



HAL
open science

Formulation et étude de nouveaux détergents enzymatiques pour le nettoyage des membranes d'ultrafiltration de l'industrie laitière : développement et validation de méthodologies associées

Sophie Kavugho Mission

► To cite this version:

Sophie Kavugho Mission. Formulation et étude de nouveaux détergents enzymatiques pour le nettoyage des membranes d'ultrafiltration de l'industrie laitière : développement et validation de méthodologies associées. Génie chimique. Université de Rennes, 2024. Français. NNT : 2024URENS005 . tel-04685231

HAL Id: tel-04685231

<https://theses.hal.science/tel-04685231v1>

Submitted on 1 Oct 2024

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

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

COLLEGE SCIENCES DE LA MATIERE

DOCTORAL DES MOLECULES

BRETAGNE ET MATERIAUX



Université
de Rennes

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 638

Sciences de la Matière, des Molécules et Matériaux

Spécialité : Chimie : Procédés et Environnement

Par

Sophie KAVUGHO MISSION

«Formulation et étude de nouveaux détergents enzymatiques pour le nettoyage de membranes d'ultrafiltration de l'industrie laitière – Développement et validation de méthodologies associées»

Thèse présentée et soutenue à « Rennes », le « 14 juin 2024 »

Unité de recherche : Institut des Sciences Chimiques de Rennes

UMR CNRS 6226, Equipe Chimie Ingénierie des Procédés

Rapporteurs avant soutenance :

Romain KAPEL
Maxime PONTIE

Professeur, LRGP, Université de Lorraine
Professeur, GAP, Université d'Angers

Composition du Jury :

Présidente : Geneviève GESAN-GUIZIOU Directrice de Recherche, UMR STLO, Rennes INRAE

Examineurs : Clémence COETSIER Maître de Conférences, LGC, Université Toulouse 3

Directrice de thèse : Murielle RABILLER-BAUDRY Professeure, ISCR, Université de Rennes

Co-directeur de thèse : Régis PERION Directeur R&D, HYPRED/Kersia

Invité(s)

Lucie LE PETIT
Olivier CONNAN

Ingénieure R&D, HYPRED/Kersia
Ingénieur R&D, HYPRED/Kersia

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'ANRT ainsi que du Groupe Kersia dans le cadre d'une convention CIFRE (CIFRE 2020/0507).

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à l'ANRT dont les financements ont permis la réalisation de cette collaboration entre le Groupe Kersia, l'ISCR et moi-même pour accoucher d'un travail aussi bien accompli et qui porte déjà des fruits.

Cette thèse n'aurait pas été un succès non plus sans l'apport scientifique de :

- Pr. Murielle Rabiller-Baudry que je remercie énormément pour ses conseils, ses critiques et son engagement dans mon travail, aux occasions de participer à des congrès internationaux (France, Italie, Japon). Je lui exprime aussi ma gratitude pour sa rigueur et la discipline avec laquelle elle a encadré ma thèse.
- Dr. Régis Perion, pour son co-encadrement au niveau de l'entreprise Kersia et qui s'est donné la peine de suivre mes travaux malgré son planning surchargé.
- Dr. Lucie Le Petit et Mr. Olivier Connan pour leurs précieuses contributions scientifiques, techniques et morales qui ont fait de ma thèse une expérience enrichissante et bien agréable tant je me suis sentie intégrée avec eux au sein de l'équipe de R&D du groupe Kersia.

Ma gratitude va également au groupe Kersia de façon générale pour l'opportunité offerte et particulièrement aux différents membres du groupe avec lesquels je suis entrée en contact et qui ont résolu mes problèmes techniques, administratifs avec la plus grande gentillesse et avec rapidité : Aurélie Busnel, Philippine Erard, Sylvain Doublet, Elwan Lefeuvre, Isabelle Bouvet, sans oublier les membres du CSE, très efficaces.

J'aimerais aussi remercier les Dr. Gèneviève Gésan-Guiziou et Dr. Estelle Couallier, pour avoir accepté de faire partie de mon CSI et pour m'avoir apporté leurs commentaires et conseils tant bienveillants qu'enrichissants. Je remercie aussi le Dr. Gésan-Guiziou de participer à mon jury aux côtés du Dr. Clémence Coetsier, du Pr. Romain Kapel et du Pr. Maxime Pontié, car vos conseils et contributions scientifiques participent à la réussite de ce manuscrit de thèse.

Maintenant, la vie au labo n'aurait pas été aussi agréable sans la présence accueillante de l'équipe CIP, particulièrement au bât 10A avec les personnels permanents Pr. Antony Szymczyk, Dr. Thierry Renouard, Dr. Patrick Loulergue, Dr. Anne Pensel. Mes conversations avec vous sur les métiers académiques, les métiers de la recherche, nos parcours académiques et personnels étaient très enrichissantes.

Je ne voudrais surtout pas oublier d'adresser ma reconnaissance à mes collègues doctorantes Fatima-Zohra Charik et Penglin Fan qui ont déjà soutenu leurs thèses à ce jour. Je n'oublie pas non plus les derniers arrivés : Agathe Lizée, Dawry Capella-Batista, Raouf (Dr. Zine Ellabidine Hammache), Aïcha El-Kharraf. Malgré le court temps passé ensemble, votre présence dans le labo a largement contribué à la bonne ambiance qui rend si agréable le travail au sein de notre équipe CIP (a.k.a. Centre d'Insertion Professionnelle !). Merci aussi pour nos sorties gastronomiques au cours desquelles nous avons beaucoup partagé culturellement et sur nos vies personnelles pour apprendre à mieux nous connaître.

La chance, c'est de trouver un travail qu'on aime. Le bonheur, c'est d'effectuer un travail qu'on aime avec les gens qu'on aime.

Ainsi, je remercie tous les collègues qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail de thèse. Plus particulièrement à Serge Roy qui, avec une grande serviabilité, s'est occupé efficacement des réservations d'hôtels et des billets de transports lors de nos congrès.

Je remercie particulièrement Alex Javelle qui, pour son stage de 2 mois (IUT, Rennes) a passé tout son temps à réaliser rapidement et avec efficacité des spectres ATR-FTIR de plus de 40 membranes, sans lesquels mes travaux accusaient un sacré retard à cause de l'endommagement du cristal ZnSe qui a dû être remplacé.

De même, je remercie énormément Anna Prudhomme, étudiante en BUT3 (IUT Rennes) et Sarah El Morr, ancienne stagiaire à l'ISCR-CIP pour son Master 2 de l'Université Libanaise, Faculté de génie agronomique et de médecine vétérinaire, qui ont réalisé une partie des tests sur la membrane spirale.

Avec fierté, je dédie cette thèse à mes parents Fabiola et Willy qui ont mis beaucoup d'espoir en moi et ont beaucoup investi en moi. Maman, Papa, je ne serai jamais assez reconnaissante des sacrifices que vous avez consentis pour que je me tienne debout là où je suis aujourd'hui.

Je remercie aussi ma sœur Louange pour ses démarches juridiques pour l'obtention des documents demandés par l'administration française, ma sœur Fortune, mes frères Gaby et Mathias pour toutes les démarches administratives et logistiques qui m'ont aidées à obtenir divers documents sans lesquels ma situation administrative en France aurait été compromise. Merci tout simplement d'être une merveilleuse fratrie pour moi.

A mon mari, Colin, toi qui es arrivé dans ma vie au bon moment et qui as su être là pour me soutenir avec beaucoup de patience quand je rentrais tard du travail, ou que je ne pensais qu'à ma rédaction. Je te remercie pour ta présence dans ma vie qui a contribué au bon déroulement de mon cycle doctoral. Je suis fière que tu sois fière de moi. Et je suis fière de toi pour tes propres réalisations.

Tout est bien qui finit bien !

Liste des travaux

Présentations de poster(s)

- **S. Kavugho Mission**, M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk, poster at Fouling and Cleaning in Food Processing Conference, March 28-30th, 2022, Lille, France.
- **S. Kavugho Mission**, M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk. Poster at Journée de l'Ecole Doctorale (JED) 3M, 2 juin 2022, Rennes, France.
- **S. Kavugho Mission**, A. Javelle, M. Rabiller-Baudry, Impact of enzyme stabilizers and formulation on the real efficiency of enzymatic detergent useful to clean polymer membrane fouled in skim milk ultrafiltration. Poster at the special Edition of Euromembrane 2022 to celebrate the 40th EMS Anniversary, Nov 20-24th, 2022, Naples, Italy.
- **S. Kavugho Mission**, A. Javelle, M. Rabiller-Baudry, Formulation of enzymatic detergents for the cleaning of ultrafiltration membranes fouled by skim milk. Poster at Journée de l'Ecole Doctorale S3M (JED), May 25th, 2023, Rennes, France.
- **S. Kavugho Mission**, A. Javelle, M. Rabiller-Baudry, Formulation of enzymatic detergents for the cleaning of ultrafiltration membranes fouled by skim milk. Poster at ICOM, July 9-14th, 2024, Makuhari Messe, Japan.

Actes dans des congrès internationaux (proceedings)

- M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, **S. Kavugho-Mission**, S. El Morr, Evidencing strengths and weaknesses of alkaline detergents to formulate efficient mixtures useful for polymer membranes' cleaning, Proceeding of Fouling and Cleaning in Food Processing conference, 10 pages, March 28-30th, 2023, Lille, France.
- S. Kavugho Mission**, M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk, Proceeding of Fouling and Cleaning in Food Processing conference, 10 pages, March 28-30th, 2022, Lille, France.

Communications orales dans des congrès locaux

S. Kavugho Mission, A. Javelle, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, M. Rabiller-Baudry, Developing Formulated enzymatic detergents for cleaning of PES/PVP membranes used in the skim milk ultrafiltration, Oral presentation at Journée des Doctorants ISCR (JDD), June 29th, 2022, Rennes, France.

Communications orales dans des congrès internationaux

-M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, **S. Kavugho Mission**, S. El Morr, Evidencing strengths and weaknesses of alkaline detergents to formulate efficient mixtures useful for polymer membranes' cleaning, Oral presentation at Fouling and Cleaning in Food Processing conference, March 28-30th, 2022, Lille, France.

-M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, **S. Kavugho Mission**, On a methodological approach to deal with strengths and weaknesses of surfactants to formulate efficient detergents for PES/PVP membranes' cleaning. Oral presentation at ICOM, July 9-14th, 2023, Makuhari Messe, Japan.

Articles (ACL)

-S. Kavugho Mission, A. Javelle, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, M. Rabiller-Baudry, Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk, Submitted to Environmental Technology, 2024.

-S. Kavugho Mission, A. Javelle, A. Prudhomme, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, M. Rabiller-Baudry, De-formulation for a better reformulation of enzymatic detergents: individual ingredients on the skim milk fouling cleaning efficiency as well as the PES/PVP UF membrane degradation, in preparation.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
Liste des travaux.....	5
Liste des abréviations	15
INTRODUCTION GENERALE.....	21
1. Contexte	21
2. Les thèmes abordés au cours de cette thèse	23
3. Stratégie d'étude.....	26
Références_Introduction générale.....	27
CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE	31
I.1. Procédés membranaires	31
I.1.1. Matériaux membranaires et différents procédés	32
I.1.2. Sélectivité d'une membrane, Rétention d'un soluté et Seuil de coupure d'une membrane.....	37
I.1.2.1. Rétention d'un soluté par une membrane.....	37
I.1.2.2. Seuil de coupure d'une membrane	37
I.1.3. Géométries des membranes	38
I.1.4. Grandeurs caractéristiques	41
I.1.4.1. Le flux du perméat et la Perméance	41
I.1.5. Limitation des transferts au travers de la membrane	42
I.1.5.1. Polarisation de concentration	42
I.1.5.2. Colmatage.....	43
I.1.5.3. Limitation du colmatage et de la polarisation de concentration.....	44
I.1.5.3.1. Flux critique et Flux limite	45
I.1.5.4. Méthodes alternatives de limitation du colmatage	46
I.1.5.4.1. Fabrication de membranes polymères avec des propriétés anti-colmatage.....	46
I.1.5.4.2. Champs de force additionnels.....	47
I.1.5.4.3. Décolmatage physique et Nettoyage chimique ou enzymatique	48
I.2. UF de Lait écrémé et colmatage	49
I.2.1. Composition du lait de vache.....	49
I.2.2. Types de laits en fonction de la teneur en matière grasse	51
I.2.3. Type de laits en fonction du traitement thermique appliqué.....	52
I.2.4. Procédés membranaires dans l'industrie laitière.....	52
I.2.4.1. Autres applications des membranes dans l'industrie laitière	55
I.2.4.2. Points faibles et limites des procédés membranaires dans l'industrie laitière	56

I.3. Audit du colmatage	56
I.4. Le nettoyage en Place	61
I.4.1. Evaluation de l'efficacité d'un nettoyage	62
I.4.1.1. La propreté hydraulique	62
I.4.1.2. La propreté chimique.....	62
I.4.1.3. La propreté microbiologique	63
I.4.2. Problématique du relargage des constituants des solutions détergentes et/ou désinfectantes après rinçage	64
I.4.3. Nettoyage en place appliqué à l'UF de lait écrémé	64
I.5. Mécanismes généraux du nettoyage	66
I.5.1. Equilibre entre les différents facteurs du nettoyage.....	67
I.5.2. La détergence	68
I.5.3. La qualité de l'eau.....	68
I.5.4. Le rôle de la température	69
I.5.5. L'action mécanique.....	69
I.5.6. Influence de la géométrie des membranes	69
I.5.7. L'influence du vieillissement de la membrane	70
I.6. Formulation de détergents	70
I.6.1. Détergents chimiques	71
I.6.1.1. Tensioactifs	71
I.6.1.2. Acides et Bases.....	76
I.6.1.3. Agents Complexants et Chélatants.....	77
I.6.1.4. Conservateurs	81
I.6.2. Détergents enzymatiques	83
I.6.2.1. Les enzymes	83
I.6.2.2. Les subtilisines	84
I.6.2.3. Protéases à sérine et leur mécanisme d'action	86
I.6.2.4. Les substrats des subtilisines.....	88
I.6.2.5. Les enzymes comme agent désinfectant (biocide).....	88
I.6.2.6. Risques et Précautions en rapport avec les subtilisines.....	88
I.6.2.7. Stabilisants des enzymes commerciales	89
I.6.2.8. Les solutions tampons pour optimiser l'activité enzymatique	90
I.6.2.9. Formulation d'un détergent enzymatique.....	91
I.6.2.10. NEP enzymatique des membranes	91
Conclusion du chapitre I.....	95
Références _ Chapitre I	96

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	117
II.1. Méthodologie d'aide au développement de détergents : processus de développement des détergents enzymatiques	117
II.2. Modules, pilotes d'ultrafiltration et protocoles	119
II.2.1. Le Module Plan Ray Flow X-100 et le pilote UF-LPS	119
II.2.2. Protocole de nettoyage en condition d'UF plane et en réacteurs fermés.....	120
II.2.3. Le module spiralé et le pilote UF spiral.....	121
II.3. Les appareils de mesure et d'Analyse	123
II.3.1. Les balances et Agitateurs magnétiques	123
II.3.2. Le pH-mètre.....	123
II.3.3. La spectroscopie UltraViolet-Visible	123
II.3.4. La spectrométrie Infrarouge en mode reflexion totale atténuée : ATR-FTIR	125
II.3.4.1. Principes de l'IR et de la FTIR	125
II.3.4.2. Principe de l'ATR-FTIR	128
II.3.4.3. Protocole d'analyses ATR-FTIR	130
Références _ Chapitre II.....	132
CHAPITRE III : COLMATAGE DE REFERENCE.....	135
III.1. Introduction	135
III.2. Colmatage par le lait écrémé en conditions d'UF	135
III.2.1. Eau et lait écrémé	135
III.2.2. La Compaction : Etape de conditionnement de la membrane	135
III.2.3. Protocole de colmatage	135
III.3. Flux limite/ Flux critique	136
III.4. Choix des conditions d'UF : 2 bar	138
III.5. Colmatage irréversible initial après UF à 2 bar (après rinçage à l'eau DI)	140
III.5.1. Colmatage moyen.....	140
III.5.2. Cartographie du colmatage d'une membrane d'UF de lait écrémé.....	141
Conclusion du Chapitre III	145
Références _ Chapitre III	146
Chapter IV: METHODOLOGY TO SELECT COMMERCIAL ENZYMES INCORPORATED IN FORMULATED DETERGENTS USED IN THE CLEANING OF ULTRAFILTRATION PES/PVP MEMBRANES FOULED BY SKIM MILK	149
Abstract.....	149
1. Introduction.....	149
2. Enzyme in (membrane) cleaning	150

2.1. Subtilisins: a family of proteases commonly used in cleaning	150
2.2. Subtilisin specificity and optimum activity vs pH and temperature	151
2.3. Stabilizing agents of commercial Subtilisins	152
2.3.1. Preservative and bactericide	152
2.3.2. Surfactants	153
2.4. Enzyme in a formulated detergent	153
2.5. Enzyme final deactivation	154
2.6. How to prove the enzymatic cleaning efficiency?	154
3. Experimental	155
3.1. Solutions	155
3.1.1. Water and skim milk	155
3.1.2. Stabilised Enzymes.....	155
3.1.3. Prototype detergents	156
3.1.4. Solution characterization by UV	157
3.2. Membrane and filtration experimental set-up	157
3.2.1. Membranes	157
3.2.2. Filtration set-up.....	157
3.3. Membrane fouling and cleaning	158
3.3.1. Cleaning of pristine membrane	158
3.3.2. Fouling by skim milk in crossflow UF conditions	158
3.3.3. Cleaning in place (CIP) by prototype detergents in UF conditions	158
3.3.4. Cleaning by prototype detergents or pure stabilized enzymes in batch reactor	158
3.4. Membrane characterisation by ATR-FTIR	159
3.4.1. Proteins/enzyme quantification	159
3.4.2. Membrane degradation.....	160
3.4.3. Detergent ingredients adsorption.....	161
4. Results and Discussion	161
4.1. UV characterization of the stabilized Subtilisins.....	161
4.1.1. Stabilized enzymes in DI water	161
4.1.2. Stabilised enzyme in carbonate buffer	162
4.1.3. Stabilised enzyme in Matrix D with or without carbonate buffer	164
4.2. Efficiency of membrane cleaning	164
4.2.1. The chemical efficiency point of view	164
4.2.2. The hydraulic cleanliness point of view	166
4.3. Residual adsorption of detergent components on UF cleaned pristine membranes	170

4.3.1. Pristine membranes cleaned by prototype detergents (stabilized enzymes + Matrix D + Carbonate buffer)	170
4.3.2. Pristine membranes cleaned by stabilized enzymes in carbonate buffer.....	171
4.3.3. Pristine membranes cleaned by Matrix D + carbonate buffer	173
5. Conclusion	174
Nomenclature	174
References_Chapitre IV	175
Supporting information	180
§1: Enzymatic detergents' solutions stability	180
Chapter V: DE-FORMULATION FOR REFORMULATION OF THE SURFACTANT SYSTEM FOR MORE EFFICIENT ENZYMATIC DETERGENTS: FROM BATCH REACTOR TO SPIRAL ULTRAFILTRATION VALIDATION	183
Abstract.....	183
1. Introduction	183
2. Background on surfactants	184
2.1. CMC and Micelles formation.....	185
2.2. Hydrophilic/ Lipophilic Balance (HLB)	186
2.3. Surfactants in formulated detergents for membrane cleaning	186
2.3.1. Classification of surfactants by family	186
2.3.2. Surfactants in formulated detergents for membrane cleaning	188
3. Materials and Methods	189
3.1. Solutions	189
3.1.1. Water and skim milk and their analytical tools	189
3.1.2. Prototype cleaning solutions	190
3.1.3. Commercial Surfactants entering the Matrix composition.....	191
3.2. Membrane and filtration experimental set-up	193
3.2.1. Membranes	193
3.2.2. Filtration set-up with flat membranes	193
3.2.3. Filtration set-up with spiral membrane	193
3.3. Membrane Fouling and Cleaning.....	194
3.3.1. Cleaning of pristine flat membranes in UF conditions.....	194
3.3.2. Fouling with skim milk in UF conditions	194
3.3.3. Cleaning of fouled flat membranes in batch reactors.....	194
3.3.4. Cleaning in place (CIP) of fouled flat membranes in UF conditions.....	194
3.3.5. Hydraulic Cleanliness: The Water Flux Recovery (WFR) Method	195

3.4. How to prove membrane chemical cleanliness	196
3.4.1. Membrane characterization by ATR-FTIR	196
3.4.2. Proteins/enzyme quantification: cleaning efficiency	196
3.4.3. Detergent ingredients adsorption: advanced chemical cleanliness	197
3.5. Membrane integrity	198
3.5.1. Membrane short-term integrity: from one to four UF cleanings	198
3.5.2. Accelerated aging of PES/PVP Membranes under Microwave (MW) to evaluate long-term integrity	199
4. Results and Discussions	200
4.1. Cleaning efficiency in batch reactors at 50°C, pH 10.5	200
4.1.1. With Enzyme C in the presence of buffer	200
4.1.2. With cleaning solutions (Enzyme C+ surfactant system + buffer + calcium)	200
4.2. Transposition to flat UF: cleaning with full detergents	203
4.3 Transposition to the spiral membrane: fouling & cleaning up to 53 h in enzymatic detergents	205
4.4. Quid of the membrane integrity? Analysis of flat cleaned pristine membranes	208
4.4.1. Impact of the surfactants on the water flux recovery	208
4.4.2. Ingredients adsorption evidenced by ATR-FTIR	208
4.4.3. Impact of surfactants on the membrane chemical integrity	212
4.4.4. Long-term: Micro-wave ageing acceleration (coupons)	213
4.4.5. Organic ingredients adsorption	213
4.4.6. Adsorption of ingredients containing C=O vs PVP stability	215
5. Conclusion	220
References_Chapitre V	221
Supporting information	226
S1 Supplementary: Hydrophilic/Lipophilic Balance (HLB)	226
S2 Supplementary: Cleaning in batch reactors	228
S2.1. Kinetics of skim milk protein removal in batch with enzyme C2	228
S2.2. Kinetics of skim milk protein removal in batch with surfactant S1	228
S2.3. Effect of surfactants mixtures S2 + S3 and S3 + S4 on the skim milk protein removal efficiency compared to S1	229
CONCLUSION GENERALE	233
PERSPECTIVES	237
Références_Conclusion générale & Perspectives	238

Liste des abréviations

A

α -LA: α -Lactalbumine
Abs: Absorbance
AFM: Atomic Force Microscopy
AM: Active Matter (surfactant)
ANRT : Association Nationale de la Recherche et de la Technologie
AR: Apport de Référence
ATMP: Amino Tris (Methylene Phosphonic acid)
ATR-FTIR: Attenuated Total Reflectance – Fourier-Transform InfraRed

B

BHA: Butylated Hydroxy Anisole (Hydroxyanisole butylé)
BHT: Butylated Hydroxytoluene (hydroxytoluene butylé)
 β -LG : β -Lactoglobuline
BSA: Bovine Serum Albumin

C

CAS: Chemical Abstracts Service
CE: Conformité Européenne
CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la Recherche
CIP: Cleaning In Place
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CMC : Concentration Micellaire Critique
COT : Carbone Organique Total

D

DAA : Disubstituted Alanin Amide
DCO : Demande Chimique en Oxygène
DEL: Diodes électroluminescentes
DHA: Docosa Hexaenoic Acid (Acide Déhydroacétique)
DI: Déionisée / Deionised
DLUO: Durée Limite d'Utilisation Optimale
DMDM hydantoin: 1,3-Bis(hydroxyméthyl)-5,5-diméthylimidazolidine-2,4-dione
DRX: Diffraction des Rayons X
DTPA : Diethylene Triamine Penta acetic Acid (acide diéthylène triamine penta acétique)
DTPMP: Diethylene Triamine Penta (Methylene Phosphonic Acid)

E

Ea: Entrée Alimentation
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EDX: Energy Dispersive X-ray spectrometry

F

FCFP: Fouling and Cleaning in Food Processing
FDS : Fiche des Données de Sécurité /Security Data Sheet
FPBA : 4-Formyl Phenyl Boronique Acid
FRV : Facteur de Reduction Volumique

G

GC: Gas Chromatography

GLDA: Glutamic Diacetic Acid

GMP: Glyco Macro Peptide

H

HEDTA: HydroxyEthylethyleneDiamineTriacetic Acid

HEDPA: 1-HydroxyEthylidene-1,1-Diphosphonic Acid

HLB: Hydrophilic/Lipohlic Balance

HPLC: High-performance liquid chromatography

HTT: High Temperature Treatment

I

IAA: Industrie Agroalimentaire

IEX-HLPLC: Ion exchange-high-performance liquid chromatography

Ig: Immunoglobuline

J

Jp: permeate flux

K-L

LCR: Low Concentration Retentate

Lp : Permeance

LPC : Liquid-Pre-Cheese

M

MA : Matière Active

MBR : Membrane Bioreactor (Bioréacteur à membranes)

MCR : Medium Concentration retentate

MEB: Microscope Electronique à Balayage

MET: Microscopie Électronique en Transmission

METMAC: [2-(MEthacryloyloxy) ethyl] TrimethylAmmonium Chloride

MF: Microfiltration

MGDA: Methyl Glycine Diacetic Acid

MW: Micro Wave

MWCO: Molecular Weight Cut Off

N

NEP : Nettoyage En Place

NF: NanoFiltration

NTA: Nitrilo Triacetic Acid

O

OI: Osmose Inverse

P

PAA: Poly Acrylic Acid

PAA/MA: Poly Acrylic Acid / Maleic Acid

PAN: Poly Acrylo Nitrile

PBS: Phosphate Buffered Saline

PBTCA: 2-PhosphonoButane-1,2,4, -Tri Carboxylic Acid

PDTA: Propylene Diamine Tetra-acetic Acid

PEO: Poly Ethylene Oxide (or Poly Ethylene Glycol, depending on MW)

PES: Poly Ether Sulfone

PG: Propylene Glycol

PhE: Phenoxy Ethanol

pI : Point Isoélectrique ou pH isoélectrique
PIT : Phase Inversion Temperature
PP : Poly Propylene
PSf : Poly Sulfone
PT : Pouvoir Tampon
PTM : Pression Transmembranaire
PVA : Poly Vinyl Alcohol
PVDF : Poly Vinylidene Di Fluoride
PVP : Poly Vinyl Pyrrolidone

Q-R

RCI : Ratio du Colmatage Irréversible
RCR : Ratio du Colmatage Réversible
RSD : Relative Standard Deviation
Rm : Résistance hydraulique de la membrane neuve/vierge
RO: Reverse Osmosis
RP-HPLC: Reversed-phase high-performance liquid chromatography.
Rirrev: Résistance irréversible du colmatage
Rrev: Résistance réversible du colmatage
Rres : Résistance résiduelle du colmatage
Rt: Résistance totale

S

SDBS: Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SEC: Size-Exclusion Chromatography
SEM-EDX: Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray spectroscopy
SF: Sodium Formate
SIE: Spectroscopie d'Impédance Electrique
Sp : Sortie Perméat
Sr : Sortie Rétentat
STEP : Station d'épuration

T

TA: Tensio-Actif
TB: Taux Butyreux
TFC: Thin-Film Composite membrane
Trp: Tryptophane
Tyr : Tyrosine

U

UE : Union Européenne
UF : UltraFiltation
UHT: Ultra Haute Température
USA: United States of America
UV-vis: UltraViolet - visible

V

VRR: Volume Reduction Ratio
VSA: Vinyl Sulfonic Acid
VSEP: Vibratory Shear Enhanced Processing

W

WFR: Water Flux Recovery

X-Y-Z

ZnSe : Zinc selenide

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

1. Contexte

En industrie agroalimentaire (IAA) les procédés membranaires ont plusieurs applications (produits laitiers, jus de fruits, vins, bières, ovoproduits, ...). L'utilisation des membranes dans les procédés de séparation en industrie laitière est à ce jour ancrée dans les habitudes depuis les années 1960, et représente de l'ordre de 40% des applications à membranes des IAA. Ces procédés, que l'on s'accorde à dire propres, peu énergivores et sûrs, respectant les objectifs de développement durable, sont très répandus.

L'ultrafiltration (UF) de lait écrémé pour la standardisation de la teneur en protéines dans le cadre de la fabrication des fromages occupe une place importante. Cette opération est réalisée avec des membranes spirales d'UF à base de polyéthersulfone (PES) hydrophilisée de bas seuil de coupure (MWCO = 5 - 10 kg.mol⁻¹). Sur le marché mondial de cette application, au moins 80 % des membranes sont fournies par Koch (USA) sous la référence HFK-131. C'est le modèle généralement retrouvé aussi chez la plupart des industriels de la Région Bretagne [1].

L'UF de lait écrémé est réalisé à 50°C et dure de 6 à 8 heures par cycle de production. Le problème récurrent est celui du colmatage des membranes qui limite les performances de ce procédé. Le colmatage est une accumulation de matières à la surface et/ou en profondeur de la membrane qui augmente la perte de flux de perméat, ce qui diminue la productivité. Pour lutter contre ce phénomène, des rinçages à l'eau suivis de nettoyages sont réalisés 2 fois par jour et durent de 2 à 3 heures par cycle de production. Ceci représente jusqu'à 30% du temps total d'exploitation des installations. Le but des nettoyages est de restaurer les capacités des membranes (perméance, sélectivité ...). Pourtant, malgré les nettoyages, les flux diminuent progressivement à cause de l'accumulation du colmatage, qui est en partie due également au vieillissement de la membrane. Or, le vieillissement est provoqué, entre autres, par les séquences de désinfection de la membrane, particulièrement par l'hypochlorite de sodium : NaOCl qui termine la séquence globale nettoyage/désinfection en permettant également un polissage du nettoyage quand les produits utilisés ne sont pas assez performants [2].

L'élimination du colmatage provoque une augmentation du coût de fonctionnement. Un nettoyage trop agressif provoquera *in fine* la dégradation irréversible des membranes, ce qui augmentera la fréquence de remplacement de celles-ci. La plupart des membranes ne durent que deux saisons laitières, c'est-à-dire 18 à 24 mois. Le remplacement des membranes représente ainsi de 25 à 40% des coûts totaux d'une usine [3,4].

Industriellement, les nettoyages consomment environ 1/3 de l'énergie (pompe, température) nécessaire au procédé global, c'est-à-dire la production + le nettoyage en place (NEP) [1,5].

Pour certaines applications membranaires (traitement de l'eau par exemple), des décolmatages physiques (backflush, backwash, qui consistent en une rétro-filtration plus ou moins longue du perméat vers le rétentat) peuvent être réalisés pour retrouver (partiellement) les propriétés de filtration de la membrane et reprendre une production dans des conditions acceptables. Mais en ce qui concerne les membranes spirales utilisées en IAA qui sont constituées de matériaux multicouches, cette action n'est pas possible, car elle dégrade les membranes.

Ainsi, pour l'UF de lait écrémé, les nettoyages s'effectuent très souvent à l'aide de produits chimiques et génèrent donc des effluents chargés en produits polluants (DCO : Demande Chimique en Oxygène, phosphore, nitrate ...). Les lavages chimiques peuvent être acides (acide nitrique, le plus souvent) ou

alcalins. Ces derniers détergents sont formulés à base de soude (NaOH) ou de potasse (KOH) et selon le pH sont dits forts ou modérés. Le nettoyage alcalin vise les souillures organiques (telles que les dépôts protéiques) alors que les acides sont utilisés pour éliminer les souillures minérales. Le plus généralement, ils s'effectuent en cascade alcalin/acide (ordre selon application ciblée), avec des inter-rinçages à l'eau entre les solutions. Cette étape de nettoyage est suivie par celle de désinfection, souvent effectuée à l'aide d'hypochlorite de sodium (eau de javel), pour assurer la propreté microbiologique.

Il a été rapporté dans la littérature que le colmatage des membranes à base de PES lors de l'ultrafiltration de lait écrémé est essentiellement organique, plus particulièrement protéique [1, 6, 7]. De ce fait, par la suite, il a été prouvé que l'usage de détergent acide est inutile (sous réserve d'utiliser une eau de bonne qualité pour préparer les solutions de NEP) [1,6,7,8]. Le nettoyage alcalin en revanche est efficace, particulièrement lorsqu'il s'agit d'un alcalin fort (pH=12.4 à 50°C) utilisé à température élevée (50°C) [4]. Les détergents alcalins, grâce à l'action de leur pH, agissent de sorte à faciliter la solubilisation des souillures organiques telles que les protéines. Un ou plusieurs tensioactifs doivent y être ajoutés pour renforcer l'action de solubilisation des protéines du lait, ce qui est indispensable à leur élimination.

Cependant, il arrive que le nettoyage chimique ne restaure plus de façon satisfaisante les performances de la membrane. Il est alors courant que des détergents enzymatiques, plus coûteux, soient utilisés en renfort. Ces derniers sont communément admis comme étant plus efficaces que les détergents chimiques. C'est pourquoi ils sont souvent utilisés en « traitement de choc » en industrie (une fois par semaine ou par mois, par exemple, contrairement à un ou deux nettoyages chimiques quotidiens). De plus, ils sont plus souvent utilisés lorsque la limite de pH que peut supporter la membrane est un $\text{pH} \leq 10$ (pH donné à température ambiante, compter environ +0.5 unités pH à 50°C) [4].

Le nettoyage enzymatique offre *a priori* une alternative plus verte grâce à la biodégradabilité des enzymes, comparé au nettoyage chimique qui produit, potentiellement, des substances toxiques pour l'environnement (phosphates, EDTA ...) [9]. Cependant, ce caractère vert doit être modulé en fonction des autres ingrédients présents dans les détergents enzymatiques formulés. De plus, selon certains auteurs, l'usage des produits enzymatiques peut réduire considérablement la quantité des produits chimiques requis, le volume d'eau de rinçage et, par conséquent, les volumes des rejets. Les produits enzymatiques réduiraient aussi la température de nettoyage, favorisant ainsi l'économie d'énergie [4,10,11]. Avec un pH optimum souvent autour de 9, les enzymes présentent des avantages environnementaux étant donné que de tels effluents peuvent être relargués dans les eaux usées sans prétraitement [4,10]. GrabHoff [10] a ainsi avancé qu'en dépit de la présence de composants non biodégradables dans les enzymes commerciales (tampons, stabilisants, etc.), ceux-ci sont dans des proportions tellement infimes qu'ils ne nécessitent pas un prétraitement avant relargage des effluents des NEP dans les eaux usées en station d'épuration (STEP).

Cependant, les nettoyages enzymatiques à l'échelle industrielle sont bien souvent réalisés non pas avec des enzymes seules, mais avec des solutions de détergents formulés à base d'enzymes commerciales stabilisées, de tensioactifs, de conservateurs... Ceci nécessite de prêter une attention particulière à la sensibilité des enzymes aux autres ingrédients qui peuvent affecter l'activité enzymatique et à leur impact environnemental. Il faut aussi tenir compte du coût des enzymes qui peut constituer un frein à leur utilisation massive.

Un autre point auquel il convient de prêter attention est la possibilité d'une continuité de l'activité enzymatique post nettoyage qui pourrait avoir des effets délétères sur la qualité et la sécurité alimentaire des fluides filtrés. En effet, le mécanisme de nettoyage par les enzymes (qui sont ici des protéases) est basé sur l'hydrolyse des protéines du lait, et est différent de celui du nettoyage chimique. Une problématique spécifique du nettoyage enzymatique est donc liée à la possibilité de la présence d'enzymes résiduelles actives sur la membrane et dans l'installation à l'issue du nettoyage. Ces enzymes, si elles étaient encore actives, pourraient réagir avec les produits filtrés et conduire à des dégradations non désirées des produits

manufacturés. Etant donné que la dégradation des protéines du lait pendant l'UF de lait écrémé n'est pas acceptable au regard des applications visées pour le rétentat d'UF, il est alors nécessaire d'effectuer une étape de désactivation de l'enzyme, post nettoyage enzymatique. La désactivation/inactivation peut se faire par une étape de nettoyage à pH acide ou alcalin dans le but de dénaturer l'enzyme (modification de sa structure 3D), ce qui n'est pas la même chose que de l'éliminer obligatoirement de l'installation. Ceci pose tout de même un certain nombre de questions quant à l'élimination possible de ces enzymes dénaturées : (i) Sont-elles aisément éliminables dans l'eau de rinçage ? (ii) Risquent-elles de constituer un dépôt supplémentaire et de contribuer au colmatage ? (iii) Y a-t-il un risque de relargage dans le produit manufacturé ? (iv) Comment distinguer les enzymes résiduelles (inactives ou non) des protéines résiduelles du lait sur les membranes colmatées ?

Par conséquent, le nettoyage enzymatique inclus en réalité tout un panel de substances autres que les enzymes elles-mêmes (stabilisants, co-formulants ...) auxquels il faut ajouter les produits acides ou alcalins d'inactivation. L'ensemble nécessite d'être pris en compte dans l'évaluation de l'efficacité du NEP enzymatique. De plus, l'impact sur le vieillissement des membranes ainsi que sur l'environnement reste encore à étudier.

Cependant, très peu de littérature scientifique compare l'efficacité réelle des détergents chimiques et enzymatiques par le prisme d'études à caractère fondamental. Par exemple, Diagne et al. [12] ont comparé un détergent enzymatique formulé commercial, l'Ultrasil 53 (Ecolab), à des détergents chimiques formulés, sans montrer de supériorité du NEP enzymatique. Récemment, Le Petit [5] a effectué une comparaison entre 4 détergents enzymatiques commerciaux dont l'Ultrasil 67 (Ecolab) et d'autres commercialisés par Kersia ainsi qu'un détergent alcalin fort (Kersia). Les résultats tendaient à montrer que l'efficacité était plutôt similaire entre tous ces détergents. Il apparaît donc qu'une étude plus approfondie est nécessaire pour (i) consolider ces observations, (ii) développer de nouveaux détergents enzymatiques optimisés et (iii) approfondir la connaissance des mécanismes lors du nettoyage enzymatique.

2. Les thèmes abordés au cours de cette thèse

L'objectif majeur de cette thèse est le développement de détergents enzymatiques performants pour le nettoyage de membranes PES/PVP d'Ultrafiltration (UF) de lait écrémé. La cible du nettoyage est le colmatage protéique qui constitue très majoritairement le colmatage irréversible initial, c'est-à-dire celui présent sur la membrane après le rinçage à l'eau post-UF de lait écrémé et avant NEP. Les performances seront évaluées par comparaison avec des détergents chimiques formulés commerciaux.

Tout au long de ce travail, différents thèmes seront abordés :

Le **chapitre I** aborde, dans un premier temps, les principes généraux des procédés membranaires, puis, dans un deuxième temps, il présente des informations sur le lait et l'UF de lait écrémé, le colmatage en général et le colmatage par du lait écrémé en particulier. Enfin, il aborde également les spécificités du nettoyage en IAA et les mécanismes généraux de nettoyage. La formulation des détergents enzymatiques est plus particulièrement développée ainsi que quelques notions sur les mécanismes d'action des protéases.

Dans le **Chapitre II**, sont présentés les différents matériels utilisés pour mener à bien les travaux de cette thèse, ainsi que les différentes méthodes appliquées pour les expérimentations et les analyses. Le choix qui a été fait est de ne présenter que les points complémentaires aux détails expérimentaux présentés ensuite dans les chapitres de résultats, car ceux-ci sont rédigés sous forme de « pré-publications » et la volonté a été d'éviter trop de redites.

Le **chapitre III** constitue une sorte « d'état de l'art » des connaissances de la membrane colmatée et rincée, c'est-à-dire telle qu'elle se présentera au début du nettoyage. Les résultats ne sont pas originaux et ils étaient cohérents avec les résultats des thèses antérieures conduites à ISCR-CIP. Cependant, ils permettent de décrire le colmatage d'une membrane plane (127 cm²) PES/PVP par du lait écrémé tel qu'il a été caractérisé au cours de cette thèse sur 21 membranes planes, ce qui est un point de départ indispensable à l'étude. Le but était simplement de i) connaître le colmatage de référence moyen, ii) comprendre la répartition plus ou moins homogène du colmatage de référence par le biais de la cartographie des membranes, utile pour apprécier l'efficacité des produits détergents testés en réacteur fermé sur des coupons de 14 cm² découpés dans ces membranes planes après UF de lait écrémé.

Le comportement des flux avant, pendant et après l'UF de lait écrémé sur ces mêmes 21 membranes colmatées + rincées est également discuté, ce qui permet d'établir une moyenne de récupération de flux à l'eau avant NEP et permet d'observer la répétabilité du comportement des flux à chaque étape de filtration. Les statistiques obtenues dans cette étude constituent une référence pour la suite de la thèse.

Enfin, ce chapitre explore quelques réflexions sur les conditions de filtration utilisées afin de positionner le flux de perméat dans le lait écrémé par rapport au flux critique et au flux limite.

Nous avons appliqué la méthodologie progressivement mise au point à l'ISCR depuis 20 ans pour évaluer l'efficacité ainsi que l'impact d'un détergent sur la membrane à court, moyen et long terme (≈ 50 h de contact en condition d'UF) [1,5,6,7,13]. Le module plan (127 cm²), dans les conditions hydrodynamiques de filtration utilisées, est un moyen de modélisation robuste du colmatage et du nettoyage d'une membrane spirale organique 4'' (module 4333, 6.8 m²) dans le cas de la filtration de lait écrémé [14].

Suivant cette méthodologie, les tests de validation des produits détergents ont été d'abord réalisés en réacteur fermé puis validés en mode de filtration sur module plan tout au long de la thèse avant un dernier test long sur module spirale pour les détergents les plus prometteurs (**Chapitres de résultats**).

Plus spécifiquement, les études se divisent donc en évaluation :

- Court terme :
 - En utilisant des coupons calibrés (14 cm²) de la membrane plane colmatée et rincée. Le nettoyage individuel des coupons est alors réalisé en réacteur fermé (immersion sous agitation) dans la solution enzymatique à évaluer (enzyme commerciale seule ou incorporée dans la matrice des co-formulants) ou d'autres ingrédients (co-formulants : tensioactifs principalement). Pour cela, les ingrédients sont dilués à concentration d'utilisation ciblée pour une application industrielle.
 - En réalisant, également un cycle de nettoyage à la concentration d'utilisation ciblée, en condition de filtration sur un module plan contenant une membrane plane de 127 cm².

- Moyen terme :
 - En réalisant une série de 3 à 4 cycles de nettoyage en condition de filtration sur un module plan contenant la membrane plane de 127 cm² avec le détergent formulé à sa concentration d'utilisation ciblée.

- Long terme :
 - En provoquant le vieillissement accéléré des membranes grâce à la combinaison de l'activation micro-ondes et à l'immersion dans des solutions à concentration supérieure à la concentration d'utilisation. Cependant, au début de ce travail, ce dernier point soulevait des interrogations quant à son applicabilité dans le cas du NEP enzymatique : Quid de la stabilité de l'enzyme sous micro-ondes ? Est-ce un problème en cas d'instabilité ?
 - En réalisant un test d'intégrité de la membrane spirale (6.8 m²) en lui faisant subir plusieurs heures de NEP (≈ 50 h) à concentration d'utilisation ciblée.

Le **chapitre IV** se propose de répondre à la question : Y a-t-il un impact des stabilisants présents dans les enzymes commerciales utilisées pour la formulation sur les performances de nettoyage ?

L'enzyme présente dans tous les détergents enzymatiques testés au courant de cette thèse est la subtilisine. Elle est néanmoins d'origine commerciale diverse, ce qui signifie qu'elle est déjà elle-même dans une formulation (stabilisants plus ou moins identifiés et différents). Sa teneur dans la solution commerciale est comprise entre 2.5 w/w % et 7.5 w/w % et sa concentration dans les détergents prototypes a été choisie de sorte à avoir une activité enzymatique donnée, comparable à celle de détergents commerciaux.

Le choix de l'enzyme commerciale peut-il avoir un impact sur les performances de la formulation globale ultérieure ?

Dans un premier temps, la quantité de l'enzyme adsorbée sur la membrane en fin de NEP a été évaluée par rapport à sa source commerciale aussi bien sur membrane neuve nettoyée que sur membrane colmatée + nettoyée (**Chapitre IV**). Ceci a été possible grâce aux analyses ATR-FTIR. Cependant, il est à noter qu'étant elles-mêmes des protéines, les enzymes ne sont pas distinguables des protéines du lait écrémé sur un spectre ATR-FTIR. Cependant, l'analyse des résidus enzymatiques sur des membranes vierges permet d'évaluer la part des enzymes dans les résidus post NEP sur les membranes colmatées + nettoyées.

Selon l'origine commerciale de l'enzyme (cf les stabilisants) et selon les autres ingrédients des détergents formulés, est-il possible d'observer un vieillissement ou une dégradation de la membrane ? Ceci a été notamment observé par Le Petit en 2020 [5] suite à l'adsorption de certains tensioactifs non-ioniques.

Il est à noter que l'étude de l'inactivation de l'enzyme n'a pas été conduite en détail faute de temps.

Dans le **chapitre V** seront abordées les questions liées à l'efficacité de l'enzyme commerciale en présence d'autres ingrédients ajoutés par le formulateur de détergent et constituant ce qu'on appelle « la matrice » du détergent.

On abordera ainsi le choix des autres ingrédients (co-formulants, notamment les surfactants) du détergent en vue d'en évaluer d'abord l'efficacité sur le nettoyage, puis l'impact sur le vieillissement/dégradation de la membrane. Le but de cette étude est de trouver des surfactants compatibles à la fois avec l'enzyme et la membrane. Ces tests ont été réalisés avec les surfactants sélectionnés selon des contraintes écologiques, réglementaires et économiques. Les surfactants ont été testés seuls et en présence de l'enzyme.

Les tensioactifs anioniques ou non ioniques commerciaux sont généralement issus de la pétrochimie. L'exercice prétait donc à se tourner vers des surfactants biosourcés dans le but de répondre au besoin d'améliorer le profil environnemental des détergents. Dans cette même optique, les critères de biodégradabilité (aérobie + anaérobie) ont été pris en compte, car les rejets de nettoyage doivent être traités dans les stations d'épuration avant rejet dans l'environnement.

Concernant le cadre réglementaire, les tensioactifs choisis sont conformes au règlement Européen (CE) n°648/2004 relatif aux détergents, et également en conformité avec la Liste Positive Française, arrêté du 8 septembre 1999, qui recense les constituants autorisés dans les produits de nettoyage des matériaux et objets destinés à être mis au contact des denrées alimentaires.

Nous nous sommes cependant autorisés à tester quelques molécules biosourcées qui ne sont pas encore dans ces listes afin de préparer l'avenir. Les informations sur ces points sont données sans ambiguïté dans les chapitres de résultats pour que le lecteur/utilisateur sache que les produits recommandés *in fine* à la fin de ce travail sont réglementaires.

Enfin, le savoir-faire du formateur est un facteur important dans le choix des ingrédients. Il est ici apporté par notre partenaire industriel (Kersia) dans le cadre d'un dialogue constant avec l'ISCR permettant d'adopter une démarche formulation/déformulation avec de multiples allers-retours.

Le **chapitre V** a pour but d'observer l'impact des prototypes de détergents enzymatiques formulés sur l'efficacité du nettoyage ainsi que sur l'intégrité de la membrane dans les mêmes conditions de nettoyage (pH, température optimale de l'enzyme, vitesse de circulation, pression transmembranaire).

Plus spécifiquement, l'objectif de cette étude a été d'évaluer :

- ✓ La « filtrabilité » du détergent : par le suivi de la perméance pendant le NEP (L_p^{NEP}) d'une membrane vierge.
- ✓ La « rinçabilité » du détergent considéré dans son ensemble, enzyme + stabilisants + co-formulants:
i) par le suivi de la perméance pendant le flux dans l'eau sur une membrane vierge, nettoyée et rincée jusqu'à pH neutre ($L_p^{POST-NEP}$) et ii) par l'analyse ATR-FTIR sur membranes vierges + nettoyées + rincées. L'analyse ATR-FTIR permet de qualifier et quantifier les résidus sur la membrane traitée et soigneusement séchée sous vide dynamique.
- ✓ L'efficacité du NEP sur le colmatage : i) par évaluation de la récupération du flux de référence (Flux dans l'eau avant l'UF de lait) pendant le flux dans l'eau post-NEP + rinçage, ii) par l'analyse ATR-FTIR sur membranes colmatées + nettoyées + rincées.

3. Stratégie d'étude

Afin de mener à bien toutes les études précédemment énumérées, une stratégie a été mise en place. Celle-ci consiste en 2 étapes :

- Etudier les Fiches des Données de Sécurité (FDS) des enzymes, tensioactifs et détergents formulés commerciaux afin d'identifier le type d'ingrédients présents et leurs rôles dans les performances de nettoyage.
- Tester les détergents formulés prototypes :
 - Evaluer les performances des enzymes commerciales, des surfactants seuls ou en mélanges formulés à pH naturel ou avec tampon pH 10.5 pour déterminer l'influence de ces paramètres (pH, interactions entre ingrédients) sur l'efficacité de nettoyage et l'intégrité de la membrane.
 - Identifier les constituants problématiques, s'il y en a, parmi les stabilisants de l'enzyme ou les co-formulants (ingrédients de la formule autres que l'enzyme commerciale).
 - Identifier les détergents prototypes les plus efficaces pour les proposer à la commercialisation.

