

Cryogénérisation & Lyophilisation

Projet Professionnel

Année 2017-2018

Tuteur : DESOBRY Stéphane

Auteurs :

DUMEZ Clémentine
FOREY Prescillia
FOY Emilie
MAHIER Hugo
MATEOS Coline
MAROTTE Othilia
LOBBENS Jérémy
PEROTIN Axel



Sommaire

Introduction	3
I. Synthèse bibliographique	
A. La cryogénérisation	
1. Définition	4
2. Intérêt de l'utilisation de la cryogénérisation	4
B. La lyophilisation	
1re étape : la congélation	5
2nde étape : la dessiccation	5
II. Matériels et méthodes	
A. Cryogénérisation	
1. Objectifs	6
2. Protocole	6
B. Lyophilisation	
1. Objectifs	8
2. Protocole	8
C. Réhydratation des poudres	
1. Objectifs	9
2. Protocole	9
D. Dénombrement	
1. Objectifs	9
2. Protocole	9
E. Microscope électronique à balayage	11
III. Résultats et discussion	
A. Décongélation	
1. Au micro-onde	12
Analyse qualitative de la proportion de mousse	
2. À température ambiante	
a. Analyse quantitative du temps de décongélation	13
b. Analyse quantitative de la mousse	14
B. Réhydratation des poudres	15
C. Dénombrement	16
D. Résultats du Microscope Électronique à Balayage (MEB)	
1. Le lait	18
2. Les levures	20
3. Le yaourt	22
E. Problèmes rencontrés	23
Conclusion et perspective	24
Bibliographie	25
Annexe : Tests sur le sang	26
Résumé	29
Abstract	29

Introduction

Dans notre quotidien, la congélation est un procédé de refroidissement et de conservation facilement réalisable mais conduisant à une importante dégradation des produits alimentaires. Cependant, de nombreux industriels agro-alimentaires utilisent aussi la cryogénérisation afin de limiter la dégradation de ces produits.

Dans ce projet nous allons étudier la cryogénérisation sous pression sur une gamme de pression allant de 1 à 75 bars, un nouveau procédé qui n'a jamais été étudié auparavant. En effet, un brevet quant à l'utilisation de cette méthode a été déposé en Janvier 2017.

Ainsi, ce projet a pour objectif dans un premier temps d'étudier la différence entre deux procédés utilisés en industries agro-alimentaires dans un dessein de conservation : la congélation et la cryogénérisation, puis l'effet, sur différents produits, de la pression au cours de leur cryogénérisation.

Notre travail s'est porté sur l'observation de deux paramètres : le taux de survie de certains microorganismes (levures, bactéries lactiques) et les propriétés physico-chimiques de chacun des produits.

Dans cette optique, différentes expériences ont été réalisées : une décongélation après cryogénérisation afin d'observer la libération de mousse, un dénombrement, une réhydratation ainsi qu'une observation de clichés à partir d'un microscope électronique balayage après une lyophilisation.

La lyophilisation est un procédé qui peut être avantageux après une cryogénérisation car il réduit le coût du transport des produits. Néanmoins, c'est un procédé assez coûteux, en énergie notamment, et donc privilégié pour les produits à haute valeur ajoutée.

I. Synthèse bibliographique

A. La cryogénération

1. Définition

Par définition, la cryogénération est l'action d'abaisser la température d'un organisme vivant ou d'un produit à des températures extrêmement basses¹ (inférieures à -150°C²) puis de le maintenir à une température de -80°C à -18°C dans un dessein de conservation. Plus spécifiquement, il est possible de parler de cryoconservation lorsque cette méthode de conservation par le froid est utilisée dans le domaine médical.

A ces températures basses, toute activité biologique est suspendue ce qui permettrait une longévité de plusieurs années aux cellules cryogénisées³. La congélation stoppe également le développement microbien, ce qui permet par exemple d'augmenter la date limite de conservation des produits alimentaires⁴. Néanmoins, certains phénomènes peuvent abîmer les cellules lors du processus de cryogénération comme la déshydratation, la cryoconcentration, la formation de glace hors des cellules conduisant à des effets d'écrasement et de perforation, mais aussi la formation de glace au sein de celles-ci. C'est pourquoi, il est habituel d'utiliser des cryoprotecteurs. Ils ont un effet antigel, c'est-à-dire qu'ils abaissent le point de congélation et augmentent la viscosité du fluide³. Dans ce projet nous allons essayer de voir si l'effet de la pression permet de se passer de ce type d'additif.

2. Intérêt de l'utilisation de la cryogénération

La cryogénération est un procédé de surgélation de produits en utilisant des gaz liquéfiés. Ce processus est à différencier de la congélation qui implique une descente en température plus lente. Lors de ces deux processus l'eau qui compose 70 à 85 % du cytoplasme⁵ sort des cellules et cristallise entre elles. Lorsque le refroidissement est lent, dans le cas de la congélation, de gros cristaux se forment autour des cellules ce qui perce leur paroi et détériore l'aliment. À l'inverse pour un refroidissement brutal, la déshydratation est très limitée et les cristaux formés sont plus petits, ce qui limite l'altération du produit⁴. C'est pourquoi le processus de surgélation (cryogénération) est préféré au processus de congélation malgré son prix plus élevé.

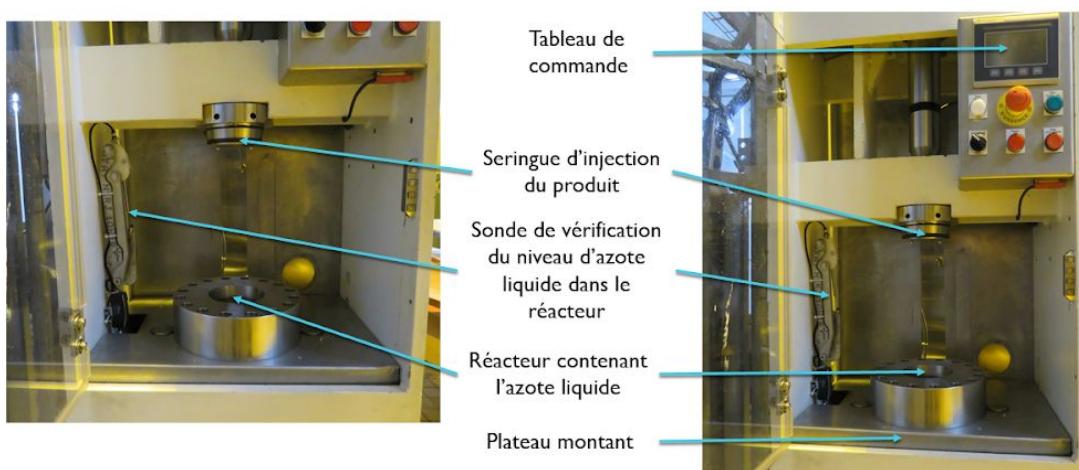


Figure 1. Photographies du pilote de cryogénération.

B. La lyophilisation

La lyophilisation, autrefois appelée cryodessiccation, est un procédé de séchage à froid permettant de retirer l'eau contenue dans un produit. Il se réalise en deux étapes : congélation du produit puis sublimation⁶. Cette dernière se faisant en maintenant le produit sous vide à une température basse. Le produit obtenu est appelé lyophilisat. Le terme "lyophile" signifie en grec "ami des solvants", en effet le lyophilisat ayant une structure très poreuse il présente une grande affinité pour les solvants aqueux. Cette structure lui permet le plus souvent de se dissoudre ou de se laisser pénétrer par un solvant avec une grande rapidité⁷. Pour obtenir de nouveau le produit initial, une 3ème étape de réhydratation est nécessaire.

L'objectif premier de la déshydratation des systèmes biologiques est l'inhibition des réactions chimiques et biochimiques avec pour conséquence le passage de ces systèmes dans un état inerte, appelé vie latente. Le produit déshydraté est ainsi considérablement plus stable que lorsqu'il était hydraté, ce qui facilite sa conservation⁸.

