



Université de Bourgogne



D.E.A. "Sciences de l'alimentation" – Option Sciences des aliments

Année 2002 – 2003

Utilisation des hydrocolloïdes dans les crèmes glacées : contribution à la compréhension du rôle des polymères lors de la congélation.



Sébastien JAMELOT

Responsables de stage : Dominique CHAMPION et Odile CHAMBIN

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Sensorielle de l'Aliment (IMSA)

E.N.S.B.A.N.A.

Université de Bourgogne - 1, esplanade Erasme – 21000 DIJON

RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous avons pour objectif de comprendre le mode d'action des polysaccharides sur la stabilité des produits congelés tels que les crèmes glacées lors de cycles de congélation/décongélation (de -60 °C à -10 °C). Un même polysaccharide : la pectine faiblement méthylée (0,9%) a été utilisée en solution et en milieu gélifié avec 30% de saccharose.

Les résultats obtenus par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par Analyse Enthalpique Différentielle (AED) n'ont pas permis de constater un effet significatif de la structure du milieu sur la mobilité des protons de l'eau, sur la transition vitreuse ou sur la quantité de glace. Par contre, l'étude des propriétés visco-élastiques en fonction de la température a montré que la structure organisée du système gélifié permet une fusion de la glace progressive au cours du réchauffement d'un produit congelé. L'organisation en réseau favoriserait une meilleure répartition et/ou une orientation privilégiée des cristaux de glace lors de la mise en place de la congélation.

ABSTRACT

In this study, we aimed to understand the mode of action of polysaccharides on the stability of the products frozen like ice cream at the time of freezing / unfreezing (of -60 °C with -10 °C). The same polysaccharide : low methoxy pectin (0.9%) was used in solutions and gels with sucrose 30%.

The results obtained by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) did not make it possible to note a significant effect of the structure of the medium on the mobility of the protons of water, on the vitreous transition or the quantity of ice. On the other hand, the study of the viscoelastic properties according to the temperature showed that the organized structure of freezing allows a fusion of progressive ice during the reheating of a frozen product. The organization in network would support a better distribution and/or a privileged orientation of the crystals of ice at the time of the installation of freezing.

SOMMAIRE

1. I-INTRODUCTION	p.3
II-MATERIELS et METHODES.....	p.5
A- Matériels.....	p.5
B- Méthodes.....	p.5
1- Protocole de fabrication des milieux gélifiés et épaissis.....	p.5
2- Test d'écoulement (ou test de "fonte").....	p.6
3- Analyse Thermo-Mécanique Dynamique (A.T.M.D.).....	p.6
4- Analyse Enthalpique Différentielle (A.E.D.).....	p.7
5- Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.).....	p.7
5.1 Principe de la RMN.....	p.7
5.2 Mesures de T_2	p.8
5.3 Mesures RMN.....	p.8
6- Analyses statistiques des résultats.....	p.9
III-RESULTATS et DISCUSSION.....	p.9
1- Propriétés thermiques des milieux étudiés.....	p.9
1.1. Fusion de la glace dans les différents milieux.....	p.9
1.2. Transition vitreuse d'un produit congelé.....	p.9
2- Caractéristiques rhéologiques des milieux étudiés.....	p.11
2.1. Test de « fonte ».....	p.11
2.2. Caractéristiques visco-élastiques des milieux.....	p.12
3- Mobilité des protons dans les milieux étudiés.....	p.17
3.1. Effet du milieu à 25°C.....	p.17
3.2. Effet de la température sur la mobilité dans les milieux.....	p.19
IV-CONCLUSION.....	p.21
BIBLIOGRAPHIE.....	p.22

I- INTRODUCTION

Pendant le stockage, les crèmes glacées peuvent se détériorer du fait, par exemple, de la croissance des cristaux de glace. Cette altération de qualité est d'autant plus marquée que la température de stockage est élevée, que le produit subit de grandes fluctuations de température ou que le temps de stockage est long (Blond *et al.*, 1997). Des polysaccharides stabilisants tels que le xanthane, les carraghénanes, les gommes de guar et les alginates sont communément ajoutés aux crèmes glacées pour apporter de la cohésion et de la rigidité lors de la congélation et donner de l'onctuosité au produit lors de sa consommation.

Ces stabilisants jouent un rôle important en changeant les propriétés rhéologiques du milieu. De nombreux travaux ont été faits pour tenter de comprendre le mode d'action des polysaccharides dans les crèmes glacées et les résultats ont montré que l'augmentation de viscosité du milieu provoquée par l'ajout de macromolécules ne permettait pas de prédire le taux de cristallisation de la glace. Par contre, il a été montré que les stabilisants limitent la croissance des cristaux de glace pendant le stockage (Caldwell *et al.*, 1992; Goff *et al.*, 1993). La concentration des stabilisants augmentant dans la phase cryo-concentrée, leur enchevêtrement pourrait diminuer le taux de diffusion des solutés et de l'eau, et ainsi inhiber la croissance des cristaux (Levine et Slade, 1990, cité par Goff *et al.*, 1993). Plus récemment, Ablett *et al.* (2002) ont montré par Résonance Magnétique Nucléaire que la croissance des cristaux de glace dans un milieu composé de petites molécules (di et trisaccharides) et d'eau abaissait la mobilité des protons de l'eau et des solutés. La mobilité dans la phase cryo-concentrée d'un produit congelé est fortement dépendante de la température et de son état physique. Aux basses températures, cette phase se transforme en un solide vitreux dans la zone de transition vitreuse. Un verre est défini comme étant un solide métastable avec une forte viscosité ($> 10^{13}$ Pa.s) (Levine et Slade, 1988). A la température de la transition vitreuse, le milieu passe d'un liquide visco-élastique à un solide amorphe (verre) avec, associée, une augmentation de la viscosité. Pour les aliments congelés, cette température (T_g') est définie comme la température où le produit a atteint la cryo-concentration maximum (Levine et Slade, 1988). Aux températures supérieures à T_g' , les constituants des systèmes congelés voient leur mobilité augmenter. Dans les crèmes glacées, T_g' varie entre -23 et -43 °C selon la formulation (Levine et Slade, 1990). Aux températures inférieures à T_g' , les milieux (à l'état vitreux) sont stables sans recristallisation ou autre réaction de détérioration du fait de la forte viscosité. Par conséquent, la cryostabilisation des desserts congelés comme les crèmes glacées pourrait être réalisée en élevant la T_g' en jouant sur la composition du milieu ou en conservant le produit au-dessous de T_g' . Cependant, dans la

pratique, ces produits sont généralement conservés à une température $T > T_g$. Ils ont donc tendance à évoluer relativement rapidement. Il a été montré que l'addition de petites quantités de polysaccharides, comme celles présentes dans les crèmes glacées, ne modifiait pas la température de transition vitreuse (Blond et Simatos, 1998). Par contre, des mesures des propriétés visco-élastiques par Analyse Thermo-Mécanique (Goff *et al.*, 1992) et Analyse Thermo-Mécanique Dynamique (Blond, 1994a) sur des solutions congelées de saccharose / polymères (guar, maltodextrines et dextran) ont montré que des solutions contenant l'un de ces polymères présentent une meilleure résistance mécanique qu'une solution de saccharose seule, lors de la fusion de la glace entre -35 °C et -15 °C .

Notre travail consiste à déterminer dans quelle mesure la présence de macromolécules influent sur la quantité de glace lors de cycles de congélation/décongélation. Pour cela, les expérimentations seront conduites avec différents milieux et plus particulièrement un milieu gélifié et un autre épaissi; tous deux préparés avec un même hydrocolloïde utilisé en agro-alimentaire pour ses propriétés gélifiantes ou épaississantes : la pectine. La pectine choisie est une pectine amidée faiblement méthylée très souvent employée pour la fabrication de produits faiblement calorique. Contrairement aux pectines hautement méthylées, il est nécessaire de la complexer avec des cations comme Ca^{2+} pour former un réseau gélifié (Grosso *et al.*, 2000). Ainsi, des variations de la teneur en CaCl_2 permettront de modifier l'organisation moléculaire du polysaccharide et d'observer les effets de la structure du milieu sur les propriétés thermiques (transition vitreuse, fusion de la glace), rhéologiques (propriétés viscoélastiques) et dynamiques (relaxation des protons). L'ensemble de ces propriétés sera observé lors d'un cycle congélation/décongélation afin de comprendre les effets des macromolécules sur la mise en place de la congélation et sur le comportement lors de la fusion.