Références Introduction générale

- [1] N. W. Diagne, Le nettoyage : une étape clef pour une production durable par procédé à membrane. Réflexion sur le lien entre conditions de productions et nettoyabilité de membranes PES de l'industrie laitière. Thèse de l'université de Rennes 1 (France), 2013. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01019725/document>.
- [2] M. Rabiller-Baudry, P. Thomas, T. K. H. Nguyen, J. Girard, M. E. M. E. Jastimi, P. Loulergue, Simulation of membrane ageing to go ahead in fouling and cleaning understanding during skim milk ultrafiltration. *Food and Bioproducts Processing* 113 (2019) 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.10.004>
- [3] M. Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook* (2nd ed.). Technomic Publishing Co., Inc, Lancaster, 1998. <https://doi.org/10.1201/9781482278743>
- [4] N. D'Souza, A. Mawson, Membrane Cleaning in the Dairy Industry: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (2005) 125–134. <https://doi.org/10.1080/10408690490911783>
- [5] L. Le Petit, Développement de méthodologie, conception et validation de détergents/biocides pour le nettoyage en place de membranes polymères de l'industrie laitière. Thèse de l'Université de Rennes 1 (France), 2020. <https://www.theses.fr/2020REN1S011>.
- [6] L. Bégoïn, Analyse de modules spiralés industriels d'ultrafiltration de fluides laitiers. Physicochimie du nettoyage de membranes en polyéthersulfone d'ultrafiltration de lait écrémé. Thèse de l'université de Rennes 1 (France), 2004. <https://www.theses.fr/2004REN10042>
- [7] D. Delaunay, Nettoyage éco-efficace de membranes planes et spirales d'ultrafiltration de lait écrémé. Approches physico-chimiques et hydrodynamiques concertées, Thèse de l'Université de Rennes 1 (France), 2007. <https://www.theses.fr/120325039>
- [8] L. Paugam, D. Delaunay, N. W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: On the real effect of nitric acid step, *J. Membr. Sci.* 428 (2013) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>.
- [9] C. Regula, E. Carretier, Y. Wyart, G. Gésan-Guiziou, A. Vincent, D. Boudot, P. Moulin, Chemical cleaning/disinfection and ageing of organic UF membranes: A review. *Water Res.* 56 (2014) 325–365. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.050>.
- [10] A. GrabHoff, Enzymatic cleaning of milk pasteurizers. *Food and Bioproducts Processing*, 80 (2002) 247-252. [doi:https://doi.org/10.1205/096030802321154736](https://doi.org/10.1205/096030802321154736)
- [11] M. A. Argüello, S. Alvarez, F.A. Riera, R. Alvarez, Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation, *Journal of Membrane Science*, 216 (2003) 121–134. <https://doi.org/10.1021/jf0107510>
- [12] N. W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.

[13] S. El Morr, Etude de l'impact du vieillissement induit par les étapes de désinfection oxydante sur les performances de membrane en PES/PVP au cours de l'ultrafiltration de lait écrémé. Mémoire de fin d'études de Master 2 de l'Université Libanaise/ ISCR-CIP, (Liban/France), 2019.

[14] M. Rabiller-Baudry, L. Bégoïn, D. Delaunay, L. Paugam, B. Chaufer, A dual approach of membrane cleaning based on physico-chemistry and hydrodynamics: Application to PES membrane of dairy industry, Chem. Eng. Process Intensif. 47 (2008) 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.01.026>.

Chapitre I

Bibliographie

CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE

Le chapitre Bibliographie présente des généralités sur les procédés membranaires et les membranes ainsi que sur le nettoyage de celles-ci.

I.1. Procédés membranaires

Un procédé membranaire est une technique de séparation séparant un fluide en deux fractions, sous l'effet d'une force motrice. Cette force motrice peut reposer sur des gradients de concentration, de température, de champ électrique ou de pression, en l'occurrence la différence de pression de part et d'autre de la membrane, appelée aussi pression transmembranaire.

Les deux fractions obtenues constituent d'un côté le rétentat et de l'autre, le perméat. Le premier contient les éléments retenus par la membrane, tandis que dans le second se retrouvent toutes les espèces moléculaires ayant traversé la membrane (**Figure I.1**).

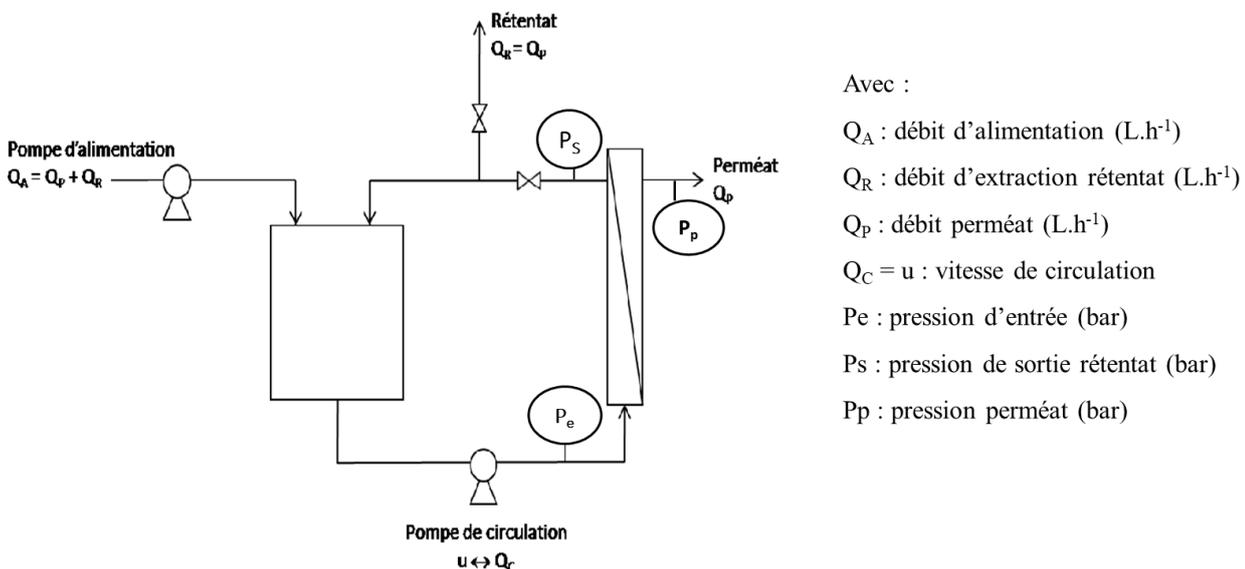


Figure I.1. Schéma opératoire de filtration membranaire en mode concentration en filtration tangentielle

Les membranes sont utilisées dans diverses applications, notamment pour la purification et la concentration. A ce jour, 40 % des applications membranaires dans les industries agroalimentaires (IAA) sont utilisées pour la filtration du lait [1]. Ceci est d'autant plus important que l'industrie laitière représente, elle-même, 20 % du chiffre d'affaires des IAA européennes [2].

Selon le mode d'alimentation, le fluide à filtrer arrive :

- perpendiculairement à la membrane : on parle alors de **filtration frontale**. Les particules retenues par la membrane peuvent former un gâteau à la surface, provoquant par la même un colmatage assez rapide de la membrane (**Figure I.2**). Ce mode de filtration est classique en microfiltration (MF) d'eau pour la potabilisation.

- parallèlement à la membrane : on parle alors de **filtration tangentielle**. Les particules retenues peuvent aussi se déposer à la surface et former un gâteau. Cependant, la force de cisaillement générée par l'écoulement tangentiel du fluide limite l'épaisseur de ce dépôt par rapport à la filtration frontale.

La filtration frontale génère donc plus facilement et plus rapidement du colmatage que la filtration tangentielle (**Figure I.2**). Ainsi, la filtration tangentielle est le mode de filtration le plus classique en IAA. C'est donc logiquement le mode de filtration employé dans cette thèse.

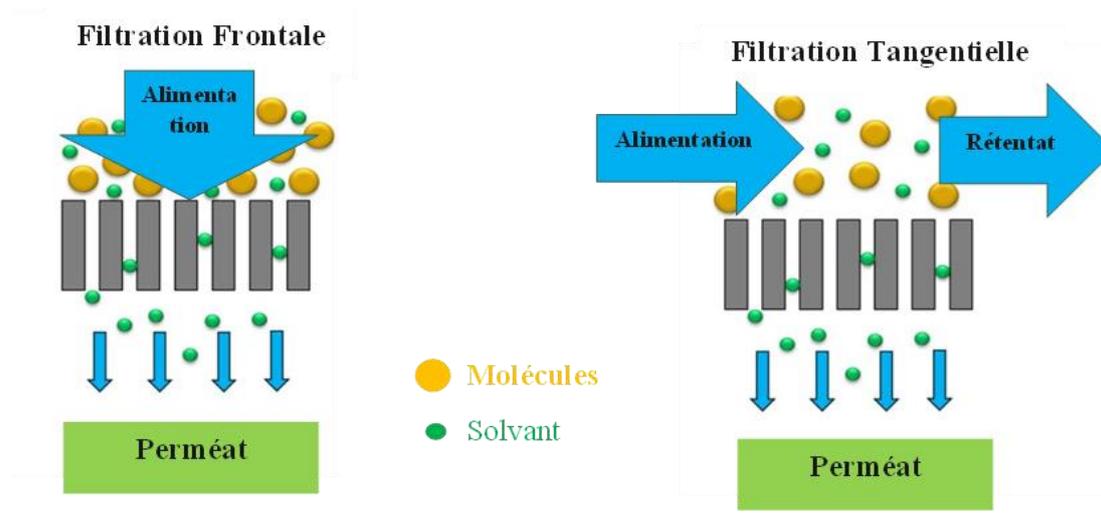


Figure I.2. Mode de filtration selon l'orientation du flux d'alimentation vs la membrane

I.1.1. Matériaux membranaires et différents procédés

L'industrie laitière utilise majoritairement des membranes organiques composites. Par conséquent, ce seront les seules à être présentées dans le cadre de cette thèse.

Une membrane organique composite est constituée généralement de trois couches : la peau active (celle qui est en contact avec l'alimentation), une couche intermédiaire anisotrope (poreuse) et la couche de support mécanique appelée aussi matrice support (**Figure I.3 et Figure I.4**). Chacune de ces couches peut être faite d'un polymère différent.

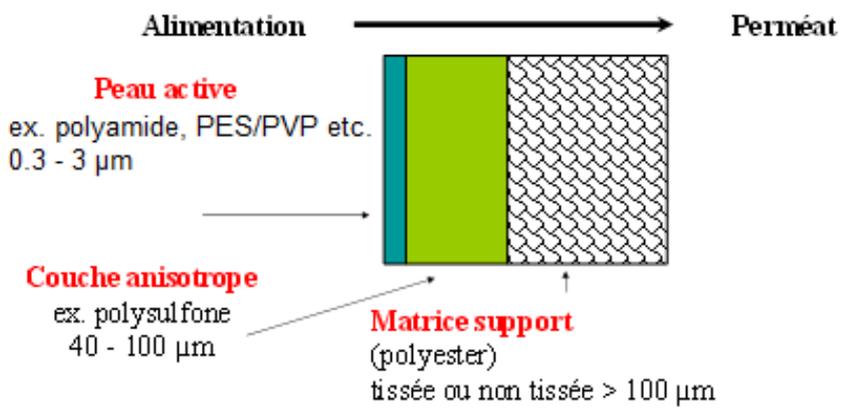


Figure I.3. Illustration de la structure d'une membrane organique composite [3]

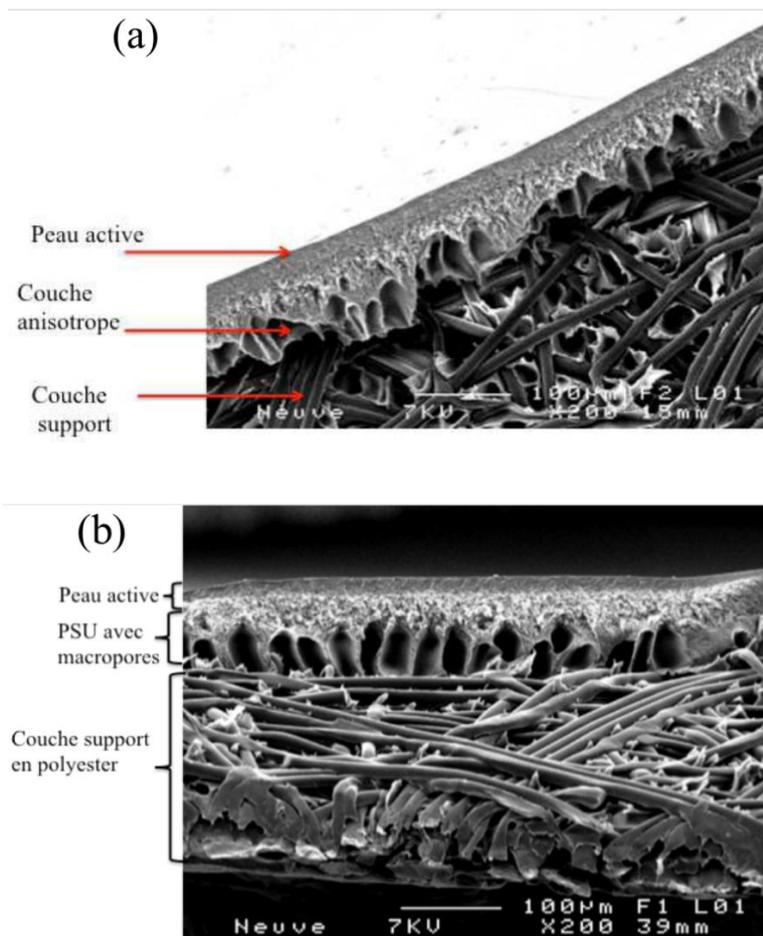


Figure I.4. Images MEB d'une membrane neuve d'UF en PES/PVP (HFk-131, Koch) avec un grossissement de 200 : (a) inclinaison : 45° ; (b) inclinaison : 90° [4]

Les polymères utilisés dans la peau active des membranes d'ultrafiltration (UF) peuvent être des mélanges de polyéthersulfone/polyvinylpyrrolidone (PES/PVP) ou du polyfluorure de vinylidène (PVDF) hydrophilisé, de la polysulfone (PSf) sulfonée ou non, du polyacrylonitrile (PAN), par exemple (**Figure I.5**).

Pour la nanofiltration (NF), la peau active est généralement faite de polyamide aromatique ou de polypipérazine amide alors que pour l'osmose inverse (OI), on retrouvera surtout la polyamide aromatique (**Figure I.6** ; **Figure I.7**).

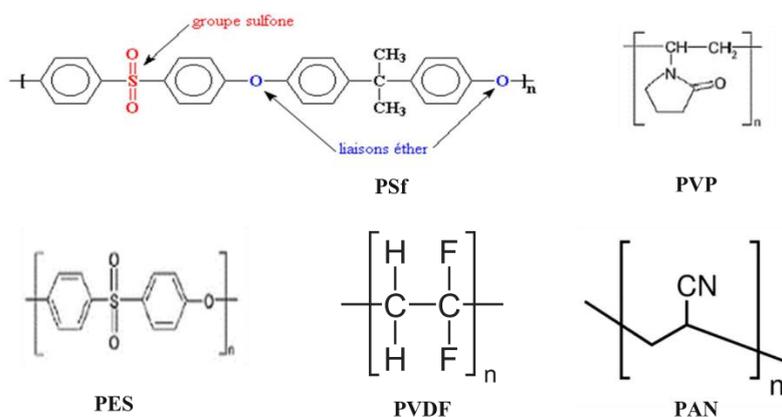


Figure I.5. Polymères pouvant entrer dans la composition de la peau active d'une membrane d'UF : PSf, PVP, PES, PVDF, PAN

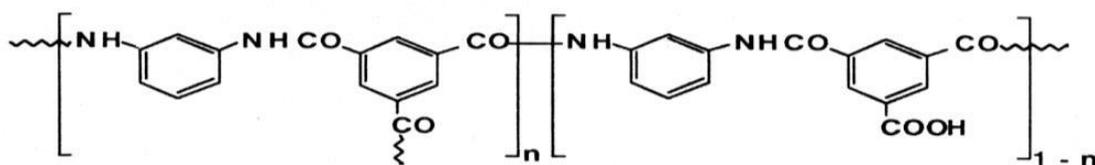


Figure I.6. Polymères constitutifs de la peau active d'une membrane de NF ou d'OI : polyamide aromatique (PA)

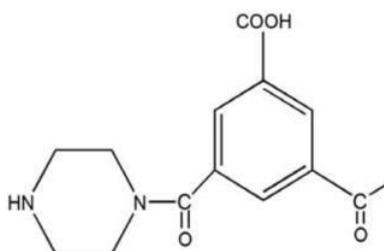


Figure I.7. Polymères constitutifs de la peau active d'une membrane de NF : Poly pipérazine amide (PIP)

En fonction des groupements chimiques constituant la couche active, les membranes présentent des caractéristiques plus ou moins hydrophiles et/ou hydrophobes. En effet, les groupes ionisés ou ionisables (amine, carboxylate, sulfonate) ou polaires (carbonyle, sulfone ; amide/amine...) sont hydrophiles, tandis que les groupes comportant des chaînes alkyles ou aromatiques apportent un caractère hydrophobe [1].

La composition chimique d'une membrane a un impact direct sur les interactions membrane-soluté (mécanisme de transfert des solutés, colmatage, vieillissement de la membrane) et aussi sur les interactions membrane-solvant (hydrophilie, hydrophobie ...). Bien que certaines de ces informations soient fournies par les fabricants, certains constituants minoritaires ne sont généralement pas indiqués. Pourtant, connaître la composition d'une membrane permettrait de mieux comprendre les différents phénomènes qui s'y déroulent et ainsi de mieux les anticiper et d'optimiser les procédés.

L'ultrafiltration (UF) du lait écrémé au niveau mondial est réalisée sur des membranes d'UF en PES/PVP (**Figure I.5**).

La PES est un polymère pouvant résister jusqu'à 80°C et à des pH couvrant une très large gamme (1 à 14). En revanche, les membranes à base de PES sont moins résistantes en température (50-52°C) et en pH (< 12.0-12.5). La PES et la PVP sont sensibles aux agents oxydants (tels que l'eau de javel) utilisés pour l'étape de désinfection des installations en IAA, mais à des niveaux différents. Néanmoins, ces oxydants sont largement utilisés à l'échelle industrielle et dégradent lentement les membranes [4,5,6] (**Figure I.8**).

La PVP est un additif qui permet d'hydrophiliser la membrane PES, permettant d'augmenter les flux de perméation en milieu aqueux. Cependant, l'exposition de la PVP à l'hypochlorite de sodium (NaClO) à pH 8, provoque une dégradation de cette dernière qui se caractérise par une augmentation des flux de perméation après traitement avec NaClO [9]. Cette dégradation se produit selon un mécanisme radicalaire ou ionique (coupures de chaînes) (**Figures I.9 et I.10**). Ces mécanismes ont été étudiés et expliqués par Wienk et al. [10]. La formation de succinimide a également été proposée par Prulho et al. [8] (**Figure I.8**).

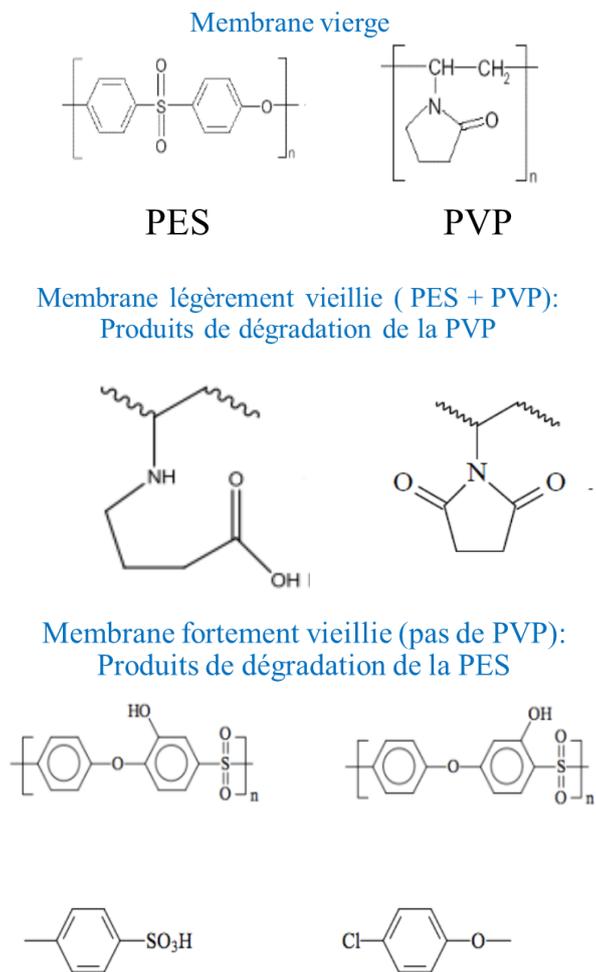


Figure I.8. Produits de dégradation de la PVP et de la PES à la suite de l'exposition au NaClO [7,8]

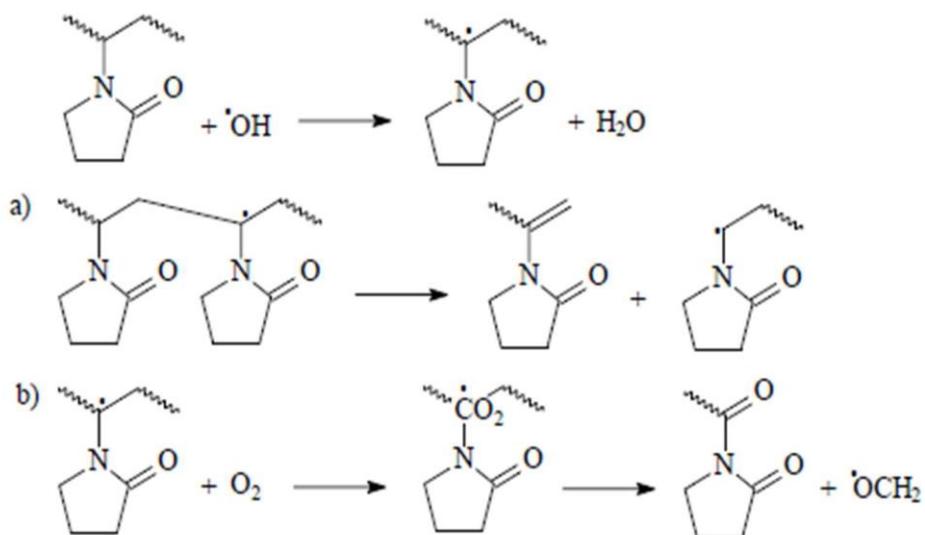


Figure I. 9. Mécanisme radicalaire de coupure de chaîne de la PVP [10]

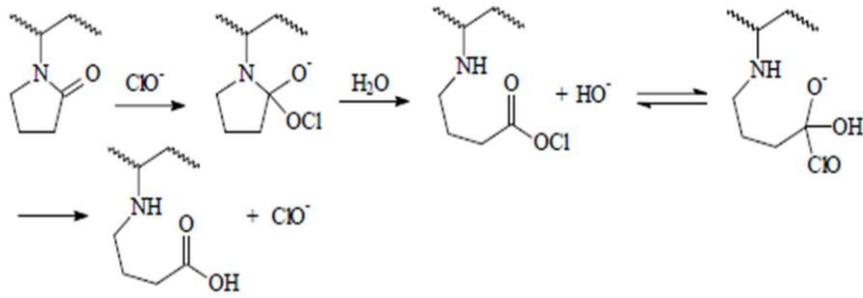


Figure I.10. Mécanisme réactionnel d'ouverture de cycle de la PVP par voie ionique [10]

Au-delà de la composition chimique, on distingue différentes structures de membranes polymères:

- **Les membranes denses** d'osmose inverse (OI) qui n'ont pas de pores, mais des vides entre les chaînes de polymère.
- **Les membranes poreuses** comprenant les membranes de nanofiltration (NF), ensuite les membranes d'ultrafiltration (UF), et les membranes de microfiltration (MF) **Figure I.11**).

Différentes applications membranaires selon leurs forces motrices caractéristiques sont présentées dans le **Tableau I.1**.

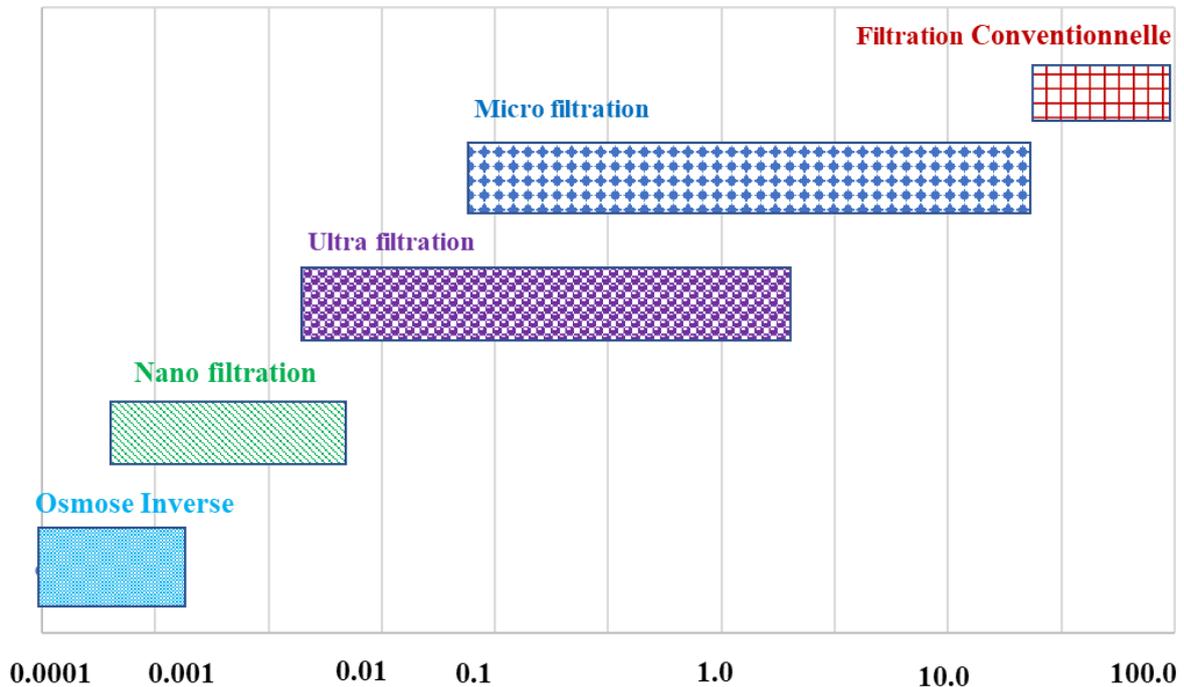


Figure I.11. Différents types des membranes selon la taille (en µm) des solutés qui peuvent être retenus

Tableau I.1. Caractéristiques de différents procédés de séparation par membranes [14]

Procédé	Force Motrice	Gamme de pression appliquée (bar)	Rétentat	Perméat
Osmose directe	Potentiel chimique	–	Eau, solutés	Eau
Dialyse	Différence de concentration	–	Macromolécules	Petites molécules
Electrodialyse	Tension/Courant	–	ions, eau	ions, eau
Pervaporation	Pression	–	Molécules non volatiles, eau	Petites molécules volatiles, eau
Osmose Inverse	Pression	20 - 100	Tout type de solutés, eau	Eau
Nanofiltration	Pression	5 - 30	Petites molécules, sels divalents, acides dissociés, eau	Ions monovalents, acides non dissociés, eau
Ultrafiltration	Pression	1 - 5	Macromolécules, eau	Petites molécules, eau
Microfiltration	Pression	0.1 - 1	Particules en suspension, eau	Composés dissous, eau

I.1.2. Sélectivité d'une membrane, Rétention d'un soluté et Seuil de coupure d'une membrane

I.1.2.1. Rétention d'un soluté par une membrane

La sélectivité d'une membrane est caractérisée par le taux de rétention (ou taux de rejet) d'une espèce (protéine, sel, microorganisme...) par la membrane [11,12]. Dans la réalité, il est plutôt convenable de parler de taux de rétention observé désignant le taux de rétention directement accessible par l'expérimentation [11,13].

Le Taux de Rétention R_{obs} d'un soluté est calculé par l'Equation I.1 :

$$R_{\text{(obs)}} = 1 - \frac{C_{\text{perméat}}}{C_{\text{rétentat}}} \quad (\text{Equation I.1})$$

Avec :

$C_{\text{perméat}}$ = concentration de l'espèce dans le perméat,

$C_{\text{rétentat}}$ = concentration de l'espèce dans le rétentat.

I.1.2.2. Seuil de coupure d'une membrane

Le seuil de coupure d'une membrane est une grandeur expérimentale qui représente la masse molaire de la plus petite molécule retenue à 90% par la membrane. Il est exprimé en g.mol^{-1} ou en Dalton. Sa détermination est réalisée à partir de la courbe d'évolution des rétentions observées en fonction de la masse molaire des solutés filtrés (Figure I.12). Cependant, la diversité des structures, la complexité des interactions physico-chimiques et l'impact de l'hydrodynamique en filtration membranaire font de cette

grandeur une valeur uniquement indicative et propre à la famille de molécules utilisées pour sa détermination. Ceci est particulièrement vrai pour les macromolécules en UF [15].

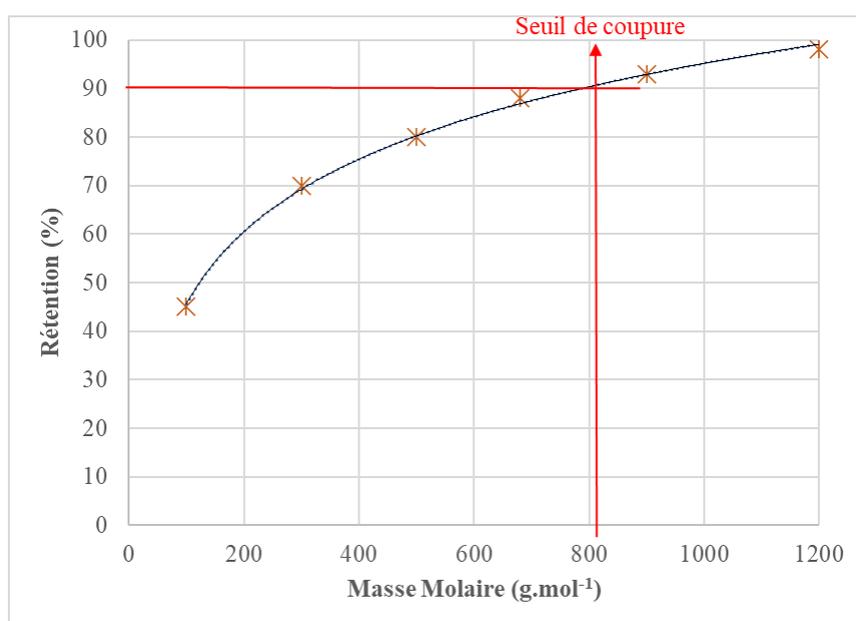


Figure I.12. Exemple de détermination du seuil de coupure d'une membrane à l'aide de la mesure de la rétention d'une série homologue de solutés de différentes masses molaires, reproduite de [13].

La notion de seuil de coupure est spécifique à l'UF et à la NF.

En MF, on préfère directement donner la taille des pores, car elle peut être facilement observée en microscopie, ce qui n'est pas le cas en UF et en NF.

En NF, les rétentions et sélectivités sont fortement dépendantes des interactions électrostatiques entre les charges de la membrane et celles des espèces ioniques filtrées [11].

Pour l'OI, on fait référence à la rétention de sels modèles. NaCl est une des espèces de référence qui renseigne le niveau d'efficacité d'une membrane d'OI par rapport à une autre. Ainsi, les membranes d'OI destinées au dessalement des eaux de mer seront choisies pour un taux de rejet de NaCl de plus de 99%, alors que celles destinées aux eaux saumâtres pourront se contenter d'un taux de rejet de NaCl de 96% [11].

I.1.3. Géométries des membranes

Il est possible de fabriquer des membranes selon 4 types de configurations dites aussi géométries : plane (**Figure I.13**), spirale (membrane plane enroulée sur elle-même) (**Figure I.14**), tubulaire (**Figure I.15**) ou fibre creuse (**Figure I.16**). A chaque géométrie correspondent des avantages et des inconvénients (**Tableau I.2**).

Outre la nature de la membrane, les principales différences entre les procédés membranaires sont basées sur la géométrie de la membrane [18]. Les membranes étant toujours installées dans un dispositif appelé module, la configuration spatiale de ce dernier induit des modes d'utilisation spécifiques des diverses géométries. Par exemple, une membrane organique de géométrie plane peut aussi bien être insérée dans un module plan ou dans un module cylindrique sous une géométrie spiralée. On parlera alors d'un module spiral ou spiralé. Le module détermine la surface filtrante, les conditions de filtration (température, viscosité, pH, pression, débit...) et de colmatage, l'aptitude au nettoyage, la consommation énergétique et les coûts de fonctionnement.

Tableau I.2. Avantages et inconvénients des différentes géométries de membranes [16,17]

Géométrie	Avantages	Inconvénients
Plane	<ul style="list-style-type: none"> - Faible volume mort, - Utilisation possible en cas de liquide visqueux, - Coût des membranes faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque de colmatage, - Nécessité d'une préfiltration, - Démontage total pour le remplacement des membranes, - Perte de charge importante
Spirale	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteux, - Module compact 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque de colmatage, - Nettoyage réputé difficile, - Démontage impossible, - Perte de charge significative
Fibre creuse	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteux, - Module compact, - Nettoyage par rétro-filtration 	<ul style="list-style-type: none"> - Application uniquement au traitement des eaux, - Basse pression (<2 bar), - Risque de colmatage
Tubulaire	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité de nettoyage, et possibilité de rétro-filtration - Accessibilité aisée du côté perméat 	<ul style="list-style-type: none"> - Volume mort important, - Perte de charge significative

Les membranes spiralées (spirales) sont des membranes constituées de plusieurs feuilles de membranes planes enroulées sur elles-mêmes autour d'un tube creux (axe collecteur) qui recueille le perméat. Des espaceurs réténat et perméat, qui sont des grilles de polypropylène, sont intercalés de part et d'autre de chaque feuille de membrane plane et assurent les écoulements en empêchant les membranes de se coller les unes aux autres (**Figure I.13** et **Figure I.14**).

Les membranes planes et spirales sont toujours organiques, alors que les membranes tubulaires et fibres creuses peuvent être organiques ou minérales.

En fonction de l'application, une géométrie sera plus pertinente qu'une autre. Ainsi, la géométrie tubulaire conviendra mieux aux fluides visqueux qu'une membrane à fibres creuses, par exemple.

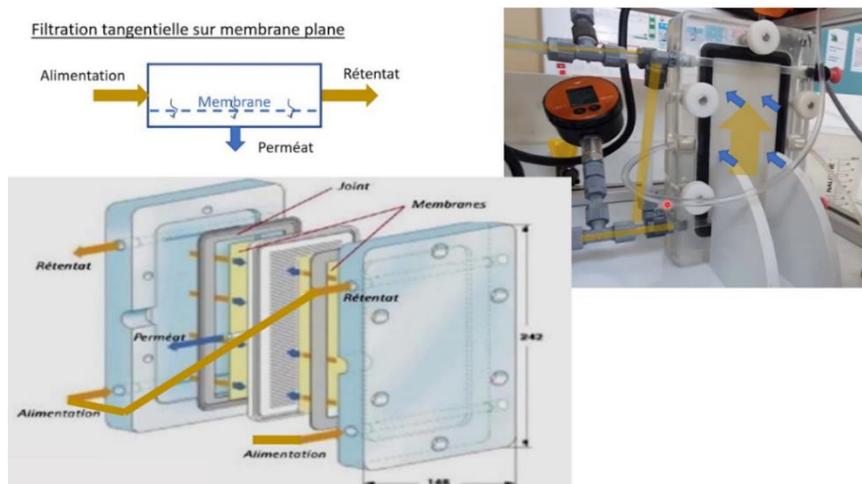


Figure I.13. Membrane plane insérée dans un module RayFlow X100 (Orelis) [19]

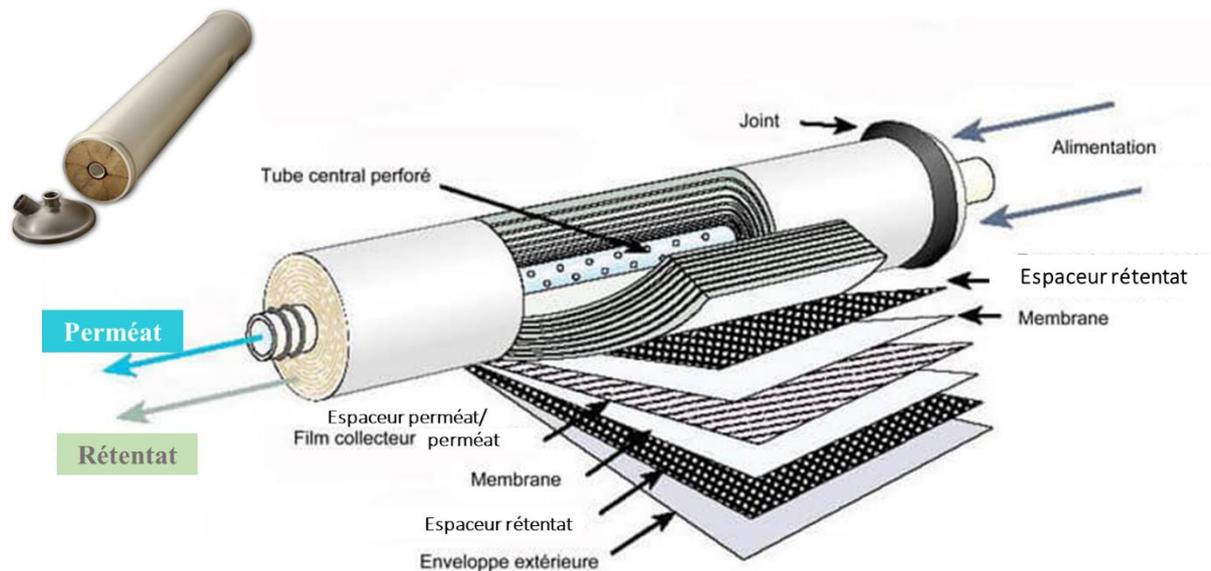


Figure I.14. Membrane spirale (*Alp'Osmose, 2022*) [20]

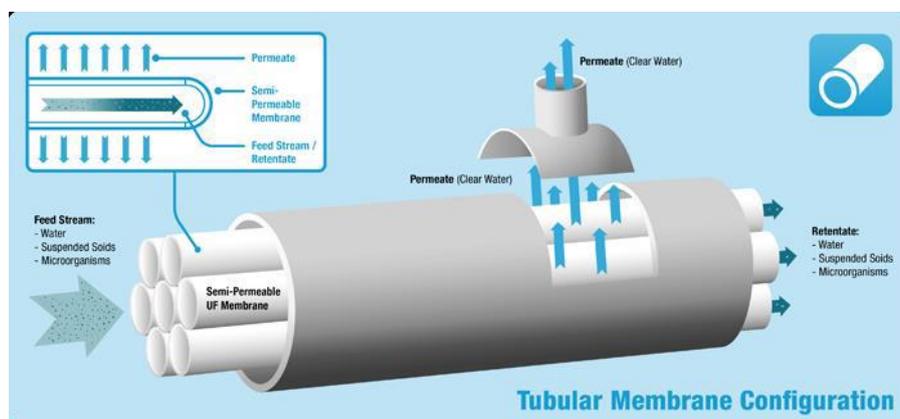


Figure I.15. Carter équipé de plusieurs membranes tubulaires (*Koch*) [21]

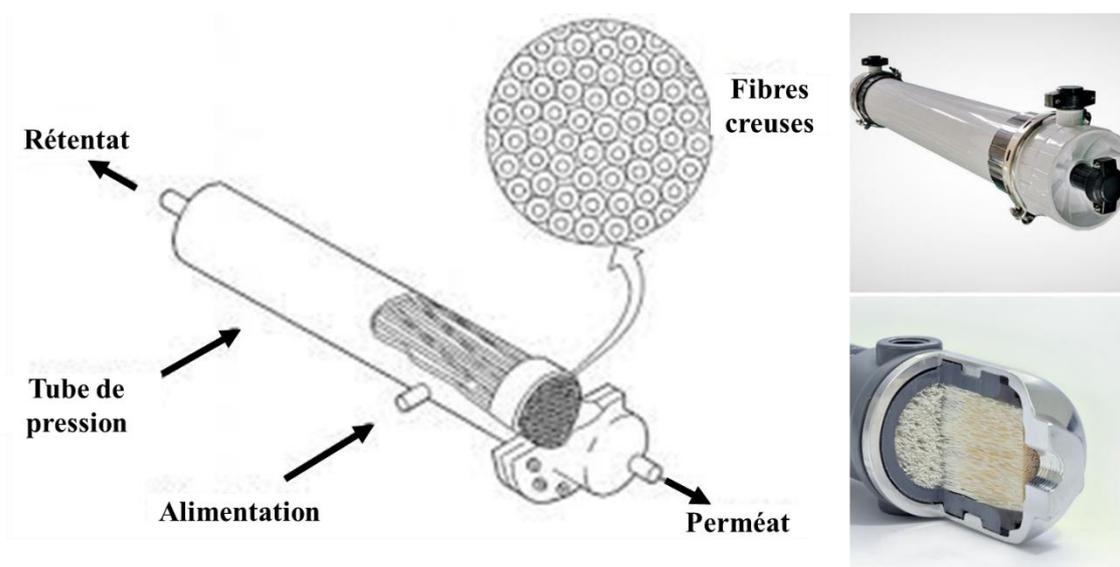


Figure I.16. Schéma de principe de fonctionnement d'un module de membranes fibres creuses (filtration frontale) [22,23]

I.1.4. Grandeurs caractéristiques

Le but recherché dans un procédé membranaire est, d'une part, la productivité (perméation) maximale afin de minimiser les coûts de fonctionnement et, d'autre part, la maîtrise de la sélectivité de la séparation. Ces deux paramètres clés sont nécessaires pour évaluer les procédés membranaires.

I.1.4.1. Le flux du perméat et la Perméance

Le flux du perméat est le débit volumique du perméat par unité de surface membranaire. Celui-ci doit être le plus élevé possible afin de minimiser la surface de filtration et donc l'investissement. Le flux du perméat, J_p ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$), est calculé selon la loi de Darcy :

$$J_p = L_p \times PTM \quad (\text{Equation I.2})$$

Avec :

- PTM : la pression transmembranaire (bar) qui désigne la différence de pression entre le côté rétentat et le côté perméat d'une membrane. C'est cette différence de pression qui est à l'origine du transfert à travers la membrane.

$$PTM = P_{\text{rétentat}} - P_{\text{perméat}} \quad (\text{Equation I.3})$$

Avec $P_{\text{rétentat}} > P_{\text{perméat}}$

Etant donné qu'en Ultrafiltration (UF) le perméat est généralement ouvert à l'air, $P_{\text{perméat}}$ est égale à la pression atmosphérique (P_{atm}). La perte de charge due à la circulation dans le module membranaire fait que la pression d'entrée (côté rétentat) P_e est toujours supérieure à la pression de sortie P_s (côté rétentat aussi). De ce fait, la pression moyenne côté rétentat ($P_{\text{rétentat}}$) correspond à :

$$P_{\text{rétentat}} = \frac{P_e + P_s}{2} + P_{\text{atm}} \quad (\text{Equation I.4})$$

Avec :

P_e : Pression relative en entrée sur le circuit rétentat, lue sur le manomètre

P_s : Pression relative en sortie sur le circuit rétentat, lue sur le manomètre

La pression transmembranaire exprimée en bar ou en Pa devient alors :

$$PTM = \frac{P_e + P_s}{2} \quad (\text{Equation I.5})$$

- L_p : la perméance de la membrane ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$) :

$$L_p = \frac{1}{\eta \times R_m} \quad (\text{Equation I.6})$$

Avec :

R_m : Résistance hydraulique de la membrane (m^{-1}), une caractéristique intrinsèque de celle-ci dans un solvant donné et à une température donnée.

η : viscosité du perméat (Pa.s) qui dépend de la température.

La perméance L_p est l'aptitude de la membrane à se laisser traverser par un fluide sous l'effet de la pression. De manière plus précise, elle détermine le flux de perméat normalisé par unité de surface et de pression. Cependant, il ne faudrait pas la confondre avec la perméabilité qui, elle, désigne le flux de perméat normalisé par unité de surface et par unité d'épaisseur de la membrane (IUPAC). L'épaisseur de la membrane étant généralement considérée comme celle de la peau active qui limite majoritairement les transferts dans le cas de membranes composites [24].

La perméance dépend des caractéristiques de la membrane, du fluide filtré et de la température. Dans l'eau, le débit de perméat augmente avec la température, car la viscosité de l'eau varie de 2.22% par °C [11].

Pour réaliser des comparaisons, une correction de l'effet de la température peut être effectuée si R_m est constante dans la gamme de température considérée :

$$L_p (50^\circ\text{C}) = \frac{\eta(T)}{\eta(50^\circ\text{C})} \times L_p (T) \quad (\text{Equation I.7})$$

I.1.5. Limitation des transferts au travers de la membrane

Le transfert d'espèces à travers les membranes diffère selon le type de membrane. Nous n'abordons que ce qui concerne l'UF dans cette thèse. En l'absence d'interactions physico-chimiques entre membranes et solutés, la rétention est principalement basée sur la taille du soluté par rapport à la taille du pore (exclusion stérique). Cependant, ces interactions physico-chimiques peuvent exister et moduler les rétentions.

Une autre façon d'aborder les transferts consiste à faire le bilan des forces s'exerçant sur le soluté au cours de la filtration. Il en résulte différents phénomènes dont la polarisation de concentration.

I.1.5.1. Polarisation de concentration

La pression exercée pour pousser le soluté à travers la membrane occasionne une accumulation du soluté à l'interface de la membrane/solution (à l'entrée des pores) par rapport au cœur de la solution (**Figure I.17**). Simultanément, une rétro-diffusion du soluté depuis la surface de la membrane vers le cœur de la solution se met naturellement en place. Un équilibre entre forces de convection et rétro-diffusion s'établit alors, qui se traduit par un profil de concentration du soluté depuis le cœur de la solution jusqu'à la surface de la membrane. Ce phénomène s'appelle la polarisation de la concentration [11]. L'épaisseur sur laquelle s'étend la polarisation est appelée la couche de polarisation.

Ces phénomènes sont résumés par l'équation du modèle du film [25].

$$J_p \times C_p = J_p \times C(x) - \frac{d(DC(x))}{dx} \quad (\text{Equation I.8})$$

Avec :

J_p : flux de perméat

D : coefficient de diffusion du soluté dans la couche de polarisation ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

$C(x)$: concentration du soluté dans la couche de polarisation.

La polarisation de concentration s'installe dès le démarrage de la filtration et s'arrête avec elle ou après une étape de rinçage au solvant pur (l'eau par exemple). C'est un phénomène réversible.

L'augmentation de la vitesse de recirculation tangentielle limite généralement la polarisation de concentration [11]. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration, pour certains solutés, pourrait conduire

à un colmatage de la membrane plus ou moins durable par la formation d'un gâteau à la surface de celle-ci. Dans certains cas, il y a même formation d'un gel à la surface de la membrane.

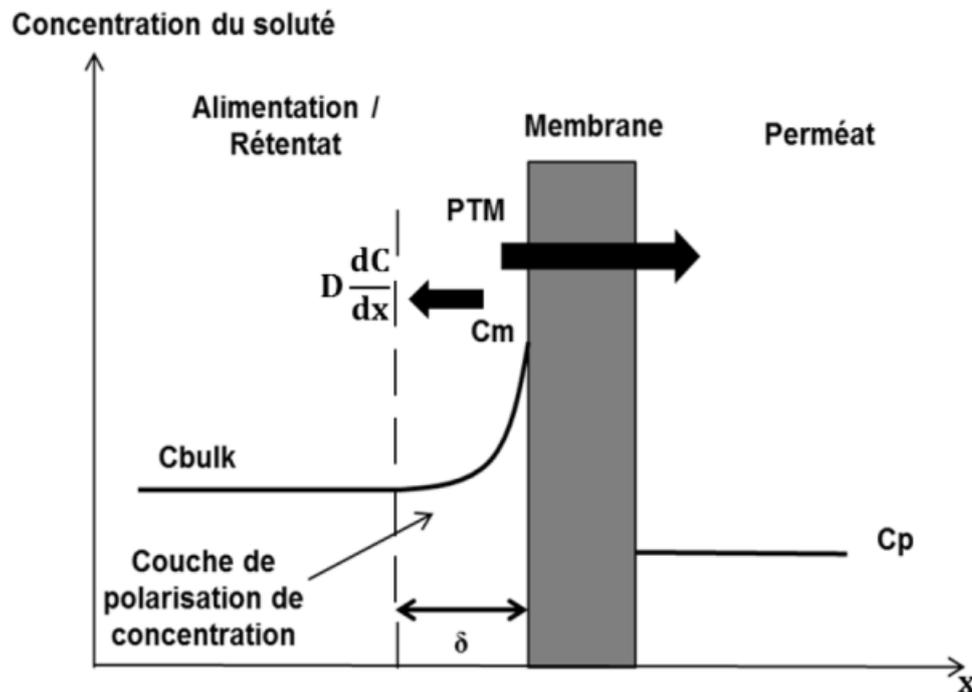


Figure I.17. Illustration de la polarisation de concentration [26]

I.1.5.2. Colmatage

Le colmatage est le principal problème pour un procédé membranaire. Le colmatage peut se situer en surface de la membrane ou à l'intérieur des pores de celle-ci [27].

Contrairement à la polarisation de concentration qui est réversible et ne traduit qu'un phénomène d'accumulation en amont de la membrane, le colmatage implique un dépôt plus ou moins important de solutés sur la membrane et/ou dans les pores de celle-ci [11].

Ces solutés obstruent plus ou moins le milieu poreux et limitent le passage du fluide à travers la membrane en engendrant une résistance supplémentaire à l'écoulement. A pression appliquée constante, le flux de perméation diminue en présence de colmatage. La baisse de pression ou l'arrêt de filtration n'inverse pas totalement ce phénomène. Cependant, le dépôt, dans sa partie superficielle, peut être partiellement érodé par l'utilisation d'une force de cisaillement tangentiel qui est induite par la circulation plus ou moins rapide du fluide à filtrer.