1re étape : la congélation

La congélation permet d'inhiber les réactions et donc de conserver les caractéristiques initiales du produit. Lors de cette étape, la température doit être inférieure à la température de solidification du produit. La congélation se fait en deux phases : une phase de nucléation qui correspond à l'apparition de germes cristallins et une phase de croissance de ces germes de glace. La qualité du produit congelé dépend de la vitesse de refroidissement du produit. Pour qu'il conserve sa qualité, il faut éviter les phénomènes d'osmoses. Ceux-ci peuvent être limités si l'on refroidit très rapidement le produit grâce à une surgélation⁹.

2nde étape : la dessiccation

Lors de cette étape, la majeure partie de l'eau est extraite par sublimation, c'est-à-dire par passage de l'eau de l'état solide à l'état de vapeur. La vapeur d'eau formée est extraite du produit à travers ses pores et par diffusion. Ce phénomène de dessiccation se fait de la surface de l'échantillon vers l'intérieur de celui-ci.

La sublimation dans l'enceinte doit se faire à la pression de vapeur saturante du produit congelé. Plus la différence entre cette pression et celle à l'intérieur de l'enceinte est importante plus la vitesse de sublimation augmente. La pression est maintenue constante dans l'enceinte grâce à une pompe à vide. De plus, la température lors de la sublimation doit être maintenue en dessous de la température de fusion de l'échantillon¹⁰. Si cette condition sur la température n'est pas respectée on observe une dénaturation biochimique des substances sensibles aux fortes concentrations en électrolytes (protéine...), une perte des produits volatils (comme les composés responsables des arômes) et une altération de la texture poreuse. Il y a alors affaissement du produit : la couche de matière sèche est plus compacte du fait de l'obstruction des pores, ce qui ralentit la sublimation. Le produit lyophilisé subit alors une rétractation et la réhydratation se fait plus difficilement⁸.

Cette technique permet donc l'obtention de produit à longue durée de conservation, même sans additifs, car l'humidité résiduelle est inférieure à 5 %. De plus, même les produits les plus thermosensibles conservent leur qualité organoleptique et nutritionnelle. Cependant, la consommation énergétique est importante car le procédé est long, il peut durer jusqu'à 72 heures. Enfin, l'utilisation de gaz frigorigène comme le fréon, puissant gaz à effet de serre, vient également poser les limites environnementales de ce procédé^{11,12}. Cependant, aujourd'hui ces gaz frigorigènes sont souvent remplacés par d'autres gaz moins polluants.

La déshydratation par sublimation de la glace laisse donc au produit la forme qu'il avait lorsqu'il était congelé et la texture poreuse du produit reflète donc la texture du produit congelé. En plus de sa forme, le produit conserve également sa dimension, sa couleur et ses qualités

organoleptiques. Même les nutriments les plus fragiles conservent leur qualité. On obtient donc des produits à haute valeur ajoutée mais pour un coût de revient élevé¹³.

A travers cette synthèse bibliographique nous nous sommes rendus compte que jamais l'effet de la pression n'avait été étudié et c'est donc sur ce point que va se concentrer notre étude.

II. Matériels et méthodes

A. Cryogénérisation

1. Objectifs

Il s'agira ici de tester pour différents produits l'influence de la pression lors de la cryogénérisation (1 à 75 bars) sur l'aspect du produit après décongélation ainsi que sur le taux de survie de bactéries lactiques et de levures de boulanger après lyophilisation. De plus, lors de la cryogénérisation sous pression, nous avons remarqué lors de premiers essais qu'il se formait de la mousse lors de la décongélation du produit. Cette formation de mousse se fait par libération d'azote dissout dans le produit cryogénisé. Il se forme alors une dispersion colloïdale d'azote gazeux dans la matrice alimentaire. Par conséquent, il s'agira également de voir si la pression influence la proportion de mousse après décongélation.

2. Protocole

Nous décrivons ici la machine pilote présentée dans la figure 1, à l'aide de la figure 2 ci-dessous. Tout d'abord, nous ajustons la pression dans le ranger d'azote liquide à environ 1,4 bars puis nous ouvrons la vanne d'alimentation en azote liquide (1). Une fois l'appareil mis en route le chauffage est allumé : il permet d'éviter que le produit ne congèle et n'obstrue la buse d'injection. Le produit est aspiré dans la seringue d'une contenance d'environ 80 mL (2). Les paramètres expérimentaux que sont la pression et la vitesse de vidange de la seringue sont définis sur l'interface de l'appareil (3). Un tamis est placé à la sortie de la buse (4) : celui-ci baigne dans la cuve qui se remplit d'azote liquide (5) et permet la récupération du produit cryogénisé sous forme de billes plus ou moins régulières selon le type de produit.

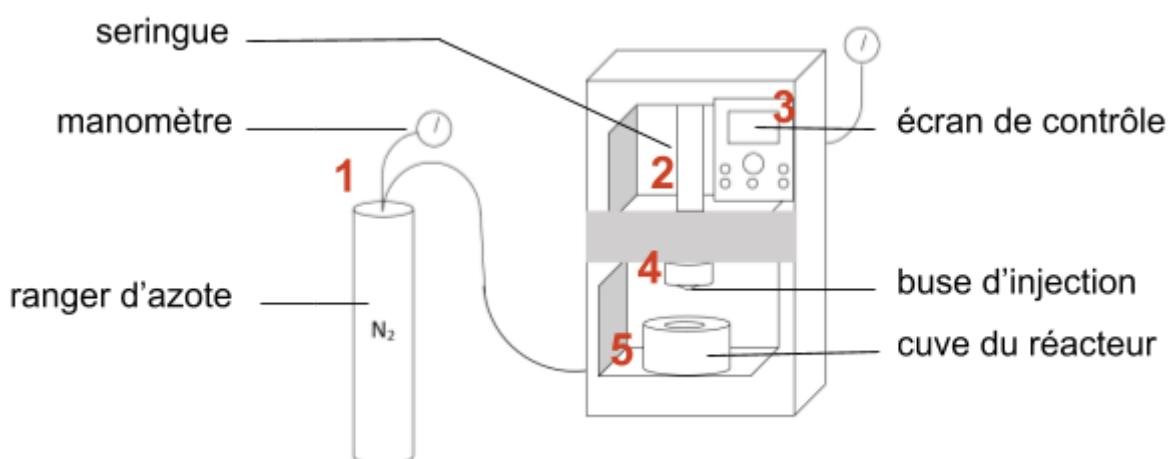


Figure 2. Schéma du pilote de cryogénérisation.

Projet Professionnel

Les différents produits testés ainsi que les pressions relatives de travail sont regroupées dans le tableau suivant.

Tableau 1. Liste des produits traités et des pressions de travail.

Produits testés	Congélation classique à -18 °C	0 bar	10 bars	20 bars	25 bars	50 bars	75 bars	Passage au lyophilisateur
Blanc d'œuf			X		X	X		X
Jaune d'œuf						X		X
Café						X		
Soda gazeuse (Pepsi)	X					X		
Velouté de tomates						X		
Jus d'orange	X	X	X		X	X		X
Bière						X		
Crème fraîche		X	X		X	X		X
Mayonnaise	X					X		
Lait	X	X	X		X	X		X
Levures vivantes	X	X	X		X	X		
Levures	X		X		X	X		
Sang mouton			X	X				X

Nous réalisons deux types d'expériences afin d'évaluer la formation de mousse et la libération d'azote après décongélation :

- une qualitative, après décongélation pendant 30 secondes au micro-onde,
- une quantitative. Cinq grammes de produit sont placés dans un tube à essai à température ambiante (environ 23°C). Le temps de décongélation est alors déterminé. Le chronomètre est lancé lors de la pesée puisqu'en effet il y a décongélation du produit dès la sortie du congélateur. Les tubes à essai sont préalablement gradués tous les centimètres afin de pouvoir mesurer le rapport de mousse sur liquide suite à la décongélation. Une photographie est prise au début et à la fin de la décongélation. La proportion de mousse est alors déterminée grâce au logiciel Mesurim.