II- MATERIELS et MÉTHODES

A- Matériels :

- La pectine utilisée (**Unipectine 305**, Degussa, Redon, France) est faiblement méthylée (degré d'estérification = 23,8) et son degré d'amidation est de 20,8. La teneur en eau de la poudre est de 11% (+/- 0,8%). Elle est composée d'acides α ,D-galacturoniques partiellement estérifiés par du méthanol (*Figure 1*), de quelques unités de β -L-rhamnose et de sucres neutres comme le galactose, l'arabinose et le xylose (*Figure2*).

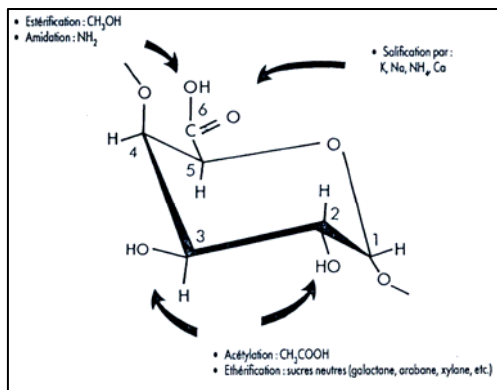


Figure 1 : Substitutions de l'acide anhydro α ,D-galacturoniques.

- Le saccharose (Merck, Darmstadt, Allemagne), de formule $C_{12}H_{22}O_{11}$, a une masse molaire de 342,3 g/mol .

- Le chlorure de calcium dihydraté, $CaCl_2 (+2H_2O)$ (NormapurTM, Prolabo, Paris, France), a une masse molaire de 147,2 g/mol.

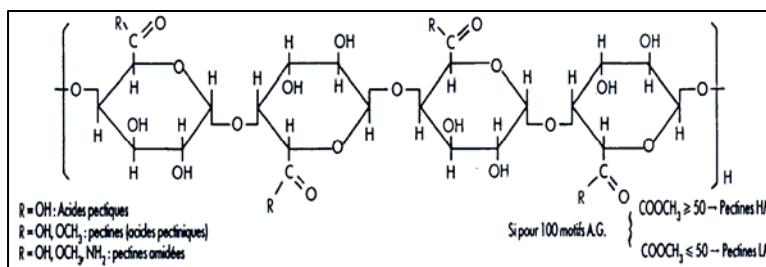


Figure 2 : Schéma d'une chaîne pectique.

B- Méthodes :

1- Protocole de fabrication des milieux gélifiés et épaissis :

La composition des milieux étudiés est indiquée dans le *Tableau 1*. Les poudres ont été préalablement mélangées avant une dissolution à chaud (80-100 °C) sous agitation à 1300 tr/min, pendant 10 minutes, dans de l'eau distillée. Les milieux ont été refroidis à température ambiante. Le becher et son contenu ont été pesés pour s'assurer de la constance du poids. Le $CaCl_2$ a été prélevé d'une solution mère à 10^{-2} M et ajouté à la solution remise sous agitation. Pour le milieu A₂, 0,2 mL de HCl (10^{-2} M) est ajouté à la solution A pour abaisser le pH jusqu'à celui de la solution B. Le gel a été laissé en maturation pendant au moins 18 h à 20 °C avant utilisation.

Milieux	[saccharose] (g/100g)	[CaCl ₂] (mol/l)	[CaCl ₂] (g/100g)	[pectine] (g/100g)	Masse Ca ²⁺ /masse pectine (g/100g)	pH (σ)
A (épaissi)	30	1.45x10 ⁻³	0.015	0.9	1.6	4.49 (0.06)
A₂ (épaissi+HCl)	30	1.45x10 ⁻³	0.015	0.9	1.6	4.06 (0.06)
B (gélifié)	30	5x10 ⁻³	0.05	0.9	5.5	4.09 (0.08)
Milieux témoins						
C (eau pure)	0	0	0	0	0	/
D	0	1.45x10 ⁻³	0.015	0	0	/
E	0	5x10 ⁻³	0.05	0	0	/
F	30	0	0	0.9	0	/

σ : écart-type

Tableau 1 : Composition des milieux étudiés.

2- Test d'écoulement (ou test de « fonte ») :

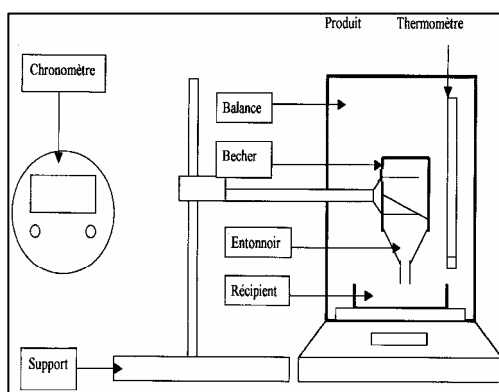


Figure 3 : Système mis en place pour le test de fonte.

L'analyse a été effectuée avec 10 g de produit. Après 18 h de maturation à température ambiante, les produits sont placés 72 heures à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ils sont ensuite sortis tour à tour et placés au-dessus d'une balance (schéma 1) afin de quantifier le poids de produit décongelé qui s'écoule en fonction du temps. La température ambiante est de $23.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3- Analyse Thermo-Mécanique Dynamique (A.T.M.D.) :

Le viscoanalyseur METRAVIB (Ecully, France) impose de très faibles taux de déformation en régime harmonique. La température est contrôlée à $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les milieux sont introduits dans l'appareil à température ambiante. Les mesures sont réalisées en pompage annulaire (diamètre du piston = 7,9 mm ; diamètre du godet = 10 mm). Pour nos mesures, le taux de déformation est de 0,05%, avec un refroidissement de $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ à une vitesse de $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, avec un palier de 10 minutes à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis un palier de 3 minutes à $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$; les échantillons sont ensuite réchauffés jusqu'à $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Le module de Coulomb (G^*)

modules de **conservation (G')** et de **perte (G'')**, ainsi que **l'angle de perte δ** ont été mesurés à six fréquences différentes : 5, 10, 15, 20, 40, 80 Hz.

4- Analyse Enthalpique Différentielle (A.E.D.) :

Cette technique permet de mesurer les températures et l'enthalpie des changements d'état d'échantillons soumis à un traitement thermique. Les analyses enthalpiques différentielles ont été effectuées avec un **calorimètre différentiel à balayage** (DSC 7, Perkin-Elmer Co. Ltd., CT). Cet appareil a été calibré avec du n-octane et de l'eau (températures de fusion respectives : $-56.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) ainsi que de l'indium pour calibrer l'axe d'énergie (28.45 J/g). Les échantillons, d'un poids moyen de 5 mg, sont placés dans des capsules d'aluminium et une capsule vide sert de référence. Les différents milieux sont refroidis de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis chauffés jusqu'à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

5- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

5.1 Principe de base de la RMN :

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène qui apparaît lorsque le noyau de certains atomes sont dans un champ magnétique statique et exposés à un second champ magnétique tournant.

Lorsque l'hydrogène est placé dans **un champ magnétique B_0** , les moments magnétiques ne s'alignent pas avec la direction du champ mais précessent autour d'un vecteur qui est le même pour tous, et à une vitesse correspondant à **la fréquence de Larmor** définie par l'équation (1) :

$$\omega = \gamma \cdot B_0 \quad (1)$$

où ω est la fréquence de précession ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$), B_0 la force du champ magnétique statique (Tesla) et γ le rapport gyromagnétique spécifique du noyau étudié ($\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). On a donc un phénomène d'organisation des directions de moments magnétiques (*Figure 4*).

