critical size of the ice crystals, which can be measured, is 15 μm . It was also possible to compute the pore granulometry. Even if the pores are connected, the porous network was artificially divided into individual pores using the 3D watershed algorithm of the MorphoLibJ library (Legland et al. 2016). An additional borderkill algorithm (Legland et al. 2016) was applied to remove the pores in contact with the aluminium sample holder. Then, as for the ice crystals, it was possible to count the number of pores N^{pore} and to compute their equivalent diameter d_{eq}^{ice} .

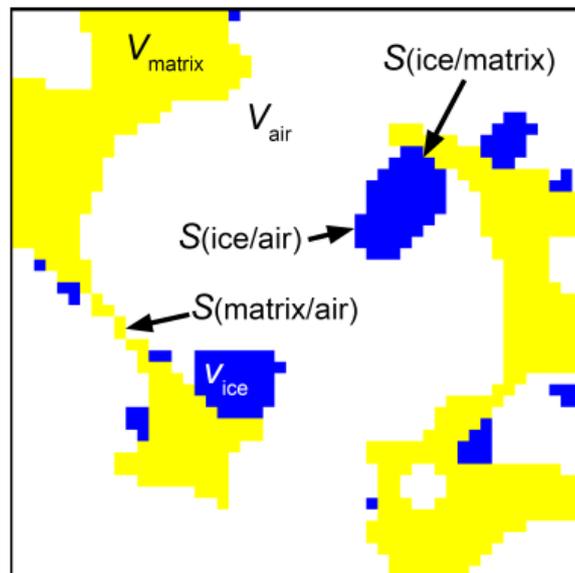


Figure 62: Schematic representation of the sponge cake phases and interfaces.

III. Results and discussion

III.1 Microstructural observations

Cryo-SEM was used to visualize the microstructure of model sponge cake after freezing. Figure 63 shows a micrographs of a frozen sample at magnification of x500. The formation of ice crystals can be observed; they are partially embedded into the wall and protrude into the pores. The typical size of such crystals is about 20 μm . Even if there are few crystals, which

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

are a little bit smaller, the used resolution for the X-Ray 3D images after binning (15 μm) is sufficient to capture most of the crystals.

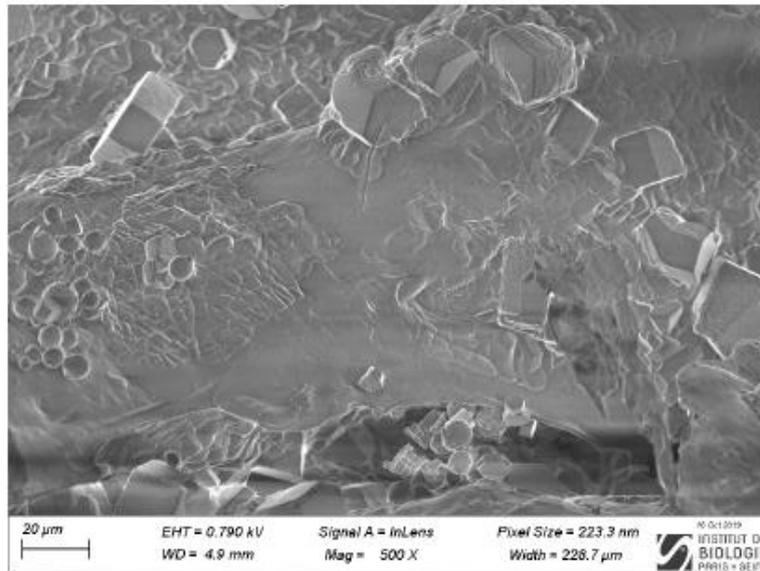


Figure 63 : Cryo-SEM image of a fractured frozen sponge cake.

Figure 64 presents vertical slices of some 3D images acquired during the experiment. The global evolution of the sample can be observed, as well as the local one through the insets in the surroundings of a pore of characteristic dimensions of $1.2 \times 0.8 \text{ mm}^2$. The sponge cake exhibits a highly porous microstructure: (i) the air volume fraction is about 79 % and (ii) the connected pore network presents a large variety of pore sizes. This mean porosity is higher than the one initially determined by density measurements (57%) and described in section 2.2.2. These differences can be mainly explained by the heterogeneity of the sponge cake, the presence of large pores and the volume of the sample that was nearly 80 times higher in the case of density measurements.

Overall, the sample seems not to undergo many modifications during the experiment, except at the beginning during the freezing stage. Indeed, from S0 ($T=5 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=0 \text{ h}$) and S3 ($T=-30 \text{ }^\circ\text{C}$, $t=8.8 \text{ h}$), an important shrinkage of the sample can be observed as shown by the black arrows on the S3 slice (Figure 64). In the initial state S0, the sample is in contact with the aluminium sample holder (Figure 64) while in S3 there is an average air gap of 0.25 mm between the aluminium holder and the sample. Then, this gap slightly decreases during each warming-up. At the end of the experiment (S36), this gap is at an average of around 0.3 mm. At the pore scale, small crystals (of about 50 μm or less) mainly appear and grow at the matrix-air interface (red arrows in Figure 64), which is consistent with cryo-SEM observations (Figure 63). These particles have a grey level intensity, i.e. a linear X-ray attenuation coefficient below the one of the matrix (about 10% less). The number and the size of these crystals depend on the freezing time and the temperature. During the warming-up stage, some ice crystals can totally or partially disappear (see red arrows in S18-S22 and S27-S31, Figure 64).

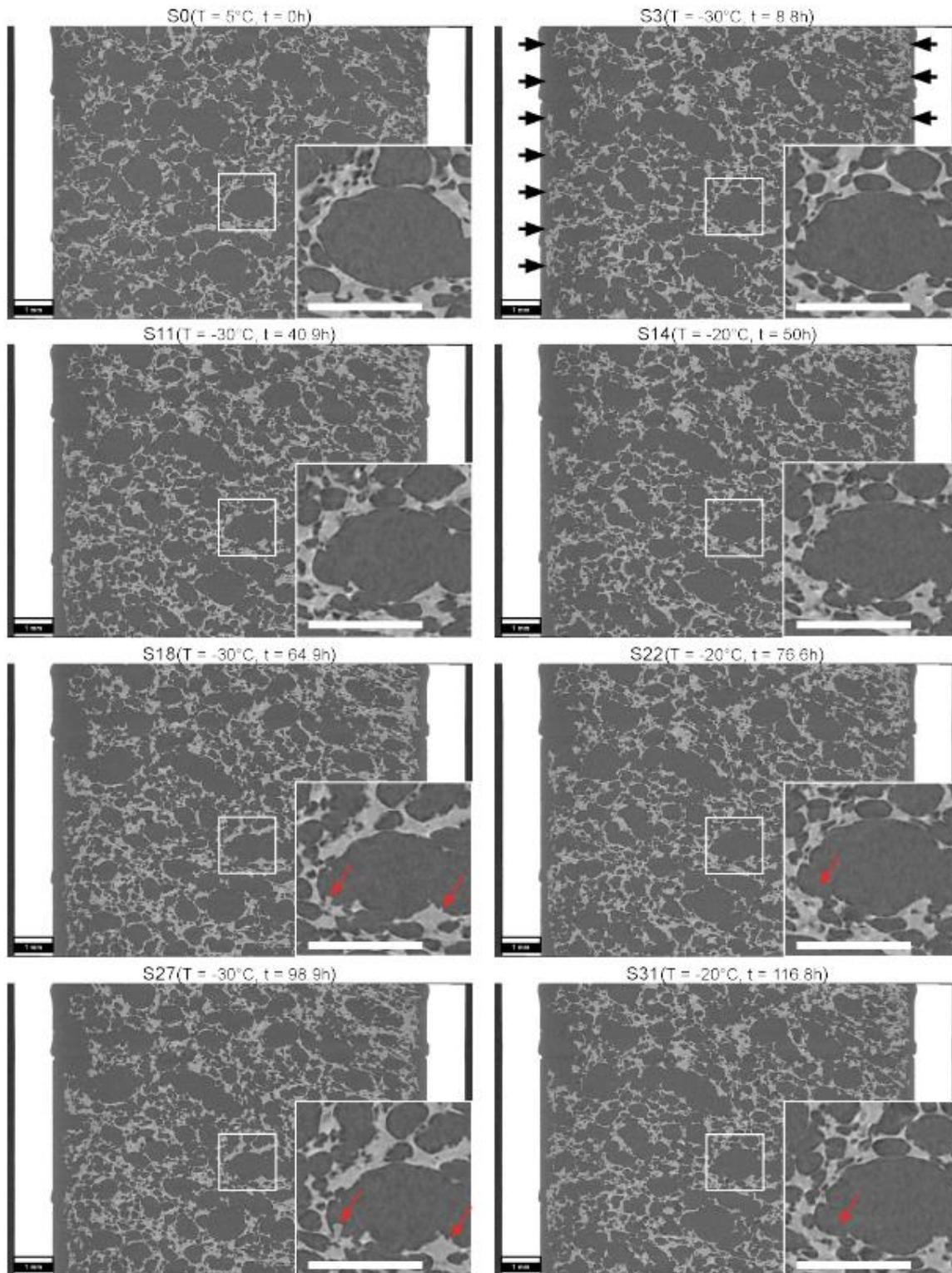


Figure 64 : Vertical slices of some 3D images showing the evolution of the matrix microstructure and the growth of the ice crystals during the experiment.

III.2 Porosity and pore sizes

As already mentioned, the sponge cake sample exhibit a highly porous microstructure and about 99% of the air volume was found to be connected, i.e. the volume of pores trapped in the matrix was less than 1% of the total air volume in the sample.

The pores size and distribution computed from the 3D images are presented in Figure 65. Figure 65 (a) shows that most of the pores are within the range 0.1 to 0.9 mm. The number of pores with $d_{eq}^{ice} < 0.4$ mm slightly decreases during the experiment. No pore with $d_{eq}^{ice} < 0.1$ mm is detected for the S36 scan. This can be explained by the shrinkage of the sample that decreases the pores size and makes the smallest ones not detectable by the experimental set-up. This is not an image processing artefact since $d_{eq}^{ice} = 0.1$ mm is much larger than the image voxel size (0.015 mm). On the other hand, the characterization of the largest pores (typically with $d_{eq}^{ice} > 1.0$ mm) may undergo some image processing issues. Some of the biggest pores might be over-splitting while others are under-splitting by the 3D watershed algorithm. Despite such image processing issues, the 3D images clearly show that the sponge cake matrix presents some large pores whose diameters are within the range 1 - 5 mm.

The number of pores is initially about 5000 (Figure 65 (b)), and their mean equivalent diameter is about 0.4 mm (Figure 65 (c)). During the experiment, the number of pores decreases while the mean equivalent diameter increase. These evolutions are mainly related to the shrinkage of the matrix during the experiment. Indeed, as already underlined, due to the shrinkage, the smallest pores with a diameter below 0.1 mm may disappear or become too small to be detectable. Consequently, the number of pores decreases and the mean equivalent pore size increases.

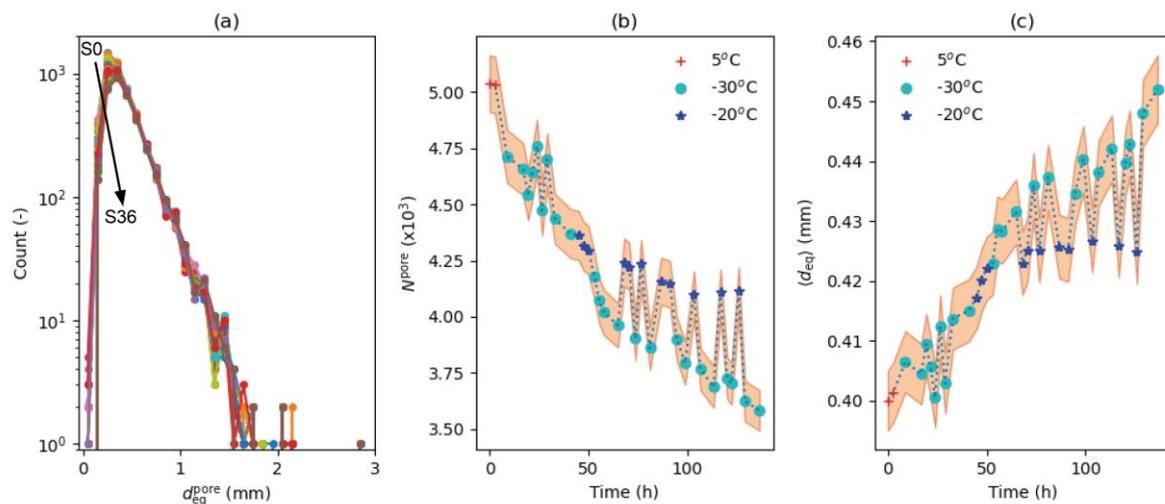


Figure 65: Evolution during the experiment of: (a) the distribution of the equivalent diameters of the pores d_{eq}^{pore} , the class width is 0.1 mm, each scan is represented by a color, (b) the number of pores inside the sample N^{pore} , and (c) the mean equivalent diameter of these pores $\langle d_{eq} \rangle$. The orange shaded areas correspond to the estimated error.

III.3 Sample shrinkage

Figure 66 presents the evolution of sample volume during the experiment divided by its initial volume. The shaded area represents the estimated errors obtained with different grey level thresholds (see Section 2.4.4). This figure shows that during the first freezing stage (from S0 ($T=5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t=0\text{ h}$) to S3 ($T=-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t=8.8\text{ h}$), the shrinkage of the sample is about 4%.

After 32 hours at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (S11), this shrinkage attains nearly 6%. During the seven warming-up/cooling cycles, this shrinkage is almost stable and oscillates between 5% and 8%. The shrinkage phenomena is discussed in the section 3.7.3.