B. Lyophilisation

1. Objectifs

Il s'agit de connaître l'impact de la lyophilisation sur nos produits cryogénisés à différentes pressions. Tout d'abord, nous voulons connaître l'influence de la lyophilisation sur le taux de survie de levures et de bactéries lactiques. Ensuite, nous souhaitons déterminer l'impact de la lyophilisation et des différentes pressions de cryogénérisation sur la capacité des produits à se réhydrater.

2. Protocole

Les produits préalablement cryogénisés sont placés dans un lyophilisateur, la lyophilisation dure entre 24 et 48 heures. Chaque échantillon lyophilisé a un volume d'environ 40 mL.

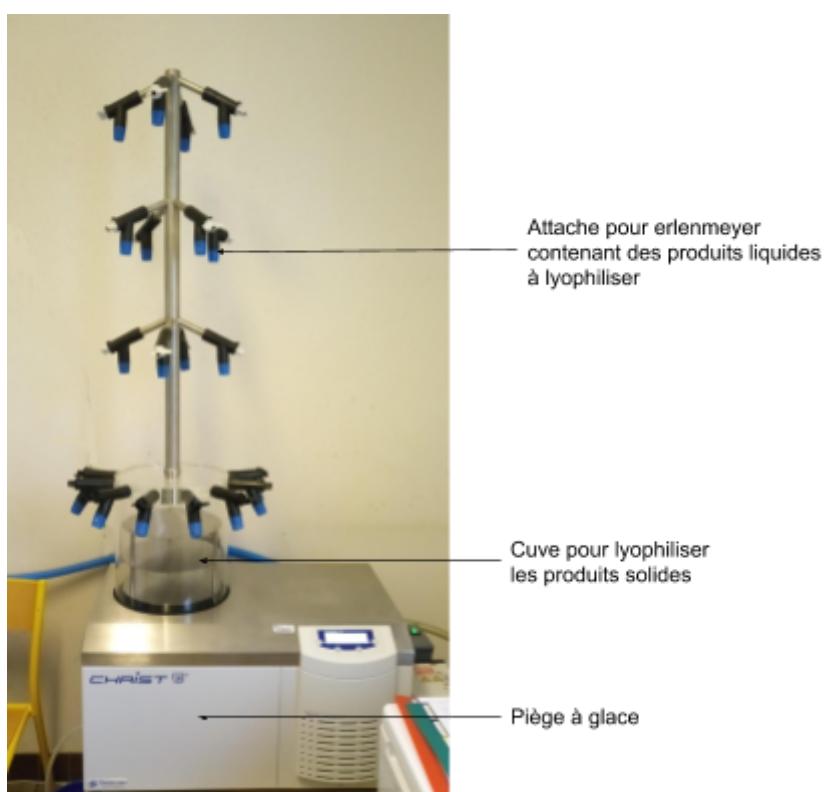


Figure 3. Photographie légendée du lyophilisateur utilisé lors de notre expérience.

Tableau 2. Liste des produits lyophilisés.

Produits testé	Congélateur classique à -5 °C	0 bar	10 bars	25 bars	50 bars
Lait	X	X	X	X	X
Levure	X	X	X	X	X
Yaourt			X	X	X

C. Réhydratation des poudres

1. Objectifs

Une fois nos poudres obtenues par lyophilisation, nous souhaitons connaître l'impact de la variation de pression de cryogénérisation sur la qualité de la poudre obtenue notamment son temps de réhydratation.

2. Protocole

Tout d'abord, 0,1 g de poudre, obtenue suite à la cryogénérisation et à la lyophilisation de nos échantillons, est introduit dans 20mL d'eau distillée, le tout dans des bêchers de 50 mL. Chaque suspension est mélangée avec un agitateur magnétique, jusqu'à réhydratation totale des poudres, c'est-à-dire qu'il ne reste aucune particule visible dans le bêcher. Des photos sont prises toutes les 30 secondes afin de suivre l'évolution de la manipulation. L'expérience est reproduite 2 fois à des agitations de 1200 tours/min puis 600 tours/min.

D. Dénombrement

1. Objectifs

Suite à la cryogénérisation à différentes pressions et à la lyophilisation des bactéries lactiques (yaourt) et de levures vivantes (de boulanger), nous cherchons à voir si la pression exercée lors de la cryogénérisation a un impact sur le taux de survie de ces micro-organismes.

Pour cela, nous avons mis en culture ces micro-organismes sur des milieux de culture adaptés.

2. Protocole

Toutes les manipulations ont été réalisées dans un milieu stérile afin de ne pas contaminer nos échantillons et de ne pas fausser nos résultats.

Avant de réaliser l'étalement, nous avons coulé deux milieux de culture différents dans des boîtes de Pétri :

- 80 boîtes avec un milieu adapté uniquement au développement des levures : OGA (oxytétracycline – glucose – yeast extract agar)
- 60 boîtes avec un milieu adapté uniquement aux développements des bactéries lactiques : MRS

Les boîtes contenant le milieu OGA nous serviront par la suite à l'étalement de levures vivantes et les boîtes contenant le milieu MRS pour l'étalement des bactéries lactiques.

Les échantillons sont mis en suspension de sorte à avoir 1 g de poudre dans 9 mL de TSE (tryptone, sel, eau). Cette solution correspond donc à notre solution mère non diluée. Par la suite, nous réalisons des dilutions en cascade d'un facteur 10 à partir de la solution mère jusqu'à la dilution 10^{-6} .

Explication de la méthode utilisée pour la première dilution :

Nous commençons par prélever 1 mL de la solution mère à l'aide d'une pipette de 1 mL graduée stérile. Ce prélèvement est ajouté à 9 mL de TSE dans un tube à essai stérile. Le contenu du tube est homogénéisé à l'aide d'un vortex. À l'aide de la même pipette qu'au préalable, nous

Projet Professionnel

prélevons 0,1 mL de solution de ce tube que nous déposons dans une boîte de Pétri. Enfin, nous répartissons de façon homogène le dépôt à l'aide d'un étaleur stérile.

Cette opération est répétée pour chaque dilution en changeant de pipette à chaque fois.

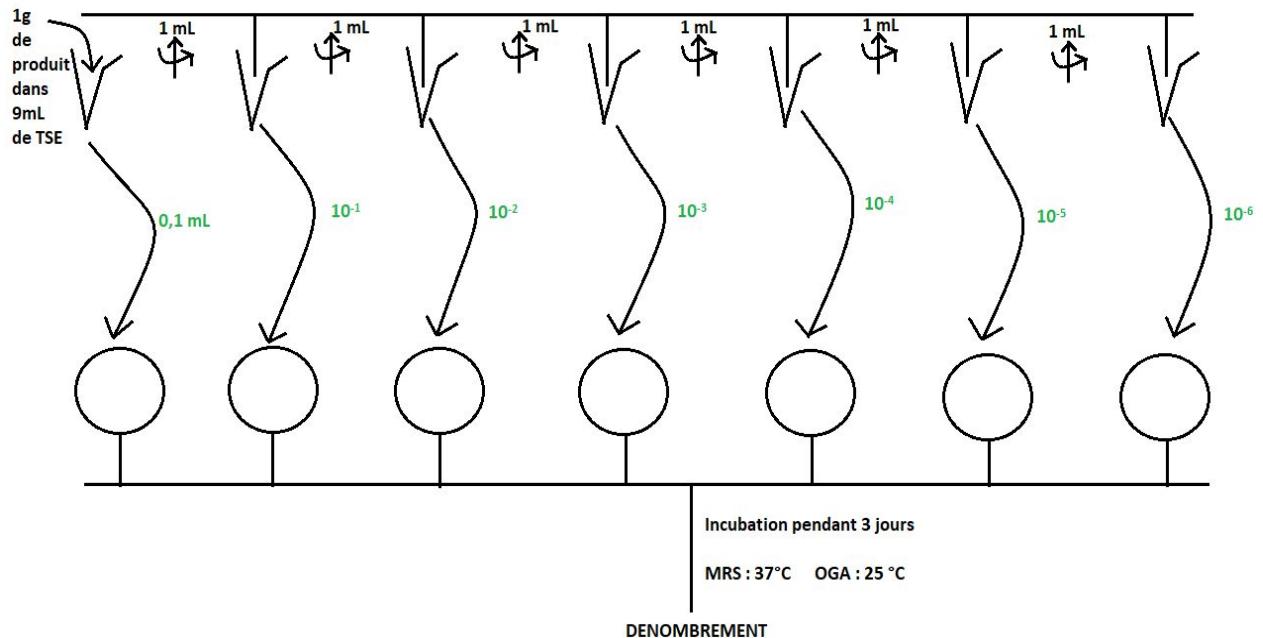


Figure 4. Protocole de dilution et d'ensemencement des levures et des bactéries lactiques.