Pour obtenir la résonance, **un champ magnétique alternatif B_1** de fréquence ν_0 est appliqué perpendiculairement à B_0 . Sous l'effet de B_1 , **l'aimantation M_0** bascule d'un angle dépendant de l'intensité de B_1 et de la durée de l'impulsion (pulse). Une impulsion à 90° provoque un basculement du vecteur dans le plan transversal ; l'amplitude du signal est alors

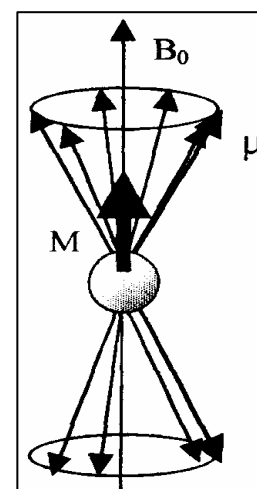


Figure 4 : Moments magnétiques de l'hydrogène en précession dans un champ magnétique statique.

maximale et l'on peut mesurer l'aimantation M qui en résulte. La suppression de B_1 induit la réorientation progressive de M . Le temps nécessaire à ce phénomène est appelé **temps de relaxation**. Plus l'atome est mobile, plus il met du temps à retrouver son état d'équilibre. Pendant ce temps, les noyaux émettent de l'énergie par échange entre spins voisins et entre les spins et le réseau de noyaux des molécules. Cette émission détectée sous forme de tension dans une bobine perpendiculaire au champ B_0 constitue **le signal**.

5.2 Mesures de T_2 :

Le signal donne accès à différents paramètres comme la quantité de protons présents dans le milieu, le temps de relaxation longitudinal (T_1) et le **temps de relaxation transversal (T_2)**. Ce T_2 , que nous utiliserons dans cette étude, caractérise les échanges d'énergie entre les protons voisins d'où le terme de « relaxation spin-spin » et il est influencé par l'inhomogénéité du champ B_0 . Il est court pour les milieux solides et plus long pour les liquides.

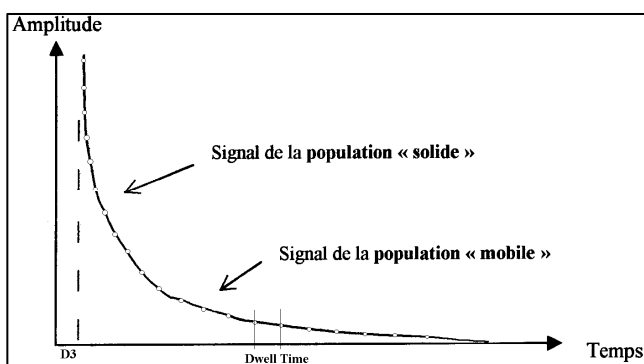


Figure 5 : Signal FID (avec D3, le temps mort entre le pulse et l'acquisition de données ; et le Dwell Time, le temps entre deux points d'acquisition).

90° au temps $t=0$ suivi par une série de pulses à 180° caractérisant les echos (Figure6).

Le signal de précession libre (ou **Free Induction Decay (FID)**) (Figure 5) est enregistrée après une impulsion à 90° pour obtenir la valeur des T_2 courts. La séquence **CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)** a été utilisée pour avoir accès aux protons qui provoquent un déclin du signal lent et éviter ainsi les problèmes liés à l'inhomogénéité du champ magnétique. Ceci implique un pulse de

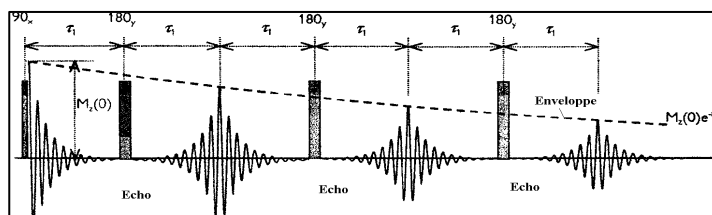


Figure 6: Séquence CPMG.

5.3 Mesures RMN :

Dans chaque tube en verre d'un diamètre de 8 mm, 0,5g de produit sont introduits. Toutes les mesures ont été effectuées à 25 °C et à -10 °C. Pour les mesures a -10 °C, les échantillons ont été placés préalablement à 72 heures à -30 °C (+/- 5 °C). L'appareil utilisé est **un spectromètre MARAN Ultra (Resonance instrument)** fonctionnant à une fréquence de résonance de 23.4 MHz. En CPMG, les pulses de 90-180° sont espacés d'un temps (τ) de 250 μ s à

25 °C et 25 μ s à -10 °C. Un nombre d'échos suffisant (4096) a été utilisé pour obtenir un retour à l'ordonnée zéro. Enfin, les résultats ont été analysés par les logiciels de « Resonance Instruments » : **Winfit** et **WinDxp** pour les T_2 .

6- Analyses statistiques des résultats :

Chaque expérimentation a été répétée au moins trois fois et les grandeurs mesurées en AED et RMN (T_2 , T_m , T_g ...) ont été analysées par un test de comparaison de moyenne (**test de Duncan**). Les résultats présentés sont significativement différents pour un α de **0.01**.

II- RESULTATS et DISCUSSION:

1. Propriétés thermiques des milieux étudiés

1.1. Fusion de la glace dans les différents milieux:

Les mesures ont été effectuées en Analyse Enthalpique Différentielle (AED) sur des échantillons refroidis de +20 °C à -100 °C à 10 °C/min puis réchauffés à la même vitesse. Les thermogrammes obtenus pour les milieux A (épaissis) et B (gélifiés) ont été exploités lors du réchauffement. Les thermogrammes obtenus pour les milieux A et B présentent des phénomènes

thermiques semblables (*Figure 7*).

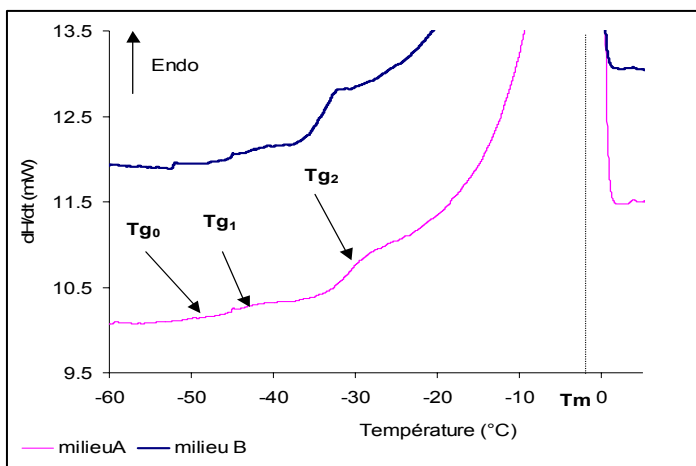


Figure 7 : Thermogrammes obtenus pour les milieux épaissi (A) et gélifié (B) lors d'un réchauffement à 10 °C/min.

Un pic endothermique est observé, correspondant à la fusion de la glace. Ce pic est caractérisé par T_m (*Figure 7*) : la température du maximum correspondant à la fusion des derniers cristaux de glace. Le *tableau 2* présente les moyennes des T_m mesurés par AED pour les milieux avec du chlorure de calcium, A (épaissi) et B (gélifié) et sans chlorure de calcium (F).

	Milieu	Moyenne (°C)	Groupe Duncan
T _m	A	-5.3	a
	B	-5.2	a
	F	-3.6	b

Tableau 2 : Moyenne des T_m : température du maximum du pic de fusion mesurée par AED dans les différents milieux.

Ainsi, le T_m moyen du milieu F (sans chlorure de calcium) est différent des milieux A et B (Tableau 2). On vérifie bien que la présence CaCl₂ provoque une diminution de T_m ; ceci est dû au fait que les petits solutés abaissent l'activité de l'eau (loi de Raoult). Par contre, il est important de noter que la différence de concentration en chlorure de calcium est suffisamment faible entre les milieux A et B pour que les températures de fusion de ces deux milieux ne soient pas significativement différentes.