Dans ce type d'approche il est courant de distinguer différents types de colmatage. Ainsi le colmatage est :

- **Réversible** : ce qui signifie qu'il disparaît avec un rinçage à l'eau (action mécanique). Dans ce cas, la polarisation de concentration peut être considérée comme faisant partie intégrante du colmatage réversible. Toutefois, ce colmatage peut également concerner des structures cohésives telles que des gels, mais qui sont peu adhérent à la surface de la membrane.
- **Irréversible** : dans ce cas, le dépôt reste accumulé sur/dans la membrane même après un rinçage à l'eau. Son élimination nécessite un nettoyage efficace afin de retrouver les propriétés initiales de la membrane.

Le colmatage implique des phénomènes physico-chimiques (adsorption) et mécaniques (blocage des pores).

- ✓ **Adsorption** : des interactions spécifiques entre les composés du fluide filtré et la membrane entrent en jeu . Ils peuvent inclure des liaisons faibles dues à des forces de Van der Waals, des attractions électrostatiques, des liaisons hydrogènes. Dans ce cas, les composés adsorbés ne pouvant pas être éliminés par une action mécanique (rinçage à l'eau, turbulence ...). La désorption nécessite un nettoyage chimique et/ou enzymatique. Ceci est fréquemment le cas des protéines (du lait par exemple) face aux membranes organiques ou même inorganiques.
- ✓ **Blocage des pores** : obstruction des pores par des molécules de taille voisine de celle des pores de la membrane dans le cas de l'UF ou de la MF, essentiellement. Ce phénomène peut apparaître dès le début de la filtration, y compris sur une membrane neuve. Plus les pores sont obstrués, moins les espèces passent à travers la membrane. Le colmatage a tendance à augmenter le taux de rejet au fil du temps.
- ✓ **Formation d'un gâteau** : des particules s'accumulent à la surface externe de la membrane formant couche par couche une nouvelle surface (gâteau). La robustesse/cohésion du gâteau dépend, en partie, des interactions entre les particules qui le constituent.
- ✓ **Formation d'un gel** : c'est une conséquence de la polarisation de concentration avec certains solutés capables de gélifier, comme certaines protéines. Des macromolécules s'accumulent directement à la surface de la membrane, générant une forte concentration telle qu'une déstabilisation de la matière se produit, conduisant ainsi à la formation d'un gel.

Le colmatage peut être constitué des dépôts inorganiques, organiques voire biologiques. Ces dépôts peuvent tout aussi bien être des particules, des macromolécules, des minéraux (précipitation de sels de calcium par exemple), des substances biologiques (formation de biofilm) [27].

Plus la taille des particules est proche de celle des pores et plus la distribution des pores est large, plus le colmatage pourra être important. Lorsqu'il s'agit de protéines, la valeur du flux de perméation est la plus faible au point isoélectrique (pI) de la protéine, car elle précipite facilement à ce pH.

Parmi les paramètres influençant le colmatage, on peut citer [27] :

- **le pH** : quel que soit le type de membrane, le colmatage est plus important au point isoélectrique des molécules qui en ont un.
- **la force ionique** : le colmatage est plus important à force ionique élevée dans le cas des molécules chargées et/ou des membranes chargées. Ceci parce que les interactions électrostatiques, notamment répulsives, sont écrantées.
- **la membrane** : la nature chimique de la membrane joue un rôle très important. Par exemple, une membrane polymère favorisera les interactions hydrophobes et sera facilement colmatée par des substances organiques. Une membrane minérale, en revanche, pourra favoriser un colmatage inorganique en fonction de la forme des ions en solution et de la compétition avec la précipitation sur la membrane. Dans un cas pareil, la membrane peut jouer le rôle de site de nucléation.

I.1.5.3. Limitation du colmatage et de la polarisation de concentration

En filtration frontale, la polarisation de concentration ainsi que le colmatage dépendent de la quantité des flux filtrés. Pour limiter le colmatage dans ce mode de filtration, il est préférable de filtrer de petits volumes

et de les alterner avec des rinçages ou des rétro-lavages. De même, réduire le flux en réduisant la pression peut limiter le colmatage [11].

En filtration tangentielle, le colmatage et la polarisation de concentration dépendent de la vitesse de recirculation tangentielle et de la pression. En effet, dans ce mode de filtration, plus on augmente le débit d'alimentation moins la couche de colmatage est épaisse.

I.1.5.3.1. Flux critique et Flux limite

Lorsqu'on filtre un solvant pur tel que de l'eau déionisée à température constante, le flux de perméat J_p varie de façon linéaire avec la PTM. La pente de la droite obtenue correspond alors à la perméance L_p .

En revanche, en présence d'un ou plusieurs solutés suffisamment concentré(s), la relation J_p et PTM change et le flux tend vers un plateau au-delà d'une certaine pression. Ce plateau correspond au flux limite J_{lim} . (Figure I.18).

La diminution de la vitesse de la pompe de recirculation entraîne l'augmentation de la polarisation de concentration et du colmatage, ce qui aboutit à la diminution du flux limite J_{lim} .

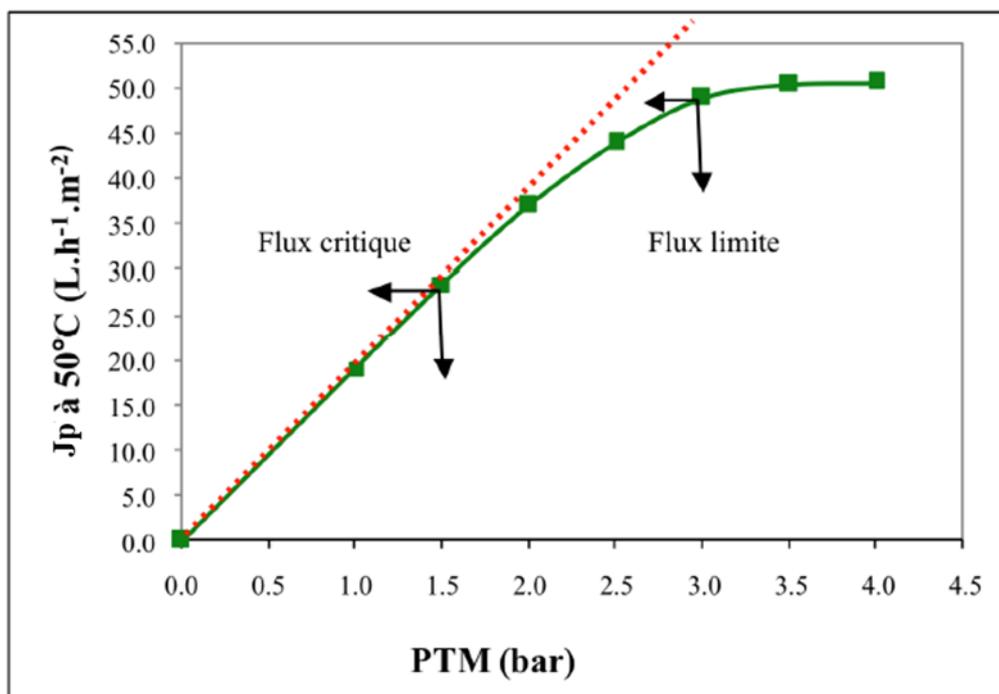


Figure I.18. Flux de perméation en fonction de la pression transmembranaire dans le cas d'UF d'un solvant pur (courbe pointillée rouge) et d'une solution contenant un ou plusieurs solutés (courbe continue verte) [28]

La valeur du flux limite dépend d'un ensemble de conditions pour un fluide donné : la membrane, la vitesse de circulation, la température ...

Le concept de flux critique (Figure I.18) a été introduit par Field et al., en 1995 [29]. Il définit un couple (PTM, J_p) autour duquel s'articule la formation d'un dépôt totalement réversible puis de plus en plus irréversible. Ce point est déterminé en traçant le flux J_p en fonction de la PTM, le flux augmentant proportionnellement avec la PTM jusqu'à un point au-delà duquel la corrélation linéaire n'existe plus. Ce point est représenté par le couple (PTM_{critique}, $J_{p,critique}$).

Trois types de flux critiques peuvent être distingués :

a) Flux critiques forts (strong form)

On parle de flux critique fort lorsque le perméat d'un fluide est identique à celui de l'eau pure jusqu'à la PTM critique. Ceci se produit lorsque la polarisation de concentration n'est pas encore présente dans la partie linéaire de la représentation (**Figure I.18**) et que la diminution du flux n'est pas observée sauf au-delà du point critique. Ce type de flux critique est observé avec des solutions modèles telles que des latex ou des silicates en UF et/ou MF [30,31,32]. En dessous du flux critique, le colmatage est totalement réversible et au-dessus, il est de plus en plus fortement irréversible. Le recours à un nettoyage à une ou plusieurs étapes s'avère nécessaire.

b) Flux critiques faibles (weak form)

Cette forme de flux critique implique que dans la partie linéaire de la droite J_p en fonction de la PTM, le flux varie linéairement avec la PTM, mais il reste inférieur au flux de l'eau pure à PTM équivalente. La diminution du flux étant due à la polarisation de concentration. Puis au-delà du point critique, le flux tend progressivement vers le flux limite. Dans ce cas de figure, le colmatage reste réversible en dessous du flux critique et irréversible au-delà. On rencontre ce type de flux critique dans les milieux complexes comme certains types d'effluents [33,34].

c) Flux critiques seuils (threshold form)

Lorsqu'il s'agit de mélanges complexes fortement colmatant (fluides alimentaires, par exemple). Il faut introduire une troisième forme de flux critique appelée flux critique seuil [35]. Il se distingue du flux critique faible par le fait qu'en dessous du flux critique, bien que la diminution du flux par rapport au flux à l'eau pure soit aussi due à la polarisation de concentration (réversible), il existe en plus un léger colmatage irréversible dû à l'adsorption de composés du fluide filtré sur la membrane. Ainsi, il y a présence d'un colmatage irréversible même en dessous du flux critique et non plus seulement au-delà. Cela dit, le colmatage irréversible au-dessus du flux critique est beaucoup plus important encore. Le flux critique seuil a déjà été discuté dans plusieurs études [28,36,37,38]. Plus particulièrement, sa présence a été démontrée en UF de lait écrémé avec une membrane PES/PVP [39].

L'idéal pour limiter fortement le colmatage serait de réaliser la filtration dans les conditions sous le seuil critique, étant donné que dans cette zone le colmatage est fortement réversible. Mais cela réduirait la productivité ou demanderait une installation d'une surface plus importante de membranes pour produire la même quantité de perméat. Industriellement, il est encore fréquent de voir des installations fonctionnant au flux limite.

I.1.5.4. Méthodes alternatives de limitation du colmatage

I.1.5.4.1. Fabrication de membranes polymères avec des propriétés anti-colmatage

Depuis une trentaine d'années, il est possible de fabriquer des membranes polymères dont la balance hydrophile/hydrophobe des polymères constitutifs est modifiée selon 3 stratégies globalement :

- (i) La première consiste à mélanger physiquement des polymères en différentes proportions en vue d'augmenter les propriétés hydrophiles des membranes. Les polymères hydrophiles souvent utilisés incluent la polyvinylpyrrolidone (PVP), l'alcool polyvinylique (PVA), le polyoxyéthylène (PEO)

ou le polyéthylène glycol (PEG) [40,41]. Dans cette catégorie on peut citer les membranes d'UF en PES/PVP objets de cette thèse ou par exemple des membranes PVDF/PVA préparées par Yuan et al. [41]. L'addition du polymère hydrophile (dans ce dernier cas le PVA) affecte significativement la structure de la membrane et la taille des pores ainsi que l'hydrophilie de la membrane PVDF.

- (ii) La deuxième stratégie qui se développe depuis quelques années maintenant, met en œuvre des copolymères à blocs dans lesquels alternent des zones polaires puis hydrophobes au sein de la même chaîne polymère [42,43].
- (iii) La troisième stratégie consiste à insérer des nanoparticules organiques ou inorganiques de type silice ou alumine dans la matrice polymère directement ce qui augmente généralement les flux [44,45].

Cependant, les recherches académiques récentes dans ce domaine ne sont pas (encore ?) transposées à l'échelle industrielle, il n'y a pas eu de nouveaux matériaux membranaires commerciaux pour les applications aqueuses d'ultrafiltration depuis de très nombreuses années.

I.1.5.4.2. Champs de force additionnels

Le colmatage étant un verrou, de nombreuses études cherchent à le limiter. Parmi ces techniques, on peut citer :

- **La filtration dynamique** : reposant sur la création d'une forte contrainte de cisaillement due à un mouvement du fluide à filtrer par rapport à la membrane. Cela peut être généré par une rotation d'un disque à proximité de la membrane ou par la rotation de la membrane elle-même (disque ou cylindre rotatif). Ces systèmes permettent de travailler avec des débits faibles et fonctionnent avec des taux de cisaillement à la membrane très élevés (10^5 s^{-1}) [46].
A titre d'exemple, le VSEP (Vibratory Shear Enhanced Processing) est un carter vibrant mis en mouvement par un arbre de torsion, générant ainsi un mouvement du fluide à la surface de la membrane polymère plane. Cela crée un fort cisaillement. De même, les disques rotatifs tournent en face de membranes fixes ou mobiles (arbre de rotation). Les travaux de Jaffrin et al. [47] comparant les techniques vibrantes aux disques rotatifs ont prouvé que les disques rotatifs généraient plus de cisaillement, donc des flux de perméat plus élevés. Ces techniques ont déjà démontré leur efficacité dans la filtration de lait ou d'effluents laitiers [47,48,49,50,51,52], mais restent très coûteuses (coûts initiaux et remplacement de membranes), et ne sont pas, à notre connaissance, utilisées à l'échelle industrielle dans le domaine laitier.
- **L'utilisation des ultrasons** : l'utilisation des ultrasons fait partie des méthodes dites non conventionnelles. Elles ont fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années [53,54,55]. Elles consistent en l'utilisation d'une onde sonore à haute fréquence qui agite le milieu et agit directement sur la couche colmatante en surface de la membrane. Simon et al. [55] ont démontré que l'application des ultrasons en cours de filtration limitait le colmatage, mais n'avait pas d'effet nettoyant post-filtration dans le cas de l'UF de Dextran 500 kDa par une membrane en PES de MWCO 10 kDa (PBTk, Millipore). De plus, les risques de dégradation de la membrane existent selon les fréquences utilisées.
- **L'application de champs magnétiques permanents** : une étude de filtration de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) a utilisé des aimants permanents avec un champ magnétique maximum de 0.7 T perpendiculairement à la membrane [56]. L'effet d'induction magnétique a été étudié en soumettant l'alimentation sous le champ magnétique pendant 2 h, avant la filtration. La combinaison du champ magnétique et de l'effet d'induction magnétique a permis l'augmentation du flux de perméat jusqu'à 90% ainsi qu'une récupération de la perméance hydraulique de la membrane (par rapport à la perméance avant le nettoyage physique et chimique). L'application du champ

magnétique dans les solutions de protéines en UF a démontré son efficacité en tant que méthode alternative pour améliorer les performances du procédé.

- **L'impact des particules en suspension** : cette technique fait référence à l'utilisation de particules ajoutées dans le milieu à filtrer (« scouring agents ») pour réduire le colmatage. Elle a été notamment utilisée dans les bioréacteurs à membranes (MBR) qui utilisent des fibres creuses immergées. En présence d'aération, les particules, généralement polymériques et de forme sphérique et taille millimétrique, vont frapper la surface de la membrane, générant ainsi une vibration/agitation. Cela produit un phénomène de cisaillement à la surface de la membrane [57,58,59]. L'ajout de particules n'est pas envisageable pour nettoyer une membrane d'UF de lait puisqu'elles resteraient dans le rétentat qui est la partie à valoriser en alimentation.

I.1.5.4.3. Décolmatage physique et Nettoyage chimique ou enzymatique

En dépit de tous les efforts pour limiter le colmatage, celui-ci reste un verrou pour les procédés membranaires. Pour le maîtriser, il est nécessaire d'optimiser les conditions hydrodynamiques de filtration, mais aussi de prévoir des décolmatages plus ou moins réguliers. Ils peuvent être réalisés sous la forme de décolmatage physique (rinçage, rétrolavage) intervenant séquentiellement lors de l'opération de filtration et/ou de nettoyage chimique et/ou enzymatique (solutions détergentes plus ou moins formulées).

1) Décolmatage physique : Rinçage et Rétrolavage

Le nettoyage physique désigne de façon globale le rinçage à l'eau dans le sens de la filtration pour décoller les dépôts de particules grâce aux forces dues à l'écoulement de l'eau. Cette méthode présente une faible efficacité, et dans de nombreux cas il subsiste du colmatage irréversible [11].

Le rétrolavage (backflush ou backwash selon la durée), consiste à régulièrement inverser pendant un temps plus ou moins long le sens de la PTM, ce qui implique de filtrer depuis le compartiment perméat vers le rétentat. Il peut permettre d'éliminer une partie des dépôts à la surface et/ou à l'intérieur des pores. Il est consommateur d'énergie et d'une partie du perméat, réduisant ainsi la rentabilité du procédé. C'est un choix fréquent en traitement d'eau avec des membranes fibres creuses. Cependant, il peut entraîner un décollement de la peau active de certaines membranes [11] et n'est ainsi pas applicable, sans risques, avec des membranes multicouches polymères.

Le décolmatage physique peut être amélioré par injection d'air dans l'eau, à l'aide d'un compresseur. L'application d'un écoulement diphasique augmente significativement les contraintes pariétales et par la même occasion améliore le décollement des dépôts concentrés [60]. L'ajout d'air a un milieu contenant des protéines conduit à la formation de mousse qu'il est très difficile d'éliminer ensuite et n'est donc pas une solution dans le cas du lait.

2) Nettoyage chimique ou enzymatique

Le nettoyage chimique est impératif lorsque les techniques physiques précédemment citées sont inefficaces ou inapplicables. Ceci est d'autant plus vrai lorsque les fluides filtrés sont très colmatants, comme c'est le cas des fluides alimentaires (protéines, lait ...).

Les nettoyages sont généralement réalisés avec des solutions détergentes à choisir selon la cible à éliminer :

- acide : pour éliminer un colmatage constitué de minéraux,
- alcalin : efficace pour éliminer les composés organiques (graisses, protéines ...).
- enzymatique : dans le cas de colmatants hydrolysables (protéines, polysaccharides, etc.).

Ce dernier choix peut être nécessaires notamment pour des membranes peu tolérantes aux détergents chimiques telles les membranes en acétate de cellulose encore utilisées en traitement d'eau [11]. Par

ailleurs, le nettoyage enzymatique est aussi souvent utilisé en industrie lorsque le nettoyage chimique n'arrive pas à venir à bout du colmatage, particulièrement dans le cas des protéines.

I.2. UF de Lait écrémé et colmatage

On appelle lait, le liquide synthétisé par les glandes mammaires chez les femelles de mammifères. Il varie en composition selon l'espèce. Le lait utilisé dans cette étude est du lait de vache.

D'autres facteurs agissent également sur la composition du lait au sein d'une même espèce : la race, le stade de lactation, la saison et l'alimentation, l'état sanitaire, etc.

I.2.1. Composition du lait de vache

Comme tout lait, le lait de vache est une émulsion de matière grasse (les globules gras) dans une phase aqueuse continue où sont dissous des glucides, des sels et des protéines solubles au pH naturel du lait (protéines sériques), et à laquelle s'ajoute une suspension colloïdale constituée essentiellement d'une partie des protéines qui sont dites micelles de caséines [1].

On caractérise le lait de vache à usage industriel en fonction de deux éléments principaux :

- Le taux protéique : caséine et protéines sériques
- Le taux butyreux : taux de matière grasse.

Le lait de vache a une densité de 1.030 à 1.034 et un pH naturel qui varie entre 6.6 et 6.8.

La composition moyenne du lait de vache est présentée dans le **Tableau I.3**.

Tableau I.3. Composition moyenne du lait de vache, d'après [1]

Composants	Concentration (g. kg ⁻¹ de lait)	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Etat d'association
Eau	863	18	Solvant
Matière grasse	40	300-800	Phase séparée (émulsion)
Lactose	46	342	Solution
Sels Minéraux	6	20-60	Solution
Acides organiques	2	100-200	Solution
Caséines	26	24 000 (monomères)	Agrégats = micelles de caséines
Protéines sériques	6	14 000- 600 000 (monomères)	Mono/oligomères

On peut regrouper les différents constituants du lait en 4 grandes catégories : la matière grasse, le lactose, les protéines et les sels.

a) La matière grasse

La matière grasse (lipides) du lait est constituée à 98% de triglycérides et en très faible quantité de phospholipides et de stérols. Elle est essentiellement sous forme de globules gras de 1 à 5 µm. Ensemble avec d'autres molécules amphiphiles (protéines, glycoprotéines, lipoprotéines), les différents composants

lipidiques du lait participent à la composition de la membrane des globules gras et permettent ainsi une émulsion huile dans eau (H/E).

b) Le lactose

Présent dans le lait des mammifères, le lactose est un glucide dont la concentration se situe entre 45 - 50 g.L⁻¹. Après l'eau, le lactose est le constituant majoritaire du lait et représente 99% des glucides contenus dans le lait. Le lactose est un disaccharide (C₁₂H₂₂O₁₁) de masse molaire 342 g.mol⁻¹ capable d'être hydrolysé en ses 2 monomères constitutifs (C₁₂H₁₂O₆) : le glucose et le galactose.

Le lactose solide est de couleur blanche et donne des solutions incolores. La coloration brune peut être observée dans le produit hydrolysé lorsque le lactose réagit avec des substances azotées en milieu alcalin. Cette coloration est le résultat de réactions de brunissement non enzymatiques ou réactions de Maillard. Elles interviennent entre la fonction réductrice d'un sucre et les fonctions amines des protéines. Divers facteurs dont la température et le pH affectent la vitesse et la nature de ces réactions.

c) Les protéines

Les protéines du lait sont synthétisées par la glande mammaire (caséines, α -lactalbumine, β -lactoglobuline, Lactopéroxydase, ...) ou proviennent directement du sang (sérumalbumine (BSA), transferrine (Lactoferrine, LF), lysozyme, plasmine ...).

Les protéines sont des chaînes d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Elles possèdent un poids moléculaire à l'état de monomère variant entre 14 000 et 380 000 g.mol⁻¹ et représentent 95 % de la matière azotée du lait.

On distingue 2 catégories de protéines de lait selon qu'elles sont solubles ou en suspension au pH naturel du lait :

- **Les caséines (26 g.L⁻¹)** : principales protéines du lait, elles ont une structure lâche, c'est-à-dire non globulaire. Elles sont facilement dégradées par les enzymes digestives.
Il existe 5 types de caséines : α ₁ : 36%, α ₂ : 10%, β : 34%, κ : 13%, γ : 3%. Ces dernières ont un poids moléculaire (monomère) de l'ordre de 24 000 g.mol⁻¹. Leur point isoélectrique (pI) est de 4.6. Tandis que les caséines α s et les caséines β sont très hydrophobes, la caséine κ possède une partie hydrophile. Les caséines sont reliées entre elles par des ponts phosphocalciques et forment ainsi des micelles de caséines en suspension dans la phase aqueuse du lait.
Les micelles de caséines sont des structures supramoléculaires polydisperses dont le diamètre moyen est de l'ordre de 200 nm, mais leur taille peut varier entre 30 et 300 nm. Les propriétés de la micelle de caséine (composition, taille, hydratation) sont influencées par les changements d'équilibre phosphate/calcium dus à des changements d'environnement physico-chimique.
Les caséines ont la capacité de former un gel lorsque la concentration et la pression sont suffisantes. Ceci sera le cas à proximité de la membrane lors de l'UF de lait écrémé, par exemple.
- **Les protéines du lactosérum ('whey') ou protéines sériques (6 g. L⁻¹)**, étaient autrefois dites « protéines solubles » en raison de leur solubilité au pH naturel du lait contrairement aux micelles de caséines en suspension. Elles ont une structure globulaire mais certaines sont plus facilement déformables que d'autres. Ce sont des monomères ou des petits oligomères de taille comprise entre 3 et 6 nm. Elles sont généralement facilement hydrolysées par des protéases.
Parmi elles, les principales protéines sériques sont la β -lactoglobuline (β -Lg) et l' α -lactalbumine (α -LA) dont les masses molaires sous forme monomère sont de 18 000 et de 14 200 g.mol⁻¹ et les points isoélectriques de 5.2 -5.4 et 4.2 – 4.5, respectivement. La β -lactoglobuline, protéine majeure du lactosérum, est sous forme dimère au pH naturel du lait. Ces propriétés techno-fonctionnelles moussantes en font une protéine très utilisée
Parmi les autres protéines sériques, on peut citer les immunoglobulines (Ig), la BSA, et à des tenseurs plus faibles : la Lactoferrine (LF) et la Lactopéroxydase (LP).

Comme toutes protéines solubles, les protéines sériques s'adsorbent spontanément sur des surfaces hydrophobes et hydrophiles. Ce phénomène est à l'origine de bien des difficultés, notamment lorsqu'il s'agit du colmatage de membranes ou de dépôt sur des dispositifs médicaux tels que les cathéters, par exemple [61].

Du fait de sa sensibilité particulière à la dénaturation thermique, la β -Lactoglobuline est responsable des problématiques de colmatage, notamment dans les échangeurs thermiques à plaques (inox) et fort probablement sur les membranes.

d) Les sels minéraux

Dans le lait, on retrouve 3 catégories de minéraux, qui sont :

- associés aux caséines
- associés aux protéines sériques dans la phase aqueuse
- libres en phase aqueuse, c'est à dire non associés aux protéines

Dans le lait de vache, les différents minéraux présents sont affichés dans le **Tableau I.4**.

Tableau I.4. Composition 'minérale' du lait de vache [62,63,64]

Minéraux	Concentration (mmol.kg ⁻¹)	Concentration (mg.kg ⁻¹)	Quantité associée à la micelle de caséine (%)
Calcium	26-32	1 043-1 283	69
Phosphore total	30-32	922-930	53
Phosphate inorganique	19-23	1 805-2 185	53
Citrate	7-11	1 323-2 079	14
Chlorure	22-34	772-1 207	5
Magnésium	4-6	97-146	47
Sodium	17-28	391-644	5
Potassium	31-43	1 212-1 681	6

Le lait de vache est naturellement riche en calcium et en phosphore. Son intérêt tient à sa teneur en calcium et à la biodisponibilité de ce dernier. L'assimilation du calcium est favorisée par plusieurs facteurs : le milieu acide, les caséines, le lactose, la vitamine D et le rapport calcium/phosphore >1 [65,66,67,68].

Dans le lait, le phosphate et le calcium sont majoritairement combinés aux caséines, de sorte qu'il n'en reste que peu sous forme libre en phase aqueuse. Néanmoins, ce peut être suffisant pour provoquer un colmatage de phosphate de calcium sur des membranes minérales.

De plus, tout changement de la température et/ou du pH, mais aussi de la concentration par dilution ou concentration provoque des déséquilibres et peut modifier leur aptitude à précipiter sur les membranes organiques de MF, UF, NF, OI et minérales (MF, UF) [38].

I.2.2. Types de laits en fonction de la teneur en matière grasse

En fonction de la teneur en matières grasses/lipides, on distingue 3 types de laits : entier, demi-écrémé, écrémé. Ils subissent différents traitements à l'échelle industrielle en fonction de leur future utilisation.

Dans le présent travail de thèse, seul le lait écrémé a été utilisé. De ce fait, seule sa composition détaillée est présentée dans le **Tableau I.5**. Le lait entier a grossièrement la même composition que le lait écrémé, mis à part la teneur en matière grasse qui est de 35 à 40 g.L⁻¹.

Tableau I.5. Composition moyenne du lait écrémé [1]

Composants	Teneur (g.kg ⁻¹)	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Etat d'association
Eau	899	18	Solvant
Lactose	48	342	Solution
Sels minéraux	6.25	20-60	Solution
Acides organiques	2	100-200	Solution
Caséines	27	24 000 (monomère)	Micelles
Protéines solubles dont α-Lactalbumine β-lactoglobuline Immunoglobines	6.25	14 200 (monomère) 36 000 (dimère) 60 000/600 000	Mono/oligomères

I.2.3. Type de laits en fonction du traitement thermique appliqué

En fonction du traitement thermique appliqué en vue de détruire les germes naturellement ou accidentellement contenus dans le lait et ainsi permettre sa conservation plus ou moins longue, on distingue plusieurs catégories de laits [69] : lait cru, lait pasteurisé, lait thermisé, lait stérilisé UHT.

Les laits écrémés qui sont traités par membrane ont généralement été traités thermiquement pendant un temps très court et à faible température pour éviter autant que possible la dénaturation des protéines. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé du lait écrémé stérilisé UHT car il est plus facile à trouver dans le commerce. Ce traitement thermique est plus « dur » que la thermisation et a pour conséquence de dénaturer de l'ordre de 50% de la β-lactoglobuline (sans hydrolyse associée) qui reste néanmoins soluble. Ceci peut constituer un biais dans la mesure où le colmatage irréversible des membranes est fortement associé à cette protéine, mais nous considérons que si les détergents sont efficaces sur ce colmatage « augmenté » alors ils le seront sur un colmatage moins récalcitrant.

I.2.4. Procédés membranaires dans l'industrie laitière

Depuis les années 1960, les technologies membranaires ont été introduites dans l'industrie laitière. Aujourd'hui, l'industrie du lait occupe la deuxième position après le traitement de l'eau pour l'utilisation des technologies membranaires qui servent d'alternatives viables comparées aux procédés de concentration traditionnels tels que la distillation, l'évaporation ou l'extraction [70].

L'industrie agroalimentaire représente 20 à 30 % des 250 millions du chiffre d'affaires de l'industrie mondiale des membranes avec 7.5 % de croissance annuelle [70]. En 2009, plusieurs centaines de milliers de mètres carrés de membranes (Ultrafiltration : 400 000 ; Nanofiltration : 300 000 ; Osmose Inverse : 100 000, Microfiltration : 50 000) étaient déjà installés et, parmi les membranes installées dans l'industrie laitière, 2/3 servaient pour le traitement du lactosérum et environ 1/3 pour le lait [71].

Les technologies membranaires pour la concentration sont peu consommatrices d'énergie par rapport aux procédés thermiques tels que l'évaporation sous vide, par exemple. Elles améliorent l'économie de l'industrie laitière en réduisant les coûts de production [72].

Les technologies membranaires sont un choix logique pour le fractionnement du lait dont les composants présentent des tailles très différentes (**Figure I.19**). Ainsi, dans les procédés laitiers modernes, les membranes jouent un rôle majeur dans la dé-bactérisation du lait (MF 1.4 μm), la concentration de constituants sélectionnés ou la séparation de composants spécifiques à haute valeur ajoutée. Le **Tableau I.6** présente les techniques membranaires communément utilisées dans l'industrie laitière. L'ultrafiltration (UF) et la microfiltration (MF) sont les plus utilisées dans l'industrie fromagère [70].

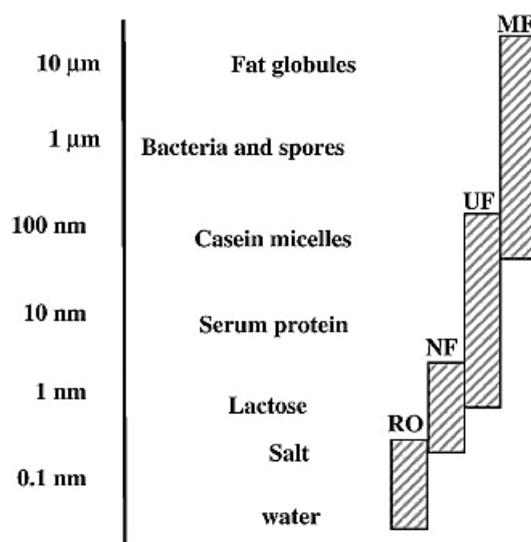


Figure I.19. Procédés membranaires en fonction de la taille des composants du lait [73]

Tableau I.6. Techniques membranaires communément utilisées dans l'industrie laitière. Adapté de [74,75,76]

Type	Taille de pore (diamètre)	Seuil de coupure	Pression (bar)	Application dans l'industrie laitière
Microfiltration (MF)	0.1 - 20 µm	na	≤ 1	Élimination des bactéries du lait Séparation micelles de caséines/protéines sériques
Ultrafiltration (UF)	3 - 100 nm	5 - 200 kg.mol ⁻¹	2 - 5	Standardisation du lait Concentration des protéines du lait et du lactosérum Réduction du calcium et du lactose
Nanofiltration (NF)	1 - 2 nm	200-1000 g.mol ⁻¹	5 - 30	Déminéralisation du lactosérum Lait à teneur réduite en lactose
Osmose Inverse (OI)	Membranes denses	na	20 - 100	Concentration, Traitement des eaux de procédés

na= non applicable

➤ **L'utilisation de l'UF dans la fabrication du fromage :**

La pré-concentration du lait par UF, étape préliminaire à la fabrication du fromage, a été développée par Maubois, Mocquot et Vassal [77] à l'INRA de Rennes, qui ont déposé un brevet en 1969 connu sous le nom 'procédé MMV. Le procédé MMV est utilisé dans le monde entier.

Il est ainsi possible de fabriquer du fromage à partir de volumes plus petits (lait pré-concentré vs lait), et cela limite les étapes de drainage et d'élimination du petit lait [70]. Cela favorise également l'augmentation des rendements de fabrication du fromage et le contrôle de la qualité à l'échelle industrielle. Cependant, ces opérations ont un impact que certains jugent négatif sur la maturité des fromages à pâtes cuites et mi-cuites [78].

En fonction des facteurs de concentration et de l'augmentation de la teneur en protéines, il existe trois différents types de rétentats obtenus en UF : le rétentat faiblement concentré (Low concentrated retentate : LCR), le rétentat moyennement concentré (medium or intermediate retentate : MCR) et le pré-fromage liquide (liquid pre-cheese : LPC) [74,79]. Chacun correspond à un type de fromage particulier (**Tableau I.7**). Les perméats d'UF contiennent de l'eau, du lactose et des minéraux qui peuvent être valorisés [70].

Il est possible d'appliquer l'UF au lait acide avec pH 4.4 à 4.6 pour la production de fromage frais de meilleure qualité [80].

Tableau I.7. Le rôle de l'UF dans le fromage au lait concentré [74,79, 81,82]

Rétentat	Facteur de concentration	Types de fromage	Remarque
Rétentat faiblement concentré	1.2 – 2.0	Cheddar, brick, cottage cheese, colby, mozzarella, edam, saint paulin, quarg	<ul style="list-style-type: none"> • 4.5 - 5 % de plus en protéines dans les fromages, • Augmentation du rendement, • Utilisation efficace de cuves de fromage, • Bon contrôle de composition
Rétentat moyennement concentré	2 - 6	Cheddar, feta, havarti, gouda, et bleu	<ul style="list-style-type: none"> • 6 - 8 % de plus en rendement, • Besoin d'équipement spécial pour la fabrication de fromage
Pré fromage liquide	5 - 7	Feta, mozzarella, quarg, camembert, ricotta, cream cheese, mascarpone et saint mauri	<ul style="list-style-type: none"> • Très économique, • Pas besoin de cuves de fromage, • Drainage minimum de lactosérum

Quelques exemples de membranes d'UF utilisées dans l'industrie laitière sont présentés dans le **Tableau I.8**.

Tableau I.8. Quelques exemples de membranes d'UF utilisées dans l'industrie laitière

Nom	Fournisseur	Polymère	MWCO (kg.mol ⁻¹)	Référence
HKF-131	Koch (USA)	PES/PVP	5-10	[27,83,84,85,86]
Dow Company	Dow Company (Danemark)	Polysulfone (PSf)	30	[87]
Omega	Pall (Australie)	PES	30	[88]
Type G20	Desal Desalination Systems Inc (USA)	PSf/PEG	3.5	[89]
GR 73PE	Alfa Laval, Nakskov (Danemark)	PES	10	[90]
Synder Filtration	Synder Filtration Inc, Vacaville (CA)	PVDF hydrophilisé	10	[91]
Elements G20	Osmonics (?)	?	3.5	[92]
UH030 ; UP005	Microdyn Nadir (Germany)	PES hydrophilisée, PES	30 ; 5	[93]
PTTK polysulfone	Millipore (?)	PSf	30	[94]

La membrane HKF-131 (Koch) est la plus utilisée et représente plus de 80% de l'application d'UF de lait écrémé mondiale. C'est pour cette raison qu'elle a été choisie dans le cadre de cette thèse.

I.2.4.1. Autres applications des membranes dans l'industrie laitière

Avec l'aide des technologies membranaires, un certain nombre de nouveaux produits a vu le jour sur le marché tels que le lait sans lactose, le lait à faible concentration en calcium, le yaourt sans matière grasse, la crème glacée concentrée en protéines avec faible teneur en lactose, le lait protéiné faible en matière grasse, les boissons à base de petit lait, etc. [70].

Le contrôle de la texture des fromages grâce à la maîtrise de la composition du lait, et donc de ses propriétés, est plus facile, mais une attention particulière reste nécessaire pour la sélection du levain et les conditions d'incubation/maturation telles que la température, le temps et le pH [74,100].

Traditionnellement, la crème est séparée du lait entier par centrifugation [70]. La séparation de la crème est aussi possible par des technologies membranaires, plus économes en énergie, produisant du lait écrémé avec une bonne qualité de stockage et améliorant les attributs sensoriels de la crème sans causer de dommage à la membrane des globules gras.

Le fractionnement de ces globules gras par des membranes MF 2 µm a été rapporté par Goudedranche et al. [101]. La taille des globules gras a un fort impact sur la texture et les qualités sensorielles. La crème

avec des petits globules gras possède une texture fine et une saveur améliorée comparée à la crème avec des globules gras plus gros [101].

Les technologies membranaires ont aussi été utilisées pour séparer les caséines κ du glycomacropéptide (GMP). Le GMP est utilisé dans différentes applications : en industrie pharmaceutique pour le contrôle de l'adhésion des cellules d'*E. coli* sur les parois de l'intestin. En outre, il protège contre la grippe et prévient l'adhésion du tartre sur les dents [102].

1.2.4.2. Points faibles et limites des procédés membranaires dans l'industrie laitière

Parmi les limitations des membranes dans l'industrie du lait, comme ailleurs, il y a principalement le colmatage des membranes [92,103,104].

Pour le limiter, il est nécessaire d'augmenter la vitesse d'écoulement tangentielle et les turbulences. Mais le moyen d'y parvenir dépend de la géométrie de la membrane et peut être énergivore. Cependant, s'il est maîtrisé, le colmatage n'est jamais absent. Il faut alors l'éliminer, ce qui est réalisé avec des nettoyages réguliers qui occupent jusqu'à 30% du temps d'exploitation des membranes et consomment des produits chimiques, de l'eau et de l'énergie et génèrent des effluents.

1.3. Audit du colmatage

En industrie, il peut arriver que le colmatage soit à la source de sérieux problèmes, quand, en dépit des nettoyages, la membrane n'arrive pas à récupérer un niveau de perméance correct capable d'assurer les performances recherchées (sélectivité, rendement) et la rentabilité des opérations.

Ce problème peut provenir du fait que le nettoyage appliqué ne correspond pas au couple membrane/fluide filtré et/ou aux divers paramètres appliqués aux opérations de production et/ou de nettoyage (Température, PTM, vitesse ...). Dans ce cas, il convient d'établir un diagnostic sur le colmatage, enfin de proposer un protocole de nettoyage approprié. Les autopsies des différentes membranes en fin de vie rapportées dans la littérature peuvent servir de base pour comprendre l'état de la membrane selon sa durée de vie depuis sa mise en activité [4,83,105,106,107,108].

De plus, les différents traitements subis par la membrane tout au long de sa vie peuvent éclairer la source du problème. Par exemple, une membrane ayant été traitée au NaOCl pour la désinfection, peut être sujette à une dégradation des polymères et souffrir du vieillissement accéléré selon les concentrations, les pH et la fréquence [109]. Un autre point est lié à la qualité (insuffisante) de l'eau utilisée pour le nettoyage qui peut expliquer la perte d'efficacité. Celle-ci pourrait être provoquée, par exemple, par des silicates contenus dans l'eau de rinçage qui précipiteraient et abraseraient la membrane et accélèrerait ainsi son vieillissement ou le tartre qui précipiterait et aggraverait le colmatage. Il y a donc bien de facteurs à prendre en compte pour comprendre la vie d'une membrane et diagnostiquer la source de ses problèmes.

Parmi les symptômes d'une membrane problématique, on peut citer :

- la chute du flux de production,
- la durée de vie écourtée,
- la consommation excessive d'énergie à la suite de l'augmentation de la PTM pour essayer de retrouver une productivité rentable lors de filtration à flux constant
- la perte en eau dans les multiples nettoyages non efficaces,
- la détérioration de la qualité bactérienne des produits,

En résumé, l'audit du colmatage doit permettre, d'une façon générale, de réaliser les actions suivantes :

1-Diagnostic du colmatage et identification de l'origine du colmatage des membranes en analysant certains facteurs du procédé de production

-Normalement, connaissant le fluide filtré, le matériau membranaire et les conditions de filtration, on doit être capable de prédire la source du colmatage. Par exemple, dans le cas de la filtration du lait écrémé sur une membrane d'UF PES/PVP de seuil de coupure 5-10 kg.mol⁻¹ à 50°C, il faut s'attendre à ce que près de 99.6% du colmatage irréversible soit dû aux protéines [4, 28, 105, 110]. En revanche, dans le cas du lait entier, en plus du colmatage par les protéines, il faut prendre en compte également le colmatage dû aux matières grasses. Les membranes minérales de même seuil de coupure et filtrant les mêmes fluides seront en plus colmatées par des minéraux. Dans le cas du traitement d'eau, où les désinfections sont moins fréquentes que dans l'industrie laitière, du colmatage microbologique (formation de biofilm) peut se développer [111,112].

-L'observation des flux peut donner des indices sur la présence du colmatage global indépendamment de la source (organique, minérale ou microbologique). La perte de la perméance, l'augmentation de la PTM, l'augmentation de la résistance de la membrane, etc. sont autant de variables mesurables/calculables qui permettent d'alerter sur la présence et l'augmentation du colmatage [113,114]. Par ailleurs, ces paramètres peuvent servir pour calculer le ratio du colmatage irréversible [114,115,116]. Ainsi, il peut être possible de suivre ce ratio, enfin d'observer son évolution au fil du temps.

-La reproductibilité du process de production indique que chaque séquence de nettoyage accomplit bien sa tâche et ramène la membrane à l'état acceptable de fonctionnement [113]. Si des flux trop faibles indiquent un colmatage résiduel, des flux trop importants peuvent indiquer la dégradation d'une membrane (augmentation de la taille des pores) et/ou son hydrophilisation [4,39,114,117].

Cependant, il faut noter que la récupération des flux d'origine n'implique pas l'absence de colmatage irréversible même après nettoyage [39,114,117,118]. Lujan-Facundo et al. [114] ont avancé que de très faibles quantités de protéines résiduelles sur la membrane n'affectaient pas le flux après un nettoyage car elles ne permettaient pas le blocage des pores. La récupération des flux à l'eau d'origine a déjà été observée en dépit de la présence des protéines résiduelles, après un nettoyage enzymatique [118], acide [117] ou alcalin [39,114,119].

Rabiller-Baudry et al. [120] ont montré que des phénomènes liés à la dégradation de la membrane par NaOCl pouvaient être compensés par le colmatage résiduel post NEP masquant l'installation d'un colmatage au fil du temps qui peut servir de point d'ancrage à un colmatage de plus en plus important.

2-Déterminer le protocole de nettoyage le plus adapté à la situation

La détermination d'un protocole de nettoyage adapté nécessite la maîtrise d'un certain nombre de facteurs. En particulier, il est utile de déterminer les conditions de production optimales en tenant compte du fluide filtré, de la membrane, des paramètres appliqués et des contraintes économiques :

- en s'assurant de la qualité de l'eau de rinçage
- en déterminant les paramètres optimaux du nettoyage (durée, fréquence, température, pH, concentration, vitesse d'écoulement ...)
- en choisissant les produits de nettoyage appropriés (efficacité vis-à-vis du colmatage visé, coûts, contraintes réglementaires ...)
- en mettant en place un protocole clair et facile à suivre pour le personnel
- en mettant en place un test de contrôle d'efficacité du nettoyage

Au niveau industriel, en principe, les membranes sont livrées avec des instructions d'exploitation et de maintenance. Dans le cas où, malgré toutes les consignes des fabricants de membranes et celles des formulateurs de détergents, l'utilisateur rencontrerait quand même des problèmes de colmatage résiduel important, celui-ci peut en général faire appel à un audit de sorte à se faire aider par des spécialistes du nettoyage des membranes industrielles.

Dans le cas d'une membrane d'UF, un audit type réalisé sur place en milieu industriel pourrait suivre les 4 étapes décrites par la **Figure I.20** :

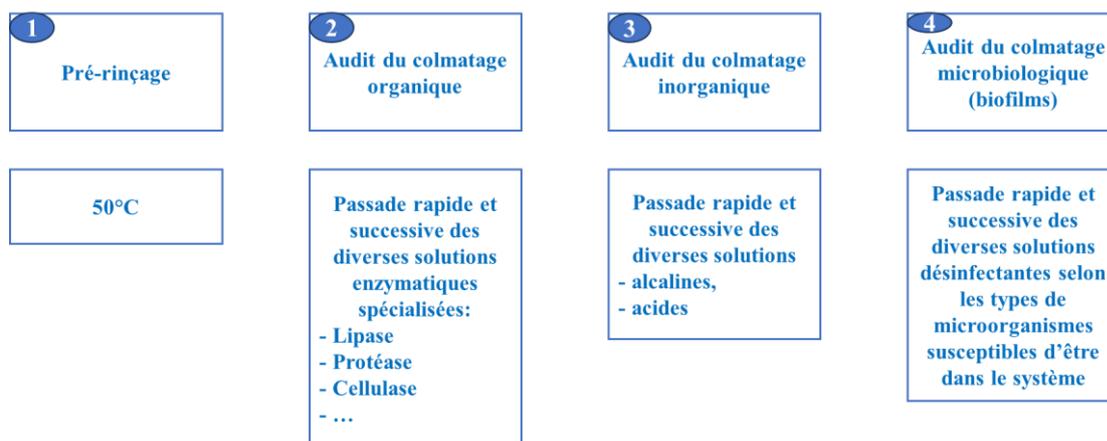


Figure I.20. Audit du colmatage : exemple d'un protocole généraliste à 4 étapes

Pour un fluide « multi-colmatant », cette méthode a un double objectif : déterminer la source du colmatage et en même temps trouver le produit qui permettrait de l'éliminer.

Chaque passage d'une solution nettoyante/désinfectante s'effectue selon les paramètres « optimaux » liés à la solution-même (concentration, pH) pendant une durée pouvant aller de 5 à 45 min. Ainsi, en 4 ou 6 heures, l'audit peut être réalisé. Dans le meilleur des cas, un protocole de nettoyage adapté peut être suggéré rapidement. Ceci implique qu'à chaque nettoyage, la validation de l'efficacité est possible et il est d'usage de se fier au flux à l'eau récupéré. Les travaux réalisés à ISCR depuis 20 ans et au cours de cette thèse, montrent que la mesure des flux à l'eau n'est pas toujours faible pour conclure sur l'efficacité du NEP.

3-Déterminer un plan de prévention du colmatage :

En identifiant le couple flux critique/PTM critique propre au système concerné, il est possible de préconiser les meilleures conditions de production pour limiter simultanément le colmatage global et le colmatage irréversible. Au-delà de ce point le colmatage irréversible est de plus en plus sévère. Il existe des études dans la littérature dans le cas du lait écrémé et de certaines membranes. Par exemple, pour la membrane en PES/PVP (HFK-131, Koch), filtrant à 50°C du lait écrémé UHT à 32 g.L⁻¹ de protéines, une pression critique autour de 1.5 bar et une pression limite à 3.5 bar ont été rapportées dans des conditions hydrodynamiques proches d'écoulement dans une membrane spirale (spacer 31 mil, vitesse tangentielle 0.3 - 0.5 m.s⁻¹) [28,110]. Il reste toujours possible d'appliquer cette méthode au modèle de la membrane étudiée pour préconiser les conditions favorables, néanmoins la filtration au flux critique implique une baisse de volume de perméat, ce qui signifie une augmentation de la surface membranaire nécessaire pour atteindre le même niveau de production.

Cette détermination est plus aisément effectuée en laboratoire que sur des installations industrielles, souvent peu flexibles. Ainsi, avec les études de validation de l'efficacité d'un protocole de nettoyage donné, les déterminations des flux critiques ont tout intérêt à être sérieusement prises en compte en amont de l'exploitation des installations industrielles.

4-Valider la propreté de la membrane

En ce qui concerne le test de validation de la propreté après nettoyage il est d'usage de se fier à la récupération des flux à l'eau d'origine (WFR, water flux recovery) (**Equation I.9**), ou à sa variante, la récupération de la résistance (**Equation I.10**) de la membrane. Ces paramètres peuvent être suivis en ligne en temps réel et donnent accès à la propreté hydraulique de la membrane.

$$\mathbf{WFR} = \mathbf{J_p / J_p^{réf}} \quad (\mathbf{Equation\ I.9})$$

Avec :

J_p : le flux à l'eau après NEP ($L.m^{-2}.h^{-1}$)

$J_p^{réf}$: le flux à l'eau de la membrane propre – avant colmatage - ($L.m^{-2}.h^{-1}$).