Les différentes boîtes sont mises à l'étuve :

- À 20-25 °C pendant 5 jours pour le milieu OGA contenant les levures
- À 37°C pendant 3 jours pour le milieu MRS contenant les bactéries lactiques

Le dénombrement a été réalisé au bout de 3 jours car un développement a été observé sur la majorité des boîtes.

E. Microscope électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir une image de la surface de presque tous les solides. Les images obtenues permettent de visualiser en détail et en relief la structure de la surface. Nous l'avons utilisé pour observer les poudres obtenues après lyophilisation.

L'échantillon est préalablement recouvert d'une fine couche de carbone, cette couche est déposé à la surface de l'échantillon. L'image visualisée est une image reconstituée. En effet, une sonde, constituée d'un faisceau d'électrons, balaye la surface de l'échantillon. Ensuite, un détecteur capte ce signal réfléchi par l'échantillon. Tous ces signaux servent alors à reconstituer une image en relief¹⁴.

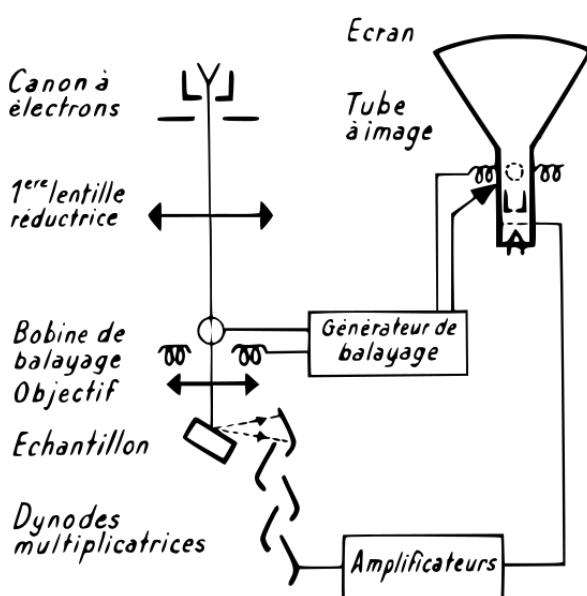


Figure 5. Photographie du MEB et schéma de principe.¹⁵

III. Résultats et discussion

A. Décongélation

1. Au micro-onde

Analyse qualitative de la proportion de mousse

Les produits cryogénisés ont été passés au micro-onde (750 W) pendant 30 secondes. Les résultats sont les suivants :

Tableau 3. Résultats qualitatifs des produits cryogénisés à 50 bars et décongelés au micro-onde.

Produits testé	Aspect avant décongélation	Aspect après décongélation	Mousse
Bière	Grosses particules	Liquide, aucune bulle	+
Jus d'orange	Pas de bille	Liquide, aucune bulle	+++
Jaune d'œuf	Fonte rapide (riche en MG)	Cuisson du jaune, pas de dégazage	/
Blanc d'œuf	Billes	Cuisson à partir de 40 s	/
Café + Lait	Petites particules	Liquide	+++
Café	Petites particules	Liquide	+++
Crème 30%	Petites particules	Liquide	+
Lait entier	Petites particules	Liquide	+

Les produits décongelés ont tous, excepté l'œuf qui a cuit, donné de la mousse suite à la décongélation au micro-onde. Cette observation pourrait présenter un intérêt commercial pour l'expresso dont le caractère moussant est un enjeu important. Les billes de café obtenue après cryogénération pourrait être utilisée plus facilement puisqu'il n'y a pas besoin d'investir dans des machines à café. Le café peut être fait à n'importe quel moment, il suffit juste de laisser décongeler ces billes de café. Enfin, l'aspect écologique n'est pas à négliger, il n'y a nul besoin d'utiliser de dosettes, difficiles à recycler.

2. À température ambiante

a. Analyse quantitative du temps de décongélation

Tableau 4. Temps de décongélation des différents échantillons.

Produits testés	Essai	Poids des produits (g)	Temps de décongélation
Jus d'orange à P=50 bars	1	5,09	19 min 06 s
	2	5,1	24 min 03 s
Jus d'orange à P=25 bars	1	5	17 min 51 s
	2	5	19 min 26 s
Jus d'orange à P=10 bars	1	5,04	22 min 41 s
	2	5,04	25 min 28 s
Jus d'orange à P=1 bar	1	5,02	26 min 07 s
	2	5,04	28 min 14 s
Blanc d'œuf à P=50 bars	1	5	32 min 10 s
	2	5,04	31 min 30 s
Blanc d'œuf à P=25 bars	1	5	26 min 43 s
	2	5	29 min 32 s
Lait à P=50 bars	1	5,08	22 min 26 s
	2	5,1	24 min 51 s
Lait à P=10 bars	1	5,07	23 min 22 s
	2	5	23 min 17 s
Cola à P=50 bars	1	4,97	26 min 27 s
	2	5,01	26 min 24 s
Cola à P=1 bar	1	4,8	31 min 38 s
	2	4,83	27 min 36 s
Bière à P=50 bars	1	4,98	17 min 39 s
	2	5,08	21 min 09 s
Crème dessert à P=1 bar	1	5,04	20 min 07 s
	2	5,04	23 min 37 s
Mayonnaise à P=1 bar	1	5,11	08 min 31 s
	2	5,09	05 min 36 s
Velouté de tomates à P=50 bars	1	5,08	> à 1h
	2	5,04	> à 1h

b. Analyse quantitative de la mousse**Tableau 5. Résultats obtenus sur la hauteur de mousse des différents échantillons.**

	Hauteur totale (liquide + mousse) (cm)	Hauteur de mousse (mm)	Pourcentage (%) de mousse
Blanc d'oeuf 25 bars	3,96	2,69	6,79
Jus orange 10 bars	3,34	1,18	3,53
Jus d'orange 50 bars	4,63	17,3	37,36
Lait 10 bars	3,27	2,29	7,00
Lait 50 bars	3,07	6,39	20,81

La quantité de mousse observée suite à la décongélation à température ambiante n'est pas mesurable pour tous les produits à l'aide des graduations faites sur les tubes à essais :

- la méthode de décongélation à l'air libre pourrait expliquer cette faible quantité de mousse par rapport à la partie liquide (il y aurait un dégazage lors de la décongélation),
- peut-être qu'il y a un effet de la forme du tube, le tube pourrait réduire la formation de mousse,
- la quantité de produit décongelée (5 g) est trop faible.

B. Réhydratation des poudres

Tableau 6. Temps de réhydratation de nos échantillons

	1200 tours/min	600 tours/min
Levure 0 bar	0 min	2 min 30 s
Levure 10 bars	0 min	3 min
Levure 25 bars	0 min	1 min
Levure 50 bars	0 min	1 min 30 s
Levure congélateur	0 min	1 min
Lait 0 bar	1 min 30 s	6 min
Lait 10 bars	1 min 30 s	< 12 min
Lait 25 bars	1 min 30 s	< 12 min
Yaourt 10 bars	1 min 30 s	2 min
Yaourt 25 bars	1 min 30 s	2 min
Yaourt 50 bars	1 min 30 s	2 min

Pour une agitation de 1200 tours/min, on observe que la réhydratation des levures est instantanée tandis que les échantillons de lait et de yaourt ont un temps de réhydratation de 1 min 30 s. Il n'y a pas donc d'impact de la pression de cryogénérisation sur le temps de réhydratation. Or la réhydratation d'une poudre dépend essentiellement de la structure des particules, la pression ne semble donc pas avoir d'impacte sur la structure des particules.