L'aire sous le pic de fusion représente l'enthalpie de fusion de la glace (ΔH). ΔH varie en fonction de la température de fusion de la glace de 333 J/g à 0 °C à 255 J/g à -30 °C (Franks, 1982). La plage de fusion dans les produits A et B s'étalant sur 30 °C (Figure 7) et le ΔH variant avec la température, il est difficile de mesurer précisément par AED la quantité de glace des échantillons à l'exception de l'eau pure. Par ailleurs, seule une partie de l'eau contenue dans ces échantillons congèle (eau dite congelable).

Milieu	A	B	F	C	D	E
ΔH moyen (J/g d'eau dans le produit)	164	173	178	333*	315	281
(σ)	(2)	(13)	(16)		(32)	(28)

σ : écart-type * d'après Franks, 1982

Tableau 3 : ΔH de la fusion de la glace dans chaque milieu.

Les enthalpies de fusion des échantillons ayant une plage de fusion semblable ont été analysées afin de comparer la quantité de glace présente dans les milieux. Les ΔH moyens des milieux A (épaissi), B (gélifié) et F ne sont pas significativement différents (Tableau 3). Dans ces milieux, la quantité de glace est donc identique. Par ailleurs, les milieux D et E (eau + CaCl₂), ont des ΔH moyens beaucoup plus élevés que ceux des milieux contenant du saccharose (A, B et F). La température de fusion et la quantité de glace dans les milieux A et B congelés ne sont pas significativement différentes.

1.2. Transition vitreuse d'un produit congelé:

La température de transition vitreuse d'un produit congelé contenant des petits solutés (solution de saccharose (Mac Inness, 1993 ; Blond *et al.*, 1997), jus de fraise (Torreggiani *et al.*,

1999), crème glacée (Goff *et al.*, 1993)) est couramment appelée Tg'. Cette température représente la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum, c'est-à-dire ayant une teneur en eau de l'ordre de 18% pour les exemples cités. Cependant, expérimentalement aux basses températures, deux variations de chaleur spécifique (Cp) caractérisent la transition vitreuse de ces produits congelés. Trois températures Tg₀, Tg₁ et Tg₂ sont généralement utilisées pour caractériser ces différentes étapes (Blond *et al.*, 1997). Elles correspondent respectivement au début du premier changement de Cp et aux points milieux de ces transitions (*Figure 7*). La Tg' correspondant à l'intersection des courbes Tm et Tg sur un diagramme de phase, est une température intermédiaire entre Tg₁ et Tg₂ (Blond *et al.*, 1997). D'après Sahagian et Goff (1995), le premier changement de Cp correspondrait au début de l'augmentation de la mobilité moléculaire liée à la transition vitreuse alors que le second décalage de la ligne de base serait associé au début de la fusion de la glace.

	Milieu	Moyenne (°C)	Groupe Duncan
Tg ₀	A(épaissi)	-48.0	a
	B(gélifié)	-46.2	a
	F(sans CaCl ₂)	-45.0	a
Tg ₁	A	-44.9	a
	B	-43.5	a
	F	-43.4	a
Tg ₂	A	-30.2	a
	F	-30.2	a
	B	-33.6	b

Tableau 4 : Résultats du test de Duncan pour les températures, mesurées par AED, caractérisant la transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum des milieux A, B et F.

Les différences entre les milieux A, B et F ne sont pas significatives pour Tg₀ et Tg₁. En effet, il a été démontré par Blond (1994a) que l'addition d'une faible quantité de biopolymère (jusqu'à 4 %) ne modifiait pas la température de transition vitreuse. La faible quantité de pectine (0,9%) dans ces trois milieux étant identique, l'effet sur la transition vitreuse n'apparaît donc pas. Par contre, la Tg₂ du milieu B (gélifié) (-33.6 °C) apparaît significativement différente de celle des milieux A (-30.2 °C) et F (-30.2 °C). Or, cette température, correspondant au second décalage de chaleur spécifique, est très proche

du début de la fusion de la glace (*Figure 7*), ce qui rend difficile la détermination de Tg₂, surtout en présence de polysaccharides (Simatos *et al.*, 1999).

2. Caractéristiques rhéologiques des milieux étudiés

2.1 Test de "fonte" :

Un test de "fonte" (tel qu'il est souvent réalisé dans l'industrie des crèmes glacées) a été mis en oeuvre afin de différencier les milieux (*Figure 8*). La masse de produit s'écoulant du

bécher (masse initiale = 10 g) a été suivie en fonction du temps. Aucune perte en produit et en eau n'est observée pour le milieu gélifié après sa décongélation. L'écoulement du milieu épaissi permet d'établir des cinétiques de fonte. En effet, après une période de latence (1) correspondant à la mise en température du produit, le produit s'écoule entre 14 et 28 min (2). Après 28 min (3), il

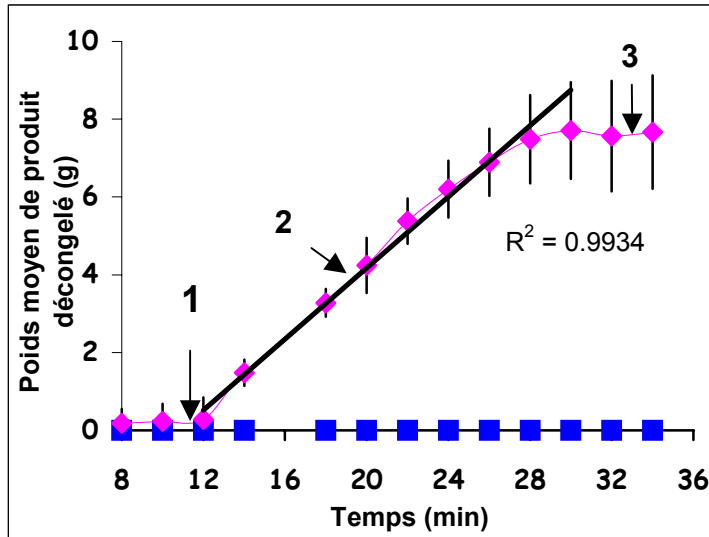


Figure 8 : Evolution du poids moyen de produit congelé en fonction du temps pour des milieux épaissis

A ◆ et gélifié B ■ de 10 g .

2.2. Caractéristiques visco-élastiques des milieux :

L'étude des propriétés viscoélastiques des milieux gélifiés et épaissis aux températures négatives ainsi que leurs évolutions lors d'un chauffage a été réalisée par Analyse Thermo-Mécanique Dynamique (A.T.M.D.). Ces mesures sont délicates à mettre en œuvre car, d'une part les produits congelés sont des produits très sensibles d'un point de vue thermique et leur comportement rhéologique est fortement dépendant de leur histoire thermique et d'autre part, les différences de rigidité du produit dans la zone de température étudiée (de -60 à -10 °C) sont si importantes qu'elles nous ont contraint à une optimisation préalable des conditions de mesure (choix du porte-échantillon, profil de température).

Une étude préliminaire a permis de montrer que la maturation de nos gels s'accomplissait durant 9 heures, à température ambiante, c'est-à-dire que suite à ce délai, il n'y a plus d'évolution significative de la valeur du module de Coulomb G^* (équation 2) en fonction du temps.

$$|G^*| = (G'^2 + G''^2)^{1/2} \quad (2)$$

avec G' le module de conservation (Pa) et G'' le module de perte (Pa)

n'y a plus d'écoulement du produit.

De cette expérience, il faut retenir d'une part que l'ajout d'une faible quantité de chlorure de calcium confère au milieu B des propriétés de gel ; la pectine formant alors un réseau continu dans le produit avec l'ion bivalent, et d'autre part que le cycle congélation/décongélation ne provoque pas d'altération du gel puisqu'il conserve sa structure et qu'aucun exudat d'eau n'est observé.