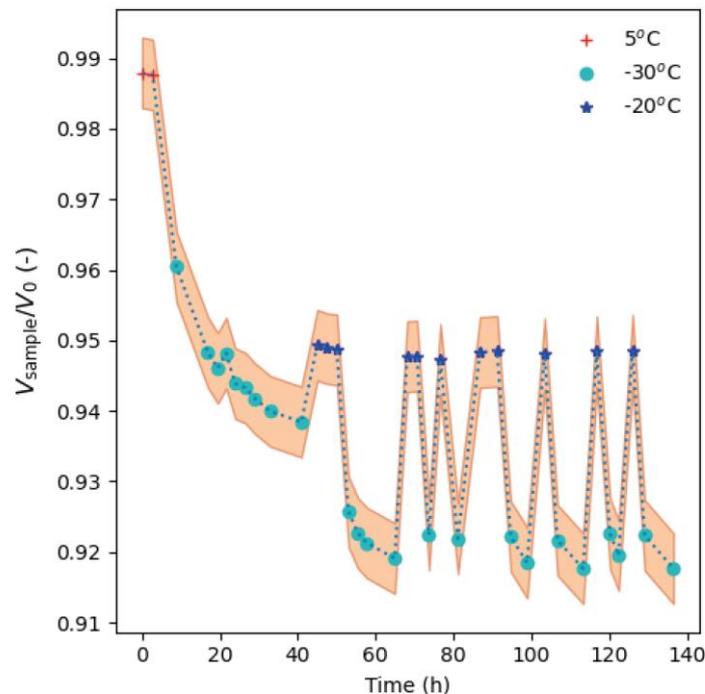


Figure 66: Evolution of the sample volume $V_{\text{sample}}=V_0$ during the experiment.

III.4 Evolution of the volume fraction of each phase

The vertical profiles of the 3 phases' volume fractions are plotted in Figure 11. These profiles show that the vertical distribution of the three phases is not perfectly homogeneous. The variations are typically around 10% for the matrix and air volume fractions (Figure 67(a) and (b)). Despite such heterogeneities, Figure 67 shows that the shape of these profiles are quite similar during the experiment, indicating an homogeneous phenomenon along the height of the sample. On the other hand, the ice volume fraction profiles plotted in Figure 67 (c) show that the ice content increases during the experiment and that this phenomenon is also rather homogeneous in the sample.

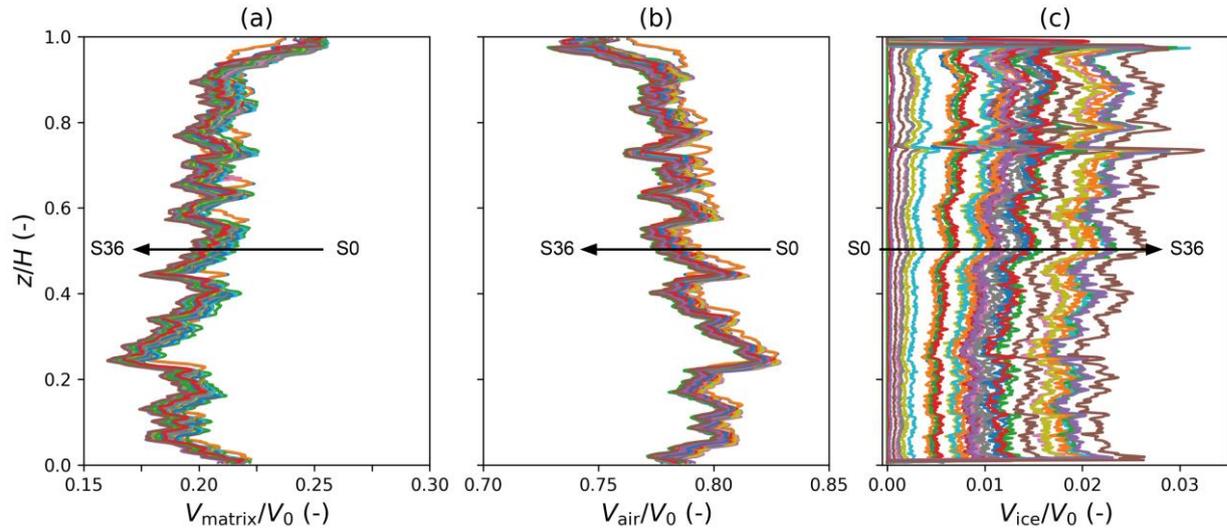


Figure 67: Vertical profiles of the 3 phases' volume fractions during the experiment: (a) matrix (cake) volume fraction $V_{matrix}=V_0$, (b) air volume fraction (porosity) $V_{air}=V_0$, and (c) ice volume fraction $V_{ice}=V_0$.

Figure 68 shows the evolution of the volume fractions of the 3 phases during the whole experiment. Both matrix and air volume fraction are mainly decreasing, respectively at a rate of $-8.5 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ and $-8.6 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-1}$, as shown by the linear regressions plotted on Figure 68 (a) and (b). By contrast, the volume fraction of ice increases and reaches a final value of about 0.024 ± 0.006 at the end of the experiment. All these evolutions are mainly related to the shrinkage process and the crystals growth. During the freezing stage, the water initially present in small pores of the matrix has migrated in the larger pores network and then has been transformed in ice crystals. This leads to a decrease of the volume of the matrix, but also of the volume of the pores due to both the disappearance of the smallest pores within the matrix and the crystals growth within the large pores. Finally, the ice volume fraction was computed and presented in Figure 68 (c). Using S3 scan as a reference, this measurement does not take into account the ice initially present in S3 due to the freezing. However, the Figure 68 (c) shows that after 8 hours (S4), the ice volume fraction is very low and is about 0.02%. As a consequence, it seems reasonable to suppose that the ice volume fraction that might be present in the reference scan S3, made 2 hours after freezing might be as low as 0.005%. Consequently, the error that was made by considering the S3 scan as a reference is negligible.

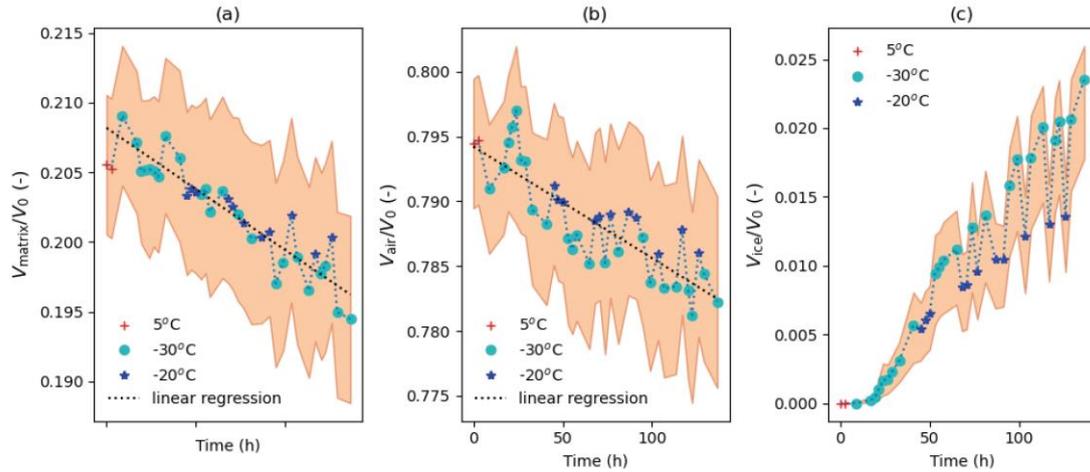


Figure 68: Evolution during the experiment of the (a) matrix volume fraction $V_{matrix}=V_0$, (b) air volume fraction (porosity) $V_{air}=V_0$, and (c) ice volume fraction $V_{ice}=V_0$.

III.5 Ice crystal properties

Figure 69 presents 3D rendering of the sponge cake after segmentation at different time of the experiment. Within the chosen 3D images, the first ice crystals (in blue) are visible for S11. They cover the matrix surface fairly evenly with maybe a preference for narrow regions (small pores), and are small (characteristic dimensions of 20 -25 μm) with round shapes.

During the thermal cycle, the number of ice crystals increases. They present different shapes and dimensions, ranging from small rounded particles to angular shaped crystals with a length of 0.1 mm and an aspect-ratio between 3 and 4. During the warm-ups, the ice crystals size decreases globally. Consequently, some of the smallest crystals can disappear and the number of crystals thus decreases. However it seems that some large crystals are not affected, their size remain almost constant and even grow (see S27-S31 in Figure 69).

The distribution of the ice crystals equivalent diameter d_{eq}^{ice} is plotted in Figure 70 (a). This figure shows that in the early stage of the experiment, about 80% of the total ice volume is composed of ice crystals such as $d_{eq}^{ice} < 30 \mu\text{m}$. By contrast, in the last steps of the experiment, more than 95% of the total ice volume is composed of particles with size higher than 30 μm . The maximum equivalent diameter measured is about 150 μm .

Figures 70 (b) and (c) show that the total number of ice crystals N^{ice} strongly increased up to 350,000 and that the mean ice crystal volume $\langle v^{ice} \rangle$ increased linearly up to 40,000 μm^3 . It must be mentioned that during the first steps after the freezing, the granulometry of the ice crystals is less accurate due to the resolution of images and the precision of the image processing, i.e., the smallest particles may not be detected or with a low precision. Finally, as already mentioned, the number of ice crystals decreases of about 15-20% after each warm-up cycle and the size of the crystals also decreases.

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

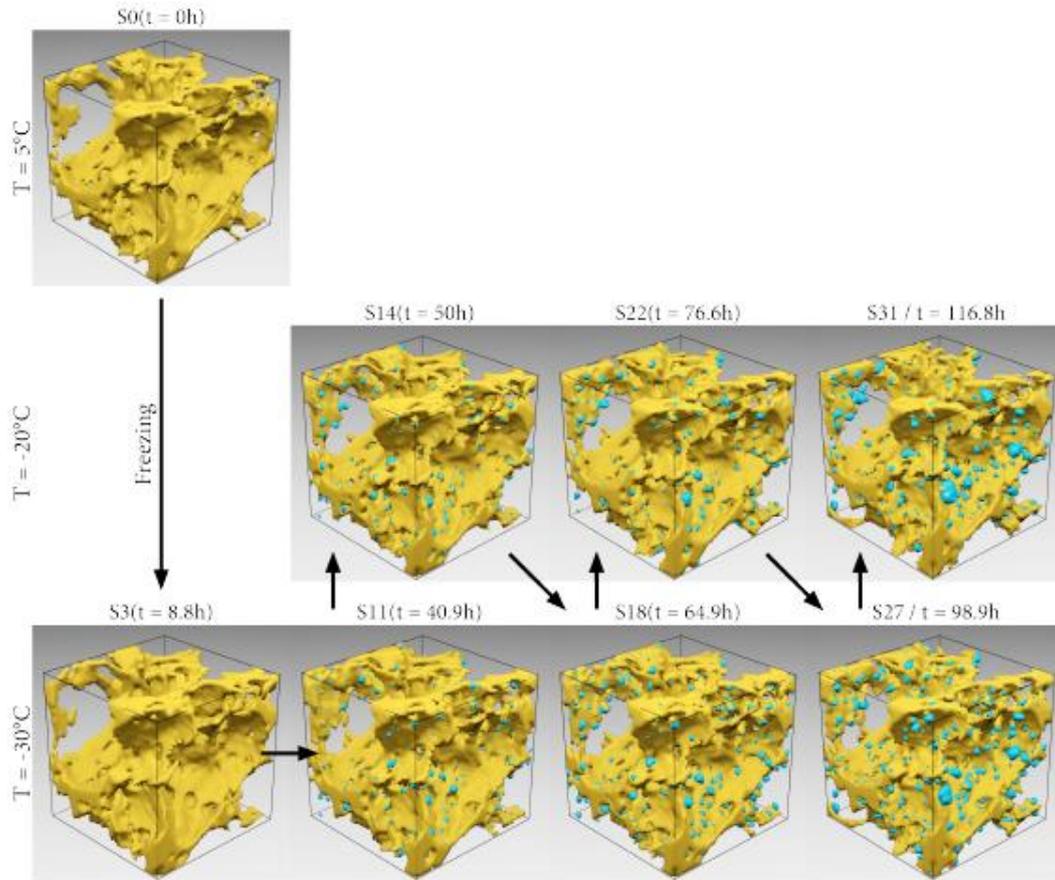


Figure 69: 3D rendering of matrix (yellow) and ice crystals (blue). The length of the edges of the bounding box is 1 mm.

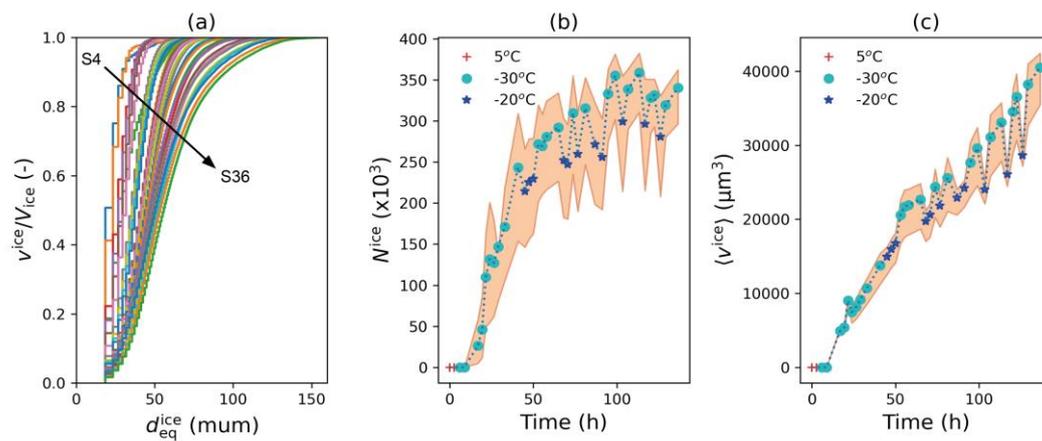


Figure 70: Evolution of the granulometry of the ice crystals during the experiment: (a) equivalent diameter distribution (class width: 10 μm), (b) number of ice crystals, and (c) mean ice crystal volume v_{ice} .