Dans plusieurs études de colmatage organique sur des membranes de NF ou d'UF, Song et al. [115] et Meng et al. [116] ont utilisé le ratio du colmatage réversible (RCR) et le ratio du colmatage irréversible (RCI) (**Equation I.10**, **Equation I.11**).

$$\mathbf{RCR} = \frac{\mathbf{J_p^{Post\ colmatage} - J_p^{final}}}{\mathbf{J_p^{réf}}} \times \mathbf{100\%} \quad (\mathbf{Equation\ I.10})$$

$$\mathbf{RCI} = \frac{\mathbf{J_p^{réf} - J_p^{post\ colmatage}}}{\mathbf{J_p^{réf}}} \times \mathbf{100\%} \quad (\mathbf{Equation\ I.11})$$

Avec :

$J_p^{eau\ post\ colmatage}$: le flux à l'eau après le rinçage post colmatage.

J_p^{final} : le flux dans l'eau à la fin de la série de toutes les opérations.

Lujan-Facundo et al. [114], comme de nombreux autres auteurs, se sont servis de la récupération de la résistance hydraulique de la membrane pour évaluer l'efficacité du nettoyage.

La résistance de la membrane neuve est donnée par :

$$\mathbf{R_m} = \frac{\mathbf{PTM}}{\mu \mathbf{J_p^{ref}}} \quad (\mathbf{Equation\ I.12})$$

Avec :

R_m : La résistance hydraulique de la membrane neuve mesurée dans l'eau déionisée (m^{-1})

PTM : la pression transmembranaire (Pa)

μ : la viscosité de l'eau (Pa.s)

En cours de filtration dans le lait écrémé, la résistance totale R_t se substitue à R_m et le flux dans le lait écrémé (J_p^{UF}) au flux à l'eau de référence ($J_p^{réf}$) dans l'**équation I.12**, la viscosité étant alors celle du perméat.

R_t est la somme de R_m , de R_{rev} , la résistance due au colmatage réversible (incluant la polarisation de concentration) et de R_{irrev} , la résistance due au colmatage irréversible (non éliminée par rinçage à l'eau.) (**Equation I.13**).

$$\mathbf{R_t} = \mathbf{R_m} + \mathbf{R_{rev}} + \mathbf{R_{irrev}} \quad (\mathbf{Equation\ I.13})$$

Après rinçage à l'eau déionisée, la résistance totale avant de débiter le NEP est la somme de R_m et de la résistance due au colmatage irréversible initial $R_{irrev,initiale}$ qui est resté sur la membrane

A l'issue du nettoyage, il est possible que du colmatage subsiste et, dans ce cas, la résistance totale est la somme de R_m et $R_{irrev, résiduelle}$ (colmatage irréversible résiduel)

Malgré le caractère intéressant de tous ces paramètres pour avoir des indices sur le colmatage, des études ont rapporté leurs limites en tant qu'indicateur fiable de la propreté chimique (absence des dépôts colmatants) des membranes. Ainsi il a été montré qu'il n'y a pas de corrélation systématique entre la récupération des flux d'origine et les dépôts résiduels des protéines en ce qui concerne l'UF de lait écrémé [4,6,39,117,119]. De plus, la récupération de flux supérieure à 100% a été systématiquement mise en évidence après une hydrophilisation de la membrane suite à l'adsorption de composés hydrophiles, notamment certains tensio-actifs des solutions détergentes [4,39,114,117,121,122].

Par conséquent, il est indispensable de se tourner vers d'autres méthodes permettant de valider de façon plus robuste l'efficacité du nettoyage. Si à l'échelle du laboratoire les protocoles de nettoyage peuvent être aisément validés par des méthodes d'analyses destructives telles que l'ATR-FTIR, il serait intéressant d'identifier les limites des corrélations entre le colmatage résiduel quantifiés par ATR-FTIR et les paramètres de flux afin d'avancer sur une méthode fiable transposable à l'échelle industrielle. Cependant, un tel objectif est difficile à atteindre. Ainsi, Rabiller-Baudry et al. [123] ont observé que la résistance irréversible résiduelle n'est pas corrélée à un dépôt de protéines dont la concentration sur la membrane est inférieure à $15 \mu\text{g. cm}^{-2}$.

En l'état actuel des choses, le meilleur moyen de proposer un protocole de nettoyage adapté aux industriels est, d'une part, de le valider d'abord en laboratoire en l'éprouvant à l'aide des méthodes d'analyses destructives pour caractériser le colmatage résiduel post nettoyage et, d'autre part, de suivre en ligne les indicateurs du colmatage tels qu'expliqués précédemment : le suivi du ratio du colmatage irréversible (RCI), l'augmentation de la résistance résiduelle ($R_{irrev \text{ résiduelle}}$), etc.

Dans la pratique, après un 1^{er} cycle de colmatage + nettoyage, tant que la récupération du flux à l'eau reste élevée (> 90% par rapport à la membrane vierge), on suppose que le nettoyage remplit sa mission car la « propreté hydraulique » est atteinte. Mais comme on peut le voir dans la littérature, cela ne suffit pas, notamment sur le long terme. L'accumulation lente mais progressive du colmatage irréversible peut affecter la productivité, la durée de vie des membranes et dans une certaine mesure la qualité du rétentat. Heureusement, des études continuent à être réalisées pour trouver un moyen plus efficace de caractériser le colmatage des membranes directement sur les lignes de production, notamment en développant des capteurs en ligne.

Actuellement, des efforts sont réalisés en ce sens, mais ne concernent presque que les membranes de traitement de l'eau. Deux techniques sont plus particulièrement développées : celles utilisant la mesure du potentiel zêta et plus récemment, la spectroscopie d'impédance électrique (EIS).

La mesure du potentiel zêta s'est montré être un outil fiable pour déterminer la présence de dépôts sur de petites pièces de membranes de MF, UF, NF et OI [124,125,126,127,128]. Cependant l'utilisation peut être délicate sur un module entier, en particulier en raison de la position des électrodes et de l'interprétation qui pourra être faite des signaux obtenus.

Des études ont montré l'efficacité de la spectroscopie d'impédance électrique (EIS) comme outil capable de détecter de façon précoce en temps réel et en ligne la formation du colmatage ainsi que sa structure (cake, gel, adsorption) sur des membranes d'OI et de le quantifier durant le processus de nettoyage [129]. Sim et al. [130] avaient observé que l'EIS détectait quasi instantanément tout changement à la surface de

la membrane d'OI, particulièrement avec le début de dépôts de silice, bien avant que la pression n'augmente. Ces résultats ont été exploités dans le choix du protocole de nettoyage. L'EIS appliquée à basse fréquence (10-100 Hz) est capable de détecter la formation de colmatage naissant par du sulfate de calcium bien avant la chute des flux dans le cas de membrane d'OI [131]. Cen et al. [132] ont aussi montré que l'EIS à très basse fréquence (~1 Hz) était très efficace pour détecter le colmatage organique (BSA et eau de procédé de mélasse) et inorganique (« silice ») mieux que la conductance ou la chute des flux. De plus, la SIE était aussi capable de renseigner sur le type de colmatage avec la diminution de la capacitance pour le colmatage organique, et l'augmentation de la capacitance pour le colmatage inorganique. Ces changements, selon les auteurs, correspondaient à la formation du gel par le colmatage organique et d'un cake lâche des particules de silice.

Gaedt et al. [133] ont montré des résultats EIS préliminaires pour caractériser en temps réel le colmatage sur des membranes d'UF en PES. Récemment, Tanudjaja et al. [134] ont étudié le mécanisme de colmatage de membranes d'UF en PES (10 kg.mol⁻¹ et 100 kg.mol⁻¹) et PSf (100 kg.mol⁻¹) par de la BSA à 10 g.L⁻¹. Ils ont pu démontrer que lorsque les dépôts de la BSA augmentaient, les variations du diagramme de Nyquist se décalaient à droite et la conductance diminuait. En revanche, l'accumulation de NaCl déplaçait les variations du diagramme de Nyquist vers la gauche. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Cen et al. [132].

D'autres membranes poreuses ont aussi été caractérisées par EIS. Parmi elles, on peut citer des membranes en polypropylène (PP) planes et fibres creuses. Dans cette étude, Bannwarth et al. [135] ont combiné l'EIS à la mesure de la résistance hydraulique pour caractériser avec succès l'épaisseur et la porosité de la couche du cake des particules de silice en cours de filtration.

L'EIS, grâce à sa détection quasi instantanée du début de colmatage en ligne et aux renseignements sur le type de ce dernier, pourrait servir pour déterminer la fréquence des nettoyages et aider à la définition d'un bon protocole. Des études de monitoring du colmatage en ligne appliquées à l'UF de lait écrémé avant et après nettoyage ne sauraient être de trop, mais rien n'indique qu'il y en ait déjà eu de faites. Cette technique étant en cours de validation à ISCR à la fin de cette thèse, elle n'a pas pu être abordée.

I.4. Le nettoyage en Place

Dans les industries agroalimentaires, notamment l'industrie laitière, les installations sont composées de réseaux tubulaires reliant des cuves aux différents équipements. La circulation de l'eau ou des détergents s'y effectue sans démontage des équipements. Le nettoyage est donc réalisé en place.

Le nettoyage en place (NEP ou CIP pour Cleaning In Place) inclut en général le nettoyage et la désinfection. Il est constitué de plusieurs étapes se succédant dans un ordre bien précis selon le couple membrane/fluide filtré visé [136]. La réussite d'un nettoyage dépend également des conditions de filtration pendant la phase de colmatage [39]. Le **figure I.21** présente des cascades de produits alcalins ou enzymatiques et d'acides puis d'oxydants tels que l'on peut rencontrer pour nettoyer des membranes d'UF de l'industrie laitière.

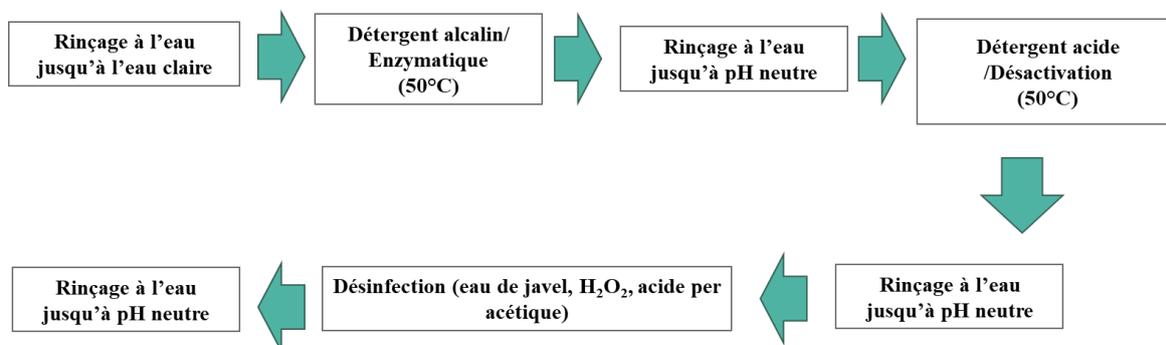


Figure I.21. Schéma de différentes étapes d'un nettoyage en place pour une membrane d'UF de l'industrie laitière.

En industrie, le cycle complet de nettoyage d'une membrane d'UF de lait écrémé sera réalisé à 50°C et suivra plusieurs étapes:

- une étape de nettoyage alcalin à pH 11.5-12.0 (pH donné à température ambiante) visant à éliminer les protéines
- une étape de nettoyage acide à pH 1.6 (en général acide nitrique) visant à l'élimination des dépôts minéraux éventuels
- une étape finale de désinfection avec de l'hypochlorite de sodium à pH 11.5 (150 ppm en Cl₂ actif).

Pour un process d'UF de lait écrémé à chaud (50°C), le NEP est réalisé toutes les 6 à 8 heures. La durée totale d'un NEP est d'environ 2 à 3 heures à raison de 30 - 60 minutes par détergent et 10 minutes (temporisation) pour les inter-rinçages à l'eau entre chaque solution [4]. Ceci représente jusqu'à 30% du temps d'utilisation des équipements. En ajoutant à cette contrainte les consommations en eau, énergie et produits chimiques, le nettoyage est une étape limitante du procédé. Pourtant, à ce jour, elle est encore gérée de façon empirique. La méconnaissance encore trop large des phénomènes fondamentaux du nettoyage, comme par exemple les origines des flux à l'eau élevés après le passage de la solution acide, floute pour de nombreux utilisateurs la lecture des résultats obtenus et leur interprétation (voir plus loin).

I.4.1. Evaluation de l'efficacité d'un nettoyage

Il y a trois sortes de propretés à atteindre lorsqu'on effectue un NEP : la propreté hydraulique, la propreté chimique et la propreté microbiologique. Chacune répond à une exigence différente et fait écho à la technique employée pour la déterminer.

I.4.1.1. La propreté hydraulique

Elle désigne la récupération de la perméance au solvant pur (ici de l'eau déionisée) à hauteur d'au moins 90 %. Ce seuil a été établi en tenant compte de la précision de mesure de 10% qui est courante à l'échelle industrielle. En dessous, la propreté hydraulique n'est pas atteinte. Ce critère est évalué simplement au moyen du WFR (**Equation I.9**) et constitue la méthode utilisée industriellement pour apprécier l'efficacité du nettoyage. Ce choix est dû au fait qu'il est facile de suivre en ligne de façon instantanée l'évolution des flux.

Mais cette façon de faire présente des limites. En effet, des études ont montré que dans le cadre de l'UF de lait écrémé, par exemple, il n'y avait pas de corrélation systématique entre un niveau élevé de récupération de perméance à l'eau d'origine après nettoyage et l'élimination effective des protéines [39,83,117,123].

Il arrive qu'après un NEP, WFR soit au-delà de 100%. Différentes interprétations peuvent alors être proposées : (i) une dégradation de la membrane et une augmentation de la taille des pores ou (ii) une hydrophilisation de la membrane due à l'adsorption d'ingrédients plus hydrophiles que la membrane elle-même. Faire la distinction entre ces deux options est un point spécialement délicat sur lequel nous reviendrons au cours de ce travail.

I.4.1.2. La propreté chimique

Elle correspond à l'absence de tout dépôt colmatant et d'impuretés résiduelles sur la membrane. Ceci concerne également les résidus de détergents utilisés pour le nettoyage. C'est une définition beaucoup plus exigeante que la propreté hydraulique et il est légitime de s'interroger sur la capacité/« souhaitabilité » réelle à atteindre un tel objectif, mais c'est un critère utile d'appréciation de la qualité du NEP.

Il existe plusieurs techniques pour évaluer la propreté chimique d'une membrane. Elles se basent sur des analyses physico-chimiques de la membrane.

Les principales techniques utilisées ont été présentées par Bégoïn [4] et reprises par Le Petit [119]. A ce jour, aucune mesure en ligne de la propreté chimique des membranes de l'industrie laitière n'existe, à notre

connaissance, bien que la mesure du potentiel zêta pourrait être une solution, ou d'un potentiel zêta apparent selon la disposition des électrodes sur le circuit hydraulique (voir plus haut). Il faut donc démonter une membrane et en faire l'autopsie (en surface et en profondeur) hors ligne (voir plus loin) pour statuer. Le résultat des analyses est toujours associé à la limite de détection de l'outil analytique utilisé.

Parfois, il peut s'agir de traces du colmatant dont la mise en évidence de si faibles quantités peut s'avérer difficile/impossible. Ainsi, lorsque l'outil de mesure ne détecte rien, il n'est pas inenvisageable qu'un résidu de colmatage reste quand même présent. En se basant sur des stratégies de cycles colmatage/NEP, on pourrait peut-être observer des accumulations dans le temps ; conséquence d'interactions physico-chimiques favorables entre les dépôts résiduels et les colmatants encore en solution ou en suspension, générant un ancrage de dépôts encore plus important [120].

Certaines techniques basées sur l'observation sont capables de localiser les dépôts sur une membrane. Par exemple, en utilisant des colorants spécifiques de certains colmatants, comme les protéines. L'imagerie MEB ou l'AFM peuvent rendre compte de la présence de dépôts importants [83,137,138,139,140,141,142]. Cependant, pour permettre à la fois la localisation, l'identification et la quantification du colmatage, il est nécessaire de suivre l'une des deux stratégies suivantes :

- a) Utiliser une technique qui retire intégralement la souillure de la membrane pour la placer dans une solution qui sera ensuite analysée.
- b) Effectuer une analyse de la souillure à même la membrane.

La stratégie a) suppose que toute la souillure soit relarguée en solution, ce qui est compliqué à démontrer et toujours plus ou moins sujet à caution. Des techniques telles que la mise en solution par application d'ultrasons, l'extraction par un solvant ou un tensioactif ... peuvent être utilisées pour cette opération. Ensuite, l'analyse/dosage peut s'effectuer moyennant des techniques globales telles que la DCO (demande chimique en oxygène) ou séparatives comme l'HPLC (RP-HPLC, SEC exclusion par la taille), IEX ou la chromatographie en phase gazeuse, par exemple.

En ce qui concerne la stratégie b), le premier défi réside dans la mise en évidence des résidus du colmatage (organique et/ou minéral) en faible quantité sur une membrane (organique ou minérale). En effet, lors de l'analyse, c'est la membrane qui fournit l'essentiel du signal. Il faut donc pouvoir identifier et écarter les possibles interférences entre le signal de la membrane et ceux des colmatants recherchés. Parmi ces techniques, on peut citer la DRX, la Fluorescence X, l'EDX (energy dispersive X-ray spectrometry), la FTIR (spectroscopie infrarouge), la mesure d'angle de contact, la mesure du potentiel d'écoulement. Toutes ces techniques ont été largement décrites dans les thèses précédentes au laboratoire [4,6,28,119]. Elles sont toutes aptes à démontrer la présence de colmatants mais toutes ne sont pas quantitatives. Dans ce travail, l'outil exploité est l'ATR-FTIR (spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier, en mode réflexion totale atténuée) qui est quantitative et facile d'utilisation en routine une fois l'étalonnage établi. Ainsi, les détails de cette dernière technique seront les seuls présentés plus en détail dans ce travail dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

I.4.1.3. La propreté microbiologique

Elle concerne l'absence de micro-organismes vivants sur/dans la membrane. L'étape de désinfection vise à les tuer mais pas obligatoirement à les éliminer du système. Les micro-organismes morts ne constitueraient pas de risque de contamination. Leur présence pourrait cependant limiter les flux des membranes.

La propreté microbiologique est suivie grâce à des tests microbiologiques réalisés sur le rétentat et le perméat en fin de NEP/désinfection. Cependant, elle peut aussi être déterminée en ligne en suivant la consommation du désinfectant oxydant tel que le chlore pour le cas de l'UF. Si la consommation en

désinfectant est nulle, la propreté microbiologique est jugée atteinte. Cependant, s'il y a des zones mortes dans les installations, celles-ci ne sont probablement pas touchées par les solutions détergentes/désinfectantes et peuvent constituer un réservoir de microorganismes vivants pouvant contaminer la production ultérieurement. Cette question d'ordre hygiénique a largement été discutée dans un certain nombre d'études [105,143,144] et fait l'objet d'études continues pour repousser les limites actuelles.

Il faut noter que la consommation de chlore peut également renseigner sur l'élimination du colmatage organique qui n'aurait pas été éliminé par les détergents avant l'étape de désinfection. Le chlore contribue au polissage du nettoyage et élimine aussi efficacement les dépôts protéiques [6,145].

Dans le cadre de ce travail, seule la propreté hydraulique et la propreté chimique seront évaluées.

I.4.2. Problématique du relargage des constituants des solutions détergentes et/ou désinfectantes après rinçage

En dépit des questions que cela suscite au sein du milieu industriel, le relargage des constituants des solutions détergentes dans les fluides à filtrer reste très peu étudié. En effet, pour la qualité du produit et la sécurité du consommateur, il est impératif qu'ils ne se retrouvent pas dans le produit à filtrer qui sera ensuite valoriser.

Un mauvais rinçage post-nettoyage pourrait laisser des résidus de détergents dans les équipements. En outre, des ingrédients des détergents sont susceptibles de s'adsorber, plus ou moins réversiblement, sur la membrane comme certains tensioactifs [119] ou sur des résidus du colmatage protéique comme certains anions [117]. Même infimes, si ces composés se libèrent lors de l'étape de filtration du lait, par exemple, ils soulèveront la question des risques pour le consommateur. Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas encore de moyen sûr de quantifier le relargage (s'il existe), mais une proposition méthodologique a été faite pour aborder ce point dans le cadre du nettoyage chimique des membranes d'UF (PES/PVP) colmatées par du lait écrémé [119]. En revanche, une marge de manœuvre consiste à s'assurer que les produits détergents soient formulés avec des ingrédients agréés comme additifs alimentaires et ainsi éviter le risque au maximum. C'est une question essentielle de santé publique.

I.4.3. Nettoyage en place appliqué à l'UF de lait écrémé

Le colmatage par du lait écrémé UHT sur une membrane d'UF en PES/PVP réalisée à 2 bar, 50°C, provoque la formation d'un gel de protéines facilement éliminé par rinçage à l'eau (colmatage réversible). Ce gel est lui-même déposé sur une couche protéique adhérente à la membrane (colmatage irréversible) [106,123,146] (Figure I.22).

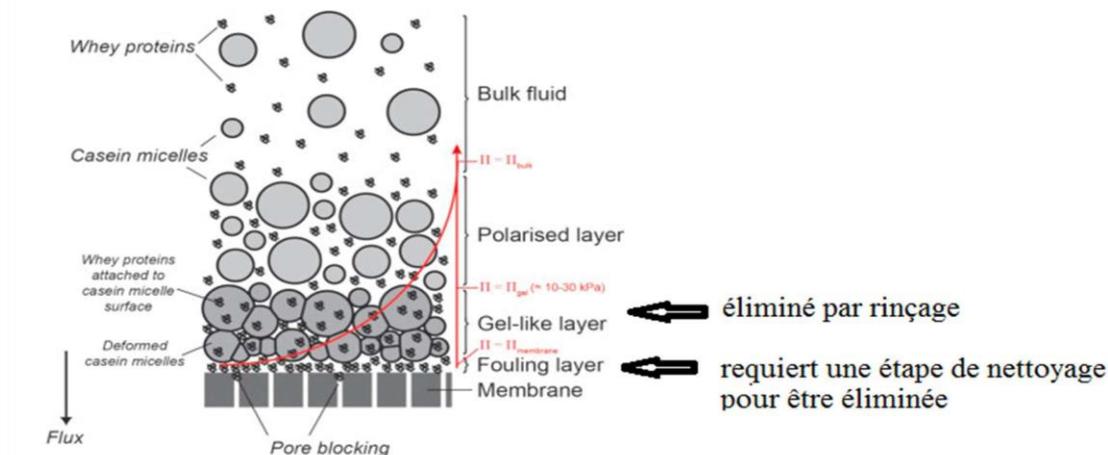


Figure I.22. Différentes couches de colmatage par du lait écrémé [147]

Il est à noter que l'hydrophilie de la couche active d'une membrane est un atout anti-colmatage. Plus une membrane est hydrophobe, plus l'adsorption des protéines sur la membrane sera élevée [114,134,148,149]. Néanmoins les protéines se déposent sur tout type de surface.

La cible du nettoyage en place des membranes d'UF de lait écrémé est le colmatage irréversible resté sur la membrane après l'arrêt de l'UF de lait écrémé et le rinçage à l'eau (Figure I.23).

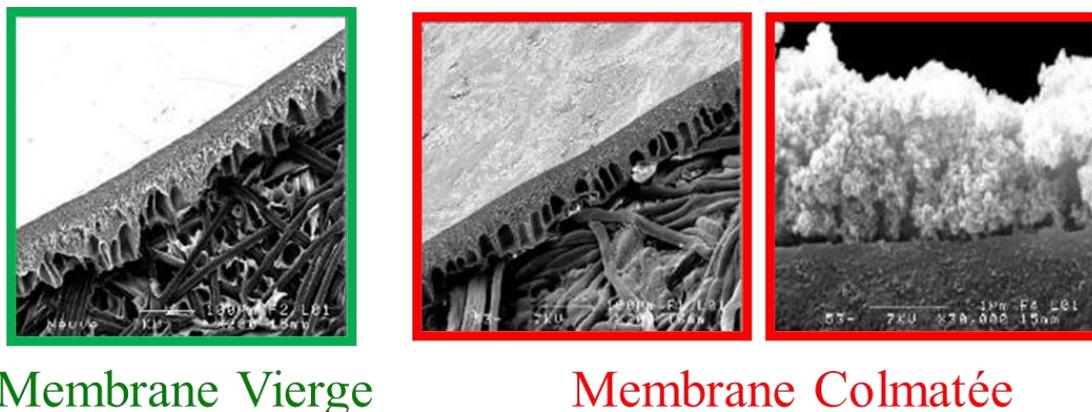


Figure I.23. Photo MEB de la couche du colmatage protéique sur la membrane après l'UF de lait écrémé à 50°C et le rinçage à l'eau en comparaison d'une membrane vierge [146]. Le colmatage irréversible initial a une épaisseur de l'ordre de 1 µm.

La nature chimique du colmatage dépend, entre autres, de la nature de la membrane. Dans le cas des membranes d'UF MWCO = 5-10 kg.mol⁻¹, le colmatage irréversible initial est constitué de protéines [4].

Une autopsie réalisée sur une membrane industrielle en fin de vie après un dernier NEP avant analyse a mis en évidence que le colmatage résiduel était constitué à 99.6% (pourcentage atomique) de matière organique et seulement à 0.4% de minéraux [4,105].

L'absence de minéraux dans le colmatage irréversible initial (après un seul cycle d'UF de lait écrémé + rinçage sur membrane neuve et avant NEP) a depuis été reproduite dans la même équipe, indépendamment du fait que le lait écrémé soit UHT, pasteurisé ou de qualité « low-heat ».

La thermodynamique joue un rôle dans l'adsorption des protéines sur les membranes, cependant, leur identification reste compliquée. Des mesures de potentiels d'écoulement réalisées tangentiellement à la surface des membranes colmatées ont mis en évidence la coïncidence entre le pI de la membrane colmatée et celui de la β -lactoglobuline [146], suggérant qu'elle pourrait être le colmatant irréversible initial majoritaire. De même, puisque l' α -lactalbumine est la seule protéine à pouvoir traverser la membrane vers le rétentat, et que les mesures de potentiel d'écoulement à travers les pores montrent un pI qui coïncide avec celui de l' α -lactalbumine, il apparaît logique de considérer que cette protéine est celle qui colmate l'intérieur des pores [146]. La forte présence de protéines en surface de la membrane et la très faible présence de protéines en profondeur (dans les pores) a été montrée par microscopie Raman [120].

Une review récente parue en 2017 [85] abonde dans le sens du colmatage par des protéines sériques et rapporte que ce sont préférentiellement ces dernières qui s'adsorbent étant donné leur capacité à changer de conformation tertiaire, contrairement aux micelles de caséines qui, en raison d'une forte présence de proline (acide aminé) dans leur structure, ont peu de possibilités de réduction d'énergie.

Diagne et al. [39] ont démontré que l'efficacité du nettoyage dépend des conditions de colmatage, indépendamment de la solution détergente employée. Ainsi, le nettoyage est plus efficace lorsque le colmatage a été réalisé au flux critique plutôt qu'au flux limite ; en outre une solution détergente efficace peut voir son potentiel annihilé si elle est mal utilisée.

Il est à noter que les membranes dégradées par NaOCl, correspondant à des membranes en milieu de vie à l'échelle industrielle, se sont avérées plus difficiles à nettoyer que des membranes neuves [109], en particulier parce qu'elles sont susceptibles de connaître un colmatage en profondeur plus important par l' α -lactalbumine qui y pénétrerait grâce à sa taille plus petite [85,123].

Finalement, que les membranes d'UF PES/PVP soient neuves ou vieilles en conditions d'utilisation industrielle, la cible reste la même : les protéines, il n'y a pas de minéraux ni de biofilm sur les membranes.

Fondamentalement, il existe deux stratégies pour éliminer un tel dépôt : le NEP chimique et le NEP enzymatique. Ces deux approches nécessitent la formulation de détergents complexes qui va être expliquée dans la suite de ce chapitre en deux parties compte tenu des différents mécanismes de nettoyage associés à ces différents détergents.

I.5. Mécanismes généraux du nettoyage

Pour comprendre le cahier des charges pour formuler des détergents efficaces, il est nécessaire de comprendre les mécanismes du nettoyage. Une partie est commune au NEP chimique et au NEP enzymatique et est décrite dans cette partie.

Pour assurer la propreté des surfaces, il est nécessaire d'appliquer des forces d'arrachements supérieures aux forces d'adhésion des souillures. Pour cela, le recours aux détergents et à la chaleur permet la diminution des forces de cohésion entre les supports et les souillures. Ceci rend plus aisé l'arrachement des souillures lorsqu'elles sont soumises à un cisaillement produit par l'écoulement du fluide dans les équipements fermés [150].

Divers mécanismes participent au processus d'élimination des souillures. Parmi eux [151,152,153] :

Le gonflement du dépôt : lorsque la solution alcaline entre en contact avec le dépôt protéique, elle provoque un gonflement de celui-ci qui est une conséquence de la répulsion des charges négatives des protéines et permet l'hydratation plus facile du dépôt.

L'érosion du dépôt : ce phénomène décrit la suppression uniforme de dépôts par les forces de cisaillement suivant une diffusion progressive du détergent dans le cœur de la souillure.

La désintégration du dépôt : c'est lorsque le dépôt est éliminé par paquets plus ou moins importants ou qu'il est dissous dans la solution détergente.

La désincrustation du dépôt : lorsqu'il reste en surface des éléments des souillures initiales qui vont subir l'action du détergent davantage que l'action mécanique, le choix du détergent se révèle ici très important pour éviter des temps de nettoyage trop longs. Ce phénomène a été démontré pour les biofilms de bactéries [154].

Ces mécanismes complexes dépendent de paramètres divers, liés au dépôt lui-même, à l'environnement physico-chimique et à la surface de contact ainsi qu'à l'hydrodynamique. Les paramètres relevant de la physico-chimie et de la mécanique des fluides permettent une marge de manœuvre pour agir sur les mécanismes de nettoyage [150].

En d'autres termes, les détergents chimiques/enzymatiques (par une action chimique/hydrolyse) et la température (par une action thermique) provoquent un affaiblissement de l'adhésion des souillures sur la membrane. La circulation d'un fluide (eau ou solution détergente) provoque un cisaillement qui emporte les souillures préalablement détachées par le détergent et la chaleur.

Il faut donc que la combinaison « cisaillement du fluide nettoyant + capacité d'affaiblissement des forces d'adhésion/cohésion souillure-support » soit plus importante que la force de cohésion souillure-support pour que l'arrachement soit effectif.

Cela signifie, qu'il est possible de jouer sur la cinétique d'écoulement (vitesse, turbulence, mouillabilité, surface de contact, etc.) et la tension de surface et le pouvoir hydrolysant, oxydant... d'un détergent pour optimiser un nettoyage.

Différents facteurs impactent l'efficacité d'un détergent.

I.5.1. Equilibre entre les différents facteurs du nettoyage

Un nettoyage réussi atteint les objectifs de propretés hydraulique, chimique et microbiologique en vue de rétablir une perméance élevée (productivité), une efficacité visée par l'application (sélectivité) ainsi que la sécurité hygiénique. Il est également nécessaire d'optimiser la fréquence de nettoyage, car il implique la consommation d'eau, de produits détergents, d'énergie, et implique un temps de non-production. De plus, chaque nettoyage expose la membrane aux conditions pouvant impacter son intégrité et favoriser une dégradation plus ou moins rapide. De ce point de vue, on peut convenir qu'un nettoyage réussi est un compromis entre certains facteurs (**Figure I.24**).

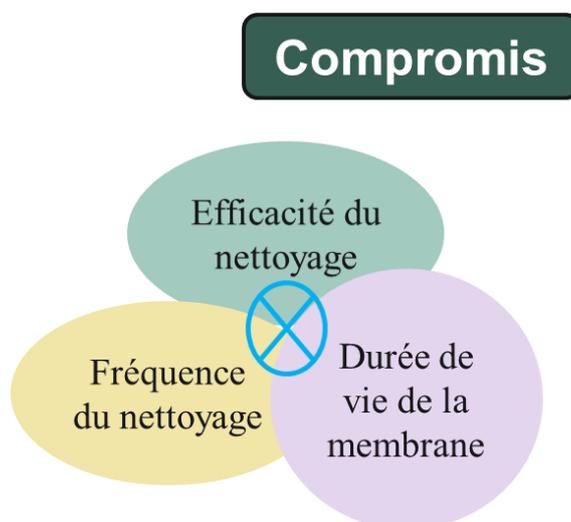


Figure I.24. Compromis pour un nettoyage réussi

La propreté chimique, au-delà des résidus de colmatage du fluide filtré, implique aussi qu'il ne doit pas y avoir de résidus des produits nettoyants. Cependant, l'expérience a montré qu'il reste toujours des résidus. Ainsi, une évaluation doit être effectuée avec les protocoles préconisés afin de valider que les doses de résidus sont en dessous des doses maximales acceptables. Au-delà, cela ne serait pas acceptable ni du point de vue de la qualité du produit ni du point de vue de la question de toxicité pouvant impacter le consommateur.

D'un point de vue expérimental, la réussite d'un nettoyage dépend de la membrane et des conditions de filtration, que ce soit lors du colmatage ou du nettoyage. Ces conditions incluent : le fluide filtré et son niveau de concentration ; le FRV (facteur de réduction volumique lors du colmatage) ainsi que les détergents (pour le nettoyage), la température de filtration, la durée, la vitesse de recirculation ainsi que la pression. Il est aussi important de tenir compte de la qualité de l'eau utilisée lors de toutes ces opérations.

I.5.2. La détergence

La détergence est un processus selon lequel des salissures sont détachées de leurs substrats et mises en solution ou dispersées. La mise en solution/dispersion est le résultat de phénomènes physico-chimiques survenant aux interfaces du système : support/souillure/détergent [155]. L'efficacité des détergents formulés est jugée sur un certain nombre de critères :

- **la récupération de la propreté** : propreté chimique, hydraulique et microbiologique
- **l'innocuité par rapport à la membrane** : absence de dégradation et/ou de vieillissement accéléré du matériau membranaire.
- **l'innocuité par rapport au fluide produit** : ici, le lait écrémé) : absence des composants du détergent dans le lait filtré...

La détergence comporte trois principaux mécanismes qui sont :

- 1) Le mouillage : Le mouillage total de la souillure n'est possible que si la tension superficielle du détergent est inférieure à la tension superficielle du dépôt. Ceci signifie que l'angle de contact détergent-souillure doit idéalement être égal à zéro. C'est là que les agents tensioactifs sont utiles, car ils permettent de diminuer la tension superficielle de l'eau depuis 73 mJ.m^{-2} vers 30 à 40 mJ.m^{-2} [4].
- 2) Le déplacement de la souillure : Lorsque le détergent entre en contact avec la souillure, la force d'adhésion entre cette dernière et le détergent doit être supérieure à la force existante entre la souillure et la membrane pour qu'il y ait arrachement. Une fois la souillure mouillée, l'étape d'après consiste donc à l'éloigner de la surface à nettoyer. Pour cela, les tensioactifs du détergent peuvent s'adsorber sur la membrane afin de diminuer l'attraction souillure/membrane et permettre l'arrachement de la souillure. Dans le cas d'un NEP chimique, la souillure peut être le composé initialement présent sur la membrane ou un de ses composés de dégradation. Dans le cas d'un NEP enzymatique, c'est un hydrolysat qui sera déplacé.
- 3) L'anti-re-déposition : Afin d'empêcher la re-déposition de la souillure à la surface de la membrane, l'intervention de plusieurs phénomènes est nécessaire qui peuvent comprendre
 - des réactions chimiques qui favorisent la solubilisation des souillures intègrent ou dégradées puis leur émulsification avec l'action des tensioactifs du détergent. Une émulsion stable peut être favorisée par des agents anti-re-déposition.
 - des phénomènes physico-chimiques au cours desquels des agents dispersants sont utiles pour éviter la formation d'agrégats/agglomérats et leur sédimentation. C'est en s'adsorbant à l'interface solide/liquide que l'agent dispersant réduit le niveau d'énergie entre les particules [155]. Ensuite, l'agglomération des particules est empêchée par l'effet électrostatique répulsif ou stérique, voire la combinaison des deux selon la nature des tensioactifs.

Ainsi, selon le type d'action des ingrédients dans le détergent, ceux-ci peuvent être regroupés en deux catégories : (i) ceux qui permettent une action chimique : les bases, acides, séquestrants, enzymes... et (ii) ceux qui permettent une action physico-chimique : les tensioactifs. Ces derniers apparaissent donc indispensables.

I.5.3. La qualité de l'eau

Comme on peut le constater, l'eau est présente dans toutes les étapes du nettoyage. Elle est incluse aussi bien dans la préparation des solutions détergentes que dans les rinçages. Il convient donc de s'assurer de sa bonne qualité afin d'éviter qu'elle soit, elle-même, source de colmatage. Par exemple, les silicates de

calcium et de magnésium étant très stables, ils peuvent facilement précipiter à la surface et dans la profondeur de la membrane. Les fabricants de membranes fournissent généralement un cahier des charges précisant la qualité de l'eau à utiliser. Par exemple, il est préconisé d'avoir une faible teneur en silicate ($\text{SiO}_2 < 10 \text{ ppm}$) [6].

Bien que prétraitée, l'eau de forage utilisée par certains industriels pour les différentes étapes de nettoyage des membranes peut participer au colmatage minéral qui s'ajoute au colmatage du fluide filtré [105].

Il est également important de tenir compte de la teneur globale en sels, car celle-ci a un impact sur la concentration micellaire critique (CMC) des tensioactifs.

Différents autres facteurs impactent l'efficacité d'un détergent et vont être décrits maintenant.

I.5.4. Le rôle de la température

La participation de la température dans le mécanisme de nettoyage consiste en :

1°) la diminution de la viscosité de la solution détergente, ce qui permet une diffusion plus rapide du détergent vers le cœur de la souillure [156].

2°) l'accélération de la vitesse des réactions entre le détergent et la souillure [157].

Cependant, une température trop élevée peut engendrer des réactions secondaires indésirables entre le détergent et les matériaux des équipements nettoyés.

Il faut donc trouver un équilibre entre une température qui préserve les équipements mais trop faible et rend le nettoyage trop long et donc économiquement non intéressant et une température trop élevée qui favorise un nettoyage rapide mais endommage les équipements.

A noter que des températures inférieures à 40°C favorisent des réactions de gélification entre les protéines et le détergent (gel protéique) rendant le nettoyage impossible dans le cas des stérilisateurs de lait UHT [158].

La limite de stabilité en température de la membrane PES/PVP étudiée ici (forme spirale englobant la problématique de la colle pour maintenir l'enroulement) est 50°C bien que le polymère de base puisse résister jusqu'à 80°C.

I.5.5. L'action mécanique

Dans le mécanisme de nettoyage, l'action mécanique repose sur le cisaillement et les turbulences fournis par le flux du fluide circulant. Un cisaillement fort favorise le nettoyage. Ainsi, la géométrie des membranes a un impact sur la nettoyabilité (existence de plus ou moins de zones mortes, existence de turbulences associées à des espaceurs par exemple).

Un débit pulsé peut avoir un effet significativement positif sur la cinétique globale du nettoyage, mais pas sur la première phase qui consiste en le gonflement de l'encrassement. Ceci indique que l'optimisation de l'association des paramètres que sont la fréquence et l'amplitude des pulsations peut être bénéfique.

I.5.6. Influence de la géométrie des membranes

La géométrie des membranes joue un rôle important dans la distribution des flux (l'hydrodynamique), ce qui impacte le colmatage. Pour approcher ce qui se passe dans une membrane spirale, Rabiller-Baudry et collaborateurs ont adapté les conditions de filtration dans un module plan en diminuant la vitesse vers 0.3-0.5 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ par rapport à des conditions classiques pour l'utilisation de tels modules ($> 1-2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) et en ajoutant des espaceurs dans la veine liquide. Ils ont considéré que les conditions de transposition module plan/module spirale étaient atteintes lorsque les flux dans le lait écrémé étaient les mêmes dans les deux géométries. Par la suite, Delaunay et al. [106] ont mis en évidence le rôle de l'espaceur rétentat pour l'UF

sur membrane plane en PES ($10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$). Lorsque l'UF du lait écrémé était réalisée avec un espaceur rétentat installé dans la veine liquide du module, il y avait moins de colmatage global (gel plus fin) et moins de colmatage irréversible initial et sa distribution était plus homogène sur toute la surface de la membrane. A l'opposé, la filtration sans espaceur avait montré un gel plus épais pour le colmatage global et un colmatage irréversible initial plus important dans la zone à faible vitesse de recirculation.

Rabiller-Baudry et al. [107] ont démontré qu'en condition de filtration au-delà du flux critique, la vitesse de recirculation tangentielle et la turbulence (fonction de la géométrie de l'espaceur rétentat) influent davantage sur la cartographie des dépôts et l'ampleur du colmatage irréversible sur la membrane spirale que ne le fait la PTM. Ces travaux ont conclu qu'il était possible d'étudier le gradient de vitesse dans les membranes spirales à partir de la connaissance des dépôts si ceux-ci étaient réalisés dans des conditions adéquates.

I.5.7. L'influence du vieillissement de la membrane

Le NEP chimique en industrie est suivi d'une étape de désinfection consistant en un passage d'une solution oxydante aux propriétés biocides, en général NaOCl à environ 150 ppm en Cl_2 actif, puis d'un rinçage à l'eau. Le but de cette étape est d'assurer la propreté microbiologique des équipements.

Bien que largement utilisé comme désinfectant, il a été montré que NaOCl est aussi un agent nettoyant efficace, et que dans la séquence nettoyage/désinfection il agit aussi pour polir le nettoyage alcalin précédent en éliminant une partie du colmatage résiduel post NEP [109,120,145]. Cependant, selon les mêmes auteurs, le NaOCl induit sans ambiguïté la diminution progressive de la résistance hydraulique de la membrane, ce qui favorise l'augmentation du colmatage irréversible lors des filtrations suivantes [109,120] et augmente les difficultés de nettoyage. Ainsi, ces auteurs préconisent un nettoyage adapté en fonction de l'âge de la membrane, qui à ce jour ne peut être évalué qu'en termes de dose cumulée de NaOCl reçue par la membrane [120]. Lujan-Facundo et al. [114] ont également observé une augmentation du colmatage irréversible avec la baisse de la résistance des membranes d'UF en PES (5 kDa et 30 kDa) lors de l'ultrafiltration d'une solution de BSA (1% w/w, pH 7.5, 2 bar, $2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, 2 h).

Tout comme l'hydrophilisation de la surface de la membrane par des agents surfactants, la dégradation et le vieillissement peuvent se compenser mutuellement de façon transitoire et donner, à tort, l'impression de la récupération des flux à l'eau d'origine [120]. L'idéal serait de réaliser la désinfection avec des solutions qui ne soient pas aussi délétères que le NaOCl pour la membrane.

I.6. Formulation de détergents

Les spécificités des détergents chimiques ainsi que celles des détergents enzymatiques sont décrites dans cette partie. La **figure I.25** résume et compare la composition typique de détergents formulés.

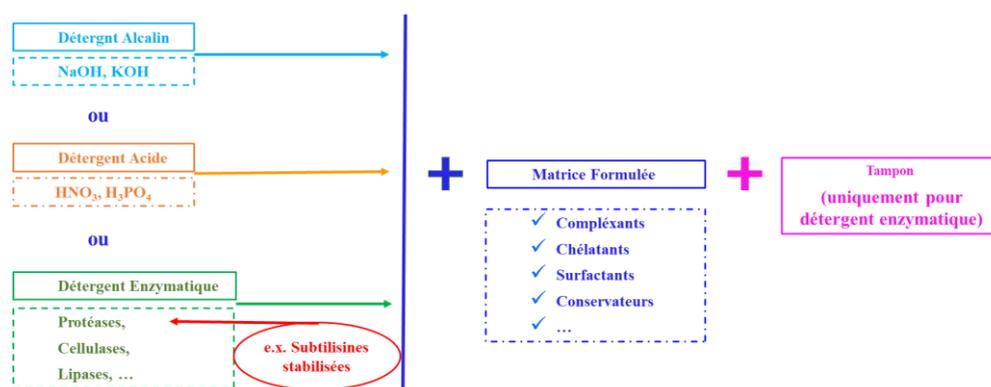


Figure I.25. Eléments constitutifs d'un détergent chimique ou enzymatique formulé

I.6.1. Détergents chimiques

On parle de NEP chimique lorsque le nettoyage est réalisé avec des produits chimiques autres que les enzymes. Ainsi, on retrouve des solutions détergentes alcalines à base de NaOH ou KOH et des solutions acides à base de HNO₃, H₃PO₄... Ces composants peuvent être utilisés seuls en solution ou accompagnés d'un ou plusieurs tensio-actifs, agents complexants, conservateurs... Tous ces ingrédients ont pour but d'améliorer l'efficacité du nettoyage.

Les acides servent à dissoudre les matières minérales. Les bases agissent sur les matières organiques dont les protéines sans les hydrolyser pour des NEP de 1 h à 50°C [4]. Les tensioactifs sont des constituants incontournables des détergents alcalins et seront plus spécialement détaillés ici, de même que les agents complexants et les conservateurs.

I.6.1.1. Tensioactifs

a) Généralités

Les tensioactifs, aussi appelés agents de surface ou surfactants, sont des composés amphiphiles (c'est-à-dire qui présentent deux parties de polarité différente). Ils sont composés d'une tête hydrophile (attirée par l'eau) et d'une chaîne hydrophobe (attirée par les graisses) (**Figure I.26**).

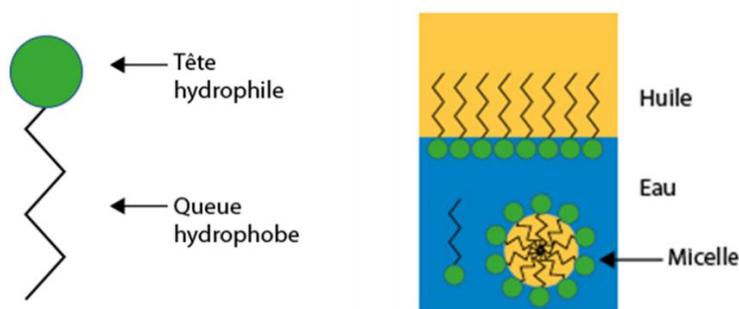


Figure I.26. Tensioactifs et formation de micelles

Au-delà de la CMC (concentration micellaire critique), un tensioactif en solution s'organise en agrégats sphériques de molécules possédant une tête polaire hydrophile orientée vers le milieu où se trouve la phase aqueuse (extérieur si la phase continue est aqueuse) tandis que les chaînes hydrophobes interagissent entre elles au cœur de la micelle.

On observe la forme monomère de tensioactifs en dessous de la CMC, tandis qu'au-dessus, la quantité de tensioactifs présente en solution est constante et la formation de micelles est provoquée par le moindre ajout supplémentaire du tensioactif (**Figure I.27**).

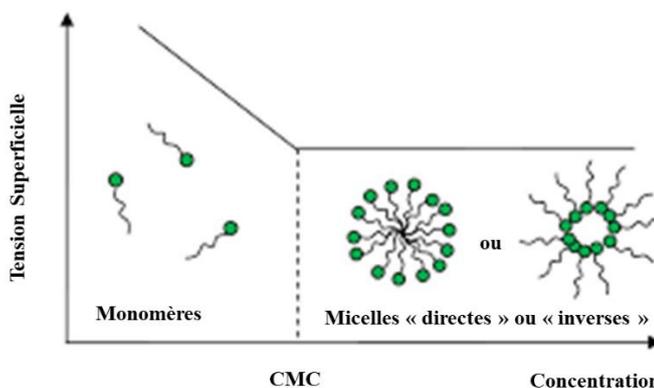


Figure I.27. Formation de micelles en fonction de la CMC

Par ailleurs, les tensioactifs agissent sur le pouvoir mouillant d'une solution. Le pouvoir mouillant permet l'entrée en contact entre la surface à nettoyer (et, par extension, la salissure) et l'eau (en d'autres termes, la solution détergente). Ainsi, la solution nettoyante peut pénétrer le dépôt, s'étaler sur sa surface et couvrir la surface à nettoyer. En cours de nettoyage, les micelles de tensioactifs qui se forment piègent les salissures hydrophobes en leur centre (**Figure I.28**).

Au cours du nettoyage, les tensioactifs agissent en trois étapes : 1) l'adhésion/adsorption à la surface du matériau et de la salissure à éliminer, 2) la séparation/détachement et 3) la répulsion par formation des micelles (**Figure I.28**).

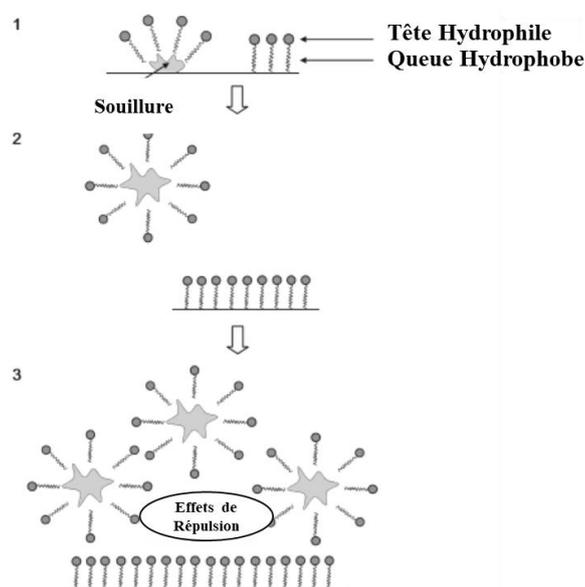


Figure I.28. Mécanisme d'action des tensioactifs [162]

Les tensioactifs (TA) peuvent jouer différents rôles en fonction de leur balance hydrophile/lipophile (HLB, Hydrophilic/Lipophilic Balance). La HLB permet de quantifier l'équilibre existant entre la partie hydrophile et la partie lipophile d'un tensioactif. Elle est corrélée à sa solubilité dans l'eau (**Figure I.29**).