Les résultats exploités correspondent au réchauffement des échantillons à 4 °C/min après une congélation relativement lente jusqu'à -60 °C à 0.5 °C/min pendant laquelle un palier de 3 min à -40 °C a été respecté afin de favoriser la cristallisation l'eau congelable. A -40 °C, les milieux étudiés n'étaient pas vitrifiés lors de la diminution de température ; la viscosité était encore suffisamment faible pour permettre la formation et/ou la croissance des cristaux de glace. Le profil de température a été optimisé pour permettre une bonne répétabilité des mesures. Il est important de noter que les températures repérées par l'appareil correspondent aux températures du four à proximité de l'échantillon. Lorsque la diminution de température est lente (0.5 °C/min), l'écart de température entre l'air environnant et l'échantillon est faible (~ 1 °C). Cependant pour une cinétique de variation de température plus importante comme nous l'avons effectuée lors du chauffage (4 °C/min) et compte tenu de l'inertie du porte échantillon utilisé, cet écart peut être plus important.

Les modules de conservation (G'), de perte (G'') et l'angle de déphasage (δ) sont décrits en fonction de la température (*Figure 9*).

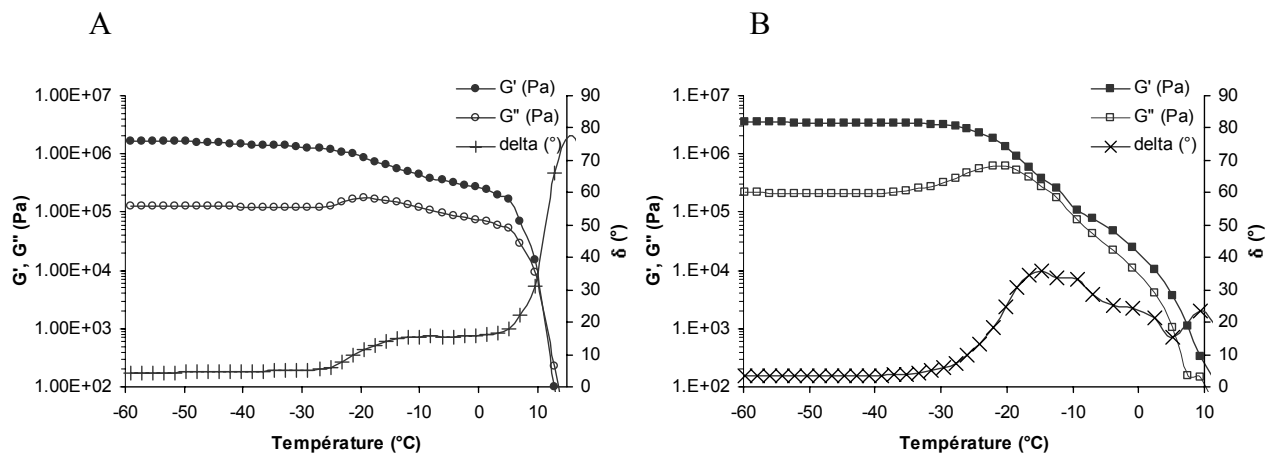


Figure 9 : Evolution de la partie réelle (G') et imaginaire (G'') du module de Coulomb (G^) lors d'un chauffage à 4 °C/min dans un échantillon non gélifié A et gélifié B.*

- Aux températures inférieures à la température de transition vitreuse : des variations de température ne provoquent que très peu d'évolution des caractéristiques visco-élastiques. De -50 °C à -40 °C (Figure 9), il y a une évolution lente des modules en fonction de la température : la courbe du module de perte G' décroît légèrement tandis que les courbes du module de conservation G'' et de l'angle de perte δ évoluent peu avec l'augmentation de température. Des différences ont été observées entre les milieux gélifiés et épais.

En *Figure 10*, sont présentées les valeurs des modules de Coulomb G^* pour les milieux A et B à 15Hz. Aux températures inférieures à la température de transition vitreuse, la valeur du module G^* apparaît supérieure pour les milieux gélifiés par rapport à celles obtenues pour les milieux épaissis, alors que tous les échantillons ont subi les mêmes variations thermiques. Dans cette

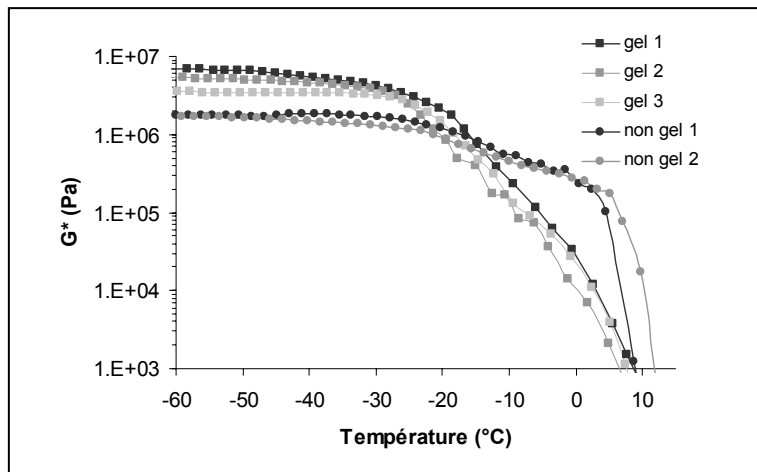


Figure 10 : Evolution de module de Coulomb à 15 Hz en fonction de la température pour les différentes répétitions dans les milieux gélifiés (■) et épaissis (●).

zone de température et pour les deux types de produit, le module de conservation G' est toujours plus important que le module de perte (G'') (*Figure 9*) ; la valeur ainsi obtenue pour G^* rend compte de la rigidité des produits aux températures négatives. La rigidité des échantillons est principalement due à la présence des cristaux de glace présents dans les milieux à ces températures, la phase cryo-concentrée étant alors vitrifiée. Ainsi la différence observée entre les deux milieux peut avoir plusieurs origines :

- i) la quantité de glace présente dans le milieu gélifié pourrait être plus importante que celle présente dans le milieu épaissi. La concentration en chlorure de calcium étant plus grande dans le milieu B que dans le milieu épaissi, il est fort improbable que ce milieu ait une quantité de glace plus importante;
- ii) la distribution et/ou l'orientation des cristaux glace après congélation pourraient être suffisamment modifiées par la présence d'un réseau continu gélifié pour conférer au produit une rigidité plus importante.

- Au passage de la transition vitreuse: (*Figure 9*), on observe une chute brutale de G' et un pic de G'' (*Figure 11*). A ce niveau, l'angle de perte δ augmente également. Ces évolutions brutales des modules visco-élastiques sont reconnues comme étant caractéristiques de la zone de transition vitreuse (Blond *et al.*, 1994 b). On peut remarquer sur la *figure 9*, que le début de la chute de G' est observable à une température inférieure au pic de G'' ; au début de l'augmentation de G'' et de δ vers -30 °C est à une température légèrement inférieure à la chute de G' . Le terme de "zone de transition vitreuse" apparaît plus approprié pour qualifier l'ensemble des phénomènes

rhéologiques observés (chute de la rigidité, début de la mobilité moléculaire). Dans notre étude, la température de référence choisie pour décrire la transition vitreuse est la température du maximum du pic de G'' .

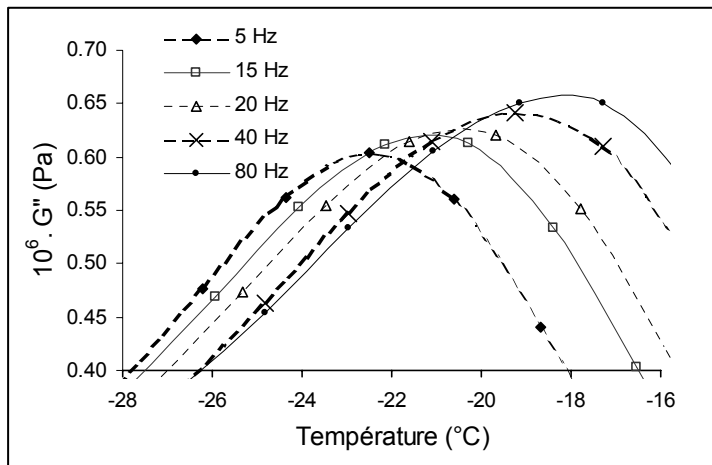


Figure 11 : Décalage de la température du pic de G'' (T_{max}) en fonction de la fréquence dans un milieu gélifié.