III.6 Specific surface areas

Figure 71 presents the evolution of the three SSAs: $SSA_{\text{matrix/air}}$, $SSA_{\text{ice/air}}$ and $SSA_{\text{ice/matrix}}$. We can observe that $SSA_{\text{matrix/air}}$ is about 10 mm^{-1} at the beginning and slightly decreases during the experiment. This decrease is linked to the apparition of the ice crystals mainly at the interface air-matrix. Consequently, the $SSA_{\text{ice/matrix}}$ increases and tends towards 1 mm^{-1} at the end of the experiment, i.e. around 10% of the air-matrix interface is covered by ice crystals.

Finally, the differences between the SSA values of the two first scans S0 and S1 are very small. While their acquisition time was separated by 3 hours, these results show: (i) the stability of the sample in the experimental set-up, and (ii) the ability of the image analysis to provide repeatable data.

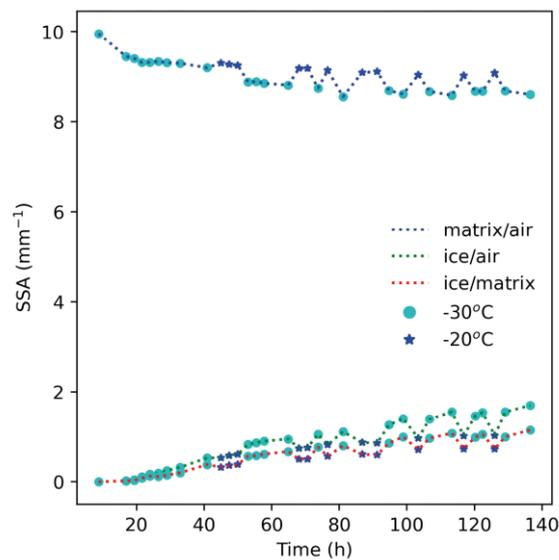


Figure 71: Evolution during the experiment of the specific surface areas between the 3 phases: air, matrix and ice, $SSA(\text{interface}) = S(\text{interface})/V_0$.

III.7 Discussion - Physical processes

III.7.1 Ice crystals location

One specificity of applying X-ray μ CT to follow ice crystals formation and growth is the possibility to get a mapping of ice crystals into the frozen sponge cake crumb. Figures 61 (g) and (h) give a 2D representation of this ice crystals mapping. A 3D rendering is shown in Figure 69. In both renderings, ice crystals labelled in blue seem to be located essentially at the matrix-air interface. This observation is more precisely demonstrated in a schematic representation at local scale (Figure 62). All ice crystals are found to surround partially the pores surface and no crystal was located inside the sponge cake crumb matrix. Furthermore, the SSA evolution of ice shown in Figure 71, points out that the ice-air interface is always larger than the ice-matrix interface. Moreover, the SSA of matrix with air decreases inversely with the increase of SSA of ice with air. But SSA of the matrix with air and ice remains

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

constant over time. This result also supports the hypothesis that ice crystals are mainly formed at the periphery of the pores and grow inside the pores. Similar conclusion were reported by Chen et al. (2012) who studied ice crystals formation and distribution in wheat bread, using DSC measurements. The DSC thermograms obtained in their study show a minor ice melting endotherm that precedes a major one. The authors attributed the minor endotherm to the melting of ice crystals located in tiny pores and capillaries within the gluten-starch matrix. In contrast, the major endotherm would be due to the melting of large ice crystals housed in gas cells that form large pores. It is worth noting that the smallest pore and ice crystal size observable in our study corresponds to the image voxel size (15 μm). Nevertheless, it is quite possible that even smaller pores are embedded inside the matrix and that ice crystals have formed and grown inside without reaching a size detectable with the method used in this study.

Other authors also argued that ice crystals formed upon freezing of porous food materials are mainly originated from pores (Baier-Schenk et al. 2005, Kontogiorgos and Goff 2006, Kontogiorgos et al. 2008). Baier-Schenk et al. (2005) imaged ice formation during freezing of bread dough and observed first ice crystals formation at the pore interfaces. They concluded that gas pore interfaces are preferential sites for ice nucleation thus favouring the growth of ice crystals into the pores. They also admitted that small ice crystals formed inside the dough matrix but are of smaller size than the ice crystals inside the gas pores. The random nature of nucleation makes it difficult to know the exact mechanisms involved on the surface of the pores. But, the structured aspect of pores surface may promote the nucleation because of irregularities that can constitute nucleation sites (Baier-Schenk et al. 2005).

There is no consensus about the mechanism by which ice nucleation occurs at the pores surface. The most plausible mechanism would be related to the coupled heat and moisture transfers that take place during freezing of porous foods and known as evapo-condensation phenomena. This theoretical model has been found to correctly predict the large variations of thermophysical properties with temperature in porous foods (Hamdami et al. 2004). In the case of sponge cake, when the product temperature is cooled down, the matrix phase becomes warmer than the pores. Indeed, the thermal diffusivity of the air inside the pores is much higher (nearly $10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$) than the sponge cake matrix thermal diffusivity (around $10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$). Water thus diffuses through the matrix and evaporates inside the pores. Once the pores surface reaches the freezing point, the water vapour inside the pores condenses at the pores surface, thus initiating ice formation.

III.7.2 Ice crystals growth and recrystallization

In-situ X-ray μCT allows us to follow the ice crystals profile into the same frozen sponge cake crumb during thermal cycling ($-30 \text{ }^\circ\text{C}$ to $-20 \text{ }^\circ\text{C}$) over a period of 6 days. Ice crystals size distributions over time are depicted on Figure 70(a). It can be seen that the distributions are shifted to the right side when aging time rises, showing an increase of ice crystals size with time. First observable ice crystals were detected for S4 (about 18h at $-30 \text{ }^\circ\text{C}$) with sizes

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

ranging from 15 to 50 μm and 80% of the particles with sizes smaller than 30 μm . For S11 (about 41h at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) which is the last scan before the beginning of the thermal cycling, the ice crystals size distribution slightly enlarged to a maximum size of 60 μm , but 70% of particles are still very small with sizes lower than 30 μm . This result shows a very low growth of ice crystals between S4 and S11. On the other hand, the number of ice crystals increased 10 times during this period at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ as can be seen on Figure 70(b). The present result may be related to the fast freezing rate ($15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) that implies a high super-cooling leading to the formation of numerous ice nuclei with small critical size for growth. Furthermore, the fast freezing rate combined to the low temperature slows down water diffusion resulting on limited growth of nuclei and small ice crystals. The increase in ice crystals number could be explained assuming two mechanisms that happen concomitantly (Figure 72): (i) nucleation continues and new ice crystals are formed, (ii) existing ice crystals grow from local freezable water in the surrounding space to reach an observable size. From S12 to S36 (the last scan), ice crystals size distributions continue to expand steadily reaching a maximum size of 150 μm as shown in Figure 70(a).

During thermal cycling, the mean ice crystal volume exhibits a quasi-linear increase (Figure 70(c)) while the increase of the number of ice crystals is strongly slowed down and seems to tend towards a plateau (Figure 70(b)). Temperature cycling near the melting point of ice in the sponge cake crumb ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$) increased water mobility and promotes further growth of ice crystals by recrystallization phenomenon based on Ostwald ripening. In the case of porous foods, recrystallization by Ostwald ripening may involve both melting-diffusion-refreezing or sublimation-diffusion-condensation processes (Zaritzky 2008). Indeed, the DSC thermogram displayed in Figure 57 shows the co-existence of ice and liquid water (from melted ice) within the thermal cycling temperature range ($-30\text{ }^{\circ}\text{C} / -20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Depending on the temperature and pressure local conditions within the product, melting or sublimation of ice can occur. When the sponge cake is warmed up, small ice crystals, which have a low energy stability, tend to melt/sublime and can even completely disappear. Water molecules thus released are redistributed through the sample and are redeposited onto large ice crystals, which are thermodynamically favoured. As mentioned earlier, in the case of porous materials, water redistribution occurs preferentially towards the pores where large ice crystals get bigger. Both melting-diffusion-refreezing and sublimation-diffusion-condensation mechanisms yield to a decrease of ice crystals number and to larger ice crystals size in the sponge cake. The fact that the number of ice crystals does not effectively diminish in this study might be explained by the continuous growth of small ice crystals, which become more and more detectable as the thermal cycling progresses.

These results are in line with the findings of Chen et al. (2013) who reported ice crystals growth by recrystallization during aging of frozen wheat bread, even though they do not measure ice crystals size directly. Bárcenas and Rosell (2006) also reported similar results for long-term storage of frozen par-baked bread without evidencing the ice crystals growth by direct measurements. Recrystallization was also found to be responsible for ice crystals growth and consequent microstructure destruction during aging of frozen flour-water mixture

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

using nuclear magnetic resonance and transmission electron microscopy (Kontogiorgos and Goff 2006). But, to our knowledge, there is no published work describing in situ ice crystals formation and growth while quantifying ice crystals size in frozen sponge cake.

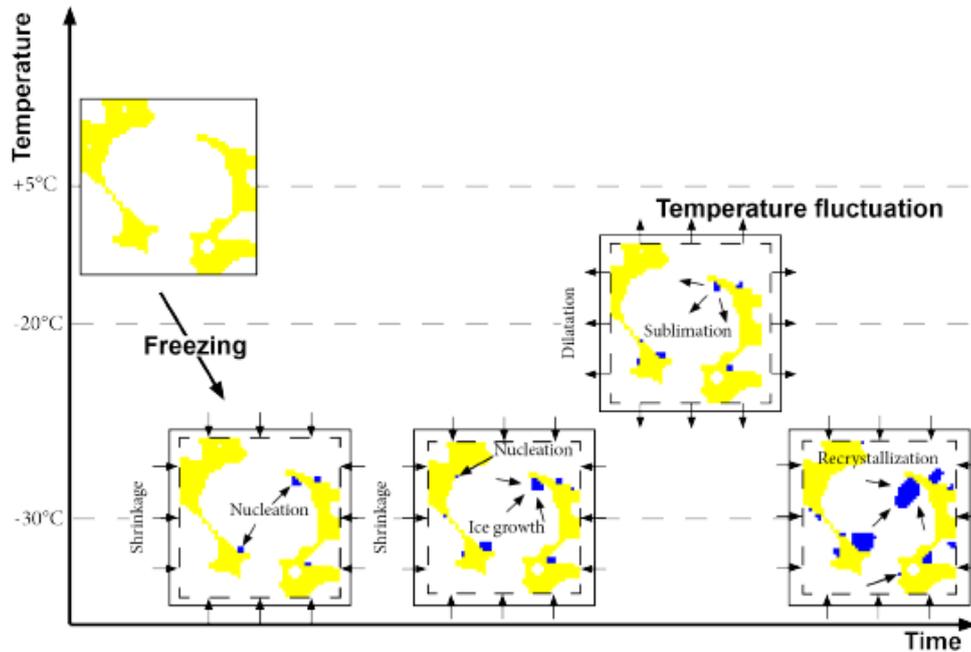


Figure 72: Physics of the sponge cake during its freezing and storage.

III.7.3 Shrinkage behaviour

Sponge cake shrinkage of about 4-6 % was observed at the early stage of the freezing process when the product temperature passes from 5 °C to -30 °C (Figure 66). During the thermal cycling, this volume retraction fluctuates between 5% (at -20 °C) and 8% (at -30 °C). The volume change that occurs at the cooling-freezing step could be related to the migration of the water initially inside the sponge cake matrix towards the macro-pores, where ice crystals are preferentially formed. When the sponge cake is warmed up to -20 °C, ice crystals sublimation can lead to dilatation particularly inside micropores where small crystals are more likely to sublimate. This results in a slight reduction of the volume retraction as can be seen in Figure 66. When the product is cooled down again to -30 °C, water diffuses through the matrix and evaporates inside the macropores but at a slower rate than during the first freezing step.

Moreover gas entrapped in the closed pores may contract. Consequently, micropores may become smaller or disappear leading to the sample volume retraction. This mechanism is consistent with the results depicted in Figure 65 (b) that shows a decrease of the total number of pores during the whole experiment and an increase of the number of pores when the sponge cake is warmed up to -20 °C. This pore number increase is accompanied by a decrease of the mean equivalent diameter of pores (Figure 65 (c)) meaning that these new pores are of small size (see section 3.2). To our knowledge, such results were not reported in the literature about

sponge cake. Nevertheless, the shrinking phenomenon was extensively studied in bread crumb. Ribotta and Le Bail (2007) reported similar trend during freezing of bread. The authors argued that the retraction of bread crumb could be related to the dehydration of the matrix during freezing due to the removal of water from the protein-starch-water system in the form of ice. A bit later, Jiang et al. (2008) showed that cellular bread crumb (with pores) shrinks during freezing whereas degassed bread crumb expands. They also explained their results by the matrix dehydration following the formation of crystals inside the pores during freezing in the case of cellular bread crumb, while these crystals are formed inside the matrix in the case of degassed bread. More recently, this phenomenon was also noticed by Aissa et al. (2010) while comparing cellular and degassed bread crumbs. Besides the hypothesis of the dehydration of the matrix, these authors assumed the compression of the gas inside the pores to explain the shrinking behaviour of the cellular bread crumb. It is noteworthy that the levels of shrinkage reported in these works on bread are about 3% and therefore well below the results obtained in the case of this study with sponge cake. The difference could be related to the product composition, porosity or to freezing and frozen storage conditions. This remains to be investigated.