Ainsi, les TAs sont capables d'agir comme détergent, d'être utilisés comme agent moussant, ou de servir de solubilisant, mouillant, émulsifiant, dispersant ou encore antiseptique selon leur HLB [163,164].

Il existe différentes approches pour calculer la HLB.

Parmi elles, la méthode de Griffin est spécifique aux tensioactifs non-ioniques éthoxylés [163,164] :

$$HLB = [(MW_{\text{fragments polaires}})/(MW_{\text{tensioactifs}})] \times 100/5 \quad (\text{Equation I.14})$$

La méthode proposée par Davies est applicable aux TA ioniques [165] (**Equation I.15**, **Tableau I.9**) :

$$HLB = \sum HLB \text{ de groupes hydrophiles} - \sum HLB \text{ groupes hydrophobes} + 7 \quad (\text{Equation I.15})$$

C'est une méthode basée sur la contribution de «groupes» (**Tableau I.9**).

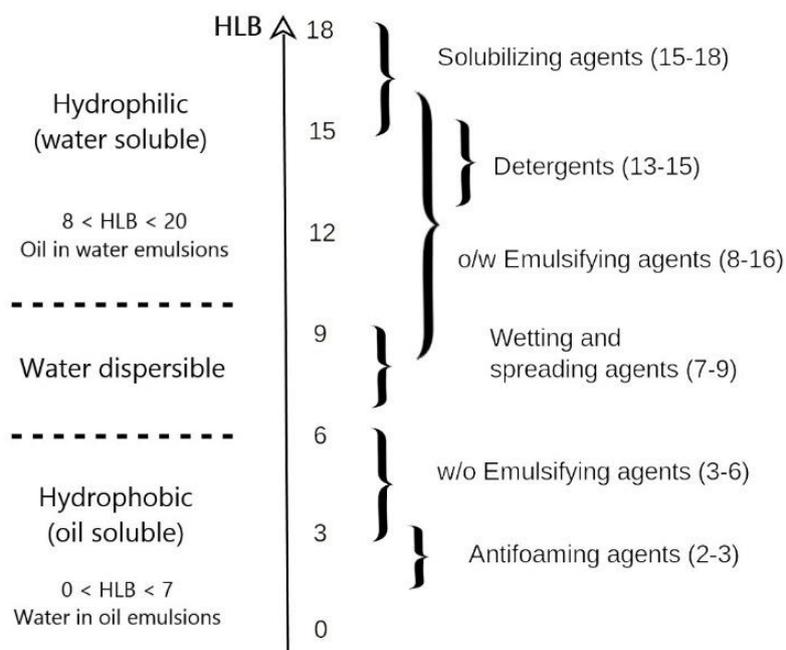


Figure I.29. Fonction des tensioactifs selon la valeur de la HLB (ici entre 0 et 18)

Tableau I.9. HLB de certains groupements chimiques [165] pour le calcul par la méthode de Davies.

Hydrophilic group	HLB	Lipophilic group	HLB
-SO ₄ Na	38.7	-CH-	-0.475
-COOK	21.1	-CH ₂ -	
-COONa	19.1	-CH ₃ -	
Sulfonate	~ 11.0	-CH=	-0.15
-N (tertiary amine)	9.4	-(CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-)	
Ester (sorbitan ring)	6.8		
Ester (free)	2.4		
-COOH	2.1		
-OH (free)	1.9		
-O-	1.3		
-OH (sorbitan ring)	0.5		

Différentes méthodes de détermination de la CMC d'un tensio-actif ou d'un mélange de tensio-actifs existent. Parmi elles, les plus courantes sont la tensiométrie (pour tous) et la conductivité (uniquement pour les tensioactifs chargés).

En effet, la tension de surface diminue jusqu'à atteindre un plateau lorsque la concentration de la solution augmente (**Figure I.30**). Certains facteurs jouent sur la diminution de la CMC et provoquent une augmentation de la tension de surface. Par exemple, l'ajout de sel dans une solution de tensioactifs implique une augmentation de la force ionique, ce qui a pour conséquence de diminuer la CMC par écrantage des charges dans le cas d'un tensioactif ionique. La CMC doit donc être donnée en précisant la température, la force ionique et le pH de la solution.

On utilise aussi la turbidité, la fluorescence, la colorimétrie pour déterminer la CMC.

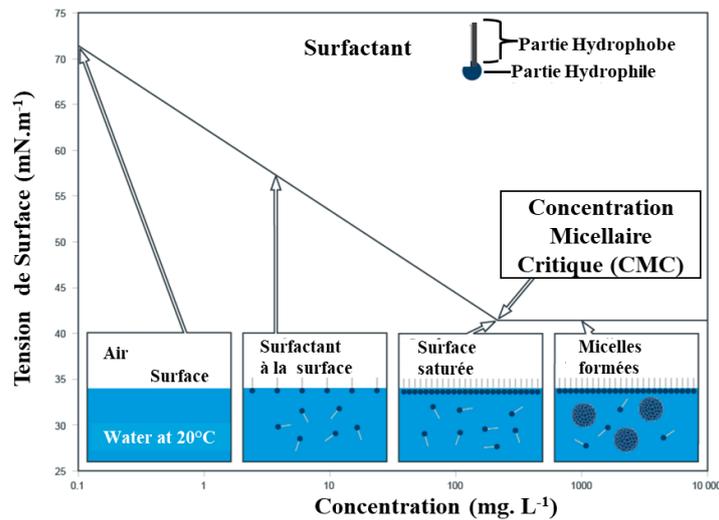


Figure I.30. Détermination de la CMC par la mesure de la tension de surface

b) Les classes de tensioactifs

Il existe quatre classes générales de tensioactifs : anioniques, non ioniques, cationiques et amphotères (Tableau I.10).

Les tensioactifs anioniques ont une charge négative lorsqu'ils sont dissociés dans l'eau et sont le plus souvent vendus sous forme de sels de sodium, de potassium ou d'ammonium. Ils constituent le groupe le plus important avec une production mondiale de 55% et sont surtout utilisés en tant que détergents, moussants et émulsifiants [119]. Leurs têtes, polaires, sont souvent des fonctions carboxylates, sulfates ou sulfonates. L'exemple peut être donné du « sodium dodecyl sulfate » (SDS) qui est représentatif des tensioactifs sulfates. Il a pour propriété d'être très soluble et de se rincer facilement. Ainsi, il est couramment utilisé comme tensioactif modèle dans les études académiques [84,166]. Un autre exemple est celui du « sodium dodecylbenzene sulfonate » (SDBS), un alkylbenzène sulfonate très utilisé dans les NEP des membranes d'UF polymères de l'industrie laitière, tel qu'en témoigne la fiche de données de sécurité du produit Ultrasil 10 (Ecolab) par exemple. Cependant, les propriétés moussantes des tensioactifs anioniques constituent leur inconvénient majeur, car à l'échelle industrielle, il peut s'avérer très difficile de gérer les mousses lors des nettoyages.

Les tensioactifs anioniques s'adsorbent logiquement sur les surfaces chargées positivement. Cependant, une étude a montré que le SDS s'adsorbait aussi sur une membrane polymère en PES chargée négativement et qu'il en modifiait la balance hydrophile/hydrophobe. La surface devient ainsi plus hydrophile que la membrane vierge. Par conséquent, le flux à l'eau de la membrane modifiée augmente [123]. De même, il a été démontré que le SDS était capable de colmater une membrane d'OI en polyamide [166], elle aussi chargée négativement.

Les tensioactifs non ioniques (25% de la production mondiale) sont des tensioactifs qui sont neutres en solution ; ils sont en général peu moussants et faciles à rincer, mais sont généralement moins efficaces que les tensioactifs anioniques pour le nettoyage. Ils sont néanmoins de bons dégraissants et peuvent être utilisés pour améliorer significativement les performances des tensioactifs anioniques [167]. Leurs têtes polaires possédant une ou plusieurs fonctions OH, ils sont souvent utilisés sous forme d'alcools linéaires éthoxylés. Etant donnée leur polyvalence, il est possible de faire varier leur groupement hydrophobe et hydrophile et d'obtenir des molécules moussantes, peu moussantes voire dé-moussantes en fonction de la longueur de la chaîne grasse et du taux d'éthoxylation.

Le NEP à haute pression ou spray nécessite des agents peu moussants. Les tensioactifs non ioniques conviennent donc bien à ce type d'usage qui n'est cependant pas adapté pour le NEP des membranes.

Les tensioactifs cationiques (4% de la production mondiale) ont une tête polaire chargée positivement et sont souvent des ammoniums, et particulièrement des ammoniums quaternaires tels que le chlorure de benzalkonium ou le bromure de dominiène. Associés avec les tensioactifs anioniques, ils forment des complexes insolubles et sont donc incompatibles en mélange.

Ayant un faible pouvoir détergent, ils possèdent, en revanche, un fort pouvoir biocide et sont principalement utilisés en tant que désinfectants. De plus, ils ont de bonnes propriétés émulsifiantes et sont utilisés comme agents antistatiques, adoucissants pour le linge, inhibiteurs de corrosion...

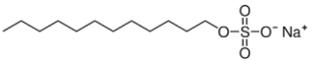
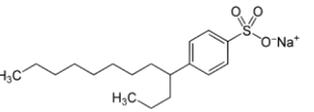
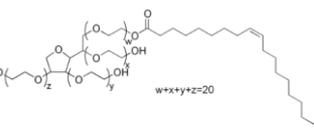
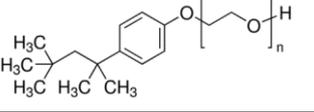
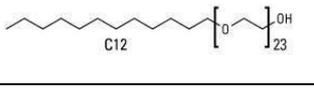
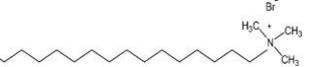
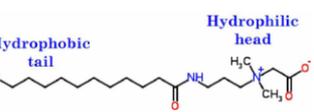
Cependant, les membranes polymères étant généralement chargées négativement, ce type de tensioactifs n'est pas utilisé pour leur nettoyage afin d'éviter qu'ils ne s'adsorbent irréversiblement sur les membranes. De plus, ils ne sont pas autorisés pour des utilisations telles que le NEP de membranes des IAA.

Les tensioactifs amphotères (ou zwitterioniques) ont à la fois des fonctions générant des charges négatives et positives dont le nombre varie en fonction du pH. Ainsi, il peut arriver que les charges se compensent. On parle alors d'une forme zwitterion. Très moussants mais peu émulsifiants, ils sont moins utilisés en détergence.

Certains peuvent posséder des capacités biocides et être utilisés en association avec des tensioactifs cationiques comme agents désinfectants, à condition que leurs charges positives soient prépondérantes.

A contrario, si c'est la charge négative qui prédomine, c'est leur pouvoir mouillant et nettoyant qui augmente. En dépit de leur faible pouvoir détergent, grâce à leurs propriétés moussantes, faiblement irritantes pour la peau, ils sont principalement utilisés en cosmétiques (shampoings, autres produits de soin du corps), en détergence ménagère, désinfection...

Tableau I.10. Exemples de tensioactifs (TA) en fonction de leur famille

Nom	Formule	HLB	CMC (mmol.L-1) A25°C
TA anioniques			
SDS Sodium dodécyl sulfate		40	8
SDBS Dodécylbenzensulfonate de sodium		11.7	1.2
TA non ionique			
Tween 80-Polyoxyethylene (80) sorbitan monooleate		15	0.01
Triton X-100 Type d'octylphénoxy polyéthoxyéthanol		13.5	0.9
Brij-35 Polyoxyéthylène glycol dodécyl éther		16.9	0.1
TA cationique			
CTAB Cetrimonium bromide		10	0.9
TA Amphotère			
CAPB Cocamidopropylbetaine		11	0.07

c) Les mélanges de tensioactifs

En raison de leurs différences de propriétés, il est fréquent d'associer plusieurs tensioactifs dans une formulation pour bénéficier de leurs complémentarités. Par exemple, l'un peut aider à la solubilisation de l'autre, qui lui sert de détergent ou de biocide.

Il est donc nécessaire de comprendre les interactions entre les différents tensioactifs en solution et les éventuels phénomènes de synergie qui pourraient se produire, conduisant alors à des tensions de surface des mélanges meilleures que celles des tensioactifs pris séparément. Ceci implique que les tensioactifs s'attirent, soit par attraction électrostatique, soit par des forces de van der Waals (groupements hydrophobes). Les interactions les plus fortes sont logiquement observées entre les tensioactifs anioniques et cationiques [168]. Il existe un paramètre de quantification des interactions entre tensioactifs, c'est le paramètre β . Il correspond au coefficient d'activité dans le mélange. Les interactions entre tensioactifs sont d'autant plus importantes que la valeur de β est négative [169].

On parle de micelle mixte lorsqu'au moins deux tensioactifs différents sont concernés. Il est possible d'évaluer la formation de telles micelles moyennant le paramètre d'interaction micellaire β^M , dont le calcul se base sur des équations de la thermodynamique des systèmes [170]. Ces équations servent à déterminer le ratio optimum de deux tensioactifs pour lequel les interactions sont maximales [168].

Si la CMC du mélange est inférieure à la CMC des tensioactifs individuels, alors il y a synergie dans la formation de micelles mixtes.

Le plus souvent, on trouve cet effet de synergie dans des mélanges de tensioactifs anioniques et non ioniques à cause de la formation de micelles mixtes.

d) Interactions Tensioactifs/Membrane

La résistance R_m de la membrane peut diminuer suite à l'exposition à des tensioactifs hydrophiles, ce qui a pour conséquence d'augmenter le flux à l'eau au-delà même du flux à l'eau d'origine (NEP de membrane vierge) [123]. Le dépôt des surfactants sur la surface de la membrane l'hydrophilise [4].

Le développement d'un gel, formé du mélange des surfactants adsorbés sur les protéines, a été montré dans le cas du nettoyage de stérilisateurs de lait UHT ainsi que la difficulté à l'éliminer [158]. Une corrélation entre l'augmentation de l'hydrophilie d'une membrane après nettoyage et la quantité des protéines adsorbées lors du colmatage a été démontrée par Levitsky et al. [159]. Naim et al. [161] expliquent qu'au contact des dépôts de micelles de surfactants, la surface de la membrane d'abord s'hydrophilise, puis s'ensuit la formation d'un cake de micelles des surfactants à la surface de la membrane qui sera responsable de l'augmentation de la rétention des protéines et du colmatage protéique. C'est pour cette raison que Levitsky et al. [160] préconisent des faibles concentrations en surfactants pour éviter d'aggraver le colmatage décrit par Naim et al. [161].

1.6.1.2. Acides et Bases

Différentes études ont avancé l'hypothèse que l'augmentation des flux à la suite du nettoyage chimique notamment avec une solution de NaOH pourrait être due à la modification des propriétés physico-chimiques de la surface de la membrane causée par l'adsorption des OH^- [114,159,160,161].

Rabiller-Baudry et al. [84] ont montré que le NEP alcalin d'une membrane PES/PVP est d'autant plus efficace que le pH est élevé. Cependant, un pH trop élevé peut endommager un module et précipiter le vieillissement d'une membrane (dégradation de la colle dans la membrane spirale).

Une corrélation entre la teneur en protéines sur la membrane et l'augmentation de flux a été montrée après un nettoyage acide (HNO_3 ; H_3PO_4) et attribuée à l'adsorption spécifiques des oxoanions sur les dépôts protéiques [117], induisant une hydrophilisation globale des membranes PES/PVP colmatées et une augmentation de flux à l'eau.

1.6.1.3. Agents Complexants et Chélatants

a) Généralités

En solution, un ion métallique peut rester libre, mais il peut aussi se combiner à des molécules généralement organiques pour former des structures appelées complexes de coordination, qui sont solubles. Les molécules formant ces complexes sont appelées agents complexant ou agents chélateurs.

Un agent complexant est capable de se lier à un ion métallique à travers au moins une liaison de type donneur-accepteur. Le complexe résultant peut être constitué d'un ou plusieurs ligands pour un seul ion métallique. Un agent chélatant est un complexant particulier qui peut jouer le rôle de plusieurs ligands. Ainsi, il est capable de se lier à un ion métallique à travers au moins deux liaisons de coordination pouvant impliquer plusieurs atomes dans la même molécule (**Figure I.31**). Les agents chélateurs sont donc des ligands multi-dentés. La denticité désigne le nombre de liaisons de coordination métal-ligand d'une molécule. Ainsi, il existe des ligands bidentés, tridentés, tétradentés, etc.

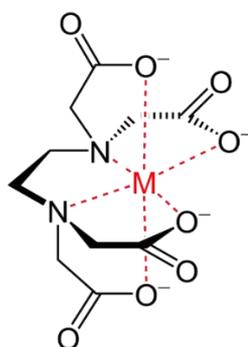


Figure I.31. Complexe chélate de l'EDTA avec un cation métallique

Les agents séquestrants enferment les ions métalliques dans des cages de géométries plus complexes.

Il arrive qu'on utilise abusivement les termes complexant, chélatant, séquestrant pour désigner les mêmes ligands.

b) Les agents complexants/chélatants utilisés en NEP

Ce sont des agents indispensables utilisés dans la formulation de détergents pour empêcher la précipitation, dans la solution et sur la membrane, des ions responsables de la dureté de l'eau (Ca^{2+} et Mg^{2+}) utilisée dans la préparation des solutions de nettoyage et lors du rinçage des équipements.

Leur rôle est aussi de solubiliser les dépôts minéraux en provenance des souillures, en particulier ceux qui contiennent du calcium et des cations multivalents.

De plus, l'action des tensioactifs anioniques s'améliore en présence d'agents complexants/chélatants car les TAs anioniques peuvent précipiter dans une eau dure, perdant par la même occasion leur capacité détergente.

Dans un esprit de respect de l'environnement, il est clair que le choix des agents chélateurs, au-delà de l'aspect efficacité, doit aussi tenir compte de leur impact sur l'environnement, étant donné qu'ils seront évacués avec les eaux de rejets de nettoyage. Par exemple, l'Éthylène-Diamino-Tetra-Acétate (EDTA) est un chélateur très puissant, mais il n'est pas biodégradable et les stations d'épuration n'arrivent pas à l'éliminer [171] ce qui le rend non éco-compatible. De plus, l'EDTA n'étant pas retenu par les filtres à charbon actif utilisés dans le traitement de l'eau potable, celle-ci pourrait être contaminée en cas de rejet accidentel dans le milieu naturel [171]. C'est pour ces raisons, entre autres, qu'il a été interdit par l'Ecolabel européen dans les produits certifiés dans une des 6 catégories de détergents [172].

A ce jour, l'EDTA est le chélateur le plus efficace connu formant des complexes très stables avec les cations multivalents. Son pouvoir complexant dépend du pH qui contrôle les formes acide/base des fonctions amines et acides carboxyliques et atteint son maximum au-delà de pH 10. L'EDTA doit son efficacité de complexation aux sites amines sous leurs formes basiques qui constituent des ligands forts des métaux. Connues pour être des ligands plus faibles et donc moins efficaces, les fonctions carboxylates contribuent tout de même à la stabilité globale du complexe soluble formé.

Le NTA (« nitrilotriacetic acid », **Figure I.32**) est un autre complexant utilisé, mais, avec une efficacité égale à 50% de celle de l'EDTA et le soupçon d'agent cancérigène qu'il suscite, il ne semble pas un candidat idéal pour le remplacement de l'EDTA.

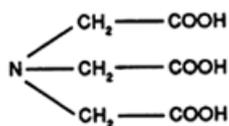


Figure I.32. Molécule de NTA

D'autres alternatives plus éco-compatibles sont proposées. Parmi celles-ci, on peut citer :

- **Le GLDA** (« glutamic diacetic acid », **Figure I.33**), dérivant d'un composé naturel d'acide glutamique. Ayant un très bon profil écologique et toxicologique, le GLDA a l'avantage d'être biodégradable. Ceci en fait une bonne alternative à l'EDTA, au NTA ou autres chélatants à base de phosphates. De plus, il est d'une bonne solubilité sur une plage de pH importante. Il est commercialisé par AkzoNobel sous le nom de Dissolvine® GL [173].

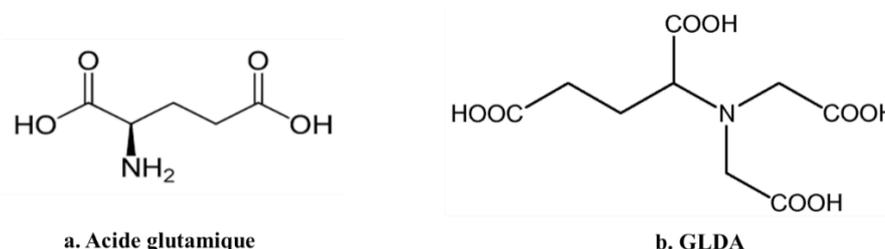


Figure I.33. Molécules (a) d'acide glutamique et (b) du GLDA.

- **Le MGDA** (« Methylglycinediacetic acid », **Figure I.34**) aussi commercialisé par AkzoNobel sous le nom Dissolvine® M-40, est un séquestrant fort qui réagit rapidement. Il est aussi biodégradable.

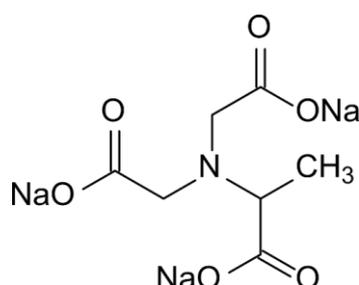


Figure I.34. Molécule de MGDA sous sa forme de sel de sodium

Cependant, des études comparatives menées sur le GLDA, le MGDA ainsi que sur d'autres molécules ont montré une efficacité de complexation moindre que celle de l'EDTA [173] (**Figure I.35**, **Figure I.36**). Avec une efficacité proche de 100% à chélater le calcium (pH=10), l'EDTA reste en tête de course devant le GLDA (environ 80%), le MGDA et le NTA avoisinant les 50%. Mais, pour une meilleure biodégradabilité, l'EDTA est de plus en plus remplacé par le GLDA et le MGDA.

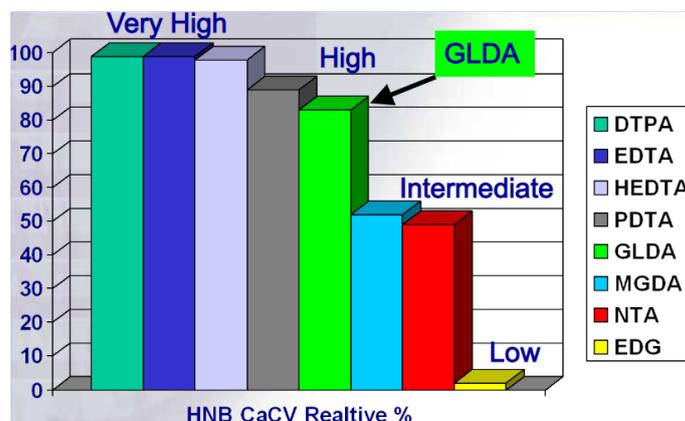


Figure I.35. Test de chélation du calcium à pH 10 avec divers agents chélateurs : 1) DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique, 2) EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique, 3) HEDTA : acide hydroxy-ethyl ethylene-diamine-triacétique, 4) PDTA : acide diamino-p [173].

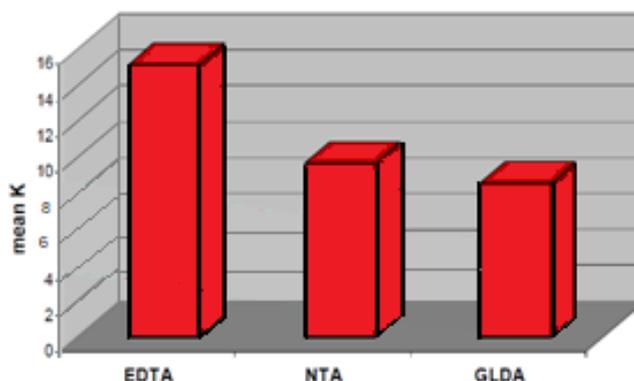


Figure I.36. Pouvoir chélateur de l'EDTA, du NTA et du GLDA (valeur moyenne de la constante de stabilité pour 7 métaux : Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Ni, Zn [173]).

Une autre alternative sont les carboxylates et polycarboxylates. Dans cette famille, on trouve :

– **le Gluconate** (mono) (**Figure I.37**) qui est biodégradable. C'est un complexant carboxylate monofonctionnel à pH neutre. Le gluconate de sodium est particulièrement utilisé comme agent antitartre pour son efficacité à complexer le calcium et le magnésium. Il est efficace pour la complexation des métaux tels que le fer, le cuivre, le nickel ou l'aluminium en milieu alcalin. A des pH supérieurs à 12, les fonctions alcools sont déprotonées, ce qui augmente les capacités de complexation. Les complexes formés sont également biodégradables. Le gluconate est utilisé dans des détergents alcalins.

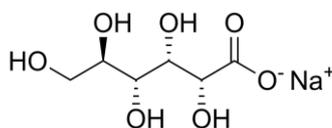


Figure I.37. Structure moléculaire du gluconate de sodium

– le Citrate (**Figure I.38**), également biodégradable, c'est un complexant d'origine naturelle dont les trois fonctions carboxylates favorisent la création de complexes stables avec le calcium et le magnésium. Il a, en outre, un effet émulsifiant et dispersant sur les particules de saleté [155].

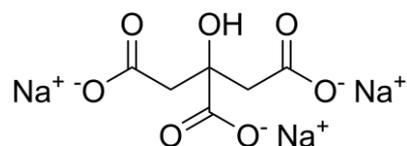


Figure I.38. Structure moléculaire du citrate de sodium

Les autres polycarboxylates sont généralement des homopolymères d'acide acrylique (PAA) et des copolymères d'acide acrylique/maléique (PAA/MA). Utilisés dans les détergents avec peu ou pas de phosphates, les polycarboxylates permettent d'éviter l'incrustation et la re-déposition.

Enfin, les séquestrants organophosphorés sont souvent utilisés. Parmi eux on trouve :

- les phosphonates (**Figure I.39**) : qu'il ne faut pas confondre avec les phosphates, qui eux ne sont pas des composés organophosphorés.

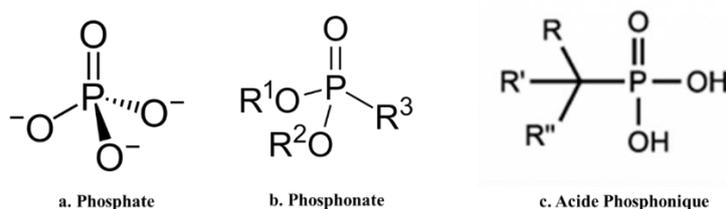


Figure I.39. Structures des phosphates et phosphonates. R = alkyl ou alkyl substitué

Les phosphonates les plus couramment utilisés sont : ATMP, DTPMP, HEDP, PBTC [174] (**Figure I.40**). Leur clivage s'effectue au-dessus de 150°C, d'où leur stabilité à de hautes températures [175].

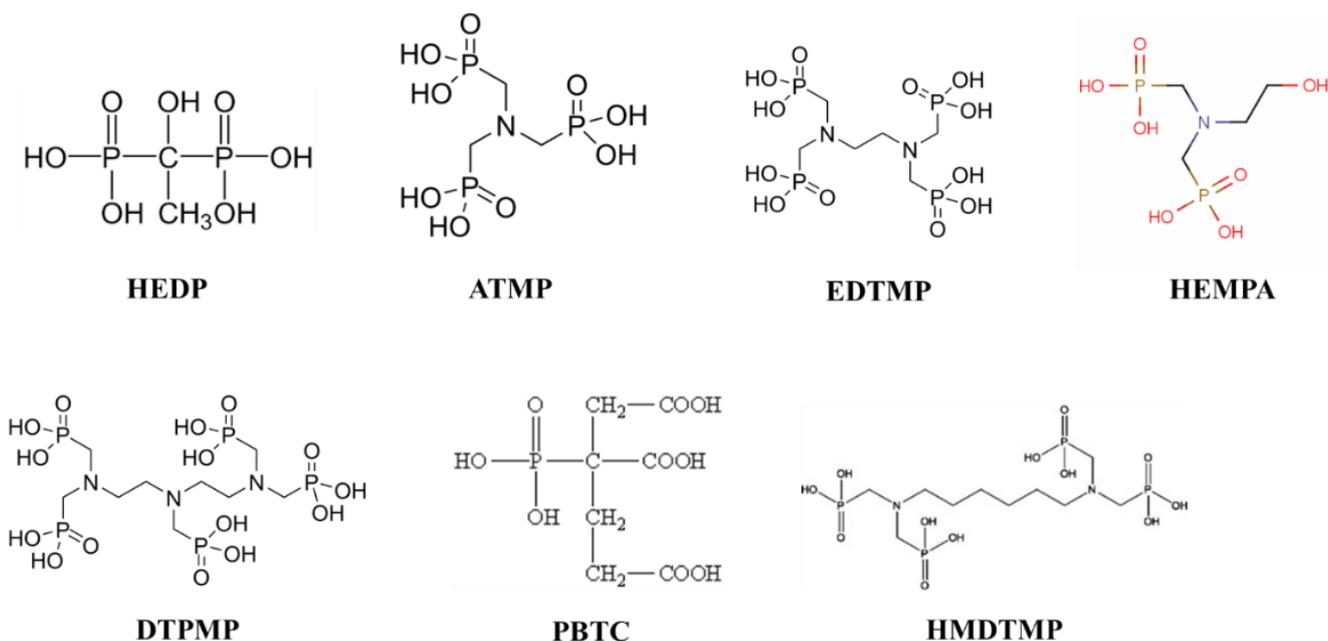


Figure I.40. Structures moléculaires des phosphonates couramment utilisés

En plus de leur propriété de complexation des cations multivalents augmentant avec le pH, les phosphonates possèdent trois propriétés supplémentaires qui les rendent intéressants [176,177] :

- ✓ Inhibition d'entartrage par effet de seuil : pour que cet effet se produise, il suffit d'une faible quantité d'inhibiteur (ex. 1 mg. L⁻¹). Les phosphonates s'adsorbent sur la surface des cristaux et altèrent leur croissance en ralentissant ou prévenant leur formation. La morphologie des cristaux qui ne s'incrustent plus sur les surfaces solides en est modifiée.
- ✓ Défloculation/dispersion : les phosphonates sont capables de donner une charge négative au complexe formé grâce à leur capacité d'absorber les cristaux ou particules colloïdales. Ceci provoque une répulsion des particules de même charge et une dispersion qui maintient les cristaux séparés les uns des autres, mais aussi loin de la surface à nettoyer (membrane par exemple).
- ✓ Inhibition de corrosion : des couches de phosphonates se forment sur la surface des métaux (hormis les alliages du cuivre).

I.6.1.4. Conservateurs

a) Généralités

Les conservateurs sont des composants qui ont pour rôle [178] :

- **d'assurer la stabilité des formulations grâce à leur activité antimicrobienne et antifongique.** Tout au long de leur durée de vie, les formulations sont exposées à des risques microbiens. Cela peut provenir des matières premières n'ayant pas été bien conservées, de l'eau utilisée pour la production mal ou pas traitée du tout, des emballages non ou mal désinfectés, des agents de production ayant oublié de se laver les mains, et sans oublier bien sûr les utilisateurs qui vont contaminer le produit à chaque fois qu'ils vont s'en servir. Sans conservateur, les produits sont susceptibles de développer une mauvaise odeur à la suite du développement des bactéries ayant causé une altération de leur qualité et exposent à des risques sanitaires.
- **d'éviter la dégradation chimique.** Dans cette catégorie, on classe les anti-oxydants dont le rôle est de prémunir les formulations d'une dégradation chimique par oxydation, notamment celle des phases huileuses (éviter de rancir).

Les détergents sous forme liquide sont de plus en plus populaires, car ils sont faciles d'utilisation. C'est également vrai pour les applications membranaires industrielles. Contrairement aux détergents en poudre, les détergents liquides ont potentiellement une durée de conservation moins longue en raison, entre autres, de la présence de la phase aqueuse. Ainsi, les formulateurs recourent à l'ajout de conservateurs afin que ces formulations aient une durée de conservation plus longue.

On distingue des conservateurs d'origine naturelle et des conservateurs d'origine synthétique.

b) Conservateurs d'origine naturelle antibactériens

Il existe des conservateurs d'origine naturelle [178], parmi lesquels on peut citer :

- L'alcool naturel issu de la fermentation des fruits ou céréales,
- L'EPP, extrait de pépins de pamplemousse (ou citrus grandis seed extract)
- Leucidal (ou leuconostoc / Radish Root ferment) : obtenu par fermentation de radis avec leuconostoc mimchii
- Natricide ou plantaserve Q

En raison de modifications de la réglementation, de nombreux conservateurs couramment utilisés en détergence sont de plus en plus abandonnés au profit d'une nouvelle catégorie de conservateurs plus respectueux de l'environnement et de la santé. Parmi ces derniers, on peut citer :

- **Les sorbates** : ce sont des conservateurs biosourcés et non sensibilisants. Ils peuvent être trouvés dans des baies de frêne de montagne, par exemple. On utilise aussi des analogues synthétiques dans la conservation des aliments (pour homme ou pour animaux), des produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Utilisés dans la gamme de concentration de 0.1 à 0.4 % et à un pH approprié, ils possèdent également des propriétés bactéricides et anti-fongiques [179].
- **Le benzoate de sodium** : d'abord connu et beaucoup utilisé en alimentation, dans le domaine de la cosmétique et celui des produits pharmaceutiques, il est désormais possible de l'utiliser dans la détergence sous le nom Kalaguard®SB. Bien que synthétique, sa molécule est identique à celle retrouvée dans la nature. Il a aussi pour avantage d'être non sensibilisant et non irritant, ce qui lui confère, entre autres, d'être classé substance à faible risque par la Commission Européenne et d'être autorisé dans les produits certifiés dans le cadre de programmes d'étiquette verte tels que Ecolabel, Ecocert, Nordic Swan et autres [180].

c) Conservateurs synthétiques antibactériens

Parmi ceux-ci, on retrouve l'acide benzoïque, l'acide sorbique, l'alcool benzylique ou Cosgard®, l'acide déhydroacétique (DHA) ou Geogard®, le sorbate de potassium. Ceux-ci sont autorisés dans les produits BIO, contrairement à certains conservateurs synthétiques conventionnels.

Au-delà des produits BIO, la réglementation donne des indications pouvant aller jusqu'à l'interdiction de certains conservateurs du fait de leur toxicité avérée ou suspectée. Parmi ces composés fortement réglementés, on trouve :

- **des parabènes**. Selon la longueur de leur chaîne alkyle, plusieurs types de parabènes existent : méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, isopropylparabène, butylparabène, isobutylparabène et benzylparabène. N'étant pas dégradables par les enzymes humaines, ces composés impliquent une toxicité chronique à long terme incluant le cancer du sein et des problèmes de reproduction. Plus la chaîne alkyle est longue, plus le parabène est toxique.
- **du triclosan** qui est un antibactérien suspecté de favoriser une résistance aux antibiotiques.
- **du formaldéhyde et des libérateurs de formaldéhydes** qui sont identifiés comme étant cancérigènes par voie respiratoire, ils sont interdits dans les aérosols, mais peuvent être retrouvés dans d'autres produits, comme par exemple à hauteur de 0.2% maximum de la composition dans les cosmétiques. En plus, les formaldéhydes sont irritants et allergisants. Pour les remplacer, les fabricants recourent au DMDM hydantoïne, au diazolidinyl urea, à l'imidazolidinyl urea, au 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, au benzylhemiformal, au sodium hydroxymethylglycinate, au quaternium-15 ou aux polyquaterniums pour ne citer que ceux-là. Malheureusement, eux non plus ne sont pas si sûrs que ça.
- **du cetrimonium bromide**. Ce tensio-actif d'origine synthétique est accusé de risque d'irritation et d'allergie sur la peau. On le retrouve dans les produits nettoyants comme les eaux micellaires avec une réglementation limitant sa concentration à 0.1%.
- **des thiazolinones**. Ce sont soit le methylchloroisothiazolinone, soit le methylisothiazolinone. Le mélange de ces composés est connu sous le nom de Kathon®CG. Ils sont connus pour être fortement allergènes.
- **du phénoxyéthanol** (ou 2-phénoxyéthanol ou phénoxytol) qui est limité à une concentration de 1%, car il présente de nombreux risques pour la santé humaine incluant l'irritation et les allergies avérées, particulièrement au niveau oculaire ; des troubles neurologiques sont suspectés. La stérilité, les anomalies dans les cycles menstruels, les avortements spontanés et la malformation font partie des effets importants imputés à ce conservateur.

d) Les conservateurs antioxydants

On peut retrouver des propriétés antioxydantes dans certains ingrédients de façon naturelle. C'est le cas par exemple de certaines huiles végétales. Cependant, ces propriétés ne sont souvent pas suffisantes, ce qui amène les formulateurs à ajouter des agents antioxydants pour garantir la protection du produit. Dans les produits BIO, on ajoute généralement de la vitamine E (aussi appelée Tocopherol ou Tocopheryl acetate) et l'extrait CO₂ de romarin (*Rosmarinus officinalis leaf extract*). Parmi les antioxydants qu'il faut éviter, on trouve :

- **le BHT** (hydroxytoluène butylé) qui est suspecté, à forte dose, d'être un perturbateur endocrinien, capable donc de provoquer des effets néfastes sur la reproduction et favoriser le développement de tumeurs.
- **le BHA** (hydroxyanisole butylé) qui est suspecté d'être cancérigène d'après le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer). Il est de moins en moins présent dans les produits cosmétiques, contrairement au BHT. Tous les deux sont suspectés d'être allergisants et sensibilisants.

Il faut noter que certains ingrédients peuvent apporter une bonne conservation au produit alors même qu'ils sont utilisés à la base pour une autre propriété. On peut citer les milieux tampons par exemple. Par leur propriété de préservation de l'équilibre du pH, ils contribuent à la préservation des milieux lorsque le pH est en faveur d'une action antimicrobienne ou antioxydante.

I.6.2. Détergents enzymatiques

Les détergents enzymatiques sont en général des détergents formulés, comme les détergents chimiques.

I.6.2.1. Les enzymes

Les enzymes sont des protéines qui possèdent une propriété catalytique d'une réaction spécifique vis-à-vis d'un ou de substrats particuliers (voir plus loin). Les protéines (enzymes ou autres protéines) sont des macromolécules constituées d'enchaînement d'acides aminés qui sont liés les uns aux autres par une liaison covalente appelée liaison peptidique qui correspond à une fonction amide (-CO-N(H)-).

L'ordre des acides aminés dans l'enchaînement est appelé « séquence primaire » de la protéine/enzyme. Les chaînes de la séquence primaire peuvent se replier pour donner la « structure secondaire ». Les replis sont principalement dus à des liaisons hydrogènes au sein de la chaîne qui peut adopter une forme d'hélice α ou de feuillet β ou une structure différente dite désordonnée.

Au-delà de la structure secondaire, les chaînes d'acides aminés peuvent adopter une configuration spatiale appelée « structure tertiaire » de la protéine/enzyme. Cette structure 3D est responsable des propriétés fonctionnelles de la protéine/enzyme. Dans son environnement naturel, la protéine adopte une structure 3D dite native. Dans un environnement physico-chimique différent, elle peut changer de structure spatiale, on dit alors que la protéine/enzyme est dénaturée.

Certaines protéines (comme la β -lactoglobuline) peuvent également s'organiser sous forme de structure quaternaire. Dans ce cas, plusieurs monomères s'associent pour créer des structures plus ou moins réversibles avec le pH et la température, par exemple. On parle alors de dimère ou d'oligomère. Selon le pH, la β -lactoglobuline peut être monomère, dimère ou octomère (8).

La structure 3D d'une protéine est à l'origine de sites ayant des fonctions particulières. Par exemple, il existe un site spécifique capable de fixer un Ca^{2+} par l' α -lactalbumine. Dans le cas des enzymes, la structure 3D est directement liée à l'activité enzymatique.

La perte de cette structure implique automatiquement la perte de l'activité enzymatique. Ainsi, chaque enzyme a une plage optimale de pH et de température pour laquelle son activité enzymatique est maximale. En dehors de ces conditions, l'enzyme est moins efficace ou totalement inefficace. Le phénomène de dénaturation est exploité à l'échelle industrielle pour inactiver l'enzyme par l'utilisation de solutions alcalines ou acides pour éviter des réactions indésirables après nettoyage avec des détergents enzymatiques.

Selon le substrat sur lequel elles agissent, il existe différents types d'enzymes parmi lesquelles on trouve les hydrolases (enzymes réalisant une hydrolyse) qui sont largement utilisées dans le nettoyage.

Selon la liaison-cible hydrolysée, les hydrolases peuvent être classées en 4 catégories : les protéases qui cassent les liaisons peptidiques (protéines), les lipases qui ciblent les chaînes esters (graisses, huiles, etc.), les amylases et les cellulases qui attaquent les liaisons glycosidiques (respectivement amidon et cellulose) [181]. Alors que les cellulases sont principalement utilisées pour la lessive, car elles ont d'excellentes propriétés d'adoucissement et d'amélioration de la couleur des surfaces textiles [182], les trois autres catégories d'hydrolases trouvent plutôt leur utilité dans les procédés de nettoyage des salissures alimentaires.

Dans ce travail, la cible du nettoyage étant les protéines colmatant la membrane, les enzymes sélectionnées sont des protéases. L'analyse des fiches de sécurité (FDS) des détergents commerciaux fait ressortir l'utilisation d'une famille d'enzymes particulières : les subtilisines.

1.6.2.2. Les subtilisines

a) Généralités

Les subtilisines sont des monomères de 268-275 résidus d'acides aminés et possèdent une masse molaire de $26.9 - 27.5 \text{ kg.mol}^{-1}$ [183] (Figure I.41).

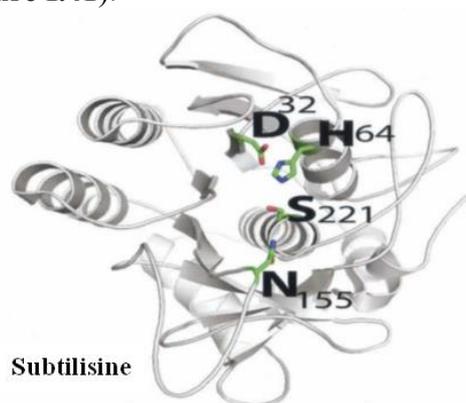


Figure I.41. Structure des “classiques” protéases à sérine Ser/His/Asp : Subtilisine Carlsberg dérivant de *Bacillus licheniformis* [184].

Le pI (point isoélectrique) diffère d'une subtilisine à l'autre mais est dans le domaine des pH alcalins. Par exemple, il peut varier de 7.8 pour la BPN à 11 pour les subtilisines dérivant de la *B. lentus* [183,185]. Pour la subtilisine Carlsberg, il est de 9.4. La subtilisine Novo et la subtilisine Amylosacchariticus ont un pI de 9.1 et 7.8 respectivement [185].

Le nom subtilisine dérive de l'espèce bactérienne *Bacillus subtilis*, à partir de laquelle l'enzyme a été isolée pour la première fois. Aujourd'hui, il s'agit d'un nom générique qui comprend une famille de protéases alcalines à sérine extracellulaire (S8) endopeptidases isolées d'espèces de bacilles apparentées. Le variant de subtilisine dépend de la souche de bacille dont il dérive. Les différentes variantes de subtilisine ont des structures différentes [186,187] et pourraient avoir différentes applications [183,186].

La subtilisine A, également appelée subtilisine Carlsberg, est dérivée de *Bacillus licheniformis* [183] et est l'une des plus couramment utilisées dans les détergents [188]. La subtilisine Carlsberg (originellement appelée « la » subtilisine) comporte une seule chaîne peptidique de 274 résidus d'acides aminés et sa masse molaire est 27 kg.mol^{-1} [187,190]. On l'appelle aussi Protéase Alcaline Bactérienne, Subtilisine A, Subtilopeptidase A, Alcalase Novo.

Comme précédemment annoncé, il existe d'autres variants de subtilisines. En voici une liste non exhaustive :

- Subtilisine DY (274 résidus d'acides aminés). Elle dérive de la souche DY de *B. Subtilis* [186].
- Subtilisine BPN' dite Nagarse (275 résidus d'acides aminés). Elle est aussi appelée Subtilisine B, Subtilopeptidase B, Subtilopeptidase C et dérive de *B. amyloliquefaciens*.
- Amilosacchariticus BPN (275 résidus d'acides aminés)
- Bacterial Proteinase Novo dérive aussi de *B. amyloliquefaciens*.
- Subtilisine 147 dérive de *B. lentus*.
- Esperase dérive aussi de *B. lentus*.
- Maxacal, aussi connu sous le nom de Savinase ou Subtilisine 309 dérive du variant N85S de *B. alcalophilus* PB92 exprimée dans *B. lentus*.
- Subtilisine 168 : dérive de la souche 168 de *B. subtilis*.
- Subtilisine E : dérive aussi de la souche 168 de *B. subtilis*.

Il a été démontré que les subtilisines Carlsberg, BPN, DY et Amilosacchariticus sont identiques à 62.5% dans la position et le type des résidus d'acides aminés. Certains pensent que ces enzymes ont sûrement eu un ancêtre commun, mais ont évolué indépendamment [186].

A titre informatif, voici une liste non exhaustive de noms commerciaux sous lesquels des subtilisines sont commercialisées : Alcalase®, ALK-enzyme, bacillopeptidase, Bacillus subtilis alkaline proteinase biopraxe, biopraxe, colistinase, genenase I, Esperase®, maxatase, protease XXVII, thermoase, superase, subtilisin DY, subtilopeptidase, SP 266, Savinase®, kausase, protease VIII, protin A 3L, Orientase 10B, Protease S. [189].

Dans cette thèse, trois subtilisines commerciales ont été utilisées dans le but de sélectionner la/les plus performante(s), le cas échéant. Pour des raisons de confidentialité, elles seront ci-après désignées enzymes X, B et C. X est connue pour être principalement à base de subtilisine A. Nous avons pu établir que le numéro d'immatriculation (CAS) de toutes les subtilisines était le même. Ce qui rend difficile, à ce jour, d'affirmer avec certitude de quelle(s) souche(s) de bacille(s) proviennent les subtilisines B et C.

I.6.2.3. Protéases à sérine et leur mécanisme d'action

Les protéases à sérine représentent un tiers de toutes les protéases connues. La plupart des protéases à sérine possèdent un site actif composé de trois résidus d'acides aminés : Sérine, Histidine, Aspartate, aussi appelé la triade Ser/His/Asp. Mais il existe aussi d'autres protéases à sérines présentant des variantes de la triade catalytique telles que Ser/His/Glu, Ser/His/His, ou Ser/Glu/Asp. Parfois, le site actif est une dyade telle que Ser/Lys ou Ser/His. [184].

Les trois résidus d'acides aminés formant la triade Ser/His/Asp ne sont pas proches les uns des autres dans la structure primaire de l'enzyme. Ils se rapprochent dans la structure tertiaire formant ainsi le site actif.

La configuration du site actif crée un environnement électronique nécessaire pour que la réaction catalytique d'hydrolyse se produise. Les protéases à sérines clivent sélectivement les liaisons peptidiques de certaines molécules.

La réaction de catalyse se déroule suivant différentes étapes décrites ci-après [191] (**Figure I.42**).

- **Etape 1 :** L'attachement du substrat à l'enzyme se fait au niveau du site spécifique appelé la poche S1. La poche S1 détermine la spécificité de l'enzyme, car elle n'attache qu'une protéine ayant une séquence spécifique d'acides aminés.
- **Etape 2 :** Cet attachement modifie légèrement la structure de l'enzyme. L'oxygène sur la chaîne latérale de l'Aspartate se polarise (charge négative) sous forme de carboxylate. Il se rapproche de l'hydrogène de l'atome d'azote (position 1) de l'imidazole de l'Histidine. Ceci modifie la configuration électronique de l'imidazole de l'Histidine ce qui amène le deuxième azote de l'imidazole (position 3) à se rapprocher de l'oxygène de l'hydroxyle OH⁻ de la Sérine.
- **Etape 3 :** Le deuxième azote de l'imidazole de l'Histidine arrache l'hydrogène de l'hydroxyle OH⁻ de la Sérine. L'oxygène du OH⁻ de la sérine se retrouve seul et chargé négativement. Il devient donc un alcoolate en quête d'un nucléophile (élément receveur d'électron).
- **Etape 4 :** L'alcoolate formé sur la Sérine subit une attaque nucléophile du carbone de la liaison C-N du substrat (la protéine à hydrolyser). Ce carbone, qui était à la base doublement lié à un oxygène, cède une liaison à l'alcoolate de la Sérine. Le substrat devient ainsi une molécule instable avec son oxygène initialement doublement lié au carbone, désormais lié à ce dernier par une liaison simple, laissant donc un électron libre.
- **Etape 5 :** Le trou d'oxyanion de l'enzyme récupère le substrat instable afin de le « désintégrer ». Ceci se fait par l'arrachement de l'hydrogène préalablement capté par le second azote de l'imidazole de l'Histidine (capté du OH⁻ de la Sérine). Cette captation de l'hydrogène par l'azote du substrat libère le carbone de la liaison peptidique. Le substrat est ainsi scindé en deux parties. La partie avec le carbone reste attachée à la Sérine, tandis que celle avec l'azote est complètement libre. La première partie de la réaction vient de s'achever. C'est la partie rapide de la réaction.

La deuxième partie de la réaction, lente, doit maintenant se produire et consiste à séparer le carbone du substrat de l'oxygène de la Sérine.