Pour une agitation de 600 tours/min, nous observons que le temps de réhydratation des levures est variable selon les pressions de cryogénérisation mais nous ne pouvons pas extraire de tendance de ces résultats, cependant pour toutes les pressions le temps de réhydratation est plus long quand l'agitation est plus faible. Le temps de réhydratation est aussi plus long pour le yaourt lorsque l'agitation est plus faible mais il est le même pour toute les pressions de cryogénérisation, il n'y a donc pas d'influence de la pression sur le temps de réhydratation. Enfin, le temps de réhydratation du lait est plus important quand l'agitation est plus faible et est beaucoup plus important que les échantillons de levures et de yaourts. Une faible agitation nous permet donc de mettre en évidence que la pression de cryogénérisation ne semble pas avoir d'impacte sur la structure des particules mais que la cryogénérisation en elle-même semble impacter leur structure.

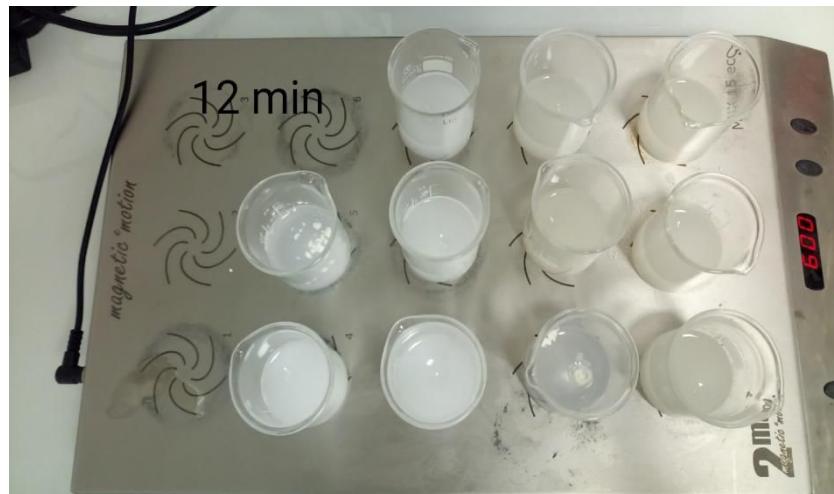


Figure 6. Observation de la réhydratation des poudres à 600 tours/min au bout de 12 min.

	Lait 0 bar	Levures vivantes 50 bars	Levures vivantes 10 bars
Lait 10 bars	Yaourt 50 bars	Levures vivantes congélateur	Levures vivantes 25 bars
Yaourt 10 bars	Yaourt 25 bars	Lait 25 bars	Levures vivantes 0 bar

Figure 7. Schéma représentant la disposition des produits sur l'agitateur magnétique.

C. Dénombrement

Tableau 7. Dénombrement des bactéries lactiques (nombre de colonies).

Dilution	Aucune	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Yaourt 10 bars	221	4	2	0	0
Yaourt 25 bars	42	13	0	0	0
Yaourt 50 bars	0	0	0	0	0

Pour la solution non diluée, on observe que l'augmentation de pression lors de la cryogénérisation conduit à une destruction des bactéries lactiques. En effet, on observe un taux de destruction de 81 % lorsqu'on passe d'une pression de cryogénérisation de 10 bars à 25 bars et un taux de destruction de 100 % lorsque la pression de cryogénérisation est de 50 bars.

Pour les solutions diluées, les résultats ne sont pas significatifs entre les différentes pressions.

Projet Professionnel



Figure 8. Étalement yaourt 10 bars sans dilution.

Tableau 8. Dénombrement des levures (nombre de colonies).

Dilution	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Levures congelées	∞	∞	48	13	1
Levures 0 bar	∞	70	4	1	0
Levures 10 bars	∞	∞	152	12	0
Levures 25 bars	∞	275	55	3	1
Levures 50 bars	∞	∞	222	22	0

∞ : plus de 500 colonies

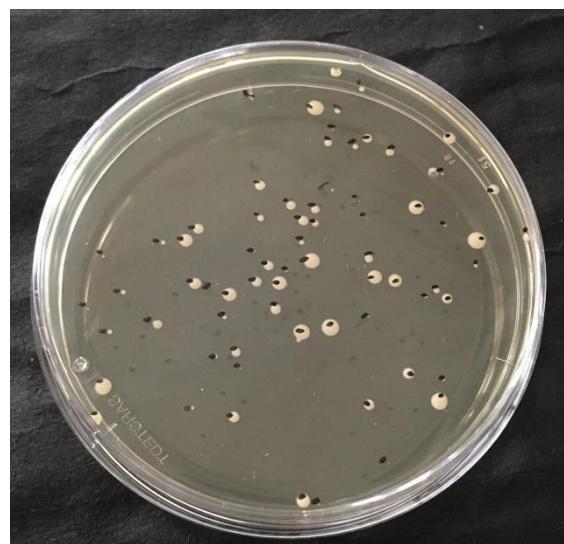


Figure 9. Étalement levures 0 bar à une dilution de 10^{-3} .

Seules les dilutions allant de 10^{-4} à 10^{-6} sont exploitables car les autres dilutions comportent un nombre de colonies trop important pour être dénombré. Pour la cryogénérisation, en ne tenant pas compte du dénombrement des levures 25 bars, nous remarquons que les levures ont tendance à mieux survivre à une cryogénérisation sous des pressions importantes.

Le résultat des levures à 25 bars ne corrobore pas la tendance observée précédemment. Ceci peut venir d'une erreur de manipulation. Pour s'en assurer, il faudrait répéter l'expérience un grand nombre de fois et réaliser une étude statistique.

Le taux de survie des levures congelées reste inférieur à celui des levures cryogénisées à 10 bars et 50 bars.

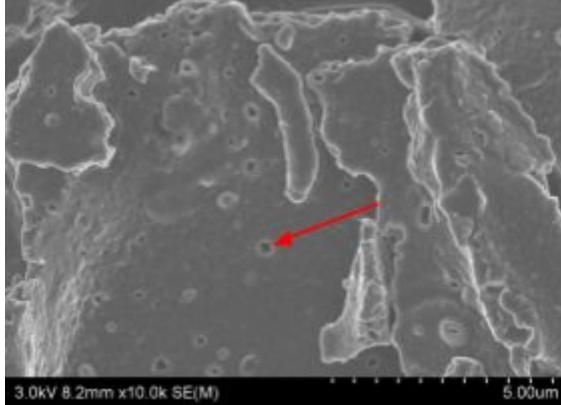
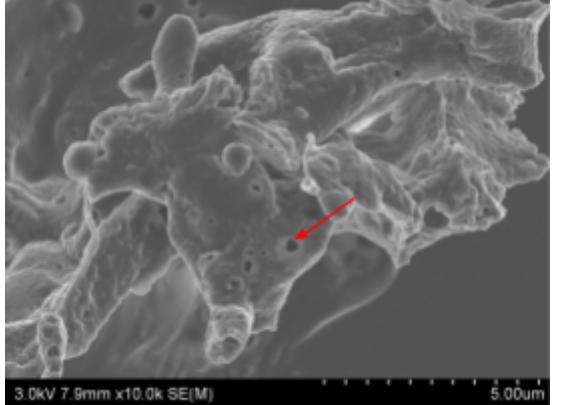
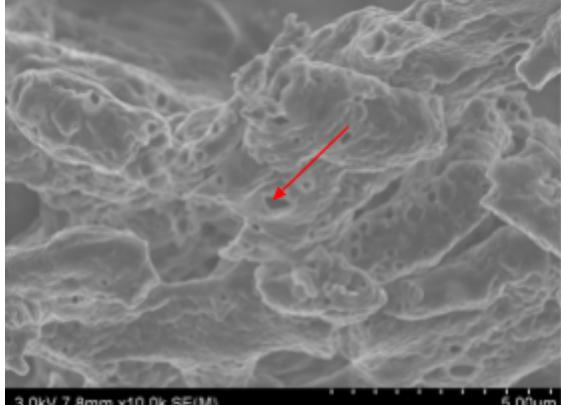
D. Résultats du Microscope Électronique à Balayage (MEB)

1. Le lait

Lors de la réhydratation du lait nous avons observé que celle-ci se faisait difficilement. Afin de mieux comprendre pourquoi, nous avons décidé d'observer la structure du lait au MEB. On observe sur les photos que certains globules gras ont explosé lors de la cryogénérisation, rendant les particules de lait hydrophobes et donc limitant la réhydratation de celles-ci. De plus, il semble qu'il y ait un nombre de globules gras explosés plus important pour les fortes pressions. Mais cette différence ne semble pas impacter le temps de réhydratation puis ce que celui-ci était le même pour toute les pressions.