La transition vitreuse est un phénomène cinétique, c'est-à-dire que la température qui la caractérise va dépendre des conditions d'observations ; dans notre cas, elle va dépendre de la fréquence de sollicitation. En effet, on peut observer un décalage de la température du maximum de G'' en fonction de la fréquence : dans l'exemple de la figure 11, ce maximum est à -22 °C à 5 Hz et à -18 °C à 80 Hz. Pour les deux milieux à 15 Hz, ce

maximum est observé à une température moyenne de -20 °C (± 2) pour le milieu A (épaissi), et à -21 °C (± 2) pour le milieu B (gélifié). La température de transition vitreuse n'est donc pas significativement différente entre les deux milieux.

Une représentation du type **Arrhénius** (Figure 12) permet de déterminer une énergie d'activation apparente (E_a) selon l'équation (3):

$$\ln F = (-E_a / RT) + \text{constante} \quad (3)$$

avec F la fréquence en Hz, E_a l'énergie d'activation apparente en J/mol, R la constante des gaz parfaits et T la température en Kelvin.

L' E_a caractérisant une **transition vitreuse** dans un produit contenant de petits solutés est comprise entre 200 et 400 kJ/mol (Simatos *et al.*, 1999). Pour nos produits, l' E_a moyenne du milieu A (épaissi) est de **330 kJ.mol⁻¹** (± 71) et celle pour le milieu B est égale à **434 kJ.mol⁻¹** (± 66).

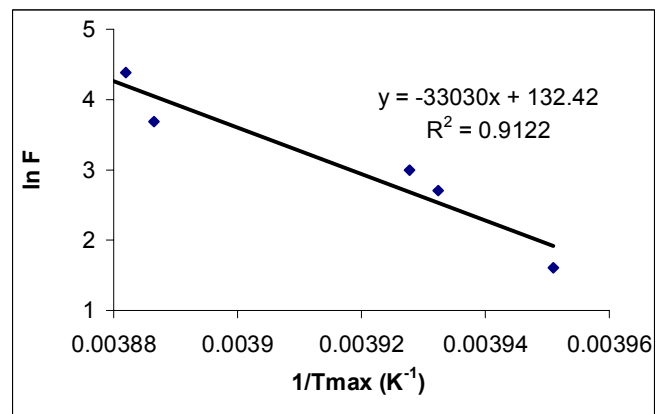


Figure 12 : Représentation de type Arrhenius de la température du maximum de G'' en fonction de la fréquence de sollicitation dans un milieu gélifié.

Les températures et les énergies d'activation apparentes obtenues en rhéologie dynamique qui sont caractéristiques de la transition vitreuse, et ne sont pas significativement différentes pour les milieux A et B. L'ajout du chlorure de calcium n'a donc pas modifié l'aptitude du produit à vitrifier lors de la diminution de la température.

- Aux températures supérieures à -18 °C : les profils rhéologiques des produits épaissi et gélifié sont très différents (*Figure 9 et 11*). Les évolutions de G' , G'' et δ sont encore très lentes dans le produit épaissi A jusqu'à 5 °C. Le milieu conserve une rigidité importante dans cette zone de température : à -15 °C, $G' = 7.10^5$ Pa pour rester à **$G' = 2,5.10^5$ Pa à 5 °C**. La fusion de la glace apparaît modérée dans le milieu épaissi compte-tenu de la faible évolution des modules. Après 5 °C, au contraire, une chute brutale de G' et G'' est observée ; la valeur de G'' devenant alors supérieure à celle de G' car le produit perd son caractère solide. De même la phase augmente très fortement sous l'influence de la fusion de la glace. Les températures de fusion observées confirment que la température indiquée par l'appareil est supérieure à celle de l'échantillon (jusqu'à +8 °C au maximum). L'effet de la température est double sur la rhéologie du produit : d'une part, il y a diminution de la rigidité due à l'agitation thermique et d'autre part, il y a surtout fusion de la glace provoquant une dilution du mélange épaissi et accentuant sa perte de rigidité.

Dans le produit gélifié B, la diminution de rigidité (G') est plus progressive lors de l'élévation de température : à -15 °C, $G' = 1,3.10^5$ Pa pour diminuer à **$G' = 8.10^3$ Pa à 5 °C**. La valeur de G' reste supérieure à celle de G'' tout au long de l'expérience ; un plateau caoutchoutique (valeur constante de δ vers 20°) est observable à 10 °C indiquant que le matériau conserve des propriétés de solide après congélation. Aucune chute brutale des modules due à une fusion marquée de la glace n'est visible. Cependant, la rigidité atteinte à 10 °C est très faible ($G' = 3.10^2$ Pa) et est de même ordre que celle obtenue dans le produit épaissi. L'organisation de la pectine en un réseau continu dans le milieu a permis une fusion progressive des cristaux de glace.

En considérant que la quantité de glace est identique dans les deux types de milieux, les différences observées pourraient être dues à la distribution des cristaux dans le produit. On peut penser que la répartition des cristaux de glace dans un système très organisé du gel dit "en boîte à œuf" (Grant *et al.*, 1973 cité par Ijima *et al.*, 2002) que constitue la pectine complexée au Ca^{2+} , est plus homogène que dans le milieu épaissi. Les cristaux ainsi mieux répartis dans l'échantillon pourraient être aussi plus homogènes en terme de distribution de taille des cristaux. La fusion serait alors plus précoce en présence de petits cristaux dans le milieu gélifié et plus brutale pour de plus gros cristaux dans le milieu épaissi, et donc moins marquée au début du réchauffement.

Par ailleurs, il a été montré que la croissance des cristaux de glace et/ou des modifications de morphologie des cristaux pouvait être modifiées par la fermeté d'un gel (Blond, 1988). La vitesse de propagation du front de glace est significativement réduite lorsque le temps de maturation du gel augmente ou lorsque l'élasticité du gel est augmentée. Cet effet a été expliqué par les contraintes mécaniques que le réseau gélifié peut exercer sur les cristaux, inhibant ainsi leur croissance. Cependant, selon les observations de Muhr et Blanshard (1986), tous les gels fermes ne sont pas aussi efficaces pour retarder la croissance des cristaux de glace, ceux-ci pouvant être altérés par la formation des cristaux. Ces derniers auteurs suggèrent même, qu'un gel flexible est plus apte à ralentir la propagation du front de glace par rapport à un gel ferme.

3- Mobilité des protons dans les milieux étudiés

3.1. Effet du milieu à 25 °C:

Nous avons vu en ATMD que la structure du polymère pouvait modifier la répartition de l'eau formant des cristaux de glace. Mais il est connu, par ailleurs, que malgré l'importante viscosité apportée par un polysaccharide à 1%, la diffusion translationnelle de petites molécules n'est pas perturbé par un agent viscosant (Contreras Lopez *et al.*, 2000). Les petites molécules peuvent diffuser sous l'influence d'un gradient de concentration au travers du réseau formé par le polysaccharide.

La structure du polysaccharide pourrait influencer la répartition de l'eau à l'échelle moléculaire sans pour autant modifier sa mobilité à l'échelle macroscopique. C'est pourquoi l'objectif de cette étude par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est de savoir si la présence d'un réseau gélifié modifie la mobilité des protons de l'eau. Hills (1999) a montré que les états dynamiques de l'eau dans des gels de polysaccharides sont variés et complexes, et notamment que les interactions entre l'eau et les polysaccharides peuvent modifier les relaxations de l'eau (T_2).