- **Etape 6 :** Une molécule d'eau vient se positionner dans le site actif de l'enzyme. Le deuxième azote de l'imidazole de l'Histidine ayant perdu l'hydrogène capté à la Sérine va à nouveau capter un hydrogène sur la molécule d'eau. Ceci libère un électron sur l'oxygène de l'eau.
- **Etape 7 :** L'oxygène de l'eau ainsi polarisé en groupement OH⁻ effectue une attaque nucléophile sur le carbone du substrat encore attaché à la Sérine. Cette attaque provoque un réarrangement autour du carbone qui forme un intermédiaire tétraédrique. L'oxygène doublement lié au carbone du substrat est instable et exerce une pression sur la liaison covalente reliant le carbone à l'oxygène de la Sérine. Cette dernière se déplace et provoque une attaque nucléophile sur l'hydrogène capté à l'eau par le deuxième azote de l'imidazole de l'Histidine. Ainsi, la coupure de la liaison covalente entre le carbone du substrat et l'oxygène de la Sérine est enfin réalisée.

Maintenant, la deuxième partie du substrat est aussi libre et le site actif de l'enzyme retourne à sa position initiale.

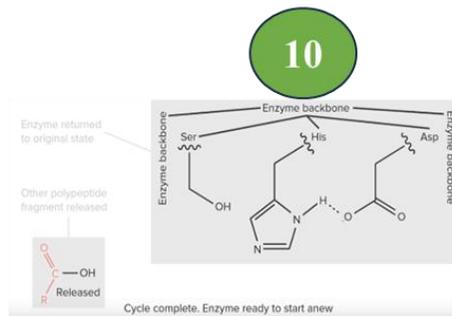
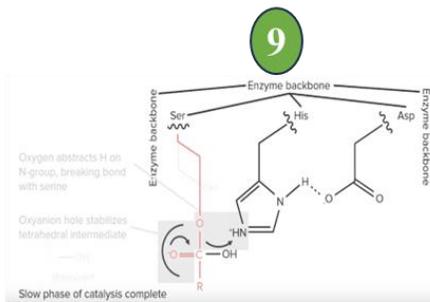
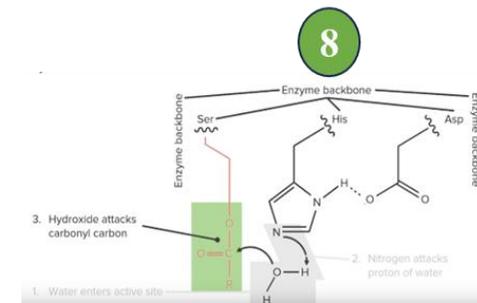
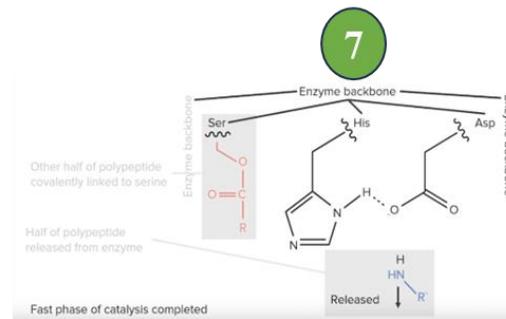
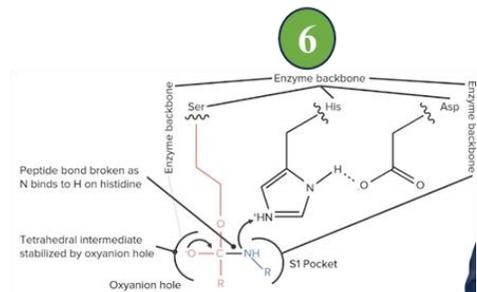
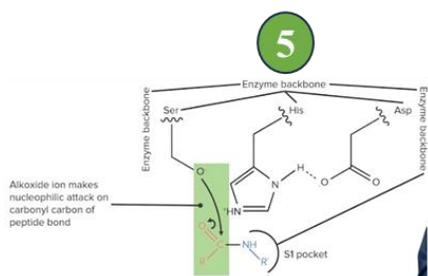
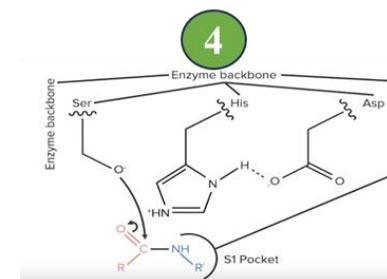
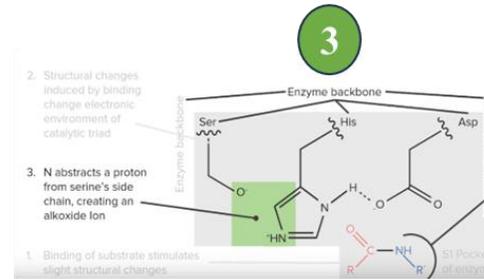
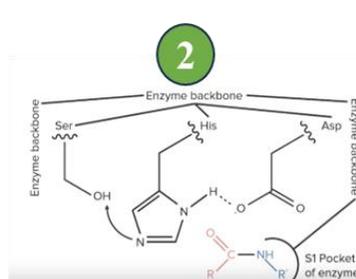
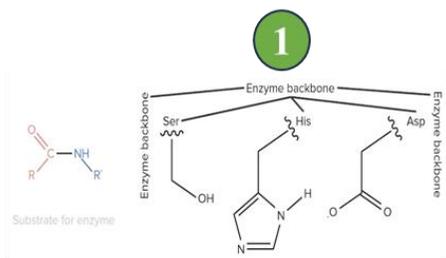


Figure I.42. Mécanisme d'action d'une protéase à sérine (Ser/Hys/Asp) [191]

1.6.2.4. Les substrats des subtilisines

Il a été prouvé que les subtilisines manifestent une large spécificité en tant que protéases.

Par exemple, Carlsberg hydrolyse la caséine, l'hémoglobine, l'ovalbumine et la gélatine. Le pH optimal pour la digestion de la caséine est dans la gamme de 10 à 11 [192].

Il a été montré également que l'activité protéinase et estérase était associée à la même enzyme [193]. Ainsi, Carlsberg est une estérase par rapport au méthylbutyrate.

La subtilisine BPN hydrolyse diverses protéines, notamment la caséine, l'hémoglobine et la gélatine. De plus, elle oxyde le lysozyme qui est également une enzyme. Son activité estérase se produit avec une plage de pH optimale de 8.5 à 9.5 [194]. Le clivage semble se produire principalement sur les NH₂ et COOH des résidus d'acides aminés neutres en positions terminales [195].

Les subtilisines hydrolysent non seulement les liaisons peptidiques internes, mais aussi celles aux extrémités de la chaîne, libérant ainsi des acides aminés [185]. Les liaisons sur lesquelles le clivage se produit diffèrent selon les subtilisines. Par exemple, le clivage de la subtilisine Carlsberg se produit entre les résidus 20 et 21 (Ala-Ser), tandis que pour la subtilisine BPN, il y a un clivage substantiel au niveau des deux liaisons 20-21 (Ala-Ser) et 21-22 (Ser-Ser) [196,197].

La subtilisine BPN favoriserait le clivage au niveau de la liaison 21-22, tandis que Carlsberg préfère le clivage au niveau de la liaison 20-21.

Une étude sur la stabilité de l'activité des hydrolases, notamment la subtilisine Carlsberg, en présence d'un solvant organique (1, 4-dioxane, un agent moussant) a conclu que le changement d'hydratation était le seul facteur capable d'influencer l'activité de l'enzyme et sa flexibilité sans pour autant modifier significativement sa structure [198]. En effet, l'étude explique que l'activité pourrait être affectée par la perte ou le mouvement (réarrangement) d'une ou deux molécules d'eau proches d'un site actif de l'enzyme. Selon l'étude, la subtilisine Carlsberg présente une stabilité de structure (secondaire et tertiaire) en présence du solvant organique, bien qu'il soit possible qu'en présence de l'eau il se passe une compétition entre l'activation et la désactivation rapide d'un site proche d'une molécule d'eau, résultant en une faible instabilité de stockage. La diminution de l'activité implique la perte de l'efficacité catalytique de l'enzyme.

Ce rapide aperçu permet de comprendre le large spectre d'hydrolyse des subtilisines et leur intérêt dans le cas du NEP des membranes colmatées par des protéines laitières.

1.6.2.5. Les enzymes comme agent désinfectant (biocide)

Les protéases telles que la Savinase® Evity 16L (une enzyme protéolytique fournie par Novozymes) sont utilisées pour la dégradation des protéines dans les souillures. C'est l'action nettoyante mise à profit dans le nettoyage en UF de lait écrémé, par exemple.

L'efficacité des enzymes protéolytiques a été prouvée sur des biofilms pour une gamme importante de microorganismes [154]. Ceci fait des protéases un outil prometteur pour la dégradation des biofilms au travers de la dégradation des protéines contenues dans la paroi des micro-organismes et dans les exopolymères qui constituent la matrice d'un biofilm [199].

Ceci souligne l'intérêt des protéases à sérines telles que les subtilisines non seulement pour la détergence, mais aussi potentiellement pour la désinfection (sous réserve de la cinétique d'action qui doit être étudiée).

1.6.2.6. Risques et Précautions en rapport avec les subtilisines

Bien que certaines subtilisines comme la Savinase puissent être utilisées en qualité d'additif alimentaire [200], il existe un risque d'allergie aux subtilisines et aux *Bacillus spp.* Johnsen et al., rapportent que le

personnel exposé aux subtilisines dans des aérosols peut développer une sensibilité immunologique à ces protéines [201]. Des informations présentes sur les fiches de données de sécurité (FDS) du fournisseur UnivarSolutions de certaines subtilisines (CAS : 9014-01-1) font mention d'un certain nombre de symptômes selon le mode d'exposition :

- **Inhalation** : possibilité de symptômes allergiques ou d'asthme ou de difficultés respiratoires. Essoufflement similaire à celui de l'asthme, respiration sifflante, difficulté à respirer, toux. Les effets sont susceptibles d'être retardés.
- **Ingestion** : possibilité d'une irritation ou d'une gêne.
- **Contact cutané** : allergie cutanée possible.
- **Contact oculaire** : provoque une sévère irritation des yeux et des rougeurs.

Les précautions à prendre varient selon le mode d'exposition. Dans la plupart des cas, les bons gestes à faire incluent de déplacer la personne exposée à l'air frais de façon qu'elle respire confortablement, rincer la zone touchée à l'eau (et au savon pour la peau) pendant au moins 15 minutes, boire beaucoup d'eau et consulter un médecin en cas de persistance de la gêne.

1.6.2.7. Stabilisants des enzymes commerciales

Les subtilisines sont commercialisées sous forme de solutions stabilisées. Certains agents stabilisants sont plus ou moins connus grâce aux FDS (fiches des données de sécurité) des fournisseurs, mais pas tous. Or, lors de la formulation de détergents enzymatiques, les stabilisants (sur lesquels le formulateur n'a aucune marge de manœuvre) rentrent *de facto* dans la composition des détergents avec une possibilité d'impacter la performance de ces derniers.

Parmi ceux dénombrés sur les FDS que nous avons consultés (**Figure I.43**), on retrouve :

a) des acides :

- **Acide 4-formylphénylboronique** : industriellement utilisé comme stabilisant, inhibiteur enzymatique ou bactéricide [202].

b) des alcools :

- **Alcool gras ethoxylé C11-C15 (Softanol 90)**. C'est un tensioactif non ionique utilisé dans les nettoyages de surface, notamment lorsque la mousse doit être maintenue au minimum (faible pouvoir moussant [203,204]).

- **Glycérol (glycérine)**. Il est utilisé dans de nombreuses compositions pharmaceutiques et désinfectantes (lubrifiant, hydratant), cosmétiques (hydratant, lubrifiant, solvant, excipient), alimentaires (Additif E422 : humectant, solvant : support d'arôme, émulsifiant, stabilisant et épaississant) [205].

- **Propylène glycol (propane-1,2-diol)**. C'est une molécule très utilisée dans l'industrie alimentaire (additif E1520 : émulsifiant, solvant), pharmaceutique (40% de la composition d'un médicament à base de phénytoïne), cosmétique (humectant anti-moisissure, excipient), textile (fabrication des fibres de polyesters), aéronautique et climatisation/chauffage (antigel), chimique (agent anti-agglomération dans la fabrication des solutions de nanoparticules) [206,207,208,209].

- **Phénoxyéthanol** qui est utilisé en industrie cosmétique et dermatologique (agent de conservation et solvant dans les crèmes pour la peau et crèmes solaires, shampoing, ...), chimique (solvant pour peinture, colorants, ...), détergent et désinfectant (biocide, répulsif d'insectes), mécanique et métallurgique (agent anti-corrosion, lubrifiant, ...), textile (coalescence pour colles au latex),

pharmaceutique (anesthésique pour certaines espèces de poissons, vaccins)... [210,211,212,213,214,215].

c) des sels, comme par exemple :

- **Alaninamide disubstitué.** Selon le brevet de son invention, cette substance est un sel dérivé d'acide dicarboxylique ayant une activité antihypertensive et/ou curative de l'insuffisance cardiaque [216]. Les acides dicarboxyliques peuvent être utilisés pour préparer des copolymères tels que les polyesters polyamides. Le caractère lipophile des acides carboxyliques augmente avec la longueur de la chaîne et, à contrario, le caractère hydrophile diminue. Ceci s'applique également aux sels d'acides carboxyliques. Ces derniers ont, en plus de la chaîne alkyle lipophile, un groupe hydrophile. Ainsi, les sels de sodium et de potassium des acides carboxyliques à longue chaîne sont des substances amphiphiles. Leurs propriétés de tensioactifs en font de bons savons et graisses de base [217]. De tels composés peuvent également agir comme des agents chélatants dans des conditions alcalines grâce à deux groupes acides carboxyliques à chaque extrémité de la chaîne carbonée.

- **Formiate de sodium.** Il est utilisé en solution saturée pour stabiliser les forages d'exploitation pétrolière en raison de sa densité relativement élevée, rendant inutile l'ajout de charges solides [218]. Il est aussi utilisé comme biocide à long terme contre la dégradation microbienne. Dilué, il est rapidement et complètement biodégradable. En biologie structurale, le formiate de sodium peut être utilisé comme cryoprotecteur pour des expériences de diffraction des rayons X sur des cristaux de protéine [219]. En mélange avec les inhibiteurs de corrosion, il est utilisé comme agent non corrosif dans les aéroports pour le dégivrage des pistes, et peut être utilisé aussi pour son effet décongélation (agent de dégivrage) [220]. Il est également utilisé comme agent tampon pour les acides minéraux forts pour en augmenter le pH. En tant qu'additif alimentaire (E237), il n'est pas autorisé en Europe.

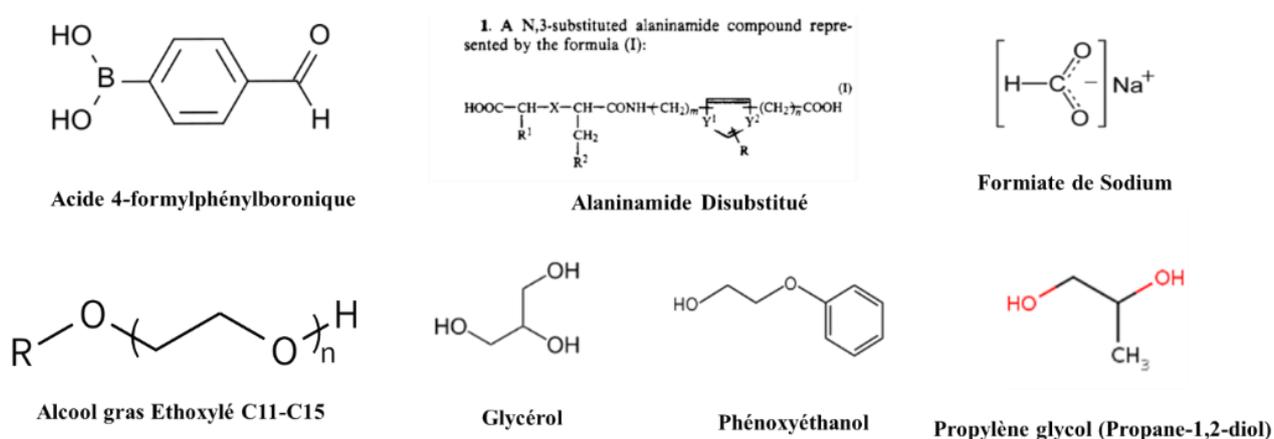


Figure I. 43. Structures moléculaires des quelques stabilisants présents dans les subtilisines commerciales

1.6.2.8. Les solutions tampons pour optimiser l'activité enzymatique

En chimie, on appelle solution tampon, une solution capable de maintenir le pH constant malgré l'addition de petites quantités d'un acide ou d'une base ou malgré une dilution [221].

Une solution tampon se compose d'un acide faible HA et de sa base conjuguée. C'est le cas par exemple :

- du couple $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$,
- du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$
- du couple $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$, un tampon physiologique qu'on retrouve dans le sang humain et qui maintient le pH sanguin entre 7.35 et 7.45

- du couple $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ qui peut donner accès à des tampons alcalins autour de pH 10.

Le pouvoir tampon d'une solution est d'autant plus grand que la concentration des espèces est élevée. Le pouvoir tampon maximal est atteint lorsque le pH est égal à la valeur du pKa du couple en solution. La relation de Henderson-Hasselbalch permet de calculer le pH à partir des concentrations et du pKa du couple acide/base :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right) \quad (\text{Equation I.16})$$

Avec :

$[\text{A}^-]$: la concentration de la base conjuguée

$[\text{HA}]$: la concentration de l'acide.

Les solutions tampons peuvent être utilisées :

- Comme milieu de conservation pour différentes molécules. C'est le cas pour la majorité des échantillons biologiques dans la recherche. En général, dans ces cas, on utilise le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7.4.
- Comme milieu réactionnel
- Dans l'établissement des conditions appropriées pour l'activité enzymatique

Le choix du tampon se fait en fonction du pH ciblé, de la concentration et de la température. Il faut se souvenir que passant de la température ambiante à 50°C le pH augmente d'environ 0.5 unité pH. Cette différence est souvent mise à profit dans les solutions détergentes utilisées à chaud mais dont le pH est souvent donné à l'ambiante. Il faut aussi tenir compte des exigences réglementaires et/ou des exigences de pureté selon l'application.

Dans le cadre de cette thèse, le tampon utilisé est un tampon à base de carbonate de potassium (K_2CO_3). Le carbonate de potassium est utilisé comme additif alimentaire portant le numéro E501. Il est accepté dans l'agroalimentaire biologique. Considéré comme régulateur d'acidité et stabilisant, il est aussi présent dans les levures chimiques et permet la gazéification des eaux gazeuses, l'effervescence des comprimés dissous dans l'eau. On l'utilise aussi en œnologie [222,223].

I.6.2.9. Formulation d'un détergent enzymatique

Le principe de la formulation d'un détergent enzymatique est globalement similaire à celui d'un détergent chimique, excepté la nécessité de la stabilité de l'enzyme. Les ingrédients principaux généralement rencontrés sont les bases, les acides et les enzymes. L'efficacité de nettoyage peut être améliorée par la présence d'agents complexants/chélatants, de tensioactifs, de stabilisants.

Dans ce travail, l'ensemble des ingrédients que sont les tensioactifs, les agents complexant, les conservateurs... sera désigné par le terme de « **matrice formulée** », à laquelle est incorporée une enzyme pour former un détergent formulé (**Figure I.25**).

I.6.2.10. NEP enzymatique des membranes

En l'état actuel de nos connaissances, aucune étude systématique portant sur le nettoyage enzymatique de membranes d'UF en PES/PVP colmatées par du lait écrémé n'a été trouvée dans la littérature, d'où l'intérêt de la présente thèse.

En revanche, des études utilisant des enzymes, le plus souvent des enzymes commerciales directement diluées dans l'eau, ont été publiées sur la thématique de nettoyage de membranes colmatées par des solutions protéiques, de façon générale. Ces études sont répertoriées dans le **Tableau I.11** ci-dessous. Pour le nettoyage des membranes de façon générale, une liste non exhaustive d'exemples de travaux de nettoyage

chimique ou enzymatique des membranes dans les procédés alimentaires et pharmaceutiques peut être trouvée dans la review de Li et al. [227].

Tableau I.11. Répertoire de quelques études sur le nettoyage enzymatique dans l'IAA

Equipement nettoyé	Fluide colmatant	Mode de colmatage/ Nettoyage	Nettoyage enzymatique	Evaluation de la propreté	Référence
Membrane d'UF en PES (réf non identifiée)	Bouillie d'avoine	En condition d'UF (module plan : Labstak™ M10)	Lipex ^R Evity 200L(Lipase), Celluclean 5000L(Cellulase), Amplify 100L (amylase), RO Dan 300E (Protease)	Potentiel zêta, Mesure d'angle de contact avec l'eau	[228]
Membrane d'UF en PES/PVP (Koch, 5 - 10 kDa)	Lait écrémé	Réacteur fermé et en condition d'UF (Module plan: RayFlow-X100)	Depta UF 305L, Filterzym SM, Filterzym SM Protect, P3 Ultrasil 67, P3 Ultrasil 53	Récupération des Flux, dosage des protéines résiduelles par ATR-FTIR	[119]
Membrane d'UF en PES (Snyder Australie, 30 kDa)	BSA, β-Lg, BSA + β-Lg	En condition d'UF	Protéinase type M (Amano: <i>Aspergillus oryzae</i>)	Résistance hydraulique, technique MALDI_MS, Méthode de Lowry, Electrophorèse sur gel	[226]
Membrane de MF (0.2 μm) en céramique	Lait de chèvre	En condition d'UF	Ultrasil®67 (détergent enzymatique) + Ultrasil® 69 (détergent alcalin)	Résistance résiduelle, bilan matière des protéines	[230]
Membranes en PSf (100 kDa), PES (30 kDa)	BSA, BSA + β-Lg, Solution de poudre de lactosérum doux	En condition d'UF, filtration en cellulaire agitée	Terg-A-Zyme (TAZ), Protease A	Récupération des flux à l'eau, Elimination de la Résistance résiduelle, Imagerie SEM et analyses MALDI-MS	[231]

Tableau I.11. Répertoire de quelques études sur le nettoyage enzymatique dans l'IAA (suite)

Equipement nettoyé	Fluide colmatant	Mode de colmatage/ Nettoyage	Nettoyage enzymatique	Evaluation de la propreté	Référence
Membrane d'UF en PSf (prototype)	Effluents d'abattoir	Réacteur (statique)	Protéase A (<i>Aspergillus oryzae</i>), Alkazyme®, Zymex®	Récupération des flux à l'eau pure, Mesures d'angles de contact	[235]
Membrane d'UF en PSf (prototype)	Effluents d'abattoir	Réacteur (statique)	Protéases (<i>Bacillus Lichenformis</i> , <i>Protease A</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>), Lipases (<i>Candida cylindracea</i> , <i>Pseudimonas mendocina</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>)	Récupération des Flux à l'eau pure, Extraction par solvant + dosage par spectrophotométrie	[232]
Membrane d'UF en PSf (prototype)	Effluents de récurage de la laine	Réacteur (statique)	Protéase A type XXIII (<i>Aspergillus oryzae</i>), Protéase B type II (<i>A. oryzae</i>), Trypsin protéase C (<i>pancreas</i>), Esterase A (<i>foie de porc</i>); Alkazyme®, Zymex®	Récupération des flux à l'eau pure, Mesures d'angles de contact à l'eau	[234]
Membrane d'UF en PSf (Millipore PTTK, 30 kDa)	BSA, Protéine de petit lait reconstitué (dilution dans l'eau MilliQ)	Réacteur (statique)	Terg-A-Zyme (un mélange de détergent + enzymes), α -chymotrypsin (enzyme), Cetyl-triméthyl-Bromure de cetyltriméthylammonium (surfactant cationique)	Résistance résiduelle, Microscopie électronique en transmission (MET)	[94]

Tableau I.11. Répertoire de quelques études sur le nettoyage enzymatique dans l'IAA (suite)

Equipement nettoyé	Fluide colmatant	Mode de colmatage/ Nettoyage	Nettoyage enzymatique	Evaluation de la propreté	Référence
Plaques en flacon, Plaques dans Echangeur de chaleur (matériau non identifié)	Lait de coco	Réacteur sous agitation, Nettoyage en place	Alcalase®, Celluclast®, Sulfonate d'alkylbenzène linéaire (surfactant anionique)	Pourcentage de masse éliminée	[229]
Echangeurs de chaleur des Pasteuriseurs de lait (inox)	Lait cru	Nettoyage en place	Savinase®, Properase 1600 L®, Esperase®, Purafect®, Alcalase®, Flavourzyme™, CIPzyme™, Neutrase®	Contôle Visuel	[225]
Test d'Hydrolyse en Solution	Lactosérum	Réacteur à verre double paroi	P3-Ultrasil 62, P3-Ultrasil 53	Détermination du degré d'hydrolyse des protéines de lactosérum par la méthode du σ -phtaldialdéhyde, en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS	[233]

Le mécanisme de nettoyage des détergents enzymatiques repose sur l'hydrolyse qui affaiblit et déstructure les structures complexes. Les protéines cibles du NEP sont dégradées en molécules plus petites qui se solubilisent plus facilement et peuvent être évacuées par rinçage. Les enzymes sont capables de nettoyer les salissures en surface, mais aussi dans la profondeur des pores de la membrane, si le seuil de coupure de celle-ci le permet [181,182,224]. Un cocktail enzymatique peut aussi offrir plus d'efficacité si les enzymes qui le composent sont complémentaires dans leurs actions. De même, l'ajout des tensioactifs améliore l'efficacité de l'enzyme en abaissant la tension interfaciale de la solution, ce qui favorise le mouillage et la pénétration de l'enzyme dans le dépôt colmatant. Bien qu'elles soient actuellement plus chères, le fait que les enzymes puissent fonctionner à pH et température modérés, donc dans des conditions moins agressives envers les matériaux nettoyés, peut constituer un avantage considérable, notamment pour les membranes organiques [136].

L'utilisation d'enzymes dans le nettoyage des équipements dans diverses industries, dont les IAA, vise également à réduire la charge de produits chimiques non biodégradables dans les effluents tels que les détergents à base de NaOH ou KOH, HNO₃, etc. [225]. De plus, selon le même auteur, l'utilisation des produits enzymatiques permet de réduire considérablement la quantité de produits chimiques nécessaires, la température de nettoyage et donc de favoriser les économies d'énergie. Malgré la présence de composants non biodégradables dans les enzymes commerciales (tampons, stabilisants, etc.), ceux-ci sont dans des proportions si faibles qu'ils ne nécessitent pas de prétraitement avant d'être rejetés dans les effluents d'eaux usées.

La durée du nettoyage enzymatique influence logiquement l'efficacité de celui-ci. Dans une étude réalisée sur le nettoyage d'une membrane en PES (MWCO= 32 kg.mol⁻¹) colmatée par un mélange de BSA et de

β -Lactoglobuline (β -Lg) par une protéinase type M 'Amano' dissoute dans l'eau Milli-Q®, les auteurs ont observé que la durée de 15 min, trop courte, avait laissé beaucoup de résidus de BSA et de β -Lg (près de la moitié du colmatage de départ) mais pas de résidus enzymatiques [226]. A l'opposé, un nettoyage enzymatique de 60 min, trop long, avait laissé des résidus enzymatiques sur la membrane (mis en évidence par électrophorèse sur gel), alors qu'il n'y avait plus de BSA et peu de β -Lg sur la membrane. Après 120 min, les résidus enzymatiques avaient plus que doublé par rapport à 60 min [226]. Ainsi, plus la membrane est couverte de protéines du colmatage, moins les enzymes de la solution nettoyante s'y déposent [226]. Aux vues de ces résultats, on peut supposer que la durée optimale pour ce nettoyage se trouve entre 15 et 60 min, chaque système souillure/détergent ayant bien sûr sa durée optimale propre. Le but est donc de trouver un équilibre entre l'élimination des protéines et la déposition des enzymes sur la surface de la membrane fraîchement nettoyée.

Dans la même étude, l'augmentation de la concentration en enzyme dans la solution de nettoyage avait permis d'éliminer efficacement les protéines (totalement pour BSA et considérablement pour β -Lg), mais par la même occasion, cela avait augmenté aussi les résidus enzymatiques post NEP [226]. De même que pour la durée de nettoyage, pour chaque colmatage, il existe une concentration optimale en enzyme (à trouver). Et réaliser les nettoyages au-delà de cette concentration non seulement n'augmentera pas l'efficacité du détergent, mais pourrait même être contreproductif, voire provoquer du colmatage. De plus, les enzymes sont connues pour être sensibles au pH et à la température. Il faut donc connaître le pH et la température optimaux pour chaque étape de nettoyage.

Les résultats de Petrus et al. [226] ont aussi révélé que la vitesse d'élimination des différentes espèces de protéines diffère, indiquant donc que la stratégie de nettoyage pouvait être faite sur mesure en fonction des couches de colmatage et de leurs compositions en protéines pour le colmatage avec des mélanges de protéines. De plus, selon la même étude, si 0.1 wt% d'enzyme (Protéinase M) et 60 min sont la concentration et la durée optimale de nettoyage pour une élimination totale de BSA, cela n'est pas le cas pour β -Lg. C'est pourquoi dans un colmatage contenant des espèces multiples, il faut cibler spécifiquement chaque colmatant.

Conclusion du chapitre I

Le bilan de ce chapitre souligne l'intérêt de se pencher sur le NEP enzymatique des membranes. Au-delà du choix de l'enzyme qui s'est naturellement porté sur une subtilisine, deux questions majeures concernent la formulation, au démarrage de cette thèse.

-La première porte sur les stabilisants des enzymes commerciales. Pour comprendre s'ils interagissent ou non avec les autres constituants d'un détergent, nous avons utilisé 3 subtilisines commerciales stabilisées qui ont été mélangées à une même matrice. Les résultats figurent dans le Chapitre IV.

-La seconde porte sur le choix du système de tensioactifs pour améliorer les performances de l'enzyme stabilisée choisie. Les résultats figurent dans le chapitre V.

Références _ Chapitre I

- [1] G. Daufin, F. René, P. Aimar, Les Séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire, Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 1998. ISBN 10: 274300228X ISBN 13: 9782743002282. <https://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/les-separations-par-membrane-dans-les-procedes-de-l-industrie-alimentaire/daufin/descriptif-9782743002282>
- [2] G. Gésan-Guiziou, M. Van Audenhaege, S. Omont, D. Froelich, Séparation à membrane et fonctionnalités de fractions protéiques : vers une approche d'éco-conception, Carrefours de l'innovation agronomique (Poster) 2011. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01454265>
- [3] M. Rabiller-Baudry, « Introduction aux procédés à membranes : microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, osmose inverse », Cours de Master 2 de Chimie et Microbiologie de l'Eau- ENSCR, (France) 2011.
- [4] L. Bégoïn, Analyse de modules spiralés industriels d'ultrafiltration de fluides laitiers. Physicochimie du nettoyage de membranes en polyéthersulfone d'ultrafiltration de lait écrémé. Thèse de l'université de Rennes 1 (France) 2004. <https://www.theses.fr/2004REN10042>
- [5] S. Rouaix, Caractérisation et étude du vieillissement d'une membrane d'ultrafiltration. Thèse de l'université Paul Sabatier, Toulouse, (France) 2005.
- [6] D. Delaunay, Nettoyage éco-efficace de membranes planes et spirales d'ultrafiltration de lait écrémé. Approches physico-chimiques et hydrodynamiques concertées, Thèse de l'Université de Rennes 1 (France) 2007. <https://www.theses.fr/120325039>
- [7] K. Yadav, K.R. Morison, Effects of hypochlorite exposure on flux through polyethersulphone ultrafiltration membranes. Food Bioprod. Process. 88 (2010) 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.09.005>
- [8] R. Prulho, S. Therias, A. Rivaton, J-L. Gardette, Ageing of polyethersulfone/polyvinylpyrrolidone blends in contact with bleach water. Polym. Degrad. Stab. 98 (2013) 164–1172. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.03.011>
- [9] C. Xu, F. Shao, Z. Yi, H. Dong, Q. Zhang, J. Yu, J. Feng, X. Wu, Q. Zhang, L. Yu, L. Dong, Highly chlorine resistance polyamide reverse osmosis membranes with oxidized graphitic carbon nitride by ontology doping method, Sep. Purif. Technol. 223 (2019) 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.04.073>.
- [10] I. M. Wienk, E. E. B. Meuleman, Z. Borneman, D. B. T. H. Va, C. A. Smolders, Chemical treatment of membranes of a polymer blend: mechanism of the reaction of hypochlorite with poly(vinylpyrrolidone), J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 33 (1) (1995) 49-54.
- [11] P. Aimar, P. Bacchin, A. Maurel, Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : perméabilité et sélectivité. Techniques de l'ingénieur, 2010. <https://doi.org/10.51257/a-v1-j2789>
- [12] Fonds National pour le Développement des Adductions d'Eau (FNDAE), Les procédés membranaires pour le traitement de l'eau, Document technique FNDAE N°14. 2002. https://www.oieau.org/eaudoc/system/files/documents/37/185566/185566_doc.pdf

- [13] L. Leitner, Etude d'un procédé de filtration membranaire à sélectivité variable et contrôlée utilisant des membranes de polydiméthylsiloxane en milieu organique : application à la séparation de peptides. Thèse de l'Université de Lorraine (France) 2013. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2013_0312_LEITNER.pdf
- [14] M. Cheryan, Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, 2nd Edition, Technomic publication 1998. <https://doi.org/10.1201/9781482278743>
- [15] AFNOR, NF X45-103, Filtration des liquides - Membranes poreuses - Taux de rétention des membranes d'ultrafiltration et de nanofiltration. <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-x45103/filtration-des-liquides-membranes-poreuses-taux-de-retention-des-membranes-/fa042976/14621#AreasStoreProductsSummaryView>
- [16] P. Aimar, G. Daufin, Séparations par membranes dans l'industrie alimentaire. Techniques de l'ingénieur (2004) p F3250-1 F3250-20. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-en-agroalimentaire-42430210/separations-par-membrane-dans-l-industrie-alimentaire-f3250/principe-f3250niv10001.html>
- [17] ADEME, Les techniques membranaires à gradient de pression (2005). <https://fr.scribd.com/document/190690455/Techniques-membranaires-a-gradient-de-pression> (Visité sur Scribd le 04 avril 2024)
- [18] D. Tondeur, Science des séparations : Progrès, enjeux, obstacles, Génie des procédés, Ed. Technique et Documentation – Lavoisier, 1993, Paris, France.
- [19] Ray-flow X100; Novasep (ex Orelis), France. <https://www.alsys-group.com/en/products/products-water-membranes/filtration-skids/>
- [20] Alp'Osmose, Principe d'une membrane, 2022. <https://www.alposmose.com/article/9-principe-d-une-membrane>
- [21] Koch, Koch membrane systems, (n.d.). <https://www.kochmembrane.com/en-US/>.
- [22] A. Abidi, Étude de mécanismes de transfert des Orthophosphates à travers une membrane de nanofiltration en mode bth. Effet de la matrice expérimentale sur la sélectivité et modélisation phénoménologique, Thèse de l'Université Mohamed Khider-Biskra (Algérie) 2014. <http://thesis.univ-biskra.dz/1283/>
- [23] S. Z. Belalia, Préparation des membranes à base des matériaux polymères et inorganiques. Mémoire de master en chimie de l'université Abou-Bakr Belkaid-Tlemcen (Algérie) 2018. <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/14176/1/Preparation-des-Membranes-a-base-des-materiaux-Polymeres.pdf>
- [24] W.J. Koros, Y.H. Ma, T. Shimidzu, Terminology for membranes and membrane processes (IUPAC Recommendations 1996), Pure Appl. Chem. 68 (1996) 1479–1489. <https://doi.org/10.1351/pac199668071479> .
- [25] A.S. Michaels, New separation techniques for the CPI, Chem. Eng. Process. (1968)31–42.
- [26] A. Lejeune, Nanofiltration organique appliquée à l'hydroformation des oléfines dans le toluène : étude expérimentale, conception et simulations de cascades, Thèse de l'Université de Rennes 1 (France) 2017. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01858634/document>

- [27] X. Shi, G. Tal, N.P. Hankins, V. Gitis, Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review, *J. Water Process Eng.* 1 (2014) 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.04.003>.
- [28] N. W. Diagne, Le nettoyage : une étape clef pour une production durable par procédé à membrane. Réflexion sur le lien entre conditions de productions et nettoyabilité de membranes PES de l'industrie laitière. Thèse de l'université de Rennes 1 (France) 2013. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01019725/document>.
- [29] R.W. Field, D. Wu, J.A. Howell, B.B. Gupta, Critical flux concept for microfiltration fouling, *J. Membr. Sci.* 100 (1995) 259–272. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)00265-Z](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)00265-Z).
- [30] B. Espinasse, P. Bacchin, P. Aimar, On an experimental method to measure critical flux in ultrafiltration, *Desalination* 146 (2002) 91–96. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00495-2](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00495-2).
- [31] P. Bacchin, D. Si-Hassen, V. Starov, M.J. Clifton, P. Aimar, A unifying model for concentration polarization, gel-layer formation and particle deposition in cross-flow membrane filtration of colloidal suspensions, *Chem. Eng. Sci.* 57 (2002) 77–91. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(01)00316-5).
- [32] D. Wu, Critical flux measurement for model colloids, *J. Membr. Sci.* 152 (1999) 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00200-2).
- [33] S.S. Madaeni, A.G. Fane, D.E. Wiley, Factors influencing critical flux in membrane filtration of activated sludge, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 539–543. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199906\)74:6<539::AID-JCTB70>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199906)74:6<539::AID-JCTB70>3.0.CO;2-X).
- [34] M. Mänttari, M. Nyström, Critical flux in NF of high molar mass polysaccharides and effluents from the paper industry, *J. Membr. Sci.* 170 (2000) 257–273. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00373-7](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00373-7).
- [35] R.W. Field, G.K. Pearce, Critical, sustainable and threshold fluxes for membrane filtration with water industry applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 164 (2011) 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.008>.
- [36] H. Bouzid, Rôle de la physico-chimie sur les flux limites et critiques en ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse : application à des effluents laitiers modèles, Thèse de l'Université de Rennes 1 (France) 2008. <https://www.theses.fr/2008REN1S180>
- [37] H. Bouzid, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, F. Rousseau, Z. Derriche, N.E. Bettahar, Impact of zeta potential and size of caseins as precursors of fouling deposit on limiting and critical fluxes in spiral ultrafiltration of modified skim milks, *J. Membr. Sci.* 314 (2008) 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.01.028>.
- [38] M. Rabiller-Baudry, H. Bouzid, B. Chaufer, L. Paugam, D. Delaunay, O. Mekmene, S. Ahmad, F. Gaucheron, On the origin of flux dependence in pH-modified skim milk filtration, *Dairy Sci. Technol.* 89 (2009) 363–385. <https://doi.org/10.1051/dst/2009018>.
- [39] N. W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.
- [40] J. Wang, C. Li, F. Wang, B. Yu, Y. Luo, H. Zeng, H. Zhu, Hydrophilic modification of PTFE microfiltration flat membrane by crosslinking OCMCS-PEI to enhance anti-fouling property, *Prog. Org. Coat.* 135 (2019) 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.06.035>.

- [41] H. Yuan, J. Ren, Preparation of poly (vinylidene fluoride) (PVDF)/acetylated poly (vinyl alcohol) ultrafiltration membrane with the enhanced hydrophilicity and the anti-fouling property, *Chem. Eng. Res. Des.* 121 (2017) 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.03.023>.
- [42] J. Wang, Y. Liu, T. Liu, X. Xu, Y. Hu, Improving the perm-selectivity and anti-fouling property of UF membrane through the micro-phase separation of PSf-b-PEG block copolymers, *J. Membr. Sci.* 599 (2020) 117851. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.117851>.
- [43] W. Jantaporn, Technologies membranaires innovantes pour la réutilisation des eaux. Thèse de l'Université de Toulouse 3 (France) 2016. <https://theses.hal.science/tel-01686282/document>
- [44] A. Rahimi, H. Mahdavi, Zwitterionic-functionalized GO/PVDF nanocomposite membranes with improved anti-fouling properties, *J. Water Process Eng.* 32 (2019) 100960. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100960>.
- [45] O.T. Mahlangu, R. Nackaerts, J.M. Thwala, B.B. Mamba, A.R.D. Verliefdé, Hydrophilic fouling-resistant GO-ZnO/PES membranes for wastewater reclamation, *J. Membr. Sci.* 524 (2017) 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.11.018>.
- [46] M. Frappart, Traitement d'effluents modèles de l'industrie laitière par filtration dynamique, Thèse de l'UTC Compiègne (France) 2006. <https://bibliotheque.utc.fr/Default/doc/SYRACUSE/682632/traitement-d-effluents-modeles-de-l-industrie-laitiere-par-filtration-dynamique?lg=fr-FR>
- [47] M.Y. Jaffrin, L.-H. Ding, O. Akoum, A. Brou, A hydrodynamic comparison between rotating disk and vibratory dynamic filtration systems, *J. Membr. Sci.* 242 (2004) 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.07.029>.
- [48] O. Al-akoum, M. Mercier-Bonin, L. Ding, C. Fonade, P. Aptel, M. Jaffrin, Comparison of three different systems used for flux enhancement: application to crossflow filtration of yeast suspensions, *Desalination* 147 (2002) 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00567-2](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00567-2).
- [49] O. Akoum, M. Y. Jaffrin, L.H. Ding, M. Frappart, Treatment of dairy process waters using a vibrating filtration system in NF and RO membranes, *J. Membr. Sci.* 235 (2004) 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.01.026>.
- [50] O. Akoum, M.Y. Jaffrin, L.H. Ding, Concentration of total milk proteins by high shear ultrafiltration in a vibrating membrane module, *J. Membr. Sci.* 247(2005) 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.09.021>.
- [51] M. Frappart, M. Jaffrin, L.H. Ding, Reverse osmosis of diluted skim milk: Comparison of results obtained from vibratory and rotating disk modules, *Sep. Purif. Technol.* 60 (2008) 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.09.007>.
- [52] M. Frappart, M.Y. Jaffrin, L.H. Ding, V. Espina, Effect of vibration frequency and membrane shear rate on nanofiltration of diluted milk, using a vibratory dynamic filtration system, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008) 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.025>.
- [53] Y. Jin, N. Hengl, S. Baup, F. Pignon, N. Gondrexon, A. Magnin, M. Sztucki, T. Narayanan, L. Michot, B. Cabane, Effects of ultrasound on colloidal organization at nanometer length scale during cross-flow ultrafiltration probed by in-situ SAXS, *J. Membr. Sci.* 453 (2014) 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.001>.

- [54] N. Hengl, Y. Jin, F. Pignon, S. Baup, R. Mollard, N. Gondrexon, A. Magnin, L. Michot, E. Paineau, A new way to apply ultrasound in cross-flow ultrafiltration: Application to colloidal suspensions, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.008>.
- [55] A. Simon, L. Penpenic, N. Gondrexon, S. Taha, G. Dorange, A comparative study between classical stirred and ultrasonically-assisted dead-end ultrafiltration, *Ultrason. Sonochem.* 7 (2000) 183–186. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00039-0).
- [56] G. Zin, F.M. Penha, K. Rezzadori, F.L. Silva, K. Guizoni, J.C.C. Petrus, J.V. Oliveira, M. Di Luccio, Fouling control in ultrafiltration of bovine serum albumin and milk by the use of permanent magnetic field, *J. Food Eng.* 168 (2016) 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.033>.
- [57] M. Aslam, A. Charfi, G. Lesage, M. Heran, J. Kim, Membrane bioreactors for wastewater treatment: A review of mechanical cleaning by scouring agents to control membrane fouling, *Chem. Eng. J.* 307(2017) 897–913. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.08.144>.
- [58] Q. Yang, J. Chen, F. Zhang, Membrane fouling control in a submerged membrane bioreactor with porous, flexible suspended carriers, *Desalination* 189 (2006) 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.07.011>.
- [59] T. Kurita, K. Kimura, Y. Watanabe, Energy saving in the operation of submerged MBRs by the insertion of baffles and the introduction of granular materials, *Sep. Purif. Technol.* 141 (2015) 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.11.025>.
- [60] A. Cabassud, S. Laborie, L. Durand-Bourlier, J.M. Laine, Air sparging in ultrafiltration hollow fibers: relationship between flux enhancement, cake characteristics and hydrodynamic parameters, *J. Membr. Sci.* 181(1) (2001) 57-69. DOI: [10.1016/S0376-7388\(00\)00538-X](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00538-X)
- [61] S. M. Miron, Study of interactions between proteins and surfaces: influence of hydrodynamic and physical operating conditions. Thèse de l'université de Mulhouse. Mulhouse (France) 2020. <https://www.theses.fr/2020MULH2949>
- [62] F. Gaucheron, The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 45 (2005) 473 – 483. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>.
- [63] J.A. Lucey, D.S. Horne, Milk salts: Technological Significance in: P. McSweeney, P.F. Fox (Eds.) *Adv. Dairy Chem.*, Springer New York, New York, NY: (2009) 351-389. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_9.
- [64] F. Doudiès, Filtration de dispersions de micelles de caséine. Propriétés physiques, rhéologiques et cohésives des couches concentrées accumulées à la surface de la membrane, Thèse de l'Université de Rennes 1, Agrocampus Ouest, 2019. <https://www.theses.fr/2019NSARB332>
- [65] L. Guéguen, A. Pointillat, The bioavailability of dietary calcium, *Journal of American College of Nutrition* 19 (2) (2000) 199S-136S. DOI: [10.1080/07315724.2000.10718083](https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718083)
- [66] L. Buhler, Quelles sont les meilleures sources de calcium? 2018. Récupéré sur <https://www.nutriting.com/actu/quelles-sont-les-meilleures-sources-de-calcium/?v=11aedd0e4327>. (Site Web visité le 07août 2023).
- [67] H-S. Kwak, W-J. Lee, M-R. Lee, Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption, *International Dairy Journal* 22 (2) (2012) 147-151. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.002>

- [68] P. Charles, Calcium absorption and calcium bioavailability, *J. Intern Med.* 231 (2) (1992) 161-168. DOI: [10.1111/j.1365-2796.1992.tb00519.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1992.tb00519.x)
- [69] Groupe d'Etude des Marchés de Restauration Collective et de Nutrition (GEM RCN), Specification technique de l'achat public : Laits et produits laitiers, 2009. http://www.minefe.gouv.fr/directions_services/daj/guide/gpem/table.html
- [70] P. Kumar, N. Sharma, R. Ranjan, S. Kumar, Z.F. Bhat, D.K. Jeong, Perspective of membrane technology in dairy industry: a review, *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 26 (9) (2013) 1347 -1358. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.13082>
- [71] A. Saxena, B.P. Tripathi, M. Kumar, V.K. Shahi, Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview, *Adv. Colloid Interface Sci.* 145 (2009) 1-22. DOI: [10.1016/j.cis.2008.07.004](https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.004)
- [72] J. W. Siebert, L. Alejandro, K. Sung-Yong, The commercial potential of new dairy products from membrane technology, *J. Food Distrib. Res.* 32(3) (2001) 24-33. DOI: [10.22004/ag.econ.27582](https://doi.org/10.22004/ag.econ.27582)
- [73] G. Daufin, J. P. Escudier, H. Carrère, S. Berot, L. Fillaudeau, M. Decloux, Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry, *Trans. ICheme* 79 (2001) 89-102. <https://doi.org/10.1205/096030801750286131>
- [74] M. Rosenberg, Current and future applications of membrane processes in the dairy industry, *Trends Food Sci. Technol.* 6 (1) (1995) 12-19. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88912-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88912-8)
- [75] A. E. Childress, M. Elimelech, Relating nanofiltration membrane performance to membrane charge (Electrokinetic) characteristics, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3710-3716. <https://doi.org/10.1021/es0008620>
- [76] Y. Pouliot, Membrane processes in dairy technology-From a simple idea to worldwide panacea, *Int. Dairy J.* 18 (2008) 735-740. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.005>
- [77] J. L. Maubois, G. Mocquot, L. Vassal, A method for processing milk and dairy products. French Patent (1969) FR 2 052121.
- [78] K. B. Qvist, Objective and sensory assessment of texture of danbo cheese made from milk concentrated 2-fold using ultrafiltration. 272, Beretning/ Statens Mejeriforsøg, Hillerød, (Denmark) 1987.
- [79] D. R. Henning, R. J. Baer, A. N. Hassan, R. Dave, Major advances in concentrated and dry milk products, cheese and milk fat-based concepts, *J. Dairy Sci.* 89 (2006) 1179-1188. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72187-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72187-7)
- [80] P. Jelen, A. Renz-Schauen, Quarg manufacturing innovations and their effects on quality, nutritive value, and consumer acceptance, *Food Technol.* 43 (1989) 74-81.
- [81] J. Van Leeuwen, H. Freeman, J. Sutherland, W. Jameson, European Patent (1987) *WP* 0 120 879 B1.
- [82] V. V. Mistry, J. L. Maubois, Application of membrane separation technology to cheese production. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Ed. P. F. Fox). Chapman & Hall: London, (1993) 493-522. DOI: [10.1016/B978-0-12-417012-4.00027-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00027-2)

- [83] M. Rabiller-Baudry, M. Le Maux, B. Chaufer, L. Bégoïn, Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR—FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane, *Desalination* 146 (2002) 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00503-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00503-9).
- [84] M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, L. Bégoïn, D. Delaunay, M. Fernandez-Cruz, C. Phina-Ziebin, C. Laviades-Garcia de Guadiana, B. Chaufer, Alkaline cleaning of PES membranes used in skimmed milk ultrafiltration: from reactor to spiral-wound module via a plate-and-frame module, *Desalination* 191 (2006) 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.07.028>
- [85] K.S.Y. Ng, M. Haribabu, D.J.E. Harvie, D.E. Dunstan, G.J.O. Martin, Mechanisms of flux decline in skim milk ultrafiltration: A review, *J. Membr. Sci.* 523 (2017) 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.09.036>.
- [86] M.H. Tran-Ha, D. Wiley, N.D. Lawrence, M. Iyer, Development of a Standard Cleaning Protocol to Evaluate the Effect of Cleaning on Membrane Performance, *Australian J. of Dairy Technol.* 57 (1) (2002) 20. https://www.researchgate.net/publication/259045306_Development_of_a_Standard_Cleaning_Protocol_to_Evaluate_the_Effect_of_Cleaning_on_Membrane_Performance
- [87] T. Mohammadi, S.S. Madaeni, M.K. Moghadam, Investigation of membrane fouling, *Desalination* 153 (2003) 155–160. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)01118-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)01118-9).
- [88] N. Norazman, W. Wu, H. Li, V. Wasinger, H. Zhang, V. Chen, Evaluation of chemical cleaning of UF membranes fouled with whey protein isolates via analysis of residual protein components on membranes surface, *Sep. Purif. Technol.* 103 (2013) 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.10.039> .
- [89] A. Makardij, X.D. Chen, Farid M. M., Microfiltration and ultrafiltration of milk: some aspects of fouling and cleaning. *Trans. IChemE.* 77 (2) (1999) 107-113. <https://doi.org/10.1205/096030899532394>
- [90] T. Berg, R. Ipsen, N. Ottosen, A. Tolkach, F. van den Berg, Influence of Reduced Cleaning-In-Place on Aged Membranes during Ultrafiltration of Whey, *Int. J. Food Eng.* 11(4) (2015) 447-455. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2014-0240>.
- [91] M. Leu, A. Marciniak, J. Chamberland, Y. Pouliot, L. Bazinet, A. Doyen, Effect of skim milk treated with high hydrostatic pressure on permeate flux and fouling during ultrafiltration, *J. Dairy Sci.* 100 (2017) 7071–7082. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12774>.
- [92] B. James, Y. Jing, X. D. Chen, Membrane fouling during filtration of milk—a microstructural study, *J. Food Eng.* 60 (4) (2003) 431-437. DOI: [10.1016/S0260-8774\(03\)00066-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00066-9)
- [93] M.J. Luján-Facundo, J.A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Urbe, S. Álvarez-Blanco, Cleaning efficiency enhancement by ultrasounds for membranes used in dairy industries, *Ultrason. Sonochem.* 33 (2016) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.018>.
- [94] M.J. Muñoz-Aguado, D.E. Wiley, A.G. Fane, Enzymatic and detergent cleaning of a polysulfone ultrafiltration membrane fouled with BSA and whey, *J. Membr. Sci.* 117 (1996) 175–187. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/0376-7388(96)00066-X).
- [95] A. Pierre, J. Fauquant, Y. Le Graet, M. Piot, J.L. Maubois, Préparation de phosphocaseinate natif par microfiltration sur membrane, *Lait* 72 (5) (1992) 461-474. DOI: [10.1051/lait:1992534](https://doi.org/10.1051/lait:1992534)

- [96] A. Caron, D. Saint Gelais, Y. Pouliot, Coagulation of milk enriched with ultrafiltered or diafiltered microfiltered milk retentate powders, *Int. Dairy J.* 7 (1997) 445-451. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00024-1)
- [97] J. L. Maubois, Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology, *Aust. J. Dairy Technol.* 57 (2) (2002) 92 - 96. https://www.researchgate.net/publication/279567250_Membrane_microfiltration_A_tool_for_a_new_approach_in_dairy_technology#fullTextFileContent
- [98] K. Schafroth, C. Fragnière, H. P. Bachmann, Herstellung von Käse aus microfiltrierter. konzentrierter Milch, *Deutsche Milchwirtschaft* 56 (2005) 861-863.
- H.J. Schlüssler, Zur von reinigungsvorangen an festen oberflächen brauwissenschaft, *Brauwissenschaft* 29 (1976) 263–268.
- [99] P.J. Pedersen, N. Ottosen, *New Applications of Membrane Processes*. IDF Spl Iss 9201. Brussels (Belgium), (1992) 67-76.
- [100] F. Lipnizki, Cross-flow membrane applications in the food industry. In: *Membrane Technology, Vol 3: Membranes for Food Applications* (Ed. Klaus-Viktor Peinemann, Suzana Pereira Nunes, and Lidietta Giorno). WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim (2010). ISBN:978-3-527-31482-9. https://www.academia.edu/33867205/Membrane_Technology_Volume_Membranes_for_Food_Applications
- [101] H. Goudedranche, J.J. Fauquant, J. L. Maubois, Fractionation of globular milk fat by membrane microfiltration, *Lait* 80 (1) (2000) 93-98. DOI: [10.1051/lait:2000110](https://doi.org/10.1051/lait:2000110)
- [102] J. L. Maubois, G. Ollivier, *New Applications of Membrane Processes*. IDF Spl. Iss. 9201. Brussels, (Belgium) (1992) 15-22.
- [103] S. Popovic, M. Djuric, S. Milanovic, M.N. Tekic, N. Lukic, Application of an ultrasound field in chemical cleaning of ceramic tubular membrane fouled with whey proteins, *J. Food Eng.* 101 (2010) 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.012>
- [104] A. Anand, A. Hassan, M. Avadhanula, The effects of biofilms formed on whey reverse osmosis membranes on the microbial quality of the concentrated product, *Int. J. Dairy Technol.* 65 (2012) 451-455. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00848.x>
- [105] L. Bégoïn, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, C. Faille, P. Blanpain-Avet, T. Bénézech, T. Doneva, Methodology of analysis of a spiral-wound module. Application to PES membrane for ultrafiltration of skimmed milk, *Desalination* 192 (2006) 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.10.010>.
- [106] D. Delaunay, M. Rabiller-Baudry, J. M. Gozálvez-Zafrilla, B. Balannec, M. Frappart, L. Paugam, Mapping of protein fouling by FTIR-ATR as experimental tool to study membrane fouling and fluid velocity profile in various geometries and validation by CFD simulation, *Chemical Engineering and Processing* 47(2008) 1106 – 1117. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.12.008>.
- [107] M. Rabiller-Baudry, N.W. Diagne, D. Lebordais, How the experimental knowledge of the irreversible fouling distribution can contribute to understand the fluid circulation in a spiral ultrafiltration membrane, *Separation and Purification Technology*, 136 (2014) 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.040>.