Sur les photos suivantes les flèches rouges désignent des globules gras éclatés.

Tableau 9. Structure du lait cryogénisé à 0, 10 et 25 bars avec un grossissement x10 000.

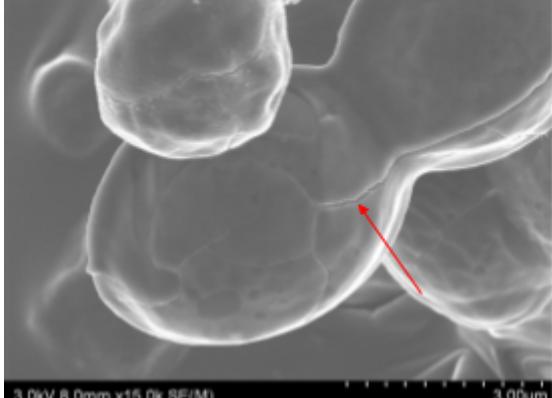
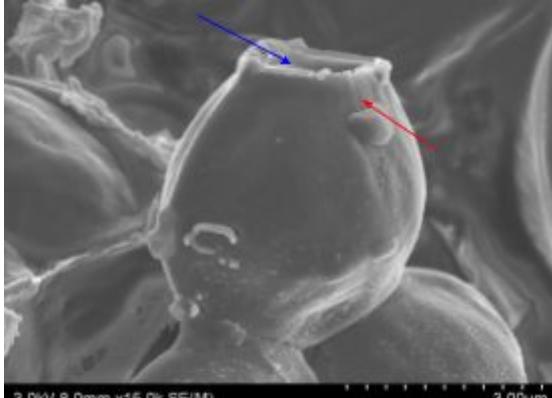
Pressions (bar)	Observations	Photographies
0	Environ 50 globules gras éclatés. Les globules gras mesurent environ 5 µm.	
10	Environ 50 globules gras éclatés. Les globules gras mesurent environ 2,5 µm.	
25	Environ 70 globules gras éclatés. Les globules gras mesurent environ 2,5 µm.	

2. Les levures

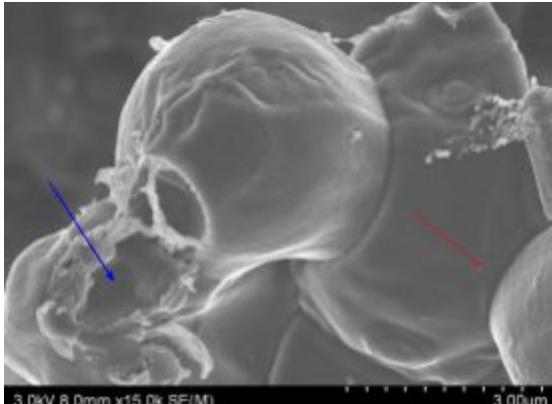
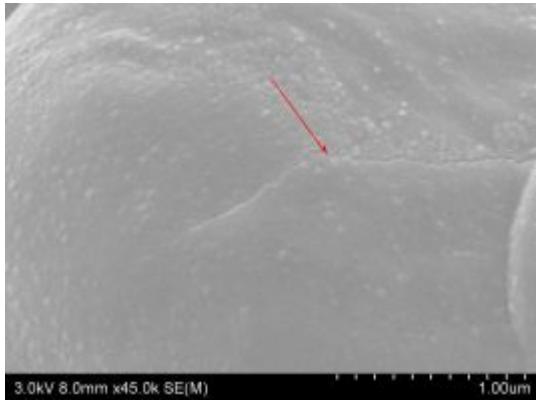
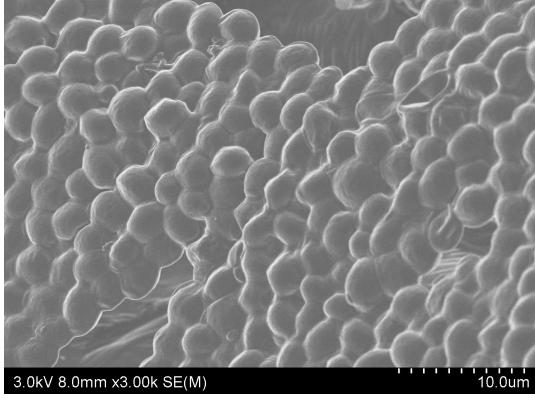
Afin de comprendre pourquoi nous observions un meilleur taux de survie des levures lorsque la pression était plus forte nous avons observé les levures au MEB. Il est possible d'observer la présence de fissures dans la paroi des levures sur les photographies ci-dessous, et ce, à toutes les pressions. Cependant, nous n'observons pas un nombre de fissures moins important pour des fortes pressions.

Les flèches rouges sur les photos suivantes désignent les fissures et les flèches bleues désignent les levures fracturées au niveau de la zone de division.

Tableau 10. Structure des levures congelées ou cryogénisées à 0, 10, 25 et 50 bars.

Pressions (bar)	Observations	Photographies
0	Pas d'écrasement, fissures de 0,15 µm	 <p>3.0kV 8.0mm x15.0k SE(M) 3.00µm</p>
10	Fracture (cicatrice de 10 µm) + fissures	 <p>3.0kV 8.0mm x15.0k SE(M) 3.00µm</p>

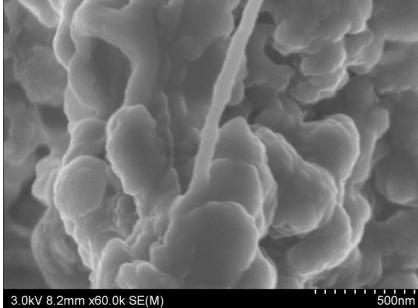
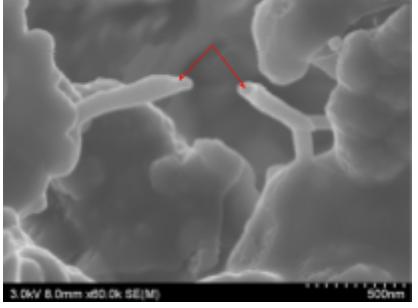
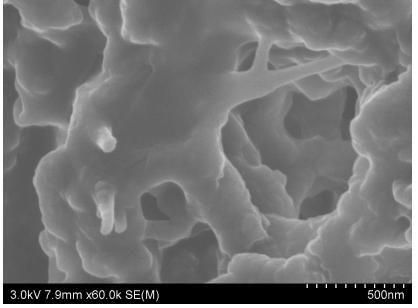
Projet Professionnel

25	Fracture et fissures	 3.0kV 8.0mm x15.0k SE(M) 3.00um
50	Moins de fissures visibles et plus petites (0,03 µm)	 3.0kV 8.0mm x45.0k SE(M) 1.00um
Congélation	Levures plus agglomérées et pas de fissures visibles	 3.0kV 8.0mm x3.00k SE(M) 10.0um

3. Le yaourt

Afin de comprendre pourquoi nous observions un taux de survie des bactéries lactiques plus important pour des faibles pressions de cryogénérisation, nous avons observé la structure de nos échantillons de yaourts cryogénisés au MEB. Cependant, cela ne nous a pas permis d'établir la cause de nos observations précédentes.

Tableau 11. Structure du yaourt congelé ou cryogénisé à 0 et 50 bars.