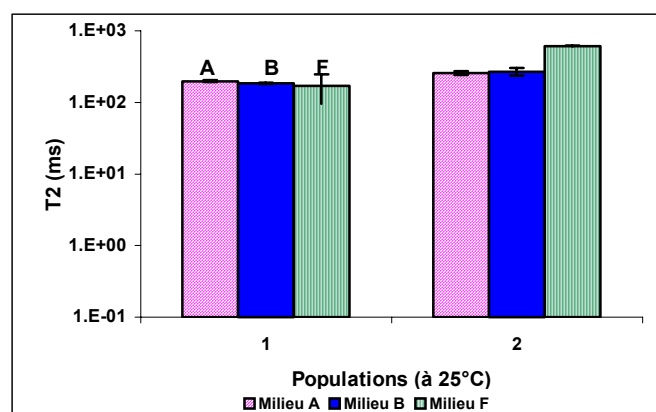


Figure 13 : Comparaison des T_2 des milieux A, B et F à 25°C.

La détermination des T_2 par RMN (Figure 13) a permis de distinguer dans chaque échantillon, deux populations de protons ayant des mobilités différentes. L'intensité relative des

populations 1 et 2 est respectivement de 16% et 84% pour le milieu A, de 17% et 83% pour le milieu B et de 14% et 86% pour le milieu F. Ces populations sont le fait d'un environnement moléculaire différent au sein du milieu. La mobilité de la population 2 est plus importante que celle de la population 1. La population 2 correspondrait aux protons de l'eau « libre » alors que la population 1 représenterait les protons de la matrice et d'une partie de l'eau en interaction avec le polysaccharide.

Les T_2 moyens de la population 1 et de la population 2 (*Figure 13*) sont respectivement de 198 ms (+/-5) et 258 ms (+/-16) pour le milieu A (épaissi), et 185 ms (+/- 5) et 268 ms (+/-32) pour le milieu B (gélifié). Suite à une analyse statistique des résultats, aucune différence significative des T_2 n'a été observée entre les milieux A et B à 25 °C. La différence de structure (continue et discontinue) des milieux gélifié et épaissi n'influence donc pas la mobilité des protons à 25 °C. Le milieu F, sans CaCl_2 , a également été étudié et les T_2 de la population 1 et de la population 2 sont respectivement de 171 ms (+/- 26) et 612 ms (+/-7). Le T_2 de la population 2 est significativement différent entre le milieu F et les milieux A et B.

Kerr et Wicker (2000) ont étudié en RMN à 25 °C des solutions diluées de pectine. Ils ont mis en évidence, comme pour nos résultats deux populations de protons de mobilité distincte dans des solutions de pectine faiblement méthylée (LMP) de 0,1% à 1%. Les temps caractéristiques T_2 des deux populations diminuent lorsque la concentration en pectine augmente. Les T_2 de la seconde population diminuaient de 240 ms à 178 ms. Ils ont également montré que cette diminution des T_2 correspondait à une forte augmentation de la viscosité relative (η/η_0 =viscosité de la solution / viscosité de l'eau à la même température) des solutions, passant de 1,62 pour 0,1% de LMP à 26,73 pour 1% de LMP. L'augmentation importante de la viscosité du milieu (x16) ne provoque qu'une faible diminution de la mobilité des protons de l'eau les plus mobiles. Les valeurs de T_2 observées pour le milieu F, dans lequel le CaCl_2 est absent, peuvent être dues à une plus faible viscosité que dans le milieu A (données non montrées) ou à une modification des propriétés d'hydratation de la pectine en absence ou en présence de Ca^{2+} et Cl^- dans le milieu. Ces ions sont respectivement connus pour leurs effets cosmotrope et chaotrope. Le milieu B (gélifié) dont la concentration en chlorure de calcium est supérieure à celle du milieu A ne présente pas de différence significative des valeurs de T_2 des deux populations. Il a été mis en évidence par Belton (1997) qu'il existait, dans des gels de polysaccharides, des interactions entre les molécules d'eau et les groupements hydroxyles du biopolymère et que d'autres molécules d'eau étaient enchassées entre les zones de jonction du gel. Ainsi, il pourrait exister au moins trois classes d'eau dans les gels de polysaccharides, chacune ayant un comportement dynamique différent selon les conditions d'étude.

Les mesures RMN dans notre cas n'ont pas révélé de différences significatives entre les milieux gélifié et épaissi et elles n'ont montré que deux populations différentes.

3.2. Effet de la température sur la mobilité dans les milieux :

La température et la composition du milieu sont des facteurs de variation de la mobilité des protons. Les échantillons ont tous subi une congélation à $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 72 heures avant l'introduction dans l'appareil de RMN préalablement conditionné à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un délai de 10 minutes a été respecté avant la mesure CPMG pour permettre la mise en équilibre thermique des échantillons. La quantité de glace dans nos échantillons à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ est de 48% selon le diagramme de phase du saccharose (Blond *et al.*, 1997) ; la concentration en saccharose et en pectine dans la phase liquide est alors respectivement de 57,5% et 1,7% (g/100 g de phase liquide).

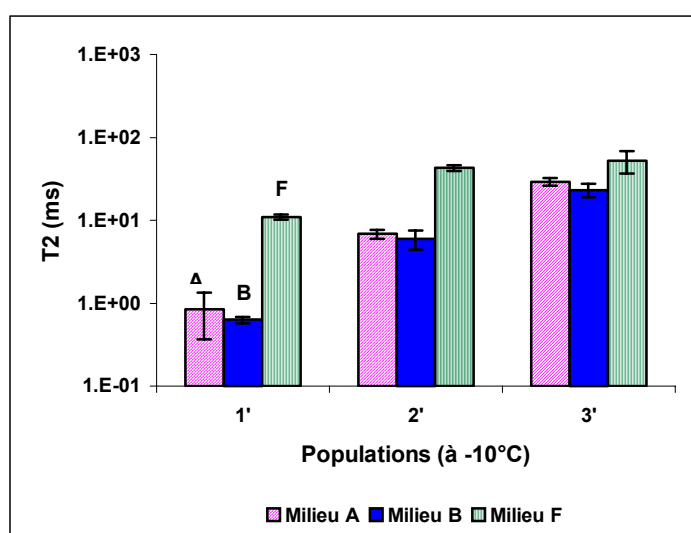


Figure 14 : Comparaison des T_2 des milieux A, B et F à -10°C .

A $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, les mesures CPMG pour tous les échantillons nous permettent de distinguer trois populations dont la mobilité est fortement réduite puisque leurs temps de relaxation sont significativement inférieurs à ceux observés à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Par contre, comme à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, aucune différence entre les échantillons A et B n'a été observée ; seul le milieu F (sans chlorure de calcium) se distingue par une plus forte mobilité pour les trois

populations. L'effet de la viscosité du milieu, modifiant les T_2 de l'eau, est ici d'autant plus marqué que l'abaissement de température provoque d'une part une diminution de la mobilité moléculaire et, d'autre part la cryo-concentration du milieu due à la formation de glace. Les T_2 observés (Figure 14), sont pour la population 1', de 0,8 ms (+/-0,1) pour le milieu A et de 0,6 pour le milieu B alors qu'elle est de 10,8 ms (+/-0,8) pour F. Compte-tenu de ces valeurs de temps de relaxation, la population supplémentaire observée à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ne peut pas être attribuée aux protons des cristaux de glace (le T_2 d'un système cristallisé est de l'ordre de quelques μs).

Les trois populations de protons de mobilité distincte à -10 °C pourraient alors être attribuées :

- i) aux protons mobiles de la matrice
- ii) aux protons de l'eau en interaction avec les protons de la matrice
- iii) aux protons de l'eau plus libre (bulk water)

Les deux premières populations pourraient n'en former qu'une à 25 °C si leur temps de relaxation sont trop proches pour pouvoir les distinguer.

Par conséquent, les mesures RMN ont permis de vérifier l'influence de ces structures continues et discontinues sur la mobilité des protons de l'eau sans révéler de différences significatives entre les milieux gélifiés et épaissis.