- [108] M. Rabiller-Baudry, A. Bouzin, C. Hallery, J. Girard, C. Leperoux, Evidencing the chemical degradation of a hydrophilised PES ultrafiltration membrane despite protein fouling, *Separation and Purification Technology*, 147 (2015) 62-81. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.056>
- [109] M. Rabiller-Baudry, P. Thomas, T. K. H. Nguyen, J. Girard, M. E.M. E. Jastimi, P. Loulergue, Simulation of membrane ageing to go ahead in fouling and cleaning understanding during skim milk ultrafiltration, *Food and Bioproducts Processing* 113 (2019) 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.10.004>
- [110] S. El Morr, Etude de l'impact du vieillissement induit par les étapes de désinfection oxydante sur les performances de membrane en PES/PVP au cours de l'ultrafiltration de lait écrémé. Mémoire de fin d'études de Master 2 de l'Université Libanaise (2019).
- [111] C. G. Kumar, S. K. Anand, Significance of microbial biofilms in food industry: a review, *Int. J. Food Microbiol.* 42 (1998) 9-27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)
- [112] X. Tang, S.H. Fint, J.D. Brooks, R.J. Bennett, Factors affecting the attachment of micro-organisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis membranes in dairy processing plants, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 443-451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04214.x>
- [113] EMD Millipore, Techniques for demonstrating cleaning effectiveness of ultrafiltration membranes: A case study: Pellicon®2 Cassette Processing of Therapeutic Proteins. Technical Brief, (Canada) 2015. <file:///C:/Users/sophie.kavughomissio/Downloads/tb1502en-ms.pdf>
- [114] M.J. Luján-Facundo, J.A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Urbe, S. Álvarez-Blanco, Evaluation of cleaning efficiency of ultrafiltration membranes fouled by BSA using FTIR-ATR as a tool, *Journal of Food Engineering* 163 (2015) 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.015>
- [115] Y. Song, X. Li, Y. Sun, Y. Wang, X. Bai, X. Zhang, N. Zhang, K. Jiang, Nanofiltration fouling behaviors with different membrane materials induced by residual natural organics left over after ultrafiltration unit encountered with divalent cations, *Chemical Engineering Journal* 413 (2021) 127398. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127398>
- [116] Y. Meng, Q. Zhong, Y. Liu, Z. Yan, Y. Liang, H. Chang, H. Liang, R.D. Vidic, Evaluating membrane cleaning for organic fouling in direct contact membrane distillation, *Journal of Cleaner Production*, 410 (2023) 137319. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137319>
- [117] L. Paugam, D. Delaunay, N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: On the real effect of nitric acid step, *J. Membr. Sci.* 428 (2013) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>.
- [118] M.A. Arguello, S. Alvarez, F.A. Riera, R. Alvarez, Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins, *Sep. Purif. Technol.* 41 (2) (2005) 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.05.005>
- [119] L. Le Petit, Développement de méthodologie, conception et validation de détergents/biocides pour le nettoyage en place de membranes polymères de l'industrie laitière. Thèse de l'Université de Rennes 1 (France) 2020. <https://www.theses.fr/2020REN1S011>.
- [120] M. Rabiller-Baudry, P. Loulergue, J. Girard, M. E.M.E Jastimi, A. Bouzin, M. Le Gallic, A. Moreac, P. Rabiller, Consequences of membrane ageing on real or misleading evaluation of membrane cleaning by

- flux measurements. *Separation and Purification Technology*, 259 (2021)118044. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118044>
- [121] S. Kavugho Mission, M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk, poster presentation at Fouling and Cleaning in Food Processing conference, March 28-30, 2022, Lille, France.
- [122] S. Kavugho Mission, A. Javelle, M. Rabiller-Baudry, Impact of enzyme stabilizers and formulation on the real efficiency of enzymatic detergent useful to clean polymer membrane fouled in skim milk ultrafiltration. Poster presentation at The special Edition of Euromembrane 2022 to celebrate the 40th EMS Anniversary, Nov 20-24, 2022, Naples, Italy.
- [123] M. Rabiller-Baudry^a, L. Bégoïn, D. Delaunay, L. Paugam, B. Chaufer, A dual approach of membrane cleaning based on physico-chemistry and hydrodynamics: Application to PES membrane of dairy industry, *Chem. Eng. Process Intensif.* 47 (2008) 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.01.026>.
- [124] E. Idil Mouhoumed, A. Szymczyk, A. Schäfer, L. Paugam, Y.H. La, Physico-chemical characterization of polyamide NF/RO membranes: insight from streaming current measurements, *J. Membr. Sci.* 461 (2014) 130–138, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.03.025>.
- [125] A. Yaroshchuk, T. Luxbacher, Interpretation of electrokinetic measurements with porous films: role of electric conductance and streaming current within porous structure, *Langmuir* 26 (2010) 10882–10889, <https://doi.org/10.1021/la100777z>.
- [126] S. Déon, P. Fievet, C. Osman Doubad, Tangential streaming potential/current measurements for the characterization of composite membranes, *J. Membr. Sci.* 423–424 (2012) 413–421, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.08.038>.
- [127] A. Szymczyk, Y.I. Dirir, M. Picot, I. Nicolas, F. Barrière, Advanced electrokinetic characterization of composite porous membranes, *J. Membr. Sci.* 429 (2013) 44–51, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.11.076>.
- [128] C. Rouquié, S. Liu, M. Rabiller-Baudry, A. Riaublanc, M. Frappart, E. Couallier, A. Szymczyk, Electrokinetic leakage as a tool to probe internal fouling in MF and UF membranes, *Journal of Membrane Science*, 599 (2020) 117707. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117707>
- [129] L. N. Sim, J. Gu, H. G. L. Coster, A. G. Fane, Quantitative determination of the electrical properties of RO membranes during fouling and cleaning processes using electrical impedance spectroscopy, *Desalination* 379 (2016) 126-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2015.11.006>
- [130] L. N. Sim, Z.J. Wang, J. Gu, H. G. L. Coster, A. G. Fane, Detection of reverse osmosis membrane fouling with silica, bovine serum albumin and their mixture using in-situ electrical impedance spectroscopy, *Journal of Membrane Science* 443 (2013) 45-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2013.04.047>
- [131] Z. Hu, A. Antony, G. Leslie, P. Le-Clech, Real-time monitoring of scale formation in reverse osmosis using electrical impedance spectroscopy, *Journal of Membrane Science* 453 (2014) 320-327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2013.11.014>

- [132] J. Cen, M. Vukas, G. Barton, J. Kavanagh, H.G.L. Coster, Real time fouling monitoring with Electrical Impedance Spectroscopy, *Journal of Membrane Science* 484 (2015) 133-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2015.03.014>
- [133] L. Gaedt, T.C. Chilcott, M. Chan, T. Nantawisarakul, A. G. Fane, H. G. L. Coster, Electrical impedance spectroscopy characterisation of conducting membranes: II. Experimental, *Journal of Membrane Science* 195 (2002) 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(01\)00542-7](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00542-7)
- [134] H. J. Tanudjaja, A. Q. Q. Ng, J. W. Chew, Mechanistic insights into the membrane fouling mechanism during ultrafiltration of high-concentration proteins via in-situ electrical impedance spectroscopy (EIS), *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 106 (2022) 429-448. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.11.019>
- [135] S. Bannwarth, T. Trieu, C. Oberschelp, M. Wessling, On-line monitoring of cake layer structure during fouling on porous membranes by in situ electrical impedance analysis, *Journal of Membrane Science* 503 (2016) 188-198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2016.01.009>
- [136] M. Rabiller-Baudry, C. Causserand, G. Gesan-Guiziu, Le Nettoyage des équipements à membrane : une étape clef dans la production durable : applications : fluides alimentaires, eau potable, eaux usées, Cahier n°5, Club français des membranes, CFM, Aix en Provence (France) 2012. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02809811>
- [137] C. Regula, E. Carretier, Y. Wyart, G. Gésan-Guiziu, A. Vincent, D. Boudot, P. Moulin, Chemical cleaning/disinfection and ageing of organic UF membranes: A review, *Water Res.* 56 (2014) 325–365. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.050>.
- [138] S. Platt, M. Nyström, Colorimetric staining of ultrafiltration membranes fouled with BSA, *Desalination* 199 (2006) 210–212. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.050>.
- [139] A. Chahboun, R. Coratger, F. Ajustron, J. Beauvillain, P. Aimar, V. Sanchez, Comparative study of micro- and ultrafiltration membranes using STM, AFM and SEM techniques. *Ultramicroscopy* 41(1992) 235–244. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(92\)90112-W](https://doi.org/10.1016/0304-3991(92)90112-W).
- [140] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [141] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- [142] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>
- [143] T. Bénézech, M. Lalande, Chapitre 12 “Le nettoyage en place (NEP)” - Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries, Lavoisier (1999). <https://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/nettoyage-desinfection-et-hygiene-dans-les-bio-industries/leveau/descriptif-9782743008185>
- [144] T. Bénézech, C. Lelièvre, J. M. Membré, A.-F. Viet, C. Faille, A new test method for in-place cleanability of food processing equipment, *J. Food Eng.* 54 (2002) 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00171-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00171-6).

- [145] L. Paugam, D. Delaunay, M. Rabiller-Baudry, Cleaning efficiency and impact on production fluxes of oxidising disinfectants on a pes ultrafiltration membrane fouled with proteins, *Food Bioprod. Process.* 88 (2010) 425–429. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.10.005>.
- [146] M. Rabiller-Baudry^b, D. Delaunay, L. Paugam, A. Pihlajamäki, M. Nyström, Complementary characterizations by streaming potential and FTIR-ATR of surface of virgin and fouled PES ultrafiltration membrane: What kind of information on fouling occurrence? in: Szymczyk A. (Ed.), *Surface Electrical Phenomena in Membranes and Microchannels*, Transworld Research Network Editions, Kerala, India, 87 (2008) 326-336
- [147] G. Gésan-Guiziu, E. Boyaval, G. Daufin, Critical stability conditions in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition, *J. Membr. Sci.* 158 (1999) 211–222. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00017-4).
- [148] A. Rahimpour, S.S. Madaeni, Improvement of performance and surface properties of nano-porous polyethersulfone (PES) membrane using hydrophilic monomers as additives in the casting solution, *J. Membr. Sci.* 360 (1–2) (2010) 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.05.036>
- [149] A. V. Bilydukevich, T.V. Plisko, F. Lipnizki, S.A. Pratsenko, Correlation between membrane surface properties, polymer nature and fouling in skim milk ultrafiltration, *Colloids and Surface A/ Physicochemical and Engineering Aspects*, 605 (2020) 125387. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125387>
- [150] Y. Sylla, Nettoyage en place des lignes agro-industrielles: Etude cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires. Thèse d'AgroParis'Tech (France) 2011. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00809268>.
- [151] A. Grasshoff, Environmental impact of the use of alkaline cleaning solutions, In *Fouling and Cleaning in Food Processing* (1989) 107–114. H. G. Kessler and D. B. Lund, eds. University of Munich, Germany.
- [152] M. R. Bird, M. Bartlett, CIP optimisation for the food industry: relationships between detergent concentration, temperature and cleaning time, *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 73 (1995) 63–70. https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902162633987655
- [153] G. K. Christian, Cleaning of carbohydrate and dairy deposits. PhD thesis, University of Birmingham (UK) 2004. <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.553766>.
- [154] Y. Lequette, C. Faille, A. Ronse, C. Slomianny, E. Garénaux, Y. Guerardel, Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel, *International Journal of Food Microbiology* 143 (2010) 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.038>.
- [155] J.-Y. Leveau, M. Bouix, Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries, *Lavoisier*, Paris, (France) 1999. <http://www.lavoisier.eu/books/food-science/nettoyage-desinfection-et-hygiene-dans-les-bio-industries/leveau/description-9782743008185>
- [156] H.J. Schlüssler, Zur von reinigungsvorangen an festen oberflächen brauwissenschaft, *Brauwissenschaft* 29 (1976) 263–268.
- [157] A.I.S.E., The case for the “A.I.S.E. Low Temperature washing” initiative. Substantiation Dossier/June 2013. www.iprefer30.eu

- [158] M-N. Perlat , M. Lalande, G. Corrieu, Etude du nettoyage d'un stérilisateur de lait U.H.T. Ordre d'utilisation des détergents alcalin et acide et aspects cinétiques, Le Lait, INRA Editions, 66 (1) (1986) 31-63. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00929055/document>
- [159] I. Levitsky, A. Duek, E. Arkhangelsky, D. Pinchev, T. Kadoshian, H. Shetrit, R. Naim, V. Gitis, Understanding the oxidative cleaning of UF membranes. *J. Membr. Sci.* 377 (1–2) (2011) 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.04.046>
- [160] I. Levitsky, A. Duek, R. Naim, E. Arkhangelsky, V. Gitis, Cleaning UF membranes with sample and formulated solutions, *Chem. Eng. Sci.* 69 (1) (2012) 679–683. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.10.060>
- [161] R. Naim, I. Levitsky, V. Gitis, Surfactant cleaning of UF membranes fouled by proteins, *Sep. Purif. Technol.* 94 (2012) 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.031>
- [162] L. Suárez, M.A. Díez, R. García, F.A. Riera, Membrane technology for the recovery of detergent compounds: A review, *J. Ind. Eng. Chem.* 18 (2012) 1859–1873. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.05.015>
- [163] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by HLB, *J. Soc. Cosmet. Chem.* N°1 (1949) 311–26. <https://library.scconline.org/v001n05/2>
- [164] W.C. Griffin, Calculation of HLB values of non-ionic surfactants, *J. Soc. Cosmet. Chem.* N°5 (1954) 249–56. <https://library.scconline.org/journal-of-cosmetic-science/~searchResults?searchMode=app&searchParam-start=0&searchParam-page=20&searchParam-terms=Griffin+W.C.%2C+1954.+Calculation+of+HLB+values+of+non-ionic+surfactants%2C+J+Soc+Cosmet+Chem+N%C2%B05.+249%E2%80%9356&searchParam-depth=metadata&searchParam-context=1438798237&searchParam-sort=relevance&searchParam-PageRange-Year=%7B%22operator%22%3A%22%22%7D>
- [165] K. Holmberg, D.O. Shah, M.J. Schwuger, eds., Handbook of applied surface and colloid chemistry, Wiley, Chichester, England; New York, 2002. https://library.samdu.uz/files/784369c69c589fbfe042ecde9b46ee6c_HANDBOOK%20OF%20APPLIED%20SURFACE%20AND%20COLLOID%20CHEMISTRY.pdf
- [166] Z. Mai, V. Butin, M. Rakib, H. Zhu, M. Rabiller-Baudry, E. Couallier, Influence of bulk concentration on the organisation of molecules at a membrane surface and flux decline during reverse osmosis of an anionic surfactant, *J. Membr. Sci.* 499 (2016) 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.10.012>.
- [167] N. D'Souza, A. Mawson, Membrane Cleaning in the Dairy Industry: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (2005) 125–134. <https://doi.org/10.1080/10408690490911783>
- [168] C. Rondel, Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives, Thèse de l'Université de Toulouse (France) 2009. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000737/>
- [169] M.J. Rosen, Synergism in mixtures containing zwitterionic surfactants, *Langmuir* 7(1991) 885–888. <https://doi.org/10.1021/la00053a012>.
- [170] D.N. Rubingh, Mixed Micelle Solutions, in: K.L. Mittal (Ed.), *Solut. Chem. Surfactants Vol.1*, Springer New York, Boston, MA: (1979) 337–354. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7880-2_15.

[171] Analytice, Analyse de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, CAS :60-00-4) dans les sols, 2020. Récupéré sur le site : <https://www.analytice.com/analyse-acide-ethylenediaminetetraacetique-edta-cas-60-00-4-sols/>

[172] Ecolabel Europe. « [Product Groups and Criteria - Ecolabel - EUROPA](#) », sur ec.europa.eu (consulté le 31 août 2022).

[173] AkzoNobel online presentation, Why does a presentation on GLDA focus on the detergent industry? What is wrong with the traditional chelating agents? (n.d.). 2013. <https://www.slideserve.com/rachana/1-why-does-a-presentation-on-gl-da-focus-on-the-detergents-industry-2-what-is-wrong-with-the-traditional-che>.

[174] P. Mourcel, S. Gougeon-Diederichs, Produit et méthode de nettoyage et de désinfection dans le domaine de l'hygiène en production laitière, European Patent (2007) 1741451 B1. <https://patentimages.storage.googleapis.com/c7/ac/4a/43b7196910ac2f/EP1741451B1.pdf>

[175] Suez water handbook - inhibitions de la précipitation, (n.d.). <https://www.suezwaterhandbook.fr/eau-et-generalites/processus-elementaires-du-genie-physico-chimique-en-traitement-de-l-eau/precipitations-chimiques/inhibitions-de-la-precipitation> (visité le 16 septembre 2022).

[176] R. Rosset, S. Douville, M. Ben Amor, K. Walha , L'inhibition de l'entartrage par les eaux géothermales du sud tunisien. Étude sur site, Rev. Sci. Eau 12 (2005) 753–764. <https://doi.org/10.7202/705376ar>.

[177] Lenntech - Entartrage et antitartre, (n.d.). <https://www.lenntech.fr/francais/antitartres.htm> (visité 16 Septembre, 2022).

[178] La Compagnie de Sens, Les conservateurs dans les produits cosmétiques : pourquoi faire ? Cosmétique naturelle maison. <https://www.compagnie-des-sens.fr/conservateurs-cosmetiques/> (visité le 27 septembre 2022).

[179] Quimidroga¹, Conservation de détergents avec des sorbates. Consulté le 23 septembre 2022. <https://www.quimidroga.com/fr/2019/06/20/conservation-de-detergents-avec-des-sorbates/>

[180] Quimidroga², Le premier Benzoate de sodiam enregistré dans le RPB comme agent de conservation pour la détergence. Consulté le 27 septembre 2022. <https://www.quimidroga.com/fr/2019/01/23/le-premier-benzoate-de-sodium-enregistre-dans-le-rpb-comme-agent-de-conservation-pour-la-detergence/>

[181] F.N. Niyonzima¹, S.S. More, Detergent-Compatible Bacterial Amylases, Appl. Biochem. Biotechnol. 174 (2014) 1215-1232. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1144-3> .

[182] H.S. Olsen, P. Falholt, The role of enzymes in modern detergency, J. Surfactants Deterg. 1(1998) 555-567. <https://doi.org/10.1007/s11743-998-0058-7>.

[183] T.P. Graycar, Subtilisins, Chap. 693, in Handbook of Proteolytic Enzymes, N. D. Rawlings, G. Salvesen, Eds.; 3rd ed., Vol. 1, Academic Press, London, UK (2013). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00693-1>.

[184] O. Dogan Ekici, M. Paetzel, R. Dalbey, Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration, Protein Science 17 (2008) 2023–2037. [doi:10.1110/ps.035436.108](https://doi.org/10.1110/ps.035436.108)

- [185] J.R. F. S. Markland, E.L. Smith, [The enzymes] Hydrolysis: Peptide Bonds || 16 Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties (Vol. 3). (P. D. Boyer, Ed.) New-York (USA) 1971. doi: [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60407-2](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60407-2)
- [186] P. Nedkov, W. Oberthur, G. Braunitzer, Determination of complete amino-acid sequence of subtilisin DY and its comparison with the primary structures of the subtilisins BPN, Carlsberg and Amylosacchariticus, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 (1985) 421–430. DOI: [10.1515/bchm3.1985.366.1.421](https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.1.421)
- [187] E. L. Smith, F. S. Markland, C. B. Kasper, R. J. Delange, M. Landon, W. H. Evans, The complete Amino Acid Sequence of two types of subtilisin, BPN and Carlsberg, *J. Biol. Chem.* 24 (241) (1996) 5974–5976. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96365-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96365-9).
- [188] O. Ward, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition): 3.49 - Proteases* (éd. 2, Vol. 3). (M. Moo-Young, Éd.) Waterloo, ON, (Canada) 2011. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1>
- [189] Wikipedia_Subtilisin. <https://en.wikipedia.org/wiki/Subtilisin> (Site Web visité le 20 juillet 2021).
- [190] G. Marchand, Méthode d'analyse des protéases de type subtilisine et évaluation des concentrations de l'air ambiant de cinq centres hospitaliers, Rapport Technique, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, Montréal, Québec, Canada, 2016. <https://www.researchgate.net/publication/315664360>
- [191] Lecturio Medical, Serine Protease: Background & Catalytic Mechanism – Biochemistry| Lecturio, 2015. Récupéré sur : https://www.youtube.com/watch?v=Z0wqKJfdxgE&list=PLvUwtjTk_mYXONI-NT3s1A8KJpf6_7w4A&index=20&t=89s
- [192] A.V. Giintelberg, M. Ottesen, Purification of the proteolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *CompL. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* 29 (3-4) (1954) 36-48. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13182800/>
- [193] J. Graae, Esterase Activity Shown by Subtilisin, a Proteolytic Enzyme from *Bacillus subtilis*, *Acta Chem. Scand.* 8 (1954) 356-357. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.08-0356>
- [194] H. Matsubara, B. Hagihara, M. Nakai, T. Komaki, T. Yonetani, K. Okunuki, Crystalline bacterial proteinase ii. General properties of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*, *N. J. Biochem. (Tokyo)* 45 (1968) 251. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/45/4/45_4_251/_article/-char/ja/
- [195] K. Okunuki, H. Matsubara, S. Nishimura, B. Hagihara, Specificity of crystalline bacterial proteinase, *J. Biochem (Tokyo)* 43(1956). 857. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/43/6/43_6_857/_article/-char/ja/
- [196] M. S. Doscher, C. H. W. Hirs, The heterogeneity of bovine pancreatic ribonuclease S., *Biochemistry* 6 (1) (1967) 304-312. <https://doi.org/10.1021/bi00853a047>
- [197] E. Gross, B. Witkop, The Heterogeneity of the S Peptide of Bovine Pancreatic Ribonuclease A*, *Biochemistry* 6 (1967) 745. <https://doi.org/10.1021/bi00855a014>.
- [198] A. Castillo, V. Bansal, A. Ganesan, P. Halling, F. Secundo, A. Ferrer, G. Barletta, On the activity loss of hydrolases in organic solvents: II.a mechanistic study of subtilisin Carlsberg, *BMC Biotechnology*, 6 (2006) 51. <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-6-51>

- [199] M. Kukhtyn, K. Kravcheniuk, L. Beyko, Y. Horiuk, O. Skliar, S. Kernychnyi, Study of the influence of savinase Ecity 16L enzyme on biofilms formation of staphylococcus aureus on stainless steel with different roughness, Food science and Technology 2 (2019) 26-32. <https://media.neliti.com/media/publications/297383-study-of-the-influence-of-savinaseecity1-6936ee00.pdf>
- [200] S. Bautista-Exposito, C. M. D. Martinez-Villaluenga, J. Silvan, J. Frias, E. Penas, Combination of pH-controlled fermentation in mild acidic conditions and enzymatic hydrolysis by savinase to improve metabolic health-promoting. Journal of Functional Foods 48 (2018) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.019>
- [201] C.R. Johnsen, T.B. Sørensen, A. Ingemann Larsen, A. Bertelsen Secher, E. Andreasen, G.S. Kofoed, L. Fredslund Nielsen, F. Gyntelberg, Allergy risk in an enzyme producing plant: a retrospective follow-up study, Occup. Environ. Med. 54 (1997) 671- 675. DOI: [10.1136/oem.54.9.671](https://doi.org/10.1136/oem.54.9.671)
- [202] X Ji, Y. Zheng, W. Wang, J. Sheng, J. Hao, M. Sun, Virtual screening of novel reversible inhibitors for marine alkaline protease MP, Journal of Molecular Graphics and Modelling 46 (2013) 125-131. DOI: [10.1016/j.jmgm.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.10.004)
- [203] H. Sanderson, R.V. Compermolle, S.D. Dyer, B.B. Price, A.M. Nielsen, M. Selby, D. Ferrer, K. Stanton, Occurrence and risk screening of alcohol ethoxylate surfactants in three U.S. River sediments associated with wastewater treatment plants, Science of the Total Environment 463–464 (2013) 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.047>
- [204] Interchimie, Alcools gras éthoxylés propoxylés (ROKANOL LP 3943) 2018. <https://www.interchimie.fr/produits/tensio-actifs-non-ioniques/alcools-gras-ethoxyles-propoxyles/>
- [205] Parlement européen et Conseil de l'Europe : La Directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants », Journal officiel de l'Union européenne (20 février 1995), no L 61, 1-56. <https://archive.wikiwix.com/cache/display2.php/attachment.pdf?url=http%3A%2F%2Feur-lex.europa.eu%2FLEXUriServ%2FLEXUriServ.do%3Furi%3DCONSLEG%3A1995L0002%3A19970404%3AFR%3APDF>
- [206] R. Holfield, Glycol coolants improve heat transfer and corrosion control. *Pipeline & gas journal*. 222(3) (1995) 28-30. <https://www.osti.gov/biblio/49311>
- [207] F. Bonet, V. Delmas, S. Grugeon, R. Herrera Urbina, P. Y. Silvert, K. Tekaiia-Elhsissen, Synthesis of monodisperse Au, Pt, Pd, Ru and Ir nanoparticles in ethylene glycol, *NanoStructured Materials* 11(8) (1999) 1277-1284. [https://doi.org/10.1016/S0965-9773\(99\)00419-5](https://doi.org/10.1016/S0965-9773(99)00419-5)
- [208] Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail (CNESST). Répertoire toxicologique : Fiche complète pour le glycol de propylène, 2007. https://reptox.cnesst.gouv.qc.ca/pages/fiche-complete.aspx?no_produit=8235. Site internet consulté le 11 août 2022.
- [209] A. Borrell, How does ice cause a plane to crash? *Scientific American*, 2009. Consulté le 11 août 2022. <https://www.scientificamerican.com/article/ice-flight-3407/>
- [210] A. Tosti, L. Guerra, F. Bardazzi, F. Gasparri, Euxyl K 400: a new sensitizer in cosmetics, *Contact Derm.* 25(2) (1991) 89-93. DOI: [10.1111/j.1600-0536.1991.tb01794.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1991.tb01794.x)

- [211] A. Tosti, C. Vincenzi, P. Trevisi, L. Guerra, Euxyl K 400: incidence of sensitization, patch test concentration and vehicle, *Contact Derm.* 33(3) (1995) 193-195. DOI: [10.1111/j.1600-0536.1995.tb00544.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00544.x)
- [212] H. Wahlkvist, A. Boman, J. Montelius, J.E. Wahlberg, Sensitizing potential in mice, guinea pig and man of the preservative Euxyl K 400 and its ingredient methyl dibromo glutaronitrile, *Contact Derm.* 41(6) (1999) 330-338. DOI: [10.1111/j.1600-0536.1999.tb06182.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1999.tb06182.x)
- [213] C. Mylonas, G. Cardilanetti, I. Sigelaki, A. Polzonetti-Magni, Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures [archive], *Aquaculture* 246 (1-4) (2005) 467-481. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.046>
- [214] H. Tsantilasa, A.D. Galatosa, F. Athanassopouloub, N.N. Prassinosa, K. Kousoulaki, Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C, *Aquaculture* 253 (2006) 1-4, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.034>
- [215] Institut national de recherche et de sécurité (INRS), édition de janvier 2022. Base de données : Fiche toxicologique (FT) n°269 du 2-phénoxyéthanol. https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_269-1/FicheTox_269.pdf
- [216] K-I. Nunami, T. Iwasaki, K. Matsumoto, K. Yano, I. Yamaguchi, S.C.Tanabe, N,3-Disubstituted Alaninamide derivatives, United States Patent (May 17, 1994) Number: 5 312 826 (USA). <https://www.freepatentsonline.com/5312826.html>
- [217] Aquaportail, Acide carboxylique : définition, explications. Consulté le 11 août 2022. <https://www.aquaportail.com/definition-14372-acide-carboxylique.html>
- [218] W. Benton, J. Turner, Cabot Specialty Fluids: Cesium formate fluid succeeds in North Sea HPHT field trials, *Drilling Contractor*, May/June 2000. <http://large.stanford.edu/publications/coal/references/docs/m-cabot.pdf>
- [219] G. Bujacz, B. Wrzesniewska, A. Bujacz, Cryoprotection properties of salts of organic acids: a case study for a tetragonal crystal of HEW lysozyme, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (7) (2010) 789–796. DOI:[10.1107/S0907444910015416](https://doi.org/10.1107/S0907444910015416).
- [220] Perstorp, Sodium Formate Deicer. Product data sheet, 2016. https://www.perstorp.com/-/media/files/perstorp/pds/sodium_formate_deicer/pds_sodium_formate_deicer_eng-2720.pdf
- [221] Wikipédia: Solution Tampon. https://fr.wikipedia.org/wiki/Solution_tampon#cite_note-1. (Site Web visité le 8 août 2023).
- [222] Additifs-alimentaires: E501, Carbonate de potassium. Récupéré sur <https://www.additifs-alimentaires.net/E501.php> . (Visité le 08 août 2023).
- [223] C. Conan, Carbonate de potassium : ce qu'il faut savoir sur l'E501, 2021. Récupéré sur <https://www.passeportsante.net/nutrition/additifs-alimentaires?doc=carbonate-potassium-faut-savoir-sur-e501> . (Visité le 08 août 2023).
- [224] F.N. Niyonzima², S.S. More, Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1, *Braz. J. Microbiol.* 45 (2014) 903-910. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300020>.

- [225] A. GrabHoff, Enzymatic cleaning of milk pasteurizers, *Food Bioprod Process* 80 (2002) 247-252. <https://doi.org/10.1205/096030802321154736>.
- [226] H.B. Petrus, H. Li, V. Chen, N. Norazman, Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by protein mixture solutions, *J Memb Sci.* 325(2) (2008) 783-92. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.09.004>
- [227] H. Li, V. Chen, Chapter 10 - Membrane fouling and cleaning in food and bioprocessing. *Membrane Technology: A Practical Guide to Membrane Technology and Applications in Food and Bioprocessing* (2010) 213-254. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-632-3.00010-0>
- [228] I. M. Hassan, Screening of enzymatic cleaning of UF membrane fouled with oat slurry. Thesis for the master's degree in Bioengineering. Aalborg University Esbjerg, Esbjerg, (Denmark)2023. https://projekter.aau.dk/projekter/files/536282043/Screening_of_Enzymatic_cleaning_of_oat_slurry_fouling_on_UF_membrane.pdf
- [229] T. Chutrakul, N. Rangton, R. Daochot, N. Sattayathitikul, P. Saikhwan, Enzyme-based integrated solution to cleaning of coconut milk foulants, *Food and Bioproducts Processing* 113 (2019) 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.09.006>
- [230] C. Astudillo, S. Gonzalez, B. Cancino, Chemical cleaning of ceramic membranes fouled with goat milk, *Journal of Biotechnology*, 136 (2008) S497. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1164>
- [231] V. Chen, H. Li, D. Li, S. Tan, H. B. Petrus, Cleaning strategies for membrane fouled with protein mixtures, *Desalination* 200 (2006) 198-200. [doi:10.1016/j.desal.2006.03.294](https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.294)
- [232] Z. Allie, E.P. Jacobs, A. Maartens, P. Swart, Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by abattoir effluent, *J. Memb Sci.* 218(1-2) (2003)107-16. [doi:10.1016/S0376-7388\(03\)00145-5](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(03)00145-5)
- [233] M. A. Arguello, D. Elzo, F. A. Riera, R. Alvarez, Optimisation de l'hydrolyse des protéines du lactosérum en utilisant des détergents commerciaux enzymatiques et non-enzymatiques, *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* 76 (2) (1998) 276 – 280. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450760216>
- [234] A. Maartens, P. Swart, E.P. Jacobs, Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled in wool-scouring effluent, *Water SA.* 24 (1) (1998) 71-76. https://www.wrc.org.za/wp-content/uploads/mdocs/WaterSA_1998_01_jan98_p71.pdf
- [235] A. Maartens, P. Swart, E.P. Jacobs, Enzymatic approach to the cleaning of ultrafiltration membranes fouled in abattoir effluent, *J. Memb Sci.* 119(1) (1996) 9-16. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(96\)00015-4](https://doi.org/10.1016/0376-7388(96)00015-4)

Chapitre II

Matériels et Méthodes

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre sont présentés, d'une part, la méthodologie d'aide au développement des détergents mise en place au sein de /ISCR-CIP et, d'autre part, les différents matériels qui ont été utilisés au cours de cette thèse :

- Pilotes d'ultrafiltration et leurs modes de fonctionnement
- Appareils d'analyse et principes de fonctionnement

II.1. Méthodologie d'aide au développement de détergents : processus de développement des détergents enzymatiques

Pour évaluer l'efficacité des détergents enzymatiques en phase de développement, il est impératif de procéder à des tests rapides mais fiables afin d'opérer des choix préliminaires et de sélectionner les prototypes prometteurs en vue de poursuivre l'étude. Pour ce faire, dans l'étude présente, la méthode a consisté en 4 grandes étapes représentées données dans le **Tableau II.1**.

1^{ère} étape : Cette étape comporte tous les processus liés à la formulation et est réalisée par notre partenaire industriel Kersia®. Parmi ces processus, on peut citer :

- L'élaboration d'une méthode de mesures de l'activité enzymatique (protéolytique)
- L'évaluation des conditions optimales pour l'activité enzymatique (pH, température)
- L'évaluation de différentes protéases par la mesure d'activité enzymatique
- L'évaluation de l'influence des co-formulants sur l'activité enzymatique
- Le suivi par mesures physico-chimiques (dont l'activité enzymatique) de la stabilité des formules développées.
- La sélection des différents ingrédients sur le marché en fonction des critères du cahier de charge,
- La vérification de la compatibilité avec le tampon destiné à être utilisé en association avec la formule.
- La vérification de la compatibilité et des conditions de l'étape de désactivation de l'enzyme après le nettoyage, étape nécessaire pour éviter un éventuel contact entre l'enzyme et les denrées alimentaires.
- L'évaluation de la stabilité des formules à différentes durées allant de 8 semaines à 24 mois (**Tableau II.1**) pour la détermination de la durée limite d'utilisation optimale (DLUO). Ici, l'aspect, le pH, la masse volumique, l'absence de déphasage, de précipitation ou de particules en suspension sont autant des critères vérifiés à chaque jalon ainsi que le suivi de l'activité enzymatique.
- L'évaluation de l'efficacité de la formule par un test d'hydrolyse de la caséine en solution (protocole interne, propriété privée de Kersia®) et le suivi de la stabilité de l'activité enzymatique.
- La détermination des conditions optimales d'utilisation (Température, pH, concentration) effectuée lors du test d'efficacité d'hydrolyse de la caséine.

Toutes ces étapes validées, la formule est prête pour les tests en conditions réelles qui se déroulent à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR) suivant les étapes 2 à 4 ci-après :

2^e étape : Elle consiste en l'évaluation préliminaire rapide et à court terme de l'efficacité de nettoyage, de l'intégrité à court termes de la membrane et de l'adsorption des ingrédients du prototype par un nettoyage en réacteur fermé sur des coupons de membrane plane de 14 cm² chacun pendant 15 à 60 min (130 mL, 500 rpm, 50°C).

3^e étape : Elle consiste en l'évaluation poussée à moyen terme de l'efficacité de nettoyage en place, de l'intégrité de la membrane et de l'adsorption des ingrédients du prototype par un nettoyage en place en condition d'UF sur membrane plane de 127 cm² pendant 60 min (4L, 2 bar, 50°C, 110 L.h⁻¹).

Tableau II. 1. Etapes de la méthode de développement des détergents enzymatiques : conception et évaluation des formulations

Etape →	Etape 1	Etape 2	Etape 3	Etape 4
Objectifs	Choix des ingrédients	Évaluation en réacteur fermé de l'efficacité d'élimination protéique, de l'intégrité de la membrane à court terme et de l'adsorption résiduelle des ingrédients détergents	Évaluation en condition d'UF (NEP) de l'efficacité d'élimination protéique, de l'intégrité de la membrane à court et moyen terme et de l'adsorption résiduelle des ingrédients détergents	Évaluation en condition d'UF (NEP) de l'efficacité d'élimination protéique, de l'intégrité de la membrane à long terme et de l'adsorption résiduelle des ingrédients détergents
	Formulation			
Méthode	Tests de Stabilité	Réacteur fermé	UF	UF
Membrane	–	Coupon de membrane plane de 14 cm ²	Membrane plane de 127 cm ²	Membrane spirale de 6.8 m ²
Concentration du détergent formulé dans l'eau DI(g.L⁻¹)	–	5	5	5
pH	Détermination du pH, Température, Concentration optimale par un test d'hydrolyse de la caséine	10.5	10.5	10.5
Durée		15 min	60 min	> 50 h
Température (°C)		50	50	50
Critères de Validation		Absence de : déphasage, précipitation, particules en suspension	–	Récupération du flux dans l'eau (WFR)
	Compatibilité des autres ingrédients avec l'enzyme : Activité enzymatique résiduelle la plus longue (100% vs t=0 min)	Quantité des protéines résiduelles (ATR-FTIR)	Quantité des protéines résiduelles (ATR-FTIR)	Rétention des protéines (UV-vis)
	Stabilités accélérées : 8 semaines (40°C), 18 semaines (30°C), 18 semaines (3°C), 24 mois (Température ambiante).	Marqueurs de dégradation de la membrane, s'il y en a (ATR-FTIR)	Marqueurs de dégradation de la membrane, s'il y en a (ATR-FTIR)	–
	Compatibilité de la formule avec la suite du processus de nettoyage (désactivation de l'enzyme)	Adsorption Résiduelle des ingrédients des détergents (ATR-FTIR)	Adsorption Résiduelle des ingrédients des détergents (ATR-FTIR)	–

4^e étape : Elle consiste à valider les prototypes ayant passé l'étape 3 et a pour but d'évaluer l'efficacité du nettoyage sur le long terme. Ceci se fait en réalisant plusieurs cycles de colmatage + nettoyage en place en condition de filtration sur une membrane spirale de 6.8 m² (25L, 2 bar, 50°C, 10.5 m³.h⁻¹) pour une durée beaucoup plus importante (au moins 50 heures de NEP). Les essais consistent à suivre les flux dans le lait écrémé et les rétentions des protéines ainsi que la récupération des flux à l'eau post NEP. Comme expliqué dans le chapitre précédent, la récupération des flux à l'eau post NEP ($WFR = L_p^{post\ NEP} / L_p^{réf}$) reste d'intérêt même si elle ne renseigne pas systématiquement sur l'efficacité du NEP [1, 2, 3, 4], car les mesures sont éclairées par les connaissances acquises sur les membranes planes dans les étapes précédentes.

II.2. Modules, pilotes d'ultrafiltration et protocoles

II.2.1. Le Module Plan Ray Flow X-100 et le pilote UF-LPS

Le module plan est un assemblage du type filtre presse. Ce type de module est le plus simple et le plus ancien. Dans le cadre de cette étude, le module plan utilisé est un modèle RayFlow X-100 (Novasep, France) présenté **Figure II.1**.

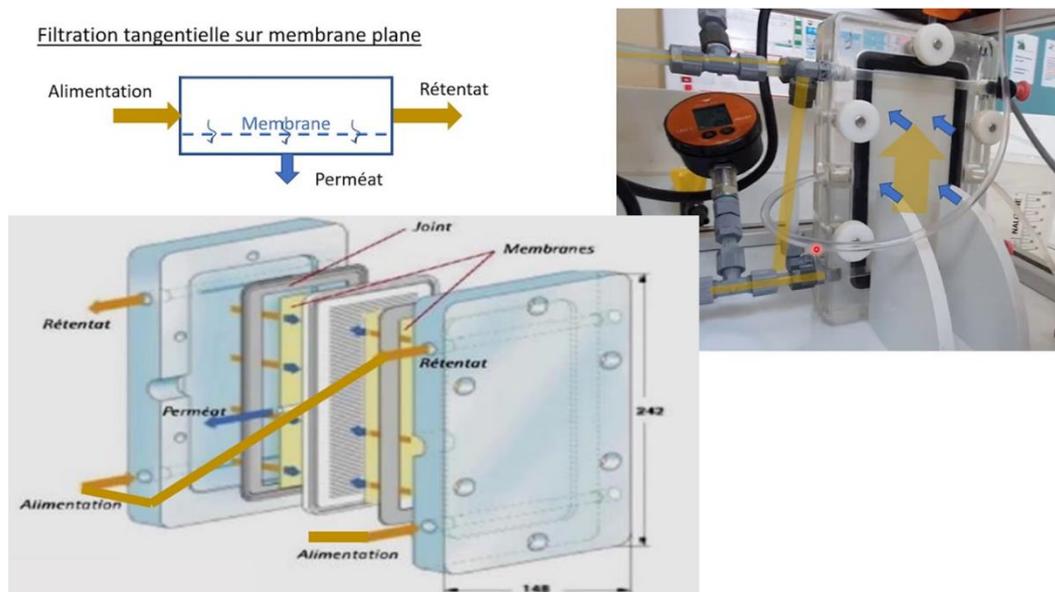


Figure II. 1. Schéma et photo d'un module plan de type RayFlow X-100 (Novasep, France). Dans notre cas la membrane est située entre un espaceur rétentat de type diamant 31 mil et un espaceur perméat ; le joint assurant l'épaisseur de la veine liquide est de 1mm.

La membrane est disposée à plat sur un support (une plaque de contention rainurée) permettant l'écoulement et la collecte du perméat. L'alimentation s'écoule de façon tangentielle par rapport à la membrane. Un espaceur rétentat (31 mil) et un espaceur perméat sont placés de part et d'autre de la membrane, ils ont été collectés dans une membrane spirale de même référence. L'épaisseur de la veine liquide est assurée par l'épaisseur du joint (1 mm) qui rend étanche le montage.

Ce type de module est peu compact et n'est donc pas utilisé en industrie laitière. Cependant, il a l'avantage de faciliter le démontage pour le changement des membranes. Ce qui en fait un bon outil pour les travaux exploratoires en laboratoire.

Le module Ray Flow X-100 est installé sur le pilote appelé UF-LPS (**Figure II.2**) pour réaliser les différentes étapes de filtration (UF de lait écrémé, nettoyage) conformément à l'étape 3 décrite dans le **Tableau II.1**. Ce pilote utilise une pompe à vis qui assure l'alimentation et la recirculation. Un capteur de

pression est placée à la sortie sur le module dont la perte de charge est de l'ordre de 50 mbar. Le bac d'alimentation ainsi qu'un échangeur de chaleur tubulaire en inox sont thermostatés à l'aide d'un thermocryostat (Julabo MH FP 35) régulant la température à 1°C près.



Figure II. 2. Photographies (a) du pilote UF-LPS, (b) du module Plan Ray Flow X-100

II.2.2. Protocole de nettoyage en condition d'UF plane et en réacteurs fermés

Pour réaliser le nettoyage décrit dans les étapes 2 et 3 du Tableau II.1., différentes étapes de filtration ont été réalisées et sont décrites Figure II. 3.