IV. Conclusion

An original set-up, initially developed for snow, was used in order to characterize microstructural changes of a sponge cake sample during freezing and subsequent storage at fluctuating temperatures using X-ray tomography. 3D images of the same sample were performed at different times during 6 days. An image processing based on Digital Volumetric Correlation (DVC) was implemented in order to segment the images and then to quantify porosity changes and ice crystal formation and growth. Several microstructural parameters (volume fraction of ice, air and matrix, number and equivalent diameter of pores and ice crystals, specific surface areas) were then computed from the 3D images. Overall, the obtained results of this first experiment have shown that:

- During the freezing step, the sample was submitted to an important shrinkage of about 4-6%. During the seven warming-up/cooling cycles, this shrinkage was almost stable and oscillated between 5% and 8%. The macro-pores network of the sample is slightly affected by this shrinkage, whereas the small pores inside the matrix have disappeared.
- During the thermal cycles, ice crystals mainly formed and enlarged at the macro-pore interface, whereas no crystal was found in the porous matrix. Thermal cycling was found to promote ice crystals growth due to the recrystallization phenomenon. Ice crystals size increased linearly with thermal cycling duration whereas their number tends towards a plateau.

In a near future, this experiment, which is long and complex, must be repeated in order to confirm the findings and to take into account the variability of food products. The obtained results open the way for future modeling to characterize the impact of freezing and frozen storage on the microstructure and quality of sponge cake. Moreover, the proposed

Chapitre 5: Effet de la congélation et des fluctuations de températures sur l'évolution de la microstructure de la génoise de référence.

methodology, which allows to study the microstructural changes of the same sample induced by complex thermal loadings, could be applied on other frozen porous products.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Au cours de la congélation d'un produit alimentaire, une structure cristalline se développe et continue d'évoluer tout au long de la chaîne du froid notamment durant les étapes de stockage où les produits sont susceptibles de subir des variations de températures. Les phénomènes de cristallisation et de recristallisation qui ont lieu vont modifier la microstructure des produits et par conséquent altérer leur qualité. Il apparaît donc essentiel de bien comprendre ces modifications de microstructure en fonction des paramètres de la chaîne du froid pour préserver la qualité des éléments congelés.

Dans la littérature, la congélation des produits alimentaires tels que des produits carnés et végétaux a largement été étudiée, contrairement aux produits alimentaires poreux de boulangerie et de pâtisserie, mise à part la pâte à pain et le pain. Par ailleurs, ces études demeurent partielles, i.e. elles se sont intéressées en général à un seul maillon de la chaîne du froid (la congélation ou le stockage). Le principal objectif de ce travail de thèse était donc d'étudier l'impact couplé de la congélation et des conditions de stockage sur l'évolution de la microstructure d'un produit alimentaire poreux : formation et la localisation de glace dans la matrice poreuse, évolution de la structure cristalline par des mécanismes de cristallisation et de recristallisation.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi d'étudier la génoise. La génoise est un gâteau avec une forte porosité, il s'agit de l'un des gâteaux les plus congelés et les plus consommés. Sa structure poreuse possède un certain nombre de caractéristiques (porosité, connectivité des pores et surface spécifique...) qui jouent un rôle primordial dans les transferts de chaleur et d'humidité pendant la congélation. Pendant la congélation de la génoise, des phénomènes de transfert de chaleur et de masse se produisent et interagissent dans les différentes phases (pores et matrice). La compréhension de ces phénomènes est la clé pour contrôler l'évolution de la microstructure pendant la congélation et le stockage de la génoise. Deux types de génoises ont été étudiés : une génoise modèle non réactive avec une forte teneur en eau et une génoise réelle de référence, réactive et pauvre en eau.

Le protocole de fabrication de ces génoises a été validé par une série de mesures des propriétés thermo-physiques (densités, teneur en eau, porosité...). Des mesures par DSC ont aussi été réalisées afin de déterminer la température de congélation commençante et la fraction d'eau congelable dans la génoise cuite. Différentes techniques ont ensuite été mises en œuvre afin de caractériser l'évolution de la microstructure en cours de congélation et de stockage : le CryoMEB à haute résolution et la microtomographie RX (de type synchrotron et de laboratoire) associée à des cellules cryogéniques (CellStat, CellDyM) initialement développées pour étudier les métamorphoses de la neige.

- Dans le cas de la génoise modèle (cf. chapitre 3 et 4), des échantillons de génoise ont été préparés et congelés à deux vitesses différentes (congélation lente et rapide) puis stockés pendant deux semaines dans des conditions stables ou avec fluctuations de températures. Les échantillons ont été ensuite visualisés à l'état congelé à très haute résolution en utilisant

Conclusion générale et perspectives

l'imagerie par cryo-MEB et une cellule thermostatée CellStat installée sur la ligne ANATOMIX (synchrotron Soleil).

- Dans le cas de la génoise de référence (cf. chapitre 5), l'évolution de la microstructure d'un même échantillon de génoise pendant sa congélation et son stockage (avec fluctuations de température) a pu être suivie et quantifiée en continu pendant 6 jours à l'aide de la cellule CellDyM installée sur un microtomographe de laboratoire. Dans ce cas, une méthode de traitement d'image spécifique basée sur la corrélation d'images digitales (DVC) a été mise en œuvre pour segmenter les images obtenues, i.e. séparer les différentes phases, et suivre l'évolution de la microstructure.

Après segmentation, l'ensemble des images 3D segmentées ont permis de quantifier l'évolution de différents paramètres microstructuraux comme les fractions volumiques des différentes phases, les surfaces spécifiques, les épaisseurs locales de la glace, la courbure moyenne, le nombre et la taille des cristaux de glace. L'ensemble des résultats obtenus a ainsi permis de comprendre d'une part l'influence de la vitesse de la congélation et d'autre part l'impact couplé de la vitesse de congélation et des conditions de stockage sur la microstructure des génoises.

Effets de la vitesse de congélation sur la formation et la localisation de la glace (génoise modèle)

L'analyse quantitative des images (cf. chapitre 3) a permis de montrer que la congélation rapide favorise la formation d'une couche de glace mince à l'interface air-matrice dans les macropores et la formation de cristaux de glace de petite taille à l'intérieur de la matrice d'amidon, distribués de façon homogène. La congélation lente favorise quant à elle la formation d'épaisses couches de glace dans les macropores et une répartition hétérogène (taille, forme) des cristaux de glace à l'intérieur de la matrice d'amidon. Par ailleurs, la majorité de la glace est formée dans la matrice en congélation rapide (69%) tandis que seul 1/3 de la glace se forme dans la matrice en congélation lente. Ces différences dans la formation des cristaux de glace et leur localisation peuvent s'expliquer par les phénomènes de nucléation et de croissance au sein du matériau poreux qui dépendent des transferts thermiques et de la diffusion de l'eau congelable. Dans le cas de la congélation rapide, un refroidissement rapide et un fort gradient de température, favorisent la formation de nombreux nucléi dont la croissance est limitée par la faible diffusion de l'eau. En congélation lente, la faible diffusivité thermique de la matrice comparée aux pores favorise la migration de l'eau vers les pores à la surface desquels la glace se forme préférentiellement.

Effets couplés de la vitesse de congélation et des conditions de stockage (durée, stable ou avec fluctuations) (génoise modèle)

Les résultats obtenus (cf chapitre 4) ont montré que quelle que soit la vitesse de congélation initiale et les conditions de conservation, la microstructure cristalline évolue. Ces évolutions (croissance des cristaux de glace) sont plus marquées lorsque les produits sont congelés lentement quelles que soient les conditions de stockage. Dans ce cas, la croissance des cristaux par des mécanismes de recristallisation est amplifiée par la migration de l'eau de la

matrice vers les pores, ce qui conduit à des modifications plus importantes de la microstructure. Même si la microstructure continue d'évoluer au cours du stockage, une congélation rapide conduit toujours à une microstructure moins endommagée (petits cristaux) qu'une congélation lente. Cette étude a également permis de mettre en évidence des phénomènes de migration de l'eau différents selon les conditions de stockage : un stockage à une température stable favoriserait une redistribution locale de l'eau dans la matrice ou dans les pores tandis que les fluctuations de température entraîneraient une diffusion plus importante de l'eau de la matrice vers les pores et par conséquent une relocalisation de la glace.

Ces effets synergiques des conditions de congélation et de stockage sont démontrés pour la première fois et constituent une belle avancée dans les connaissances des spécificités mécanistiques liées à la congélation des produits alimentaires poreux. L'ensemble de ces résultats montrent clairement la nécessité de maîtriser l'ensemble des paramètres de la chaîne de froid afin de préserver la qualité des produits congelés.

Effet de la congélation et d'un cyclage thermique sur la formation et la croissance des cristaux de glace (génoise de référence)

La cellule CellDyM a permis de suivre l'évolution de la microstructure d'un même échantillon au cours de sa congélation et de son stockage avec des fluctuations de température. Les premiers résultats obtenus ont permis de mettre évidence différents phénomènes, comme la rétraction de la matrice poreuse lors de la congélation et du cyclage thermique ainsi que la formation et la croissance des cristaux. Après congélation, de nombreux cristaux semblent se former initialement à l'interface des pores qui sont des sites préférentiels pour la nucléation de la glace. Ces cristaux sont petits (autour de 30 μm au départ) et croissent lentement. Au cours des cycles thermiques, la taille de ces cristaux augmente quasi-linéairement et leur nombre augmente avant d'atteindre un plateau. Ceci peut être expliqué par le cyclage imposé à des températures proches de la température de fusion des cristaux qui favorise les phénomènes de recristallisation (avec fonte ou sublimation de petits cristaux) avec redistribution de l'eau préférentiellement vers les pores pour grossir les cristaux à la paroi.

Les mécanismes qui avaient été mis en évidence à travers les études sur la génoise modèle sont bien retrouvés dans le cas de la génoise réelle : une formation préférentielle des cristaux à l'interface des macropores durant la congélation (lente dans ce cas), une croissance de ces cristaux par migration de l'eau de la matrice vers les pores en cours de stockage avec des fluctuations thermiques. Cette analogie dans les mécanismes de transferts mis en œuvre dans les deux types de génoise, malgré les différences de caractéristiques notamment en terme de teneur en eau, montre que la génoise modèle utilisée dans cette étude est un produit capable de représenter une génoise réelle en ce qui concerne l'étude de la microstructure cristalline. Ce premier résultat est très prometteur et ouvre de nombreuses perspectives quant à la caractérisation de produits congelés, de l'étape de congélation, en passant par le stockage

Conclusion générale et perspectives

jusqu'à la décongélation et à la compréhension des différents mécanismes mis en jeu aux cours de ces différentes étapes.

Par ailleurs, les méthodes de caractérisation et les processus d'analyse d'image mis en place dans le cadre de cette étude ont bien démontré leur robustesse. Leur application pourrait être étendue à d'autres types de produits poreux congelés. Il est important de noter que ces résultats sont tout à fait novateurs et apportent une pierre importante à la compréhension des mécanismes de transferts de chaleur et d'humidité dans les produits poreux en cours de congélation.

Perspectives

Ce travail de thèse ouvre plusieurs perspectives.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de regarder la microstructure de ces produits poreux après leur décongélation et de la comparer avec celle initiale. L'intérêt de la congélation est de maintenir le plus et le plus longtemps possible l'état initial du produit. Il serait aussi intéressant de regarder des critères macroscopiques de qualité de l'aliment, après sa décongélation, comme sa texture et sa perte en eau. Ceux-ci sont le signe d'une modification d'une structure initiale dans laquelle l'eau est emprisonnée.

Les résultats expérimentaux obtenus sont très prometteurs et peuvent contribuer à expliquer les phénomènes de transfert de chaleur et masse au sein d'un milieu poreux au cours de sa congélation et pendant son stockage. Même si certaines expériences mériteraient d'être répétées, l'ensemble des images 3D obtenues constitue une base de données importante pour, soit valider une modélisation fine des phénomènes de transfert à l'échelle des pores pour bien comprendre les mécanismes en jeu, soit pour calculer les propriétés effectives associés aux phénomènes de transfert nécessaires dans les modélisations macroscopiques, i.e. à l'échelle du produit. Ceci peut en effet être réalisé par la résolution sur des volumes élémentaires représentatifs extraits des images 3D des problèmes aux limites issus de processus d'homogénéisation (Calonne et al. 2011, Calonne et al. 2014).

La génoise modèle étudiée est une génoise riche en eau (environ 60%), après la congélation, l'eau congelée forme un bloc (squelette) de glace. Dans ces conditions il est difficile de séparer les cristaux de glace et donc d'évaluer leur évolution en nombre et en taille. Il serait intéressant d'améliorer le protocole actuel afin d'avoir une génoise modèle avec moins d'eau tout en conservant les mêmes caractéristiques (porosité et propriétés thermophysiques) afin de pouvoir individualiser la population de cristaux et se rapprocher plus de la microstructure d'une génoise réelle.