Pressions (bars)	Observations	Photographies
0	Réseau de caséine <i>Streptococcus</i> (6 µm) <i>Lactobacillus</i> (9 µm)	
50	<i>Lactobacillus</i> rompu (flèches rouges)	
congélateur	<i>Streptococcus</i> (6 µm)	

Les résultats observés au MEB sont en corrélation avec ceux liés au dénombrement. En effet, une augmentation de la pression exercée lors de la cryogénérisation conduit à un rupture des *Lactobacillus* du yaourt. Ainsi, les propriétés organoleptiques du yaourt sont dénaturées.

De plus, nous remarquons l'inexistence de différence microscopique entre le produit congelé et le produit cryogénisé à 0 bar. Dans ce cas, la cryogénérisation n'a aucun intérêt dans la préservation de la qualité du produit.

E. Problèmes rencontrés

Au cours des manipulations réalisées, des problèmes ont été rencontrés au niveau de la machine ce qui a ralenti les manipulations et nous a empêché de répéter les expériences ou de tester d'autres produits.

Dans un premier temps, la sonde de remplissage restait bloquée à cause du froid, empêchant les produits d'être injectés. Ensuite, la vanne contrôlant la pression à l'intérieur de la machine, ne la régulait pas correctement et cette dernière n'atteignait pas la pression voulue. Enfin, après plusieurs utilisations, l'arrivée d'azote liquide se bouchait à cause de l'accumulation des produits qui formaient un bouchon congelé. Ceci entraîne un dysfonctionnement de la machine puisque la cuve ne se remplit plus d'azote liquide.

Conclusion et perspective

Dans ce projet, nous avons voulu déterminer si la cryogénérisation sous pression pouvait présenter certains avantages pour la commercialisation de divers produits alimentaires.

Les premières expériences ont eu pour but de savoir si en plus de la longue conservation permise par cette technique, le fait de la réaliser à différentes pression modifie le produit une fois décongelé et le rend plus intéressant pour sa commercialisation. Le seul produit qui nous a semblé plus intéressant à commercialiser après décongélation a été le café. Il présente d'autant plus de mousse lorsqu'il a été cryogénisé à haute pression.

Les expériences suivantes réalisées sur les produits cryogénisés puis lyophilisés ont ensuite permis de conclure quant au taux de survie des microorganismes contenus dans certains produits (bactéries lactiques du yaourt et levures). Pour ce cas, la pression n'est pas avantageuse pour la survie des bactéries lactiques du yaourt puisque leur nombre a tendance à diminuer avec une augmentation de la pression. En revanche, elle est avantageuse pour la survie des levures car l'effet inverse est observé.

Suite à ces observations, nous avons voulu savoir, au niveau structural, comment ceci peut être expliqué. Des images en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence la rupture des *Lactobacillus* du yaourt qui se sont de plus en plus fracturés avec l'augmentation de la pression, ce qui explique les observations précédentes. L'observation faite suite au dénombrement des levures n'a pas pu être explicitée par ces images puisque les levures présentent un même nombre de fissures quelque soit la pression.

Le seul produit ayant présenté des difficultés à se réhydrater est le lait, par conséquent, sa structure a également été observée par microscopie électronique. Sur ces images, ont été observés des globules gras éclatés, ce qui a rendu les particules de lait hydrophobes et explique donc le temps de réhydratation assez conséquent.

Les effets de l'augmentation de pression au cours de la cryogénérisation ne sont pas toujours visibles : le nombre de bactéries lactiques du yaourt et le temps de réhydratation ne varient pas avec la pression.

L'utilisation de la technique de cryogénérisation n'est parfois pas justifiée : la survie des bactéries lactiques est identique dans le cas du yaourt cryogénisé sous pression atmosphérique et congelé.

Concernant les perspectives d'amélioration, certains résultats n'étaient pas cohérents, par exemple l'augmentation du nombre de levures avec l'augmentation de la pression est observée entre 10 et 50 bars mais à 25 bars elle chute sans explication. En testant la répétabilité de cette expérience et des autres, cela pourrait permettre de confirmer les tendances générales du rapport.

De plus, la mise en place d'un plan d'expérience pour le dénombrement des bactéries lactiques du yaourt et des levures, après cryogénérisation et après lyophilisation, pourrait nous permettre de déterminer l'impact du procédé sur la survie des microorganismes.

Bibliographie

1. Dictionnaire LAROUSSE, Définition cryogénérisation [en ligne]. Disponible sur <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/cryog%C3%A9nisation/20807> [consulté le 27 septembre 2017]
2. MAYER N., Définition cryogénie [en ligne]. Disponible sur <http://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-cryogenie-15941/> [consulté le 27 septembre 2017]
3. Cryoconservation [en ligne]. Disponible sur <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cryoconservation> [consulté le 27 septembre 2017]
4. GENIALIS [en ligne]. Disponible sur <http://www.genialis.fr/> [consulté le 03 octobre 2017]
5. CASSEZ R. et GAILLOT E., TPE cryogénérisation [en ligne]. Disponible sur <http://cryogenisation-tpe-2013.e-monsite.com/pages/ii-pourquoi-le-froid.html>. [consulté le 03 octobre 2017]
6. CRYOTEC.Lyophilisateur. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cryotec.fr/nos-produits/lyophilisateur/> [consulté le 19 octobre 2017]
7. HEDOUX A., Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. Techniques de l'ingénieur.[en ligne].10 sept. 2013. Disponible sur <https://www.techniques-ingeneur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/mise-en-forme-des-medicaments-42611210/lyophilisation-de-produits-pharmaceutiques-et-biopharmaceutiques-pha2026/> [consulté le 19 octobre 2017]
8. SIMATOS D. *et al.*,La lyophilisation, Principes et applications. Paris : Brevatome,1974, 467 p. ANRT. ISBN : D1360209656
9. AMOIGNON J., La lyophilisation., Boulogne : Sefefim, 1996, 103 p. ISBN : 2-9504903-4-4
10. EUROTHERM. Le procédé de lyophilisation. [en ligne]. Disponible sur <http://www.eurotherm.tm.fr/freeze-drying> [consulté le 3 octobre 2017]
11. LYOPHARM. La lyophilisation. [en ligne]. Disponible sur <http://www.lyopharm.it/fr/lyophilisation.htm> [consulté le 19 octobre 2017]
12. CRYONEXT. Aide à la lyophilisation. [en ligne]. Disponible sur <http://www.cryonext.fr/lyophilisateurs/aide-a-la-lyophilisation-cryonext.pdf> [consulté le 19 octobre 2017]
13. Institut Danone. L'alimentation pour la santé. [en ligne]. Disponible sur : <http://institutdanone.org/objectif-nutrition/les-procedes-de-conservation-des-aliments/dossier-les-procedes-de-conservation-desaliments/> [consulté le 19 octobre 2017]
14. FABER J., Microscopie électronique à balayage, 2014, Institut de Physique et Chimie des matériaux de Strasbourg [page 5]
15. Goldstein J. *et al.* Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis, 1992

Annexe : Tests sur le sang

I. Protocole

Des tubes de sang de mouton dont le contenu a été préalablement cryogénisé nous ont permis de tester l'hémolyse ou non du sang.

Afin de tester la qualité du sang suite à la cryogénérisation, nous avons centrifugé le sang. En effet, si le sang a été totalement hémolysé, alors lors de la centrifugation, le capillaire sera d'une couleur homogène rouge liée à la libération de l'hémoglobine dans le plasma. À l'inverse, si les hématies ne sont pas hémolysées, il y aura deux phases dans les capillaires : une phase rouge contenant les globules rouges et une phase transparente correspondant au plasma.

Grâce aux témoins, l'hématocrite, c'est-à-dire le volume occupé par les globules rouges, aussi appelés érythrocytes, sera déterminé et cela permettra de vérifier que le sang utilisé n'était pas à l'origine déjà hémolysé. Pour ce faire, les sanguins seront centrifugés et on mesurera à l'aide d'une graduation la hauteur du culot dans le capillaire par rapport à la hauteur totale. Un schéma de résultat attendu est présenté dans la figure 1 ci-dessous.