IV- CONCLUSION

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre comment l'organisation moléculaire d'un polysaccharide pouvait modifier la mise en place de la congélation. Les crèmes glacées contiennent traditionnellement des polysaccharides dont les effets sur l'inhibition de la croissance des cristaux de glace de ces macromolécules sont connus, même si leur mode d'action n'est pas clairement défini.

Pour répondre précisément à notre objectif, nous avons cherché un milieu modèle présentant des caractéristiques rhéologiques différentes sans modification importante de sa composition. Notre choix s'est orienté vers un milieu contenant de la pectine faiblement méthylée, du saccharose (30%) et des concentrations variables de chlorure de calcium. Si la fabrication d'un gel de pectine (LMP) est facile (Grosso *et al.*, 2000), la détermination des concentrations en CaCl_2 nécessaire à l'obtention de milieux gélifié et épaissi (à 30% de saccharose), fut un travail beaucoup plus laborieux sans références précises disponibles. Ensuite, nous avons vérifié le temps nécessaire à la maturation complète des gels pour s'assurer de la stabilité de leur structure avant leur congélation. Un test de "fonte" a été également réalisé pour vérifier que la congélation n'altérerait pas nos gels.

La première étape des mesures des propriétés visco-élastiques par ATMD fut de déterminer une histoire thermique adaptée afin que nos échantillons soient à l'équilibre (toute l'eau congelable a été congelée). La seconde étape a consisté à mesurer l'évolution des propriétés rhéologiques des milieux gélifié et épaissi lors d'un réchauffement (de $-60\text{ }^\circ\text{C}$ à $-10\text{ }^\circ\text{C}$), rendant compte de leur comportement lors de la congélation. Les échantillons, qui ont par ailleurs montré les mêmes propriétés thermiques en AED et aucune différence significative des temps de relaxation spin-spin des protons de l'eau à $25\text{ }^\circ\text{C}$ comme à $-10\text{ }^\circ\text{C}$ en RMN, ont pourtant révélé un comportement rhéologique différent.

Nos expériences ont montré que l'organisation en réseau continu ne modifie ni la quantité de glace, ni la diffusion de l'eau mais pourrait favoriser une meilleure répartition des cristaux de glace et/ou une orientation privilégiée de ces cristaux dans le milieu.

Les perspectives d'études envisagées sont, par exemple, l'utilisation d'une gamme de concentration en CaCl_2 au-dessus et en dessous de celles de nos milieux épaissi et gélifié, pourrait permettre de déterminer l'effet sur la viscosité et sur le temps de relaxation des protons. Ou encore, l'utilisation d'un autre ion bivalent tel que Zn^{2+} pour la gélification de la pectine LMP pourrait être envisagée. Cet ion ayant un encombrement stérique plus important peut créer un réseau de gel moins dense et modifier le profil rhéologique du système lors de la décongélation.

BIBLIOGRAPHIE

Ablett, S. Clarke, C. J. Izzard, M. J. and Martin, D. R. 2002. Relationship between ice recrystallisation rates and the glass transition in frozen sugar solutions. *J. Sci. Food. Agric.*, 82: 1855-1859.

Belton, P. S. 1997. NMR and the mobility of water in polysaccharide gels. *Int. J. Biol. Macromol.*, 21: 81-88.

Blond, G. 1988. Velocity of linear crystallization of ice in macromolecular systems. *Cryobiol.*, 25: 61-66.

Blond, G. 1994a. Mechanical properties of frozen model solutions. *J. Food Eng.*, 22: 253-269.

Blond, G. Ivanova, K. and Simatos, D. 1994b. Reliability of dynamic mechanical thermal analysis (DMTA) for the study of frozen aqueous systems. *J. Rheol.*, 38: 1693-1703.

Blond, G. Simatos, D. Catte, M. Dussap, C. G. and Gros, J. B. 1997. Modeling of water-sucrose state diagram below 0°C. *Carbohydr. Res.*, 298: 139-145.

Blond, G. and Simatos, D. 1998. Optimized thermal treatments to obtain reproducible DSC thermograms with sucrose + dextran frozen solutions. *Food Hydrocol.*, 12: 133-139.

Caldwell, K. B. Goff, H. D. and Stanley, D. W 1992. A low-temperature scanning electron microscopy study of ice cream. 2. Influence of selected ingredients and processes. *Food Struct.*, 11: 11-23.

Contreras-Lopez, E., Champion, D. Hervet, H. Blond, G. and Le Meste, M. 2000. Rotational and translational mobility of small molecules in sucrose plus polysaccharide solutions. *J. Agric. Chem.*, 48: 1009-1015.

Franks, F. 1982. Water and aqueous solutions at subzero temperatures. In : *Water A Comprehensive Treatise*, (F. Franks Ed.) : Plenum Press, New York and London, Vol. 7, p.250-253.

Goff, H. D. 1992. Low-temperature stability and the glassy state in frozen food system. *Food Res. Int.*, 25: 317-325.

Goff, H. D., Caldwell, K. B. Stanley, D. W. and Maurice, T. J. 1993. The influence of polysaccharides on the glass transition in frozen sucrose solutions and ice cream. *J. Dairy Sci.*, 76: 1268-1277.

Grant, G.T. Morris, E.R. Rees, D.A. Smith, P. J. C. and Thom, D. 1973. Biological interactions : the egg box model. *FEBS Lett.*, 32: 195-198.

- Grosso, C.R.F. Bobbio, P.A. and Airoidi, C.** 2000. Effect of sugar and sorbitol on the formation of low pectin gels. *Carbohydr. Polym.*, 41: 421-424.
- Hills, B. P.** 1999. NMR studies of water mobility in foods. In: *Water Management in the Design and Distribution of Quality Foods*. Isopow 7. (Y. H. Roos, R. B. Leslie and P. J. Lillford Eds): Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, p.107-131.
- Ijima, M., Hatakeyama, T., Nakamura, K. and Hatakeyama, H.** 2002. Effect of annealing on calcium pectin gel formation by thermomechanical analysis. *J. Therm. Anal. Cal.*, 70: 815-824.
- Kerr, W. L. and Wickers, L.** 2000. NMR proton relaxation measurements of water associated with high methoxy and low methoxy pectins. *Carbohydr. Polym.*, 42: 133-141.
- Levine, H. and Slade, L.** 1988. Principle of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water systems. A review. *Cryo-Letters*, 9: 21-63.
- Levine, H. and Slade, L.** 1990. Cryostabilization technology : thermoanalytical evaluation of food ingredients and systems. In: *Thermal Analysis of Foods*. (V. R. Harwalkar and C. Y. Ma eds): Elsevier Applied Sci., London, p.221-305.
- Mac Inness, W. M.** 1993. Dynamic mechanical thermal analysis of sucrose solutions during freezing and thawing. In: *The Glassy State in Foods*. (J. M. V. Blanshard and P. J. Lillford Eds): Nottingham University Press, Nottingham, p.223-248.
- Muhr, A. H. and Blanshard, J. M. V.** 1986. Effect of polysaccharide stabilizers on the rate of growth of ice. *J. Food Technol.*, 21: 683-710.
- Sahagian, M. E. and Goff, H. D.** 1995. Influence of stabilizers and freezing rate on the stress relaxation behaviour of freeze-concentrated sucrose solutions at different temperatures. *Food Hydrocoll.*, 9: 181-188.
- Simatos, D. Blond, G. and Martin, F.** 1999. Influence of macromolecules on the glass transition in frozen systems. In : *Food Macromolecules and Colloids*. (E. Didkinson and D. Lorient Eds) : The Royal Society of Chemistry, London, p.519-531.
- Torreggiani, D. Forni, E. Guercilena, I. Maestrelli, A. Bertolo, G. Archer, G. P. Kennedy, C. J. Bone, S. Blond, G., Contreras-Lopez, E. and Champion, D.** 1999. Modification of glass transition temperature through carbohydrates additions: effect upon colour and anthocyanin pigment stability in frozen strawberry juices. *Food Res. Int.*, 32: 441-446.