D'un point de vue méthodologique, les cellules thermostatées utilisées (CellStat et CellDyM), initialement développées pour la caractérisation de la neige, ont montré leur intérêt pour étudier les produits alimentaires congelés. En effet ces cellules présentent l'intérêt soit de préserver l'échantillon dans des conditions stables pendant des temps longs, qui sont souvent

Conclusion générale et perspectives

nécessaires à l'acquisition d'images en microtomographie RX de bonne qualité, ou bien d'imposer un champ de température contrôlé variable dans le temps afin de refléter les différentes phases de la chaîne de froid. Ces cellules peuvent être adaptées pour étudier un grand nombre de produits alimentaires (poreux ou pas).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agoulon, A. (2010). *Impact des paramètres de surgélation sur les caractéristiques des denrées alimentaires*, Air Products.
- Aissa, M. F. B., Monteau, J.-Y., Perronnet, A., Roelens, G. and Le Bail, A. (2010). *Volume change of bread and bread crumb during cooling, chilling and freezing, and the impact of baking*. *Journal of Cereal Science*, 51(1): 115-119.
- Akbarian, M., Koocheki, A., Mohebbi, M. and Milani, E. (2016). *Rheological properties and bread quality of frozen sweet dough with added xanthan and different freezing rate*. *Journal of Food Science and Technology*, 53(10): 3761-3769.
- Aleong, J. M. (2008). *Novel ice recrystallization inhibition agents in ice cream*, University of Guelph.
- Alizadeh, E., Chapleau, N., de Lamballerie, M. and Le-Bail, A. (2007). *Effect of different freezing processes on the microstructure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4): 493-499.
- Anese, M., Manzocco, L., Panozzo, A., Beraldo, P., Foschia, M. and Nicoli, M. C. (2012). *Effect of radiofrequency assisted freezing on meat microstructure and quality*. *Food Research International*, 46(1): 50-54.
- Anese, M., Mirolo, G., Beraldo, P. and Lippe, G. (2013). *Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility*. *Food chemistry*, 136(2): 458-463.
- Anonyme (, 2016). *Enquête congélation produits pâtisseries-artisans pâtisseries*
- Arsiccio, A. and Pisano, R. (2020). *The Ice-Water Interface and Protein Stability: A Review*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(7): 2116-2130.
- Babin, P., Della Valle, G., Chiron, H., Cloetens, P., Hoszowska, J., Pernot, P., Réguerre, A., Salvo, L. and Dendievel, R. (2008). *In situ fast X-ray tomography study of the evolution of cellular structure in bread dough during proving and baking*. *Bubbles in Food 2*, Elsevier: 265-272.
- Bachtiger, F., Congdon, T. R., Stubbs, C., Gibson, M. I. and Sosso, G. C. (2021). *The atomistic details of the ice recrystallisation inhibition activity of PVA*. *Nature communications*, 12(1): 1-14.
- Baeva, M., Panchev, I. and Terzieva, V. (2000). *Comparative study of texture of normal and energy reduced sponge cakes*. *Food/Nahrung*, 44(4): 242-246.
- BahramParvar, M. and Goff, H. D. (2013). *Basil seed gum as a novel stabilizer for structure formation and reduction of ice recrystallization in ice cream*. *Dairy Science & Technology*, 93(3): 273-285.
- Baier-Schenk, A., Handschin, S., Von Schönau, M., Bittermann, A., Bächli, T. and Conde-Petit, B. (2005a). *In situ observation of the freezing process in wheat dough by confocal laser scanning microscopy (CLSM): Formation of ice and changes in the gluten network*. *Journal of Cereal Science*, 42(2): 255-260.

Références bibliographiques

- Baier-Schenk, A., Handschin, S., von Schonau, M., Bittermann, A. G., Bachi, T. and Conde-Petit, B. (2005b). *In situ observation of the freezing process in wheat dough by confocal laser scanning microscopy (CLSM): Formation of ice and changes in the gluten network*. *Journal of Cereal Science*, 42(2): 255-260.
- Baier-Schenk, A., Handschin, S. and Conde-Petit, B. (2005). *Ice in prefermented frozen bread dough—an investigation based on calorimetry and microscopy*. *Cereal Chemistry*, 82(3): 251-255.
- Baik, M. Y. and Chinachoti, P. (2000). *Moisture redistribution and phase transitions during bread staling*. *Cereal Chemistry*, 77(4): 484-488.
- Ban, C., Yoon, S., Han, J., Kim, S. O., Han, J. S., Lim, S. and Choi, Y. J. (2016). *Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality*. *Lwt-Food Science and Technology*, 73: 219-225.
- Ban, C., Yoon, S., Han, J., Kim, S. O., Han, J. S., Lim, S. and Choi, Y. J. (2016). *Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality*. *LWT*, 73: 219-225.
- Bárcenas, M. a. E., Benedito, C. and Rosell, C. M. (2004). *Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage*. *Food Hydrocolloids*, 18(5): 769-774.
- Bárcenas, M. a. E., Haros, M., Benedito, C. and Rosell, C. M. (2003). *Effect of freezing and frozen storage on the staling of part-baked bread*. *Food Research International*, 36(8): 863-869.
- Bárcenas, M. E. and Rosell, C. M. (2006). *Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread*. *Food Chemistry*, 95(3): 438-445.
- Benmesbah, F. D. (2021). *Étude Cinétique et Thermodynamique des Hydrates de Gaz en Milieu Poreux : Application aux Hydrates Sédimentaires et aux Procédés de Stockage du Froid*, Sorbonne Université.
- Berglund, P., Shelton, D. and Freeman, T. (1991). *by Duration of Frozen Storage and Freeze-Thaw Cycles*. *Cereal Chemistry*, 68(1): 105-107.
- Besbes, E., Jury, V., Monteau, J.-Y. and Le Bail, A. (2013). *Characterizing the cellular structure of bread crumb and crust as affected by heating rate using X-ray microtomography*. *Journal of Food Engineering*, 115(3): 415-423.
- Bevilacqua, A., Zaritzky, N. and Calvelo, A. (1979). *Histological measurements of ice in frozen beef*. *International Journal of Food Science & Technology*, 14(3): 237-251.
- Bevilacqua, A. E. and Zaritzky, N. E. (1982). *Ice Recrystallization in Frozen Beef*. *Journal of Food Science*, 47(5): 1410-1414.
- Bolliger, S., Goff, H. and Tharp, B. (2000). *Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream*. *International Dairy Journal*, 10(4): 303-309.

- Bories, S., Mojtabi, A., Prat, M. and Quintard, M. (1995). Transferts de chaleur dans les milieux poreux, Ed. Techniques Ingénieur.
- Botoosa, E. P., Chénè, C. and Karoui, R. (2013). *Monitoring Changes in Sponge Cakes during Aging by Front Face Fluorescence Spectroscopy and Instrumental Techniques*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(11): 2687-2695.
- Bouddour, A., Auriault, J.-L., Mhamdi-Alaoui, M. and Bloch, J.-F. (1998). *Heat and mass transfer in wet porous media in presence of evaporation—condensation*. International Journal of Heat and Mass Transfer, 41(15): 2263-2277.
- Bousquière, J. (2017). *Impact de la composition et des procédés sur la réactivité d'un produit modèle alvéolé de type cake*, Université Paris-Saclay.
- Bousquière, J., Bonazzi, C. and Michon, C. (2017). *Rational design to develop a non-reactive model food imitative of a baked cereal product by replacing the functional properties of ingredients*. Food Hydrocolloids, 63: 552-560.
- Buljac, A., Jailin, C., Mendoza, A., Neggers, J., Taillandier-Thomas, T., Bouterf, A., Smaniotto, B., Hild, F. and Roux, S. (2018). *Digital volume correlation: review of progress and challenges*. Experimental Mechanics, 58(5): 661-708.
- Calonne, N., Flin, F., Geindreau, C., Lesaffre, B. and Rolland du Roscoat, S. (2014). *Study of a temperature gradient metamorphism of snow from 3-D images: time evolution of microstructures, physical properties and their associated anisotropy*. The Cryosphere, 8(6): 2255-2274.
- Calonne, N., Flin, F., Lesaffre, B., Dufour, A., Roulle, J., Puglièse, P., Philip, A., Lahoucine, F., Geindreau, C., Panel, J.-M., du Roscoat, S. R. and Charrier, P. (2015). *CellDyM: A room temperature operating cryogenic cell for the dynamic monitoring of snow metamorphism by time-lapse X-ray microtomography*. Geophysical Research Letters, 42(10): 3911-3918.
- Calonne, N., Flin, F., Morin, S., Lesaffre, B., du Roscoat, S. R. and Geindreau, C. (2011). *Numerical and experimental investigations of the effective thermal conductivity of snow*. Geophysical research letters, 38(23).
- Carson, J. K. (2014). *Measurement and Modelling of Thermal Conductivity of Sponge and Yellow Cakes as a Function of Porosity*. International Journal of Food Properties, 17(6): 1254-1263.
- Cavalcante, R. S. and Silva, C. E. M. d. (2015). *Effects of sucrose reduction on the structural characteristics of sponge cake*. Revista Ciência Agronômica, 46: 718-723.
- Chassagne-Berces, S., Poirier, C., Devaux, M. F., Fonseca, F., Lahaye, M., Pigorini, G., Girault, C., Marin, M. and Guillon, F. (2009). *Changes in texture, cellular structure and cell wall composition in apple tissue as a result of freezing*. Food Research International, 42(7): 788-797.
- Chen, G., Jansson, H., Lustrup, K. F. and Swenson, J. (2012). *Formation and distribution of ice upon freezing of different formulations of wheat bread*. Journal of Cereal Science, 55(3): 279-284.

Références bibliographiques

- Chen, G., Öhgren, C., Langton, M., Lustrup, K. F., Nydén, M. and Swenson, J. (2013). *Impact of long-term frozen storage on the dynamics of water and ice in wheat bread*. Journal of cereal science, 57(1): 120-124.
- Cheng, W., Sun, D.-W., Pu, H. and Wei, Q. (2018). *Characterization of myofibrils cold structural deformation degrees of frozen pork using hyperspectral imaging coupled with spectral angle mapping algorithm*. Food Chemistry, 239: 1001-1008.
- Chernov, A. (1989). *Formation of crystals in solutions*. Contemporary Physics, 30(4): 251-276.
- Chevallier, S. and Le Bail, A. (2012). *X-ray microtomography to characterize the microstructure of bakery products*. Annual Miro-CT Meeting, Brussels, Belgium, April.
- Chevallier, S., Réguerre, A.-L., Le Bail, A. and Della Valle, G. (2014). *Determining the cellular structure of two cereal food foams by X-ray micro-tomography*. Food biophysics, 9(3): 219-228.
- Choi, H. W. and Baik, B. K. (2013). *Significance of wheat flour particle size on sponge cake baking quality*. Cereal Chemistry, 90(2): 150-156.
- Colbeck, S. C. (1997). *A Review of Sintering in Seasonal Snow*.
- Coles, M. E., Hazlett, R. D., Spanne, P., Soll, W. E., Muegge, E. L. and Jones, K. W. (1998). *Pore level imaging of fluid transport using synchrotron X-ray microtomography*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 19(1): 55-63.
- Cook, K. and Hartel, R. (2010). *Mechanisms of ice crystallization in ice cream production*. Comprehensive reviews in food science and food safety, 9(2): 213-222.
- Dalvi-Isfahan, M., Jha, P. K., Tavakoli, J., Daraei-Garmakhany, A., Xanthakis, E. and Le-Bail, A. (2019). *Review on identification, underlying mechanisms and evaluation of freezing damage*. Journal of Food Engineering, 255: 50-60.
- Damodaran, S. (2007). *Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(26): 10918-10923.
- Datta, A. (2007). *Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. I: Problem formulations*. Journal of food engineering, 80(1): 80-95.
- Datta, A. (2007). *Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. II: Property data and representative results*. Journal of food engineering, 80(1): 96-110.
- De Lamo, B. and Gómez, M. (2018). *Bread enrichment with oilseeds. A review*. Foods, 7(11): 191.
- De Vries, D. (1958). *Simultaneous transfer of heat and moisture in porous media*. Eos, Transactions American Geophysical Union, 39(5): 909-916.

- De Vries, D. A. (1987). *The theory of heat and moisture transfer in porous media revisited*. International Journal of Heat and Mass Transfer, 30(7): 1343-1350.
- Demirkesen, I., Kelkar, S., Campanella, O. H., Sumnu, G., Sahin, S. and Okos, M. (2014). *Characterization of structure of gluten-free breads by using X-ray microtomography*. Food Hydrocolloids, 36: 37-44.
- Díaz-Ramírez, M., Janovitz-Klapp, A., Chanona-Pérez, J., Farrera-Rebollo, R., Gutiérrez-López, G. and Calderon-Dominguez, G. (2011). *Structural and physical changes of a sponge-cake during frozen storage and its relation with its absorption capacity*.
- Díaz-Ramírez, M., Calderón-Domínguez, G., Salgado-Cruz, M. d. l. P., Chanona-Pérez, J. J., Andraca-Adame, J. A. and Ribotta, P. D. (2016). *Sponge cake microstructure, starch retrogradation and quality changes during frozen storage*. International Journal of Food Science & Technology, 51(8): 1744-1753.
- Donhowe, D. P. and Hartel, R. W. (1996a). *Recrystallization of ice in ice cream during controlled accelerated storage*. International Dairy Journal, 6(11): 1191-1208.
- Donhowe, D. P. and Hartel, R. W. (1996b). *Recrystallization of ice during bulk storage of ice cream*. International Dairy Journal, 6(11): 1209-1221.
- Dougherty, R. and Kunzelmann, K.-H. (2007). *Computing local thickness of 3D structures with ImageJ*. Microscopy and Microanalysis, 13(S02): 1678-1679.
- Eckardt, J., Öhgren, C., Alp, A., Ekman, S., Åström, A., Chen, G., Swenson, J., Johansson, D. and Langton, M. (2013). *Long-term frozen storage of wheat bread and dough—Effect of time, temperature and fibre on sensory quality, microstructure and state of water*. Journal of Cereal Science, 57(1): 125-133.
- Edoura-Gaena, R.-B., Allais, I., Trystram, G. and Gros, J.-B. (2007). *Influence of aeration conditions on physical and sensory properties of aerated cake batter and biscuits*. Journal of food engineering, 79(3): 1020-1032.
- Esselink, E. F., van Aalst, H., Maliepaard, M. and van Duynhoven, J. P. (2003). *Long-term storage effect in frozen dough by spectroscopy and microscopy*. Cereal chemistry, 80(4): 396-403.
- Evans, J. A. (2008). *Frozen Food Science and Technology*., Blackwell Publishing.
- Fennema, O. (1973). *Nature of freezing process*. Low temperature preservation of foods and living matter: 151-222.
- Flin, F., Brzoska, J.-B., Coeurjolly, D., Pieritz, R. A., Lesaffre, B., Coléou, C., Lamboley, P., Teytaud, O., Vignoles, G. L. and Delesse, J.-F. (2005). *Adaptive estimation of normals and surface area for discrete 3-D objects: application to snow binary data from X-ray tomography*. IEEE Transactions on Image Processing, 14(5): 585-596.
- Flin, F., Brzoska, J.-B., Lesaffre, B., Coléou, C. and Pieritz, R. A. (2003). *Full three-dimensional modelling of curvature-dependent snow metamorphism: first results and*

comparison with experimental tomographic data. Journal of Physics D: Applied Physics, 36(10A): A49.