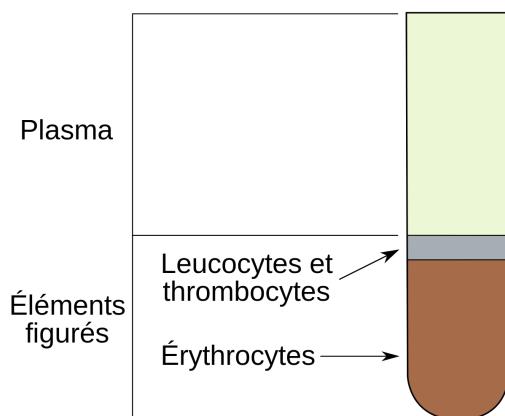


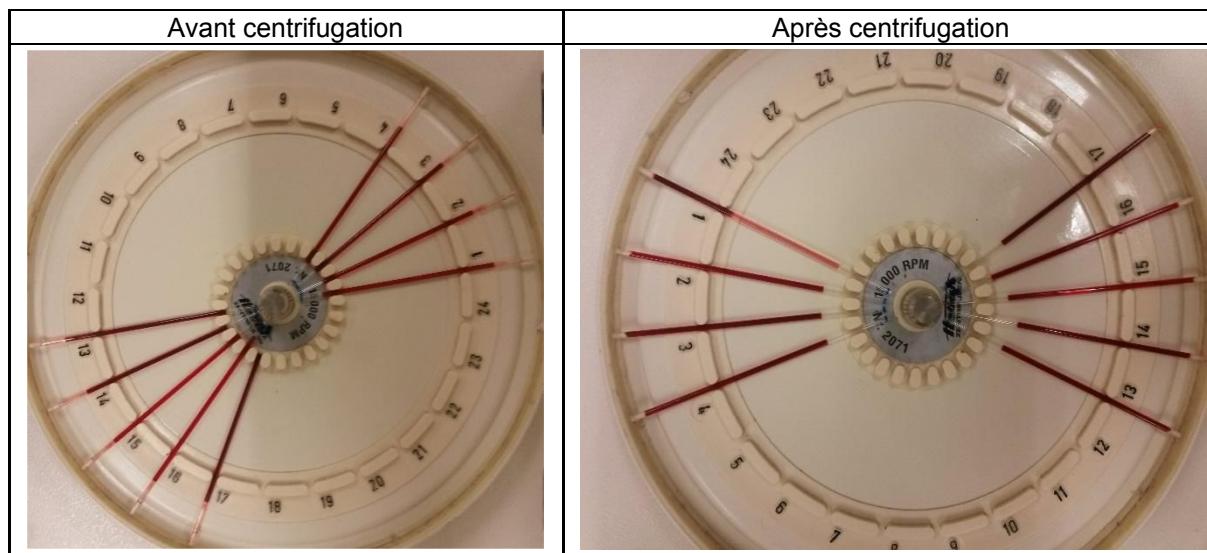
Figure 1. Schéma de résultat d'une centrifugation de sang frais.

II. Résultats

Dans les tableaux ci-après, les capillaires contiennent les éléments suivants :

- N°1 : tube témoin sang de mouton : hématocrite à 40 %
- N°3 : 10 bars
- N°4 : 50 bars
- N°13 : 75 bars
- N°14 : 90 bars
- N°15 : 1 mL congélation - 20°C pendant 30 minutes
- N°16 : 1 mL congélation - 80°C pendant 30 minutes
- N°17 : 50 bars 2^e essai

Tableau 1. Photographies des capillaires contenant les sangs avant et après centrifugation.



Avant centrifugation, l'ensemble des tubes testés ont une couleur homogène rouge. Suite à la centrifugation, le tube 1 correspondant au témoin du sang de mouton est composée de deux phases distinctement visibles, ce dernier n'est donc pas hémolysé. Cependant, pour l'ensemble des autres tubes testés nous remarquons que la couleur du capillaire est homogène signifiant que la cryogénérisation ou la congélation ont conduit à une hémolyse des globules rouges.

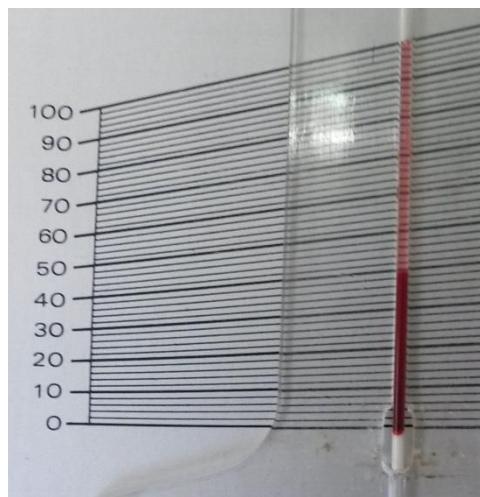


Figure 2. Photographie de la détermination de l'hématocrite du sang de mouton frais.

Les centrifugations du sang frais de mouton et d'humain nous permettent aussi de mesurer l'hématocrite. Ainsi pour le sang de mouton, il y a 40 % d'hématocrite correspondant à une valeur normale pour un sang de mouton. Cette mesure aurait pu nous permettre de comparer la quantité de globules rouges non hémolysés en fonction des différentes pressions exercées lors de la cryogénérisation ou de la température de congélation.

III. Conclusion

Au regard des tests réalisés, nous pouvons déduire que ce sang a été hémolysé suite à la cryogénérisation.

Une explication quant à ce phénomène lors de la congélation est la formation de gros cristaux d'eau conduisant à l'éclatement des globules rouges et donc la libération de l'hémoglobine.

Lors de la cryogénérisation la pression appliquée sur les cellules a aussi conduit à la libération de l'hémoglobine. Néanmoins sous 10 bars, l'action de la cryogénérisation sur le sang n'a pas été testée, or à une pression inférieure à 10 bars, la composition du sang aurait pu rester intacte.

Résumé

Le projet est basé sur l'étude d'une nouvelle méthode de cryogénérisation. En comparaison avec la technique déjà existante, celle-ci s'effectue sous différentes pressions (de 1 à 75 bars).

Les hypothèses à vérifier sont les suivantes :

- Plus la pression est élevée plus la structure des micro-organismes est conservée et par conséquent leur taux de survie est plus important.
- Plus la pression est élevée plus la quantité de mousse est abondante suite à la décongélation.

L'étude de ce potentiel n'a été réalisée que sur des produits où la formation d'une mousse présente un intérêt tels que le café, la bière, le soda et le lait. Les micro-organismes cryogénisés (bactéries lactiques et levures) ainsi que le lait ont ensuite été lyophilisés. Suite à cette manipulation, les taux de survie des micro-organismes pour chaque pression ont été estimés par ensemencement sur des boîtes de Pétri. De plus, leur structure a également été analysée grâce à la Microscopie Électronique à Balayage (MEB). Ces deux observations ont aussi été réalisées sur les micro-organismes congelés à -20°C afin de pouvoir comparer congélation et cryogénérisation.

Mots-clefs : cryogénérisation, pression, mousse, lyophilisation, MEB.

Abstract

The project is based on the study of a new cryogenic method. In comparison with the current method, this one works under different pressures (from 1 to 75 bars).

The hypothesis which have to be confirmed are :

- the higher the pressure, the better the preservation of the microorganism and the better their survival rate,
- the higher the pressure, the stronger the foaming effect after defrosting.

The study of this potential was only conducted on products in which the generation of foam could be interesting like coffee, beer, fizzy drink and milk. Then, cryogenized microorganisms (lactic bacteria and yeast) and milk were lyophilised. After this manipulation, the survival rate of microorganisms for each pressure was estimated by sowing on Petri dish. Furthermore, their organisation was also analysed thanks to the Scanning Electron Microscopy (SEM). These two observations were made on microorganisms which were freezed at -20°C in order to compare traditional and cryogenic freezing.

Keywords : cryogenics, pressure, foam, lyophilisation, SEM.