Flin, F., Brzoska, J.-B., Lesaffre, B., Coléou, C. and Pieritz, R. A. (2004). *Three-dimensional geometric measurements of snow microstructural evolution under isothermal conditions.* Annals of Glaciology, 38: 39-44.

Flin, F., Lesaffre, B., Dufour, A., Gillibert, L., Hasan, A., Rolland du Roscoat, S., Cabanes, S. and Pugliese, P. (2011). *On the computations of specific surface area and specific grain contact area from snow 3D images.* Physics and chemistry of ice: 321-328.

Flores, M. A. A. (1998). *Ice crystallization and recrystallization in frozen model solutions and ice cream as affected by polysaccharide gums,* University of Guelph.

France Agrimer (, 2020). *Compétitivité des produits de seconde transformation de l'industrie agroalimentaire française/ Synthèse - Biscuits, gâteaux et pâtisserie artisanale.* Edition janvier 2020: pp 34.

Fu, J., Thomas, H. R. and Li, C. (2021). *Tortuosity of porous media: Image analysis and physical simulation.* Earth-Science Reviews, 212: 103439.

Gambús, H., Sikora, M. and Ziobro, R. (2007). *The effect of composition of hydrocolloids on properties of gluten-free bread.* Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria, 6(3): 61-74.

Gaukel, V., Leiter, A. and Spieß, W. E. (2014). *Synergism of different fish antifreeze proteins and hydrocolloids on recrystallization inhibition of ice in sucrose solutions.* Journal of Food Engineering, 141: 44-50.

Gelinas, P., Roy, G. and Guillet, M. (1999). *Relative effects of ingredients on cake staling based on an accelerated shelf-life test.* Journal of Food Science, 64(5): 937-940.

George, R. (1993). *Freezing proceseses used in the food industry.* Trends in Food Science & Technology, 4(5): 134-138.

Germishuys, Z. (2021). *X-ray micro-computed tomography (μ CT) evaluation of bubble structure to determine quality of dough and bread made from roasted wheat flour.*

Giannou, V., Tzia, C. and Le Bail, A. (2006). *Quality and safety of frozen bakery products.* FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 155: 481.

Glover, G. and Pelc, N. (1980). *Nonlinear partial volume artifacts in x-ray computed tomography.* Medical physics, 7(3): 238-248.

Goff, H., Ferdinando, D. and Schorsch, C. (1999). *Fluorescence microscopy to study galactomannan structure in frozen sucrose and milk protein solutions.* Food Hydrocolloids, 13(4): 353-362.

Gómez, M., Ruiz, E. and Oliete, B. (2011). *Effect of batter freezing conditions and resting time on cake quality.* LWT-Food Science and Technology, 44(4): 911-916.

Références bibliographiques

- Goranova, Z., Marudova, M. and Baeva, M. (2019). *Influence of functional ingredients on starch gelatinization in sponge cake batter*. Food chemistry, 297: 124997.
- Grenier, A. (2003). *Caractérisation par IRM et modélisation des transferts thermiques dans une matrice à structure alvéolée évolutive. Application à la congélation, décongélation-pousse d'un pâton de pain.*, Ecole Polytechnique - Université de Nantes.
- Guillard, V., Broyart, B., Bonazzi, C., Guilbert, S. and Gontard, N. (2003a). *Modelling of Moisture Transfer in a Composite Food: Dynamic Water Properties in an Intermediate aw Porous Product in Contact with High aw Filling*. Chemical Engineering Research and Design, 81(9): 1090-1098.
- Guillard, V., Broyart, B., Bonazzi, C., Guilbert, S. and Gontard, N. (2003b). *Moisture Diffusivity in Sponge Cake as Related to Porous Structure Evaluation and Moisture Content*. Journal of Food Science, 68(2): 555-562.
- Guo, E., Kazantsev, D., Mo, J., Bent, J., Van Dalen, G., Schuetz, P., Rockett, P., StJohn, D. and Lee, P. D. (2018). *Revealing the microstructural stability of a three-phase soft solid (ice cream) by 4D synchrotron X-ray tomography*. Journal of food engineering, 237: 204-214.
- Guo, E., Zeng, G., Kazantsev, D., Rockett, P., Bent, J., Kirkland, M., Van Dalen, G., Eastwood, D. S., StJohn, D. and Lee, P. D. (2017). *Synchrotron X-ray tomographic quantification of microstructural evolution in ice cream – a multi-phase soft solid*. RSC Advances, 7(25): 15561-15573.
- Haffar, I., Flin, F., Geindreau, C., Petillon, N., Gervais, P.-C. and Edery, V. (2021). *X-ray tomography for 3D analysis of ice particles in jet A-1 fuel*. Powder Technology, 384: 200-210.
- Haffar, I., Flin, F., Geindreau, C., Petillon, N., Gervais, P.-C. and Edery, V. (2022). *3D microstructure evolution of ice in jet A-1 fuel as a function of applied temperature over time*. International Journal of Heat and Mass Transfer, 183: 122158.
- Hagiwara, T. and Hartel, R. W. (1996). *Effect of sweetener, stabilizer, and storage temperature on ice recrystallization in ice cream*. Journal of Dairy Science, 79(5): 735-744.
- Hagiwara, T., Hartel, R. W. and Matsukawa, S. (2006). *Relationship between recrystallization rate of ice crystals in sugar solutions and water mobility in freeze-concentrated matrix*. Food Biophysics, 1(2): 74-82.
- Hamdami, N., Monteau, J.-Y. and Le Bail, A. (2003). *Effective thermal conductivity evolution as a function of temperature and humidity, during freezing of a high-porosity model food*. Chemical Engineering Research and Design, 81(9): 1123-1128.
- Hamdami, N., Monteau, J.-Y. and Le Bail, A. (2004). *Thermophysical properties evolution of French partly baked bread during freezing*. Food Research International, 37(7): 703-713.
- Hamdami, N., Monteau, J.-Y. and Le Bail, A. (2004a). *Heat and mass transfer in par-baked bread during freezing*. Food Research International, 37(5): 477-488.

- Hamdami, N., Monteau, J.-Y. and Le Bail, A. (2004b). *Simulation of coupled heat and mass transfer during freezing of a porous humid matrix*. International Journal of Refrigeration, 27(6): 595-603.
- Hamdami, N., Monteau, J. Y. and Le Bail, A. (2004). *Transport properties of a high porosity model food at above and sub-freezing temperatures. Part 2: Evaluation of the effective moisture diffusivity from drying data*. Journal of Food Engineering, 62(4): 385-392.
- Harper, E. and Shoemaker, C. (1983). *Effect of locust bean gum and selected sweetening agents on ice recrystallization rates*. Journal of Food Science, 48(6): 1801-1803.
- Hartel, R. W. (1998). Mechanisms and kinetics of recrystallization in ice cream. The properties of water in foods ISOPOW 6, Springer: 287-319.
- Hartel, R. W. (2001). Crystallization in Foods. Gaithersburg, Maryland, Aspen Publishers, Inc.
- Herremans, E., Verboven, P., Defraeye, T., Rogge, S., Ho, Q. T., Hertog, M. L., Verlinden, B. E., Bongaers, E., Wevers, M. and Nicolai, B. M. (2014). *X-ray CT for quantitative food microstructure engineering: the apple case*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 324: 88-94.
- Hild, F., Fanget, A., Adrien, J., Maire, E. and Roux, S. (2011). *Three-dimensional analysis of a tensile test on a propellant with digital volume correlation*. Archives of Mechanics, 63(5-6): 1-20.
- Hildebrand, T. and Rügsegger, P. (1997). *A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images*. Journal of Microscopy, 185(1): 67-75.
- Hsieh, J. (2009). *Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances 2nd edn* (Bellingham, WA: SPIE Optical Engineering Press).
- Islam, M. N., Zhang, M., Fang, Z. and Sun, J. (2015). *Direct contact ultrasound assisted freezing of mushroom (Agaricus bisporus): growth and size distribution of ice crystals*. International Journal of Refrigeration, 57: 46-53.
- Janjarasskul, T., Tananuwong, K., Kongpensook, V., Tantratian, S. and Kokpol, S. (2016). *Shelf life extension of sponge cake by active packaging as an alternative to direct addition of chemical preservatives*. LWT - Food Science and Technology, 72: 166-174.
- Jiang, Z., Le Bail, A. and Wu, A. (2008). *Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from Thermotoga maritima on the quality of frozen partially baked bread*. Journal of Cereal Science, 47(2): 172-179.
- Joardder, M. U., Brown, R. J., Kumar, C. and Karim, M. (2015). *Effect of cell wall properties on porosity and shrinkage of dried apple*. International Journal of Food Properties, 18(10): 2327-2337.
- Kaale, L. D. and Eikevik, T. M. (2013). *A study of the ice crystal sizes of red muscle of pre-rigor Atlantic salmon (Salmo salar) fillets during superchilled storage*. Journal of Food Engineering, 119(3): 544-551.

Références bibliographiques

- Karaoğlu, M. M., Kotancilar, H. G. and Gerçekaslan, K. E. (2008). *The effect of par-baking and frozen storage time on the quality of cup cake*. International journal of food science & technology, 43(10): 1778-1785.
- Kasper, J. C. and Friess, W. (2011). *The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 78(2): 248-263.
- Kiani, H. and Sun, D. W. (2011). *Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review*. Trends in Food Science & Technology, 22(8): 407-426.
- Kim, Y. and Hong, G. P. (2016). *Effects of Artificial Supercooling Followed by Slow Freezing on the Microstructure and Qualities of Pork Loin*. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 36(5): 650-655.
- Kim, Y. H. B., Liesse, C., Kemp, R. and Balan, P. (2015). *Evaluation of combined effects of ageing period and freezing rate on quality attributes of beef loins*. Meat Science, 110: 40-45.
- Kobayashi, R., Kimizuka, N., Suzuki, T. and Watanabe, M. (2014). *Effect of supercooled freezing methods on ice structure observed by X-ray CT*. 3rd IIR International Conference on Sustainability and the Cold Chain, London, UK.
- Kobayashi, R., Kimizuka, N., Suzuki, T., Watanabe, M. and Int Inst, R. (2014). *Effect of supercooled freezing methods on ice structure observed by X-ray CT*. 3rd Iir International Conference on Sustainability and the Cold Chain. Paris, Int Inst Refrigeration. **2014**: 392-396.
- Kobayashi, R., Kimizuka, N., Watanabe, M. and Suzuki, T. (2015). *The effect of supercooling on ice structure in tuna meat observed by using X-ray computed tomography*. International Journal of Refrigeration-Revue Internationale Du Froid, 60: 270-277.
- Kobayashi, R., Kimizuka, N., Watanabe, M., Takenaga, F. and Suzuki, T. (2018). *Property Changes during Frozen Storage in Frozen Soy Bean Curds Prepared by Freezing Accompanied with Supercooling*. Transactions of the Japan Society of Refrigerating and Air Conditioning Engineers, 35(3): 269.
- Kong, C. H., Hamid, N., Ma, Q., Lu, J., Wang, B.-G. and Sarojini, V. (2017). *Antifreeze peptide pretreatment minimizes freeze-thaw damage to cherries: An in-depth investigation*. Lwt, 84: 441-448.
- Kontogiorgos, V. and Goff, H. D. (2006). *Calorimetric and microstructural investigation of frozen hydrated gluten*. Food Biophysics, 1(4): 202-215.
- Kontogiorgos, V., Goff, H. D. and Kasapis, S. (2008). *Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour–water mixtures*. Food Hydrocolloids, 22(6): 1135-1147.
- Koponen, A., Kataja, M. and Timonen, J. (1997). *Permeability and effective porosity of porous media*. Physical Review E, 56(3): 3319.

Références bibliographiques

- Kuroki, S., Oshita, S., Sotome, I., Kawagoe, Y. and Seo, Y. (2004). *Visualization of 3-D network of gas-filled intercellular spaces in cucumber fruit after harvest*. *Postharvest Biology and Technology*, 33(3): 255-262.
- Le Bail, A., Monteau, J., Margerie, F., Lucas, T., Chargelegue, A. and Reverdy, Y. (2005). *Impact of selected process parameters on crust flaking of frozen partly baked bread*. *Journal of Food Engineering*, 69(4): 503-509.
- Le Bail, A., Tzia, C. and Giannou, V. (2011). *Quality and safety of frozen bakery products*. *Handbook of frozen food processing and packaging*: 501-528.
- Legland, D. and Arganda-Carreras, I. (2016). *MORPHOLIBJ USER MANUAL*. INRA, Nantes.
- Legland, D., Arganda-Carreras, I. and Andrey, P. (2016). *MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ*. *Bioinformatics*, 32(22): 3532-3534.
- Lenoir, N., Bornert, M., Desrues, J., Bésuelle, P. and Viggiani, G. (2007). *Volumetric digital image correlation applied to X-ray microtomography images from triaxial compression tests on argillaceous rock*. *Strain*, 43(3): 193-205.
- Leplay, P., Réthoré, J., Meille, S., Baietto, M.-C., Adrien, J., Chevalier, J. and Maire, E. (2013). *Three-dimensional analysis of an in situ double-torsion test by X-ray computed tomography and digital volume correlation*. *Experimental Mechanics*, 53(7): 1265-1275.
- Li, D., Zhu, Z. and Sun, D.-W. (2018). *Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review*. *Trends in Food Science & Technology*, 75: 46-55.
- Li, M., Dia, V. P. and Wu, T. (2021). *Ice recrystallization inhibition effect of cellulose nanocrystals: Influence of sucrose concentration*. *Food Hydrocolloids*, 121: 107011.
- Lifshitz, I. M. and Slyozov, V. V. (1961). *The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions*. *Journal of physics and chemistry of solids*, 19(1-2): 35-50.
- Limodin, N., Réthoré, J., Buffière, J. Y., Hild, F., Ludwig, W., Rannou, J. and Roux, S. (2011). *3D X-ray Microtomography Volume Correlation to Study Fatigue Crack Growth*. *Advanced Engineering Materials*, 13(3): 186-193.
- Lipton, J., Arnold, D., Nigl, F., Lopez, N., Cohen, D., Norén, N. and Lipson, H. (2010). *Multi-material food printing with complex internal structure suitable for conventional post-processing*. 2010 International Solid Freeform Fabrication Symposium, University of Texas at Austin.
- Liu, Q., Guo, X.-N. and Zhu, K.-X. (2019). *Effects of frozen storage on the quality characteristics of frozen cooked noodles*. *Food Chemistry*, 283: 522-529.
- Liu, Y., Pu, H. and Sun, D.-W. (2017). *Hyperspectral imaging technique for evaluating food quality and safety during various processes: A review of recent applications*. *Trends in Food Science & Technology*, 69: 25-35.

- Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B. and Wang, Y. (2017). *3D printing: Printing precision and application in food sector*. Trends in Food Science & Technology, 69: 83-94.
- Lostie, M., Peczalski, R., Andrieu, J. and Laurent, M. (2002b). *Study of sponge cake batter baking process. II. Modeling and parameter estimation*. Journal of food Engineering, 55(4): 349-357.
- Lostie, M., Peczalski, R., Andrieu, J. and Laurent, M. (2002a). *Study of sponge cake batter baking process. Part I: Experimental data*. Journal of Food Engineering, 51: 131-137.
- Lucas, T., Le Ray, D. and Davenel, A. (2005). *Chilling and freezing of part-baked bread. Part I: An MRI signal analysis*. Journal of food engineering, 70(2): 139-149.
- Lucas, T., Quellec, S., Le Bail, A. and Davenel, A. (2005). *Chilling and freezing of part-baked bread. Part II: Experimental assessment of water phase changes and structure collapse*. Journal of Food Engineering, 70(2): 151-164.
- Madene, A. (2006). *Etude des transferts d'arômes encapsulés dans une matrice alimentaire type génoise*, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Mafart, P. (1991). *Génie industriel alimentaire(Tome I, Les procédés physiques de conservation)*.
- Magnussen, O. M., Hemmingsen, A. K., Hardarsson, V., Nordtvedt, T. S. and Eikevik, T. M. (2008). *7 Freezing of Fish*. Frozen food science and technology: 151.
- Mandala, I., Kapetanakou, A. and Kostaropoulos, A. (2008). *Physical properties of breads containing hydrocolloids stored at low temperature: II—Effect of freezing*. Food Hydrocolloids, 22(8): 1443-1451.
- Mandala, I., Polaki, A. and Yanniotis, S. (2009). *Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients*. Journal of Food Engineering, 92(2): 137-145.
- Marcellini, M., Noirjean, C., Dedovets, D., Maria, J. and Deville, S. (2016). *Time-Lapse, in situ imaging of ice crystal growth using confocal microscopy*. ACS Omega, 1(5): 1019-1026.
- Martino, M. N. and Zaritzky, N. (1989). *Ice recrystallization in a model system and in frozen muscle tissue*. Cryobiology, 26(2): 138-148.
- Martino, M. N. and Zaritzky, N. E. (1988). *ICE CRYSTAL SIZE MODIFICATIONS DURING FROZEN BEEF STORAGE*. Journal of Food Science, 53(6): 1631-&.
- Martoia, F., Orgéas, L., Dumont, P. J., Bloch, J.-F., Flin, F. and Viguié, J. (2017). *Crumpled paper sheets: low-cost biobased cellular materials for structural applications*. Materials & Design, 136: 150-164.
- Masschaele, B., Dierick, M., Van Loo, D., Boone, M. N., Brabant, L., Pauwels, E., Cnudde, V. and Van Hoorebeke, L. (2013). *HECTOR: A 240kV micro-CT setup optimized for research*. Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing.

Références bibliographiques

- Masselot, V., Benkhelifa, H., Cuvelier, G. and Bosc, V. (2020). *Rheological properties of stabilizers at low temperatures in concentrated sucrose solutions*. Food Hydrocolloids, 103: 105691.
- Masselot, V., Bosc, V. and Benkhelifa, H. (2021a). *Analyzing the microstructure of a fresh sorbet with X-ray micro-computed tomography: Sampling, acquisition, and image processing*. Journal of Food Engineering, 292: 110347.
- Masselot, V., Bosc, V. and Benkhelifa, H. (2021b). *Influence of stabilizers on the microstructure of fresh sorbets: X-ray micro-computed tomography, cryo-SEM, and Focused Beam Reflectance Measurement analyses*. Journal of Food Engineering, 300: 110522.
- Masselot, V. r. (2020). *Influence des stabilisants sur la cristallisation d'un semi-liquide alimentaire: Application à la congélation des sorbets*, université Paris-Saclay.
- Medebacha, A., Pinzera, B. R., Duboisb, C., Limbachb, H. J., Schneebelec, M. and Stampanonia, M. (2013). *X-ray phase contrast tomography of ice cream : A time-lapse study*. Food Symposium. Leuven, Belgium.
- Mercier, S., Ndoye, F. T. and Alvarez, G. (2016). *Coupled population balance and heat transfer model for the description of ice recrystallization during long-term storage of ice cream*. Journal of Food Engineering, 170: 72-82.
- Mersmann, A. (2001). *Crystallization technology handbook*, CRC press.
- Mirone, A., Brun, E., Gouillart, E., Tafforeau, P. and Kieffer, J. (2014). *The PyHST2 hybrid distributed code for high speed tomographic reconstruction with iterative reconstruction and a priori knowledge capabilities*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 324: 41-48.
- Mo, J., Guo, E., McCartney, D. G., Eastwood, D. S., Bent, J., Van Dalen, G., Schuetz, P., Rockett, P. and Lee, P. D. (2018). *Time-resolved tomographic quantification of the microstructural evolution of ice cream*. Materials, 11(10): 2031.
- Mok, J. H., Choi, W., Park, S. H., Lee, S. H. and Jun, S. (2015). *Emerging pulsed electric field (PEF) and static magnetic field (SMF) combination technology for food freezing*. International Journal of Refrigeration, 50: 137-145.
- Molina-Garcia, A. D., Otero, L., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., Arabas, J., Szczepek, J. and Sanz, P. D. (2004). *Ice VI freezing of meat: supercooling and ultrastructural studies*. Meat Science, 66(3): 709-718.
- Mondal, A. and Datta, A. (2008). *Bread baking—A review*. Journal of Food Engineering, 86(4): 465-474.
- Moureh, J. and Derens, E. (2000). *Numerical modelling of the temperature increase in frozen food packaged in pallets in the distribution chain*. International Journal of Refrigeration, 23(7): 540-552.

Références bibliographiques

- Mousavi, R., Miri, T., Cox, P. W. and Fryer, P. J. (2005). *A novel technique for ice crystal visualization in frozen solids using X-ray micro-computed tomography*. Journal of Food Science, 70(7): E437-E442.
- Mousavi, R., Miri, T., Cox, P. W. and Fryer, P. J. (2007). *Imaging food freezing using X-ray microtomography*. International Journal of Food Science and Technology, 42(6): 714-727.
- Muela, E., Sanudo, C., Campo, M. M., Medel, I. and Beltran, J. A. (2010). *Effect of freezing method and frozen storage duration on instrumental quality of lamb throughout display*. Meat Science, 84(4): 662-669.
- Mullin, J. W. (2001). Crystallization, Elsevier.
- Mulot, V. (2019). *Caractérisation expérimentale et modélisation multi-échelles des transferts thermiques et d'eau lors de la congélation des produits alimentaires*, Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France.
- Mulot, V., Benkhelifa, H., Ndoye, F.-T., Pathier, D. and Flick, D. (2018). *Measurement of food dehydration during freezing: development of an experimental tool and application to tylose*. 5th IIR International Conference on Sustainability and the Cold Chain, Beijing, China.
- Mulot, V., Benkhelifa, H., Pathier, D., Ndoye, F.-T. and Flick, D. (2019). *Measurement of food dehydration during freezing in mechanical and cryogenic freezing conditions*. International Journal of Refrigeration, 103: 329-338.
- Mulot, V., Fatou-Toutie, N., Benkhelifa, H., Pathier, D. and Flick, D. (2019). *Investigating the effect of freezing operating conditions on microstructure of frozen minced beef using an innovative X-ray micro-computed tomography method*. Journal of Food Engineering, 262: 13-21.
- Ndoye, F. T. and Alvarez, G. (2015). *Characterization of ice recrystallization in ice cream during storage using the focused beam reflectance measurement*. Journal of Food Engineering, 148: 24-34.
- Ngapo, T., Babare, I., Reynolds, J. and Mawson, R. (1999). *Freezing rate and frozen storage effects on the ultrastructure of samples of pork*. Meat Science, 53(3): 159-168.
- Ni, H. and Datta, A. (1999). *Moisture, oil and energy transport during deep-fat frying of food materials*. Food and bioproducts processing, 77(3): 194-204.
- North, M. F. and Lovatt, S. J. (2006). *Freezing methods and equipment*. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 155: 199.
- Nowotny, S. (1987). *Recommandations por la préparation et la distribution des aliments congelés—Recommendations for the processing and handling of frozen foods*. 3. Aufl. 418 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. Institut International du Froid, Paris 1986. Preis: 180,-FF, Wiley Online Library.
- Noyes, A. A. and Whitney, W. R. (1897). *THE RATE OF SOLUTION OF SOLID SUBSTANCES IN THEIR OWN SOLUTIONS*. Journal of the American Chemical Society, 19(12): 930-934.

Références bibliographiques

- Nugraha, B., Verboven, P., Janssen, S., Wang, Z. and Nicolai, B. M. (2019). *Non-destructive porosity mapping of fruit and vegetables using X-ray CT*. *Postharvest Biology and Technology*, 150: 80-88.
- Olszewski, E. A. (2006). *From baking a cake to solving the diffusion equation*. 74: 502-509.
- Owen, R. F. and Van Duyn, F. O. (1950). *Comparison of the quality of freshly baked cakes, thawed frozen baked cakes, and cakes prepared from batters which had been frozen*. *Journal of Food Science*, 15(2): 169-178.
- Paganin, D., Mayo, S. C., Gureyev, T. E., Miller, P. R. and Wilkins, S. W. (2002). *Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object*. *Journal of microscopy*, 206(1): 33-40.
- Parniakov, O., Bals, O., Lebovka, N. and Vorobiev, E. (2016). *Pulsed electric field assisted vacuum freeze-drying of apple tissue*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35: 52-57.
- Patmore, J., Goff, H. and Fernandes, S. (2003). *Cryo-gelation of galactomannans in ice cream model systems*. *Food Hydrocolloids*, 17(2): 161-169.
- Pham, Q. and Mawson, R. (1997). *Moisture migration and ice recrystallization in frozen foods*. *Quality in frozen food*, Springer: 67-91.
- Pham, Q. T. (2006). *Modelling heat and mass transfer in frozen foods: a review*. *International Journal of Refrigeration*, 29(6): 876-888.
- Phimolsiripol, Y., Siripatrawan, U., Tulyathan, V. and Cleland, D. J. (2008). *Effects of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality*. *Journal of Food Engineering*, 84(1): 48-56.
- Pierron, F., McDonald, S., Hollis, D., Fu, J., Withers, P. and Alderson, A. (2013). *Comparison of the Mechanical Behaviour of Standard and Auxetic Foams by X-ray Computed Tomography and Digital Volume Correlation*. *Strain*, 49(6): 467-482.
- Pinzer, B. R., Medebach, A., Limbach, H. J., Dubois, C., Stampanoni, M. and Schneebeli, M. (2012). *3D-characterization of three-phase systems using X-ray tomography: tracking the microstructural evolution in ice cream*. *Soft Matter*, 8(17): 4584-4594.
- Pozo-Bayón, M. A., Guichard, E. and Cayot, N. (2006). *Feasibility and application of solvent assisted flavour evaporation and standard addition method to quantify the aroma compounds in flavoured baked matrices*. *Food Chemistry*, 99(2): 416-423.
- Price, C. J. (1997). *Take some solid steps to improve crystallization*. *Chemical engineering progress*, 93(9).
- Pronk, P., Ferreira, C. I. and Witkamp, G.-J. (2005). *A dynamic model of Ostwald ripening in ice suspensions*. *Journal of Crystal Growth*, 275(1-2): e1355-e1361.
- Puel, F., Veessler, S. and Mangin, D. (2005). *Cristallisation : aspects théoriques*. *Techniques de l'Ingenieur(J2710)*: 1-16.

- Rao, M. A., Rizvi, S. S., Datta, A. K. and Ahmed, J. (2014). *Engineering properties of foods*, CRC press.
- Rawlings, J. B., Miller, S. M. and Witkowski, W. R. (1993). *Model identification and control of solution crystallization processes: a review*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 32(7): 1275-1296.
- Regand, A. and Goff, H. D. (2003). *Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems*. *Food hydrocolloids*, 17(1): 95-102.
- Ribotta, P. D. and Le Bail, A. (2007). *Thermo-physical assessment of bread during staling*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5): 879-884.
- Ribotta, P. D., León, A. E. and Añón, M. C. (2001). *Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 913-918.
- Roca, E., Guillard, V., Broyart, B., Guilbert, S. and Gontard, N. (2008). *Effective moisture diffusivity modelling versus food structure and hygroscopicity*. *Food Chemistry*, 106(4): 1428-1437.
- Roca, E., Guillard, V., Guilbert, S. and Gontard, N. (2006). *Moisture migration in a cereal composite food at high water activity: Effects of initial porosity and fat content*. *Journal of Cereal Science*, 43(2): 144-151.
- Rolland, d. R., S., Decain, M., Thibault, X., Geindreau, C. and Bloch, J. F. (2007). *Estimation of microstructural properties from synchrotron X-ray microtomography and determination of the REV in paper materials*. *Acta Materialia*, 55(8): 2841-2850.
- Ronda, F., Gómez, M., Blanco, C. A. and Caballero, P. A. (2005). *Effects of polyols and nondigestible oligosaccharides on the quality of sugar-free sponge cakes*. *Food Chemistry*, 90(4): 549-555.
- Roux, S., Hild, F., Viot, P. and Bernard, D. (2008). *Three-dimensional image correlation from X-ray computed tomography of solid foam*. *Composites Part A: Applied science and manufacturing*, 39(8): 1253-1265.
- Russ, J. C. (2004). *Image analysis of food microstructure*, CRC press.
- Rzigue, A., Monteau, J.-Y., Marmi, K., Le Bail, A., Chevallier, S., Réguerre, A.-L. and Jury, V. (2016). *Bread collapse. Causes of the technological defect and impact of depanning time on bread quality*. *Journal of Food Engineering*, 182: 72-80.
- Sahi, S. S. and Alava, J. M. (2003). *Functionality of emulsifiers in sponge cake production*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14): 1419-1429.
- Sahin, S. and Sumnu, S. G. (2006). *Rheological properties of foods. Physical properties of foods*, Springer: 39-105.
- Sanz, P. D., de Elvira, C., Martino, M., Zaritzky, N., Otero, L. and Carrasco, J. A. (1999). *Freezing rate simulation as an aid to reducing crystallization damage in foods*. *Meat Science*, 52(3): 275-278.

- Sasov and Dyck, V. (1998). *Desktop X-ray microscopy and microtomography*. Journal of Microscopy, 191(2): 151-158.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S. and Schmid, B. (2012). *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 9(7): 676-682.
- Seghir, R., Witz, J.-F. and Coudert, S. (2014). *Yadics-digital image correlation 2/3d software*.
- Shehzad, A., Chiron, H., Della Valle, G., Kansou, K., Ndiaye, A. and Reguerre, A.-L. (2010). *Porosity and stability of bread dough during proofing determined by video image analysis for different compositions and mixing conditions*. Food Research International, 43(8): 1999-2005.
- Silvas-García, M., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P., Carvajal-Millan, E., Barrón-Hoyos, J., Bello-Pérez, L. A. and Quintero-Ramos, A. (2014). *Effect of freezing rate and storage time on gluten protein solubility, and dough and bread properties*. Journal of Food Process Engineering, 37(3): 237-247.
- Skrabanja, V., Kovac, B., Golob, T., Liljeberg Elmståhl, H. G., Björck, I. M. and Kreft, I. (2001). *Effect of spelt wheat flour and kernel on bread composition and nutritional characteristics*. Journal of agricultural and food chemistry, 49(1): 497-500.
- Stevenson, A. W., Gureyev, T. E., Paganin, D., Wilkins, S., Weitkamp, T., Snigirev, A., Rau, C., Snigireva, I., Youn, H. and Dolbnya, I. (2003). *Phase-contrast X-ray imaging with synchrotron radiation for materials science applications*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 199: 427-435.
- Su, G., Ramaswamy, H. S., Zhu, S., Yu, Y., Hu, F. and Xu, M. (2014). *Thermal characterization and ice crystal analysis in pressure shift freezing of different muscle (shrimp and porcine liver) versus conventional freezing method*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 26: 40-50.
- Sun, D.-W. (2010). *Hyperspectral imaging for food quality analysis and control*, Elsevier.
- Sun, D.-W. and Hu, Z. (2003). *CFD simulation of coupled heat and mass transfer through porous foods during vacuum cooling process*. International Journal of Refrigeration, 26(1): 19-27.
- Sutton, R., Evans, I. and Crilly, J. (1994). *Modeling ice crystal coarsening in concentrated disperse food systems*. Journal of food science, 59(6): 1227-1233.
- Sutton, R. L., Lips, A. and Piccirilo, G. (1996). *Recrystallization in aqueous fructose solutions as affected by locust bean gum*. Journal of food science, 61(4): 746-748.
- Syamaladevi, R. M., Manahiloh, K. N., Muhunthan, B. and Sablani, S. S. (2012). *Understanding the influence of state/phase transitions on ice recrystallization in Atlantic salmon (Salmo salar) during frozen storage*. Food biophysics, 7(1): 57-71.
- Tavman, S., Tavman, I. and Evcin, S. (1997). *Measurement of thermal diffusivity of granular food materials*. International communications in heat and mass transfer, 24(7): 945-953.

Références bibliographiques

- Therdthai, N., Zhou, W. and Adamczak, T. (2002). *Optimisation of the temperature profile in bread baking*. Journal of Food Engineering, 55(1): 41-48.
- Tu, J., Zhang, M., Xu, B. G. and Liu, H. H. (2015). *Effects of different freezing methods on the quality and microstructure of lotus (Nelumbo nucifera) root*. International Journal of Refrigeration-Revue Internationale Du Froid, 52: 59-65.
- Ullah, J., Takhar, P. S. and Sablani, S. S. (2014). *Effect of temperature fluctuations on ice-crystal growth in frozen potatoes during storage*. LWT - Food Science and Technology, 59(2, Part 1): 1186-1190.
- Van Bockstaele, F., Debonne, E., De Leyn, I., Wagemans, K. and Eeckhout, M. (2021). *Impact of temporary frozen storage on the safety and quality of four typical Belgian bakery products*. LWT, 137: 110454.
- van Dalen, G., Don, A., Nootenboom, P. and Blonk, J. C. G. (2009). *Determination of bubbles in foods by X-ray microtomography and image analysis*. SkyScan User Meeting, Ghent, Belgium.
- van Dalen, G., Koster, M., Nijse, J., Boller, E. and van Duynhoven, J. (2013). *3D imaging of freeze-dried vegetables using X-ray microtomography*. Micro-CT user meeting SkyScan, Hasselt, Belgium.
- van der Sman, R. G. M., Voda, A., van Dalen, G. and Duijster, A. (2013). *Ice crystal interspacing in frozen foods*. Journal of Food Engineering, 116(2): 622-626.
- van Westen, T. and Groot, R. D. (2018). *Effect of temperature cycling on ostwald ripening*. Crystal Growth & Design, 18(9): 4952-4962.
- Vicent, V. (2019). *Imaging and modeling of the microstructure of frozen foods during recrystallization and sublimation: A case study on plant-based products*.
- Vicent, V., Ndoye, F.-T., Verboven, P., Nicolai, B. and Alvarez, G. (2019). *Effect of dynamic storage temperatures on the microstructure of frozen carrot imaged using X-ray micro-CT*. Journal of Food Engineering, 246: 232-241.
- Vicent, V., Ndoye, F.-T., Verboven, P., Nicolai, B. and Alvarez, G. (2020). *Modeling ice recrystallization in frozen carrot tissue during storage under dynamic temperature conditions*. Journal of Food Engineering, 278: 109911.
- Vicent, V., Ndoye, F. T., Verboven, P., Nicolai, B. and Alvarez, G. (2016). **APPLICABILITY OF X-RAY MICROTOMOGRAPHY FOR CHARACTERIZING THE MICROSTRUCTURE OF FROZEN APPLE DURING STORAGE**. 4th Iir International Conference on Sustainability and the Cold Chain. A. East, J. Carson, D. Cleland and R. Love. Paris, Int Inst Refrigeration: 414-420.
- Vicent, V., Verboven, P., Ndoye, F.-T., Alvarez, G. and Nicolai, B. (2017). *A new method developed to characterize the 3D microstructure of frozen apple using X-ray micro-CT*. Journal of Food Engineering, 212: 154-164.

- Vicent, V., Verboven, P., Ndoye, F.-T., Alvarez, G. and Nicolai, B. (2017). *A new method developed to characterize the 3D microstructure of frozen apple using X-ray micro-CT*. Journal of Food Engineering, 212(Supplement C): 154-164.
- Voda, A., Homan, N., Witek, M., Duijster, A., van Dalen, G., van der Sman, R., Nijssen, J., van Vliet, L., Van As, H. and van Duynhoven, J. (2012). *The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot*. Food Research International, 49(2): 687-693.
- Vodounnou, E. C., Hounkonnou, N., Afouda, A., Degan, G., Adou kablan, J. and Napo, K. (2016). *Stabilité thermoconvective de cuisson du gari, denrée alimentaire à base de tubercules de manioc en Afrique de l'ouest*, EPAC/UAC.
- Wagner, C. (1961). Theory of particulate change by redissolution., Z. Elektrochem.
- Walter, T., Shattuck, D. W., Baldock, R., Bastin, M. E., Carpenter, A. E., Duce, S., Ellenberg, J., Fraser, A., Hamilton, N. and Pieper, S. (2010). *Visualization of image data from cells to organisms*. Nature methods, 7(3): S26-S41.
- WANG, D. Q. and KOLBE, E. (1991). *Thermal properties of surimi analyzed using DSC*. Journal of Food Science, 56(2): 302-308.
- Wang, L., Limodin, N., El Bartali, A., Witz, J.-F., Seghir, R., Buffiere, J.-Y. and Charkaluk, E. (2016). *Influence of pores on crack initiation in monotonic tensile and cyclic loadings in lost foam casting A319 alloy by using 3D in-situ analysis*. Materials Science and Engineering: A, 673: 362-372.
- Wang, R., Zhou, W. and Isabelle, M. (2007). *Comparison study of the effect of green tea extract (GTE) on the quality of bread by instrumental analysis and sensory evaluation*. Food Research International, 40(4): 470-479.
- Wang, X., Gillibert, L., Flin, F. and Coeurjolly, D. (2012). *Curvature-driven volumetric segmentation of binary shapes: an application to snow microstructure analysis*. Proceedings of the 21st International Conference on Pattern Recognition (ICPR2012), IEEE.
- Wang, Y., Liang, H., Xu, R., Lu, B., Song, X. and Liu, B. (2020). *Effects of temperature fluctuations on the meat quality and muscle microstructure of frozen beef*. International Journal of Refrigeration, 116: 1-8.
- Weitkamp, T., Scheel, M., Giorgetta, J., Joyet, V., Le Roux, V., Cauchon, G., Moreno, T., Polack, F., Thompson, A. and Samama, J. (2017). *The tomography beamline ANATOMIX at Synchrotron SOLEIL*. Journal of Physics: Conference Series, 849: 012037.
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M. and Lakey, J. R. T. (2021). *Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations*. Cell Transplantation, 30: 1 - 12.
- Wilderjans, E., Luyts, A., Brijs, K. and Delcour, J. A. (2013). *Ingredient functionality in batter type cake making*. Trends in Food Science & Technology, 30(1): 6-15.

Références bibliographiques

- Wulff, G. (1901). *On the question of speed of growth and dissolution of crystal surfaces*. Z. Kristallogr, 34(5/6): 449.
- Yi, J. and Kerr, W. L. (2009). *Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties*. LWT-Food Science and Technology, 42(9): 1474-1483.
- Yousif, E., Gadallah, M. and Sorour, A. M. (2012). *Physico-chemical and rheological properties of modified corn starches and its effect on noodle quality*. Annals of Agricultural Sciences, 57(1): 19-27.
- Zanoni, B., Peri, C. and Gianotti, R. (1995). *Determination of the thermal diffusivity of bread as a function of porosity*. Journal of Food Engineering, 26(4): 497-510.
- Zanoni, B., Pierucci, S. and Peri, C. (1994). *Study of the bread baking process—II. Mathematical modelling*. Journal of Food Engineering, 23(3): 321-336.
- Zaritzky, N. (2000). *Factors affecting the stability of frozen foods*. Managing frozen foods, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England: 111-133.
- Zaritzky, N. (2008). *Frozen Storage*. Frozen Food Science and Technology. J. A. in: Evans, (Ed) Blackwell Publishing Ltd: pp. 224–247
- Zaritzky, N. E. (2010). *Chemical and physical deterioration of frozen foods*. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages, Elsevier: 561-607.
- Zaritzky, N. E. (2012). *Frozen storage*. In Handbook of Frozen food Processing and Packaging. E. Da-Wen Sun: 3-38.
- Zennoune, A., Latil, P., Ndoye, F.-T., Flin, F., Perrin, J., Geindreau, C. and Benkhelifa, H. (2021). *3D Characterization of Sponge Cake as Affected by Freezing Conditions Using Synchrotron X-ray Microtomography at Negative Temperature*. Foods, 10(12): 2915.
- Zhang, B., Cao, H.-j., Wei, W.-y. and Ying, X.-g. (2020). *Influence of temperature fluctuations on growth and recrystallization of ice crystals in frozen peeled shrimp (Litopenaeus vannamei) pre-soaked with carrageenan oligosaccharide and xylooligosaccharide*. Food chemistry, 306: 125641.
- Zhang, J. and Datta, A. (2006). *Mathematical modeling of bread baking process*. Journal of Food Engineering, 75(1): 78-89.
- Zhao, Y. and Takhar, P. S. (2017). *Micro X-ray computed tomography and image analysis of frozen potatoes subjected to freeze-thaw cycles*. LWT - Food Science and Technology, 79: 278-286.
- Zhu, Z., Zhou, Q. and Sun, D.-W. (2019). *Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments*. Trends in Food Science & Technology, 90: 13-25.

Références bibliographiques

Zounis, S., Quail, K., Wootton, M. and Dickson, M. (2002). *Studying frozen dough structure using low-temperature scanning electron microscopy*. Journal of Cereal Science, 35(2): 135-147.