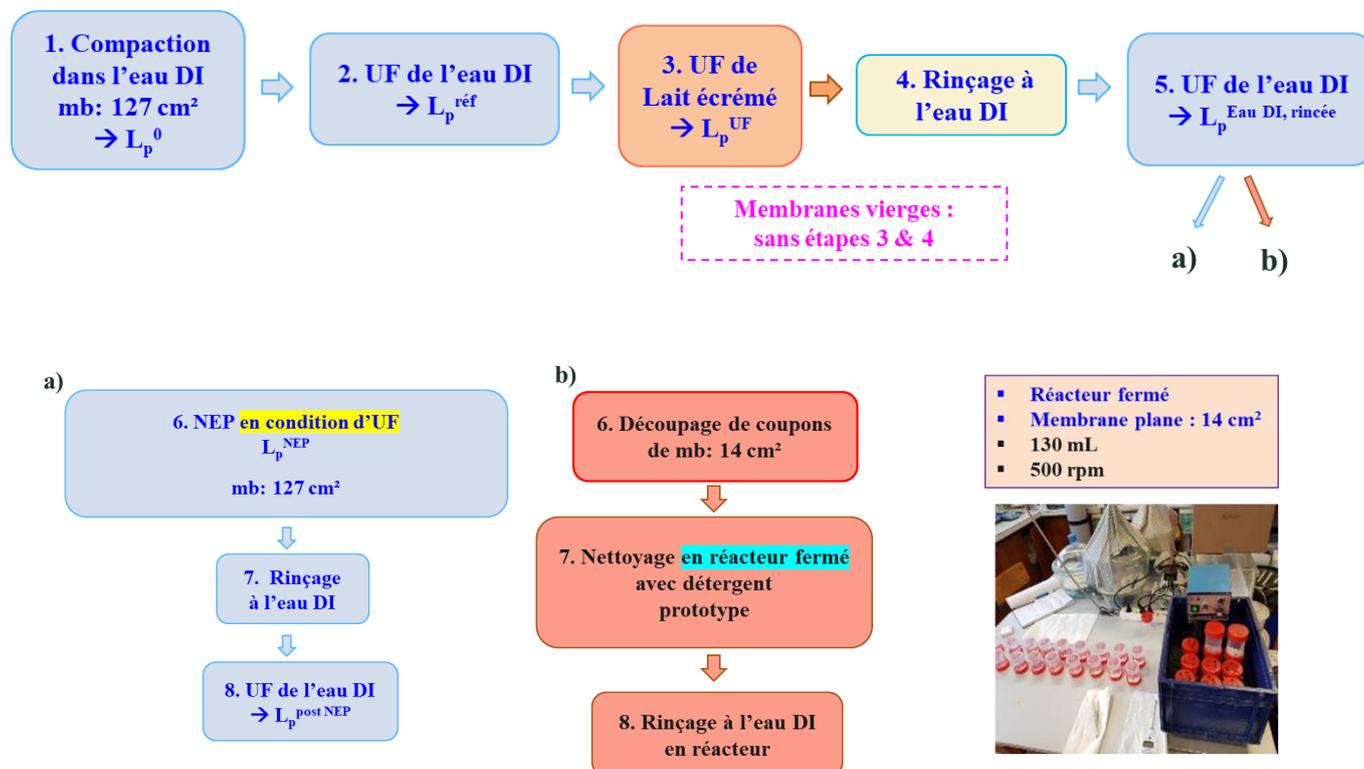


Figure II.3. Différentes étapes du protocole de nettoyage : (a) nettoyage en condition d'UF, (b) nettoyage en réacteurs fermés

De la compaction (4 bar, 3h) de la membrane dans l'eau DI jusqu'à obtenir une perméance de référence stable, en passant par l'UF de lait écrémé (2 bar, 180 min) jusqu'au flux à l'eau post UF de lait écrémé (2 bar), toutes les étapes sont réalisées sur le module Ray Flow X-100, dans des conditions standard de filtration qui sont : 4 L de solution circulant à 110 L.h⁻¹ (vitesse de recirculation estimée en veine liquide libre : ~ 0.4 m.s⁻¹) à 50°C.

A partir de là, deux voies sont possibles pour effectuer le nettoyage des membranes :

- a) soit le nettoyage est réalisé directement en condition d'UF sur le module (**Figure II.3.a**). Le nettoyage était réalisé avec 4 L de solution de nettoyage à pH 10.5 circulant à 110 L.h⁻¹ (vitesse de recirculation : ~ 0.4 m.s⁻¹), à 2 bar, à 50°C, pendant 60 min (sauf précision différente).
- b) soit la membrane est démontée puis découpée en 9 coupons de 14 cm² qui seront nettoyés en réacteurs fermés (**Figure II.3.b**). Les réacteurs fermés sont en polypropylène et ont été utilisés avec un volume de 130 mL de solution de nettoyage à pH 10.5 maintenue à 50°C sous agitation à 500 rpm, pendant 60 min (sauf précision différente) puis les coupons sont abondamment rincés à l'eau déionisée.

Quel que soit le protocole, à la fin du nettoyage, les membranes sont mises à sécher dans un dessiccateur sous vide dynamique pendant plusieurs jours pour éliminer les traces d'eau qui gênent l'analyse ATR-FTIR qui suit.

II.2.3. Le module spiralé et le pilote UF spiral

Le module spiralé utilisé dans cette thèse est un module 4333 de chez Koch (USA) (**Figure II.4 & Figure II.5**). Il est composé de plusieurs membranes planes (HFK-131) enroulées autour d'un tube collecteur percé permettant de recueillir le perméat.

Deux membranes planes collées dos à dos par les bords composent une double feuille de membranes. Un espaceur perméat est placé entre les deux membranes d'une même feuille. Chaque double feuille est séparée de la suivante par un espaceur rétentat. Les espaceurs sont des grilles plus ou moins fines en polypropylène (PP). Ils diffèrent par leurs géométries. Les espaceurs perméat assurent l'écoulement du perméat vers le tube collecteur qui se situe au centre du module. Les espaceurs rétentats (ici de type diamant 31 mil) induisent de la turbulence au voisinage de la membrane ce qui limite le colmatage tout en permettant l'écoulement du fluide d'alimentation/rétentat. Un grillage extérieur en PP maintient l'ensemble enroulé. Il y a 6 feuilles dans ce module d'une surface de 6.8 m². Ce système est beaucoup plus compact que le module plan et est par conséquent largement utilisé en industrie laitière.



Figure II. 4. Membrane spirale 4333 (dite 4 pouces) dans le carter inox du pilote (6.8 m²).

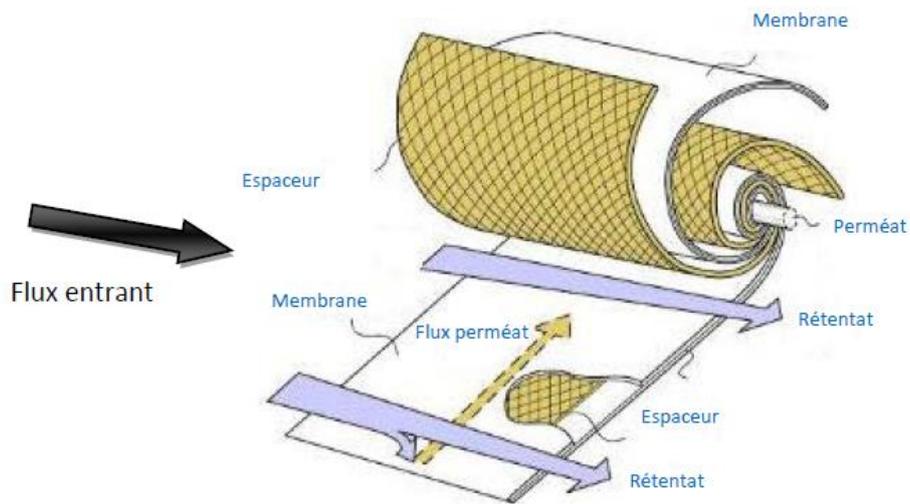


Figure II. 5. Schéma d'un module spirale 4333 (4.3 pouces \approx 11 cm de diamètre, 33 pouces \approx 84 cm de long)

Dans la pratique nous utilisons 2 modules différents, l'un (S-cut-CIP-2) est découpé pour disposer des membranes planes utilisées dans le module Ray Flow, l'autre (S-CIP-4) est installé sur un pilote spiral construit par la société TIA (Bollène, France) (**Figure II.6**).

Ce pilote utilise 2 pompes dont une pour l'alimentation (gavage avec un débit de l'ordre de $1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) et une pour la recirculation (avec un débit de l'ordre de $10 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Deux capteurs de pression sont positionnés sur le carter de la membrane spirale : un à l'entrée et un à la sortie sur le circuit alimentation/rétentat. Dans les conditions d'utilisation choisies, la perte de charge entrée/sortie est de l'ordre de 2 bar. Une vanne de contre-pression (pointeau) sur le circuit rétentat permet de réguler la pression entre 1 et 5 bar.

Le bac d'alimentation a un volume de 100 L mais le volume mort de l'installation est d'environ 5 L. Le volume minimum mis en œuvre a été choisi à 24 L (lait écrémé) ou 25 L (détergents) afin d'éviter la formation de vortex dans le fond du bac d'alimentation même si une grille brise vortex existe dans le fond. Une vanne de soutirage en dessous du bac d'alimentation permet de vidanger celui-ci.

Un échangeur de chaleur raccordé au circuit fermé d'eau réfrigérée du bâtiment permet de contrôler la température de l'installation.



Figure II. 6. Pilote spiral fabriqué par TIA (Bollène, France) équipé d'un module spirale 4333 (HFK-131, Koch, espaceurs diamant 31 mil).

Au cours de cette thèse, le module spiral a été utilisé pour la validation des détergents prototypes en condition d'UF conformément à l'étape 4 décrite dans le **Tableau II.1**.

La compaction de la membrane spirale (S-CIP4) a été réalisée au début de la vie de la membrane au laboratoire en 2013. Les étapes de colmatage par le lait écrémé ont été réalisées à 50°C, 10 m³.h⁻¹, en augmentant volontairement et progressivement la pression par palier afin de déterminer le flux critique (si possible) et le flux limite. Les étapes de nettoyage sont réalisées à 2 bar, 50°C, 10 m³.h⁻¹ pendant 60 min.

Depuis le début de son utilisation, l'historique de la membrane S-CIP4 a été soigneusement tenu à jour, ce qui nous permettra de discuter des validations entreprises au cours de cette thèse en regard de tous les essais antérieurs. Depuis 2013 la membrane a donné des résultats très stables (flux, rétentions) ce qui garantit qu'elle n'a pas spécialement vieilli. Ceci est cohérent avec l'absence d'utilisation de NaOCl sur cette membrane depuis son installation.

II.3. Les appareils de mesure et d'Analyse

II.3.1. Les balances et Agitateurs magnétiques

Pour préparer les solutions de nettoyage, les détergents (prototypes ou commerciaux), ainsi que l'eau DI étaient pesés sur une balance dont l'incertitude de mesure est ± 0.1 g. De même, les débits de perméat lors de l'ultrafiltration sur membrane plane (tout fluide confondu) et sur membrane spiralée (ultrafiltration de lait) ont été mesurés par pesée avec la même balance pour un temps chronométré.

En revanche, en raison de leurs quantités très faibles, les tensioactifs ou les enzymes commerciales stabilisées ont été pesés avec une balance de précision affichant une précision de mesure de ± 0.1 mg.

Par ailleurs, les dilutions avant analyse par spectrométrie UV-visible ont aussi été réalisées en pesant les échantillons avec la balance de précision afin de limiter les erreurs de dilution lors de l'utilisation des pipettes automatiques.

Les solutions de nettoyage ont été préparées en mélangeant du détergent formulé, des tensioactifs, ou des enzymes stabilisées à l'eau DI sur un agitateur magnétique à plaque chauffante.

II.3.2. Le pH-mètre

Les mesures de pH des solutions de nettoyage ainsi que du rétentat en début et à la fin du nettoyage en place (NEP) ont été réalisées avec un pH-mètre GLP 21 Crison équipé d'une électrode Schott Blueline 15, pH 0 – 14, -5°C – 100°C. Cet appareil a une précision de mesure de ± 0.05 unité pH.

Lorsqu'il s'agit de rincer les membranes après un NEP, celui-ci doit être conduit jusqu'à pH neutre côté rétentat et côté perméat. Cette détermination est faite avec du papier pH, la mesure d'un pH stable n'étant pas possible dans de l'eau trop fortement déionisée.

II.3.3. La spectroscopie UltraViolet-Visible

La spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis) est une spectroscopie électronique qui s'appuie sur l'absorption des photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100 – 400 nm), du visible (400 – 750 nm). Lorsqu'une source de lumière (mono ou polychromatique) illumine un échantillon, ce rayon excite les électrons des atomes de l'échantillon. Ces électrons sont capables de subir une ou plusieurs transitions électroniques qui s'accompagnent d'une absorption d'énergie qui dépend intrinsèquement de la nature des niveaux concernés [5]. La différence d'énergie entre deux niveaux électroniques caractérise la longueur d'onde (ou la fréquence) du rayonnement électromagnétique absorbé.

Le spectromètre mesure donc l'intensité de la lumière (I) qui traverse un échantillon puis la compare à l'intensité de la lumière incidente I_0 . A partir de ces données, le logiciel du spectromètre calcule la transmittance T puis l'absorption correspondantes à chaque longueur d'onde incidente.

$$T = I/I_0 \quad (\text{Equation II.1})$$

$$\text{Abs} = -\log(T) \quad (\text{Equation II.2})$$

Un spectromètre UV-vis comporte typiquement une source lumineuse, un support pour l'échantillon (cuve en quartz de 1 cm, ici), un monochromateur (en général, équipé d'un réseau de diffraction) pour séparer les différentes longueurs d'onde de la lumière, et un détecteur. Dans un spectromètre 'multicanaux' (à optique inversée), à la place d'un monochromateur, on a un polychromateur qui, comme son nom l'indique, démultiplie les différentes longueurs d'onde de la lumière (**Figure II. 7**).

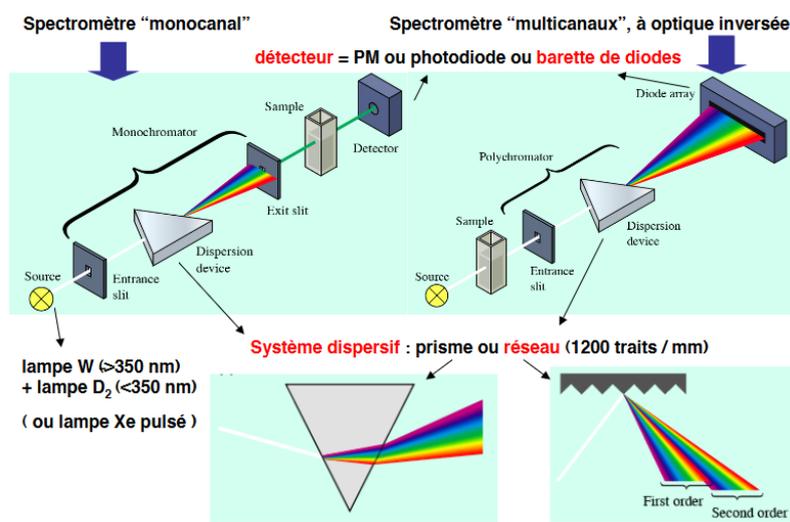


Figure II.7. Principe de fonctionnement d'un spectromètre UV-vis [7] et Spectromètre UV-Vis Jasco 630 utilisé pendant cette thèse

La spectroscopie UV-vis permet de quantifier Les composés possédant des chromophores en appliquant la loi de Beer-Lambert qui est bien connue (**Equation II. 3**).

$$\text{Abs} = \xi \cdot \ell \cdot C \quad (\text{Equation II. 3})$$

Avec :

ξ = le coefficient d'extinction molaire de l'espèce analysée à la longueur d'onde choisie, en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

ℓ = l'épaisseur de la cuve de mesure UV en cm.

C = la concentration en mol. L^{-1}

Dans le cadre de cette thèse, des analyses UV-vis ont été réalisées pour :

- Le dosage des enzymes dans le cadre d'une tentative d'étude de stabilité des solutions enzymatiques dans le temps (Chapitre IV).

- Le dosage des protéines du lait dans le cadre de l'étude de la rétention des protéines totales pendant les UF de lait écrémé (Chapitre V).

Le dosage des protéines a été réalisé à 280 nm (tryptophane) dans les conditions d'acquisition suivantes : BandWidth : 1.5 nm, Scan Speed : 400 nm.min⁻¹, Range : 200 – 800 nm, Data Interval : 1 nm. La ligne de base était mesurée avec de l'eau DI. La rétention des protéines a été calculée selon l'équation II.4 avec une précision meilleure que 3 %.

$$\text{Rétention} = \left(1 - \frac{C_{\text{perméat}}}{C_{\text{rétentat}}}\right) \quad (\text{Equation II. 4})$$

II.3.4. La spectrométrie Infrarouge en mode réflexion totale atténuée : ATR-FTIR

La spectroscopie ATR-FTIR associe la spectroscopie infrarouge, la transformée de Fourier (d'où FTIR : Fourier Transform InfraRed) et la technique de la réflexion totale atténuée (ATR : Attenuated Total Reflectance) spécialement adaptée aux échantillons opaques qui absorbent tout le faisceau IR incident en mode transmission.

II.3.4.1. Principes de l'IR et de la FTIR

La spectroscopie infrarouge (IR) est une spectroscopie d'absorption permettant d'identifier des liaisons chimiques et des groupes fonctionnels dans lesquels des liaisons polaires ou polarisables existent. Pour une liaison donnée, il existe au maximum 6 modes de vibrations dont ceux impactant la longueur de la liaison (allongement symétrique, allongement anti-symétrique) et ceux impactant les angles de liaison dans et hors du plan initial de la liaison (cisaillement, bascule, rotation et torsion).

Lorsque le rayon IR incident qui éclaire la liaison (donc l'échantillon) possède la même longueur d'onde que celle associée à l'un de ces mouvements, la liaison rentre en résonance et absorbe une partie du rayonnement (**Figure II.8**).

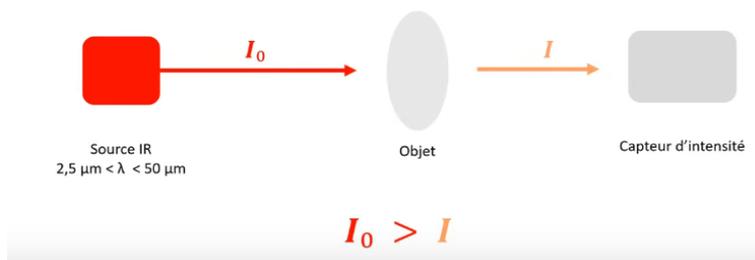


Figure II. 8. Principe de fonctionnement d'un spectromètre IR en transmission[8]

Comme pour l'UV-vis, le logiciel de traitement pourra alors calculer la transmittance T et l'absorbance. La représentation classique d'un spectre IR représente soit la transmittance T soit l'absorbance en fonction du nombre d'onde $\tilde{\nu}$ qui est l'inverse de la longueur d'onde λ (cm) (**Figure II.9**)

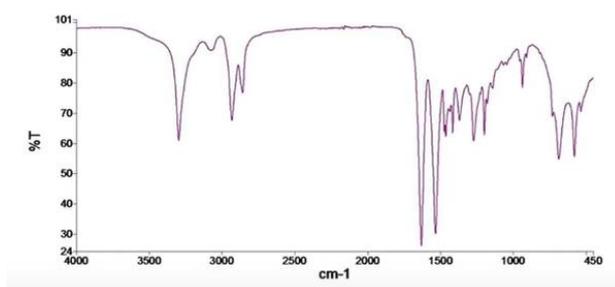


Figure II. 9. Spectre IR classique en transmission [8]

Les spectromètres dispersifs historiques faisaient l'acquisition pas à pas en fonction du nombre d'onde ce qui conduisait à des temps d'acquisition long (environ 10 min pour un spectre entre 4000 et 600 cm^{-1}). L'utilisation de la transformée de Fourier permet l'acquisition de toutes les longueurs d'onde simultanément ce qui est un gain de temps considérable car il faut moins d'une minute pour obtenir un spectre dans la même gamme que celle indiquée ci-dessus. De ce fait la pratique courante consiste désormais à accumuler plusieurs spectres pour améliorer le rapport signal sur bruit (dans notre cas nous faisons l'acquisition de 128 spectres par analyse ce qui prend environ 3.5 min).

Pour cela la FTIR associe l'IR classique avec un interféromètre de Michelson (**Figure II.10**). Ces appareils sont par essence mono-faisceau ce qui implique d'acquérir les données en l'absence d'échantillon (I_0) puis en présence d'échantillon (I) et de procéder à un traitement mathématique de l'information globale obtenue pour reconstruire un spectre.

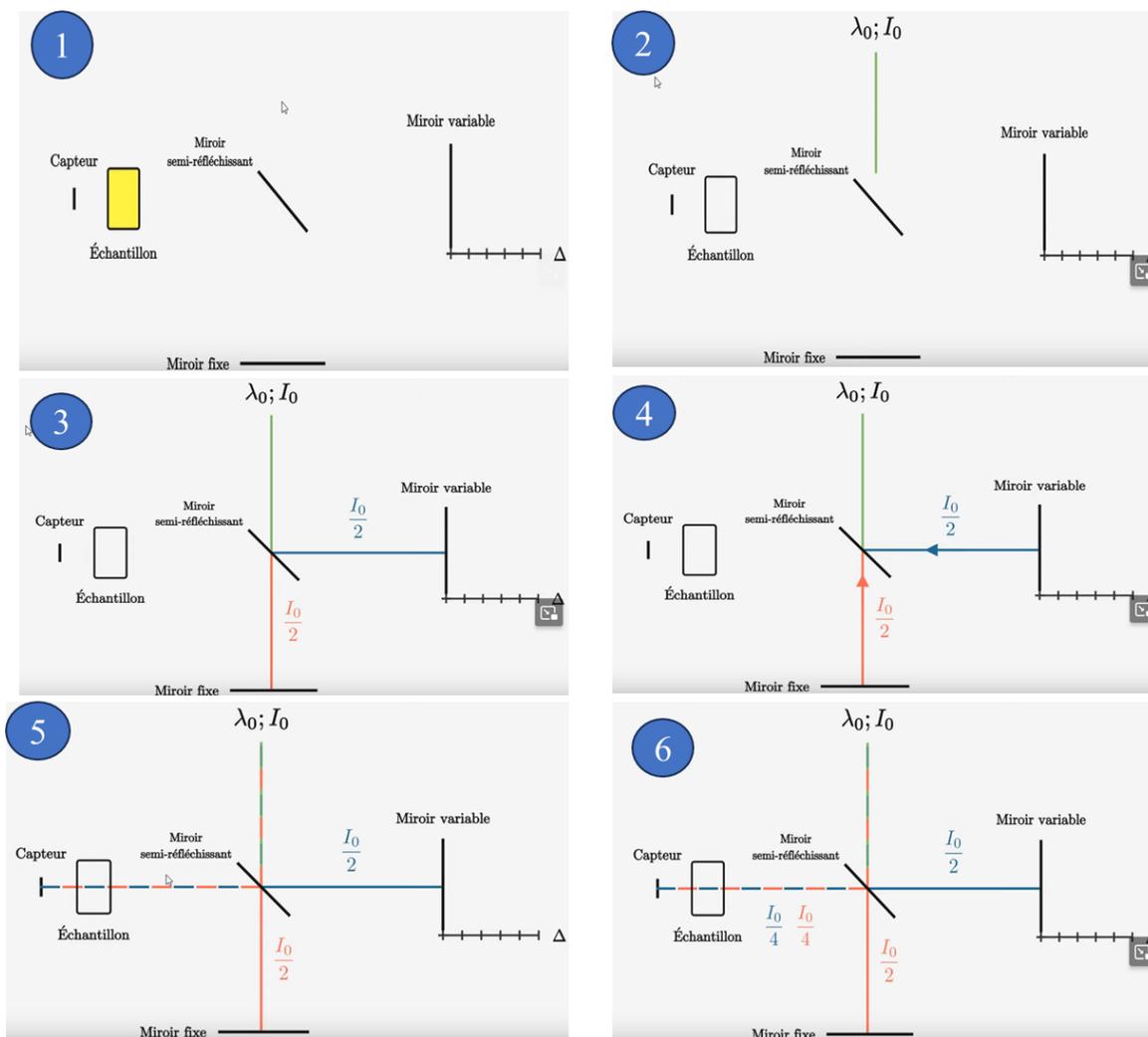


Figure II. 10. Principe de fonctionnement d'un interféromètre lors d'une mesure FTIR [8].

Cet interféromètre est composé d'un miroir fixe, d'un miroir variable et d'un miroir semi-réfléchissant au centre ; à égale distance des deux premiers. L'échantillon est placé à la sortie juste avant le capteur. En fonction du déplacement du miroir variable, chaque longueur d'onde se trouve périodiquement bloquée ou transmise par l'interféromètre, par interférences. Différentes longueurs d'ondes sont ainsi modulées à des vitesses différentes, de sorte que, à chaque instant, le faisceau sortant de l'interféromètre possède un spectre différent [9]. Plus spécifiquement, on envoie le rayonnement d'intensité I_0 sur le miroir semi-réfléchissant. Ce dernier sépare le rayonnement en 2 parts égales dont chacune possède donc une intensité $I_0/2$. Un rayon de $I_0/2$ est envoyé sur le miroir fixe tandis que l'autre est envoyé sur le miroir variable. Ces rayons sont réfléchis sur les deux miroirs et parcourent le chemin inverse. Ils sont une deuxième fois partiellement réfléchis et séparés en deux rayons dont l'un se dirige vers l'échantillon et l'autre vers la source (celui-ci n'aura pas d'intérêt par la suite). Le capteur reçoit le rayon ayant traversé l'échantillon et dont l'intensité est désormais le quart de I_0 soit $I_0/4$.

L'interprétation des spectres FTIR se fait en comparant les spectres de l'échantillon mesuré avec des tables qui identifient les différentes liaisons en les associant aux bandes d'absorption présentes aux différents nombres d'ondes. Des bases de données peuvent également permettre l'identification de molécules, mais nous n'en disposons pas dans le logiciel de traitement utilisé au laboratoire.

La fréquence de résonance (par conséquent le nombre d'onde) d'une liaison chimique dépend d'un certain nombre de facteurs [10] :

- la multiplicité de la liaison (simple, double, triple)
- la nature des atomes participant à la liaison (notamment leur masse). Ainsi, par exemple, pour les liaisons où l'hydrogène (un atome léger) intervient, le nombre d'onde d'absorption est élevé (2500 à 4000 cm^{-1}). C'est le cas des liaisons O-H, N-H, S-H et C-H.

Les autres liaisons seront recherchées dans le reste du domaine spectral (C=C, C-N, etc.).

En conséquence, un spectre FTIR permet de déterminer les liaisons présentes dans les molécules ou les solides (ici les membranes), et aussi d'identifier les groupes caractéristiques (alcools, amines ...). Quelques exemples de référencement des liaisons en fonction de leurs nombres d'ondes peuvent être consultés dans le **Tableau II.2 & Tableau II.3** [10]. La FTIR donne des résultats précis et non-destructifs, interprétables facilement. C'est une méthode quasi universelle et peu coûteuse capable d'analyser aussi bien des liquides, des poudres que des solides plus denses.

Tableau II. 2. Les hydrocarbures [10]

	Structure	Nombre d'ondes d'absorption des liaisons
Alcane	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$ <p>uniquement des liaisons C-C et C-H</p>	$\sigma_{\text{C}-\text{C}} = 1100 \text{ cm}^{-1}$ (inactive en IR) $\sigma_{\text{C}-\text{H}} = 2850 - 2950 \text{ cm}^{-1}$
Alcène	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \quad // \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$ <p>une ou plusieurs liaisons C=C et C-H</p>	$\sigma_{\text{C}=\text{C}} = 1640 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C}-\text{H}} = 3050 - 3080 \text{ cm}^{-1}$ (H relié au C sp^2)
Alcyne	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$ <p>une ou plusieurs triples liaisons CC et C-H</p>	$\sigma_{\text{C}\equiv\text{C}} = 2100 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C}-\text{H}} = 3300 \text{ cm}^{-1}$ (H relié au Csp)

En général, on précise la forme (fine ou large) et l'intensité (F = forte, M = moyenne) des bandes d'absorption. Avec les alcools et les acides carboxyliques il est classique d'observer des bandes larges impliquant des liaisons OH, l'élargissement est associé à la formation des liaisons hydrogènes (**Figure II.11**) :

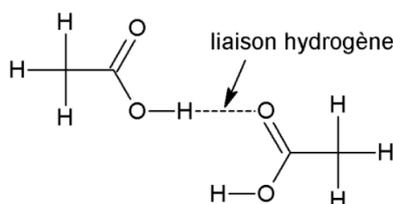
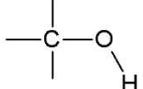
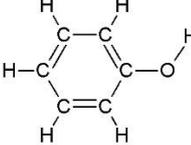
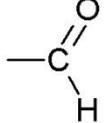
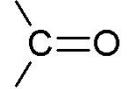
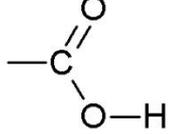
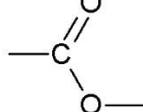
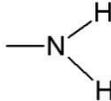
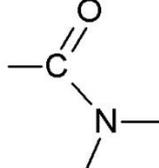


Figure II. 11. Exemple d'une liaison H entre un groupement OH- et un O d'une autre molécule [10]

Tableau II. 3. Référencement IR de quelques groupes caractéristiques * [10]

Groupe caractéristique	Fonction associée	Formule	Nombre d'onde d'absorption des liaisons
Hydroxyle	Alcool		$\sigma_{\text{O-H}} = 3400 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1050 - 1250 \text{ cm}^{-1}$
Hydroxyle	Phénol		$\sigma_{\text{O-H}} = 3300 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C=C}} = 1450 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-H}} = 3000 - 3100 \text{ cm}^{-1}$
Carbonyle	Aldéhyde		$\sigma_{\text{C=O}} = 1700 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-H}} = 2650 - 2800 \text{ cm}^{-1}$
Carbonyle	Cétone		$\sigma_{\text{C=O}} = 1680 - 1690 \text{ cm}^{-1}$
Carboxyle	Acide carboxylique		$\sigma_{\text{C=O}} = 1700 - 1725 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{O-H}} = 2500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1210 - 1320 \text{ cm}^{-1}$
Ester	Ester		$\sigma_{\text{C=O}} = 1720 - 1775 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1200 \text{ cm}^{-1}$
Amine	Amine primaire		$\sigma_{\text{N-H}} = 3300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-N}} = 1250 - 1350 \text{ cm}^{-1}$
Amide	Amide		$\sigma_{\text{N-H}} = 3350 - 3370 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C=O}} = 1630 - 1680 \text{ cm}^{-1}$

*Remarques :

1. Les valeurs données sont indicatives étant donné qu'elles dépendent du protocole de mesure du spectre et peuvent donc varier dans la littérature.
2. Dans les cycles benzéniques (phénol), la délocalisation des électrons des doubles liaisons C=C à l'ensemble du cycle a pour conséquence l'impossibilité de discerner les simples et les doubles liaisons du cycle, d'où la particularité des propriétés de ce type de structure.
3. Pour les amines primaires (NH₂) la bande d'absorption apparaît dédoublée si la résolution du spectre le permet. Les amines secondaires quant à elles, n'affichent qu'une seule bande d'absorption. Enfin, les amines tertiaires n'affichent aucune bande liée à N-H étant donné que la liaison n'existe pas.

II.3.4.2. Principe de l'ATR-FTIR

L'ATR (réflexion totale atténuée) est une technique de FTIR qui utilise un cristal d'un matériau donné (diamant, ZnSe, ou germanium...) pour effectuer les mesures (**Figure II.12**). Le rayon IR incident traverse le cristal selon un certain angle (angle d'incidence, classiquement comme ici 45°), et pénètre sur une certaine distance (profondeur de pénétration) l'échantillon maintenu fermement sur la surface du cristal. Un bon contact entre l'échantillon et le cristal est très important. L'ATR utilise le phénomène de réflexion

qui se produit lorsqu'un faisceau passe d'un milieu dense (cristal) à un milieu moins dense (échantillon). Selon la loi de Snell-Descartes (**Equation II.5**), un faisceau est réfracté par le cristal lorsqu'il subit une réflexion à l'interface cristal-échantillon [11] :

$$n_0 \sin(\theta) = n_s \sin(\phi) \quad (\text{Equation II.5})$$

Avec :

n_0 = indice de réfraction du cristal

θ = l'angle d'incidence du cristal (ici taillé à 45°)

n_s = l'indice de réfraction du second matériau (échantillon)

ϕ = angle de réfraction du second matériau (échantillon).

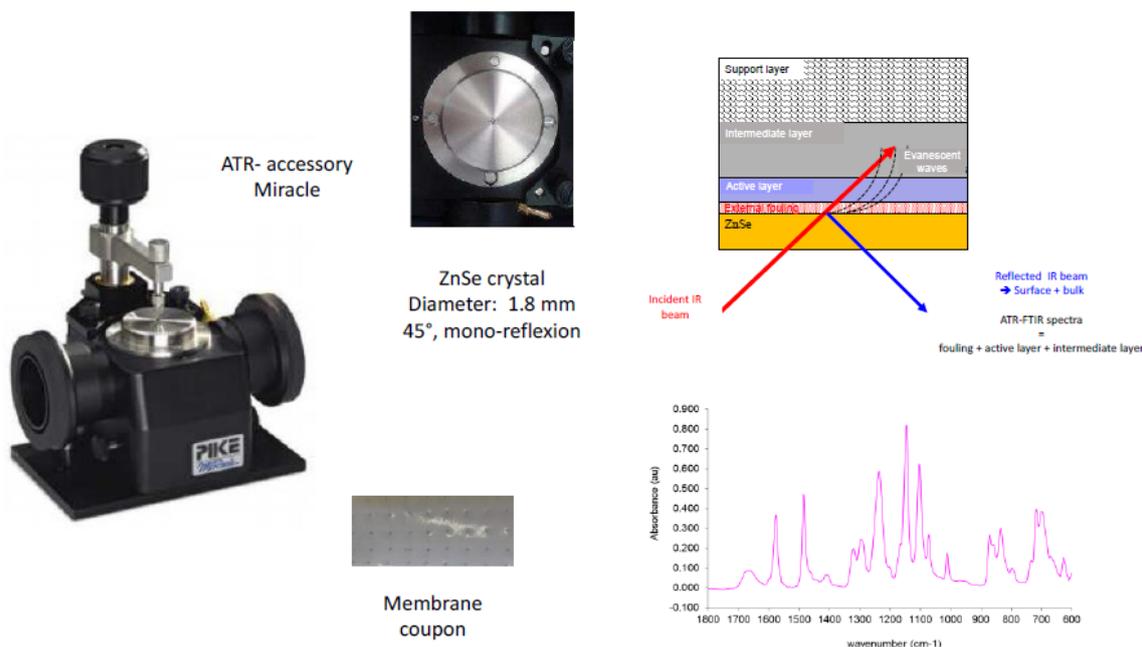


Figure II. 12. Spectromètre ATR-FTIR Jasco 4100, Accessoires et principes pour mesure ATR-FTIR.

Au point d'incidence sur le cristal, une onde pénètre l'échantillon de quelques micromètres. Cette onde est appelée l'onde évanescente. Ainsi, une partie de l'énergie est dissipée et la réflexion est atténuée.

Un détecteur de réflexion mesure alors l'intensité de la lumière réfléchi (I_R) qui contient une information caractéristique de l'échantillon. I_0 étant l'intensité réfléchi par l'air, la réflectance R est obtenue par l'**équation II.6** et est grossièrement l'équivalent de la transmittance en FTIR en transmission.

$$R = I_R/I_0 \quad (\text{Equation II.6})$$

La profondeur de pénétration des ondes évanescentes dans l'échantillon dépend de la longueur d'onde λ_0 dans le cristal, de l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la normale au sein du cristal (par exemple 45°) et des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon [6].

II.3.4.3. Protocole d'analyses ATR-FTIR

Dans le cadre de cette thèse, des analyses ATR-FTIR ont été réalisées pour l'évaluation de la propreté chimique des membranes à travers :

- Le dosage des enzymes ainsi que des protéines résiduelles sur les membranes (Chapitre III, Chapitre V).
- La caractérisation des résidus d'ingrédients des détergents après les nettoyages (Chapitre IV, Chapitre V).

Les membranes vierges ou colmatées puis nettoyées ont été systématiquement séchées au dessiccateur sous vide dynamique pendant plusieurs jours avant d'être caractérisées par ATR-FTIR ce qui permet d'éliminer les bandes OH caractéristiques de l'eau (large et très intense vers 3500 cm^{-1} et faibles vers 1660 cm^{-1}) qui pourraient se superposer aux bandes des ingrédients recherchés.

Les spectres ATR-FTIR ont été enregistrés avec un spectromètre Jasco 4100 (**Figure II.12**) équipé d'un cristal en diamant (cristal n°4, Miracle, mono-réflexion, angle d'incidence de 45°). Les conditions d'acquisition sont les suivantes : 128 scans, résolution 2 cm^{-1} , gamme 600 – 4000 cm^{-1} . Le background (I_0) était mesuré à l'air. Le spectromètre est équipé du logiciel Spectra Manager afin d'analyser les spectres.

Les échantillons de membranes étaient maintenus sur le cristal avec un système de presse (flat tip). Le faisceau infrarouge pénètre le matériau d'abord par la couche de colmatage externe, puis traverse la peau active de la membrane, puis la couche intermédiaire et enfin le support. Le signal réfléchi à la surface de la membrane se combine avec les interférences dues aux ondes évanescentes générées par l'interaction entre le faisceau IR et le matériau. Si la couche de colmatage n'est pas trop importante (cas systématiquement rencontré dans cette thèse), alors le spectre ATR-FTIR est la superposition du spectre du colmatage, de la peau active et de la couche intermédiaire. La couche support n'est jamais observée sur les spectres (**Figure II.13**).

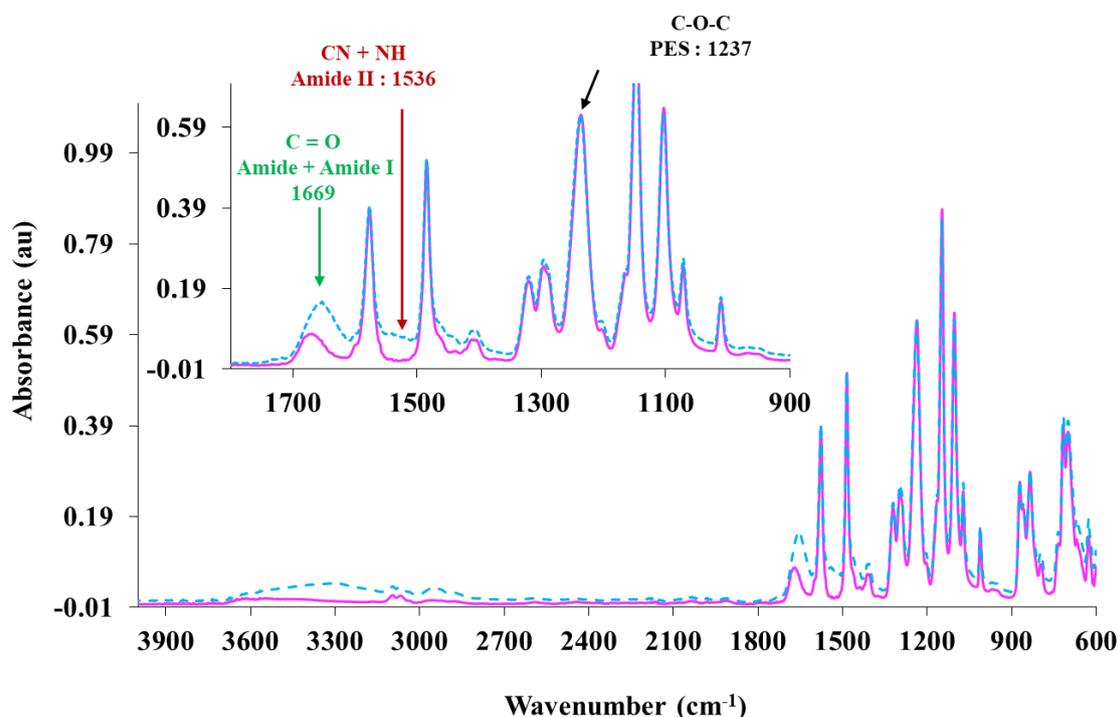


Figure II. 13. Spectres ATR-FTIR d'une membrane d'UF (HFK-131) vierge (rose, trait plein) et d'une membrane colmatée + rincée à l'eau DI (bleue, pointillé).

La quantification des protéines/enzymes a été réalisée selon le protocole mis au point et rapporté par Rabiller-Baudry et al. [1,12]. La bande située près de 1660 cm^{-1} est attribuée à la liaison C=O amide I de la protéine/enzyme et se superpose à la bande de l'amide de la PVP de la membrane. Par conséquent, la quantification a été basée sur la bande correspondant aux liaisons CN+NH de l'amide II située à 1536 cm^{-1} sans superposition avec une bande de la membrane vierge (**Figure II.13**). La bande de la PES située à 1237 cm^{-1} a été utilisée comme étalon interne, car elle n'a pas de superposition avec les composants du lait écrémé. La quantification a été obtenue à partir du rapport des absorbances, exprimé par le ratio de la hauteur à 1536 cm^{-1} (H_{1536} : amide II \rightarrow protéine) à celle à 1237 cm^{-1} (H_{1237} : PES) :

$$H_{1536} (\text{protéine : amide II}) / H_{1237} (\text{PES}) = 0.0034 [P] + 0.0165 \quad (\text{Equation II. 7})$$

Avec :

H_x : les hauteurs des bandes, mesurées par rapport à une ligne de base sélectionnée dans la plage plate du spectre dans l'intervalle 2240-2060.

[P] : la concentration en protéines ou protéines + enzyme en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Quantification possible dans la gamme 1-350 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $r^2=0.99$.

Pour chaque membrane, plusieurs spectres ont été enregistrés sur toute la surface filtrante. Le résultat donné est une valeur moyenne calculée sur tous les spectres enregistrés sur la membrane :

- 3 spectres pour les coupons de 14 cm^2
- 9 spectres pour les membranes planes de 127 cm^2 colmatées + nettoyées + rincées à l'eau
- 127 spectres pour les membranes de 127 cm^2 colmatées + rincées à l'eau

Références _ Chapitre II

- [1] M. Rabiller-Baudry, L. Bégoïn, D. Delaunay, L. Paugam, B. Chaufer, A dual approach of membrane cleaning based on physico-chemistry and hydrodynamics: Application to PES membrane of dairy industry, *Chem. Eng. Process Intensif.* 47 (2008) 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.01.026>.
- [2] L. Paugam, D. Delaunay, N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: On the real effect of nitric acid step, *J. Membr. Sci.* 428 (2013) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>.
- [3] N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.
- [4] M. Rabiller-Baudry, M. Le Maux, B. Chaufer, L. Bégoïn, Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR-FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane, *Desalination* 146 (2002) 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00503-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00503-9).
- [5] CultureSciences-Chimie, Introduction à la spectroscopie UV-visible, 15 Sept 2012. Site Web visité le 26 juillet 2023). <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-spectroscopie-uv-visible>
- [6] D. Skoog, F. Holler, S. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Sixth Edition, B. Cole, Belmont, 2007. https://www.chemcome.com/wp-content/uploads/2020/11/Principles-of-Instrumental-Analysis-7th-edition-Skoog-by-Douglas-A.-Skoog-F.-James-Holler-Stanley-R.-Crouch-z-lib.org_.pdf
- [7] F. Denat , Spectroscopie UV-visible, Université de Bourgogne (France) 2010. https://licence3-chimie.u-bourgogne.fr/cours_supports/CM_Denat_2010_UVVis.pdf
- [8] Victorien (Réalisateur). Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, Polytech Nantes (France) 2020. [Film] <https://www.youtube.com/watch?v=71jROQZSuXw>.
- [9] Wikipédia_FTIR., Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. *Récupéré sur Wikipédia* (visité le 24 juillet 2023): https://fr.wikipedia.org/wiki/Spectroscopie_infrarouge_%C3%A0_transform%C3%A9e_de_Fourier
- [10] MaxicoursV. Spectres infrarouge. Récupéré sur maxicours.com (visité le 24 juillet 2023): <https://www.maxicours.com/se/cours/spectres-infrarouge/#:~:text=Le%20spectre%20IR%20repr%C3%A9sente%20la,absorption%20s%C3%A9lective%20des%20liaisons%20chimiques>
- [11] M. Milosevic, Internal Reflection and ATR Spectroscopy. *Applied spectroscopy reviews*, 39 (3) (2004) 365-384. [DOI:10.1081/ASR-200030195](https://doi.org/10.1081/ASR-200030195)
- [12] M. Rabiller-Baudry, A. Bouzin, C. Hallery, J. Girard, C. Leperoux, Evidencing the chemical degradation of a hydrophilised PES ultrafiltration membrane despite protein fouling, *Sep. Purif. Technol.*, 147(2015) 62–81. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.056>.

Chapitre III

Colmatage Irréversible de référence

CHAPITRE III : COLMATAGE DE REFERENCE

III.1. Introduction

Le chapitre III décrit le colmatage d'une membrane plane de 127 cm^2 en PES/PVP (HFK-131) en cours de filtration de lait écrémé dans les conditions standards utilisées pendant cette thèse (2 bar, 50°C , 180 min, 110 L.h^{-1} soit 0.4 m.s^{-1} , $\text{FRV} = 1$, espaceur rétentat : 1 mm, joint : 1 mm).

L'objectif est de comprendre le colmatage global et surtout le colmatage irréversible initial, c'est-à-dire le colmatage restant sur la membrane après un simple rinçage à l'eau déionisée (DI) qui constitue la cible du nettoyage.

III.2. Colmatage par le lait écrémé en conditions d'UF

III.2.1. Eau et lait écrémé

De l'eau désionisée (DI, $18 \text{ M}\Omega$) et filtrée à $1 \mu\text{m}$ a été utilisée pour le rinçage de la membrane et la préparation de toutes les solutions. Le lait écrémé utilisé était un lait stérilisé UHT (Lait de Montagne, UHT, Carrefour, France). Sa composition moyenne est donnée par le fournisseur : 48 g.L^{-1} de glucides (principalement du lactose), 33 g.L^{-1} de protéines, et 8 g.L^{-1} de sels globaux dont 1 g.L^{-1} de NaCl.

III.2.2. La Compaction : Etape de conditionnement de la membrane

Chaque membrane plane est systématiquement trempée dans 4 L d'eau DI pendant 15 min afin d'éliminer le conservateur (glycérol). Elle est ensuite installée sur le module et compactée à 4 bar pendant 3 heures avec un débit de 110 L.h^{-1} à 50°C . Les autres étapes sont réalisées en fonction de l'objectif poursuivi.

L'étape de compaction a pour objectif de figer le maximum possible les chaînes de polymère jusqu'à atteindre un plateau de perméance, lequel plateau sera considéré comme la valeur de référence de la membrane neuve. Lors de la compaction, la forte pression exercée (3 ou 4 bar pendant 3 heures) stabilise la structure du polymère, ce qui diminue la perméance de la membrane et augmente sa résistance [1].

En refaisant une compaction (à 2 bar) après une nuit au repos, durant les 60 premières minutes les perméances sont systématiquement légèrement supérieures à celles de la première compaction avant de se stabiliser au même niveau qu'après la compression à 4 bar de la veille [1].

La compressibilité d'une membrane trouve en partie son origine dans le degré de réticulation du polymère. Plus la membrane est réticulée, moins elle gonflera en présence d'un solvant. Les membranes d'UF sont traditionnellement des membranes non réticulées ce qui constitue une difficulté. Dans tous les cas, la compressibilité de la membrane est partiellement réversible [1].

III.2.3. Protocole de colmatage

Pour réaliser le colmatage d'une membrane, l'ultrafiltration de lait écrémé UHT a été réalisée dans les conditions suivantes sur le pilote plan (UF-LPS + RayFlow X-100) suivant les étapes ci-après :

1. La compaction (4 L d'eau DI, 4 bar, 50°C , 180 min, 110 L.h^{-1})
2. L'UF de l'eau DI (4 L, 0.5-2 bar, 50°C , 10 min, 110 L.h^{-1}) $\rightarrow L_p^{\text{ref}}$
3. Le colmatage (UF de lait écrémé : 4 L de lait écrémé UHT, 2 bar, 50°C , 180 min, 110 L.h^{-1})
4. Le rinçage à l'eau DI jusqu'à l'obtention de l'eau claire côté rétentat et côté perméat
5. L'UF de l'eau DI (4 L, 0.5-2 bar, 50°C , 10 min, 110 L.h^{-1})

A ce stade, la membrane peut soit :

- i) Être démontée puis séchée pour caractérisation ATR-FTIR du colmatage irréversible. 4 membranes ont ainsi été traitées pour la quantification du colmatage moyen par du lait écrémé dans les conditions de filtration précitées ainsi que pour la cartographie de ce colmatage. Une 5^{ème} membrane a servi pour la détermination du flux critique (PTM variable dans le lait écrémé).
- ii) Être démontée puis découpée en 9 coupons de 14 cm² qui seront nettoyés et rincés en réacteur fermé. Dix-huit membranes ont ainsi été découpées et nettoyées en réacteur fermé au cours de cette thèse.
- iii) Rester sur le pilote pour subir un nettoyage en place (NEP) Cinquante-six membranes ont ainsi été nettoyées en condition d'UF au cours de cette thèse.

Les membranes planes sont référencées SKM-n. Les résultats concernant le NEP sont discutés dans les Chapitres IV et V.

III.3. Flux limite/ Flux critique

Dans l'eau DI, à température constante, le flux volumique de perméat J_p varie de façon linéaire avec la PTM. La pente de cette droite correspond à la perméance L_p . En revanche, pour un fluide contenant des solutés suffisamment concentrés, la relation J_p vs PTM cesse d'être linéaire et le flux tend progressivement vers un plateau appelé le flux limite.

Dans sa définition initiale, le flux critique, qui est inférieur au flux limite, est le flux en dessous duquel le colmatage global est totalement réversible (éliminable par un simple rinçage à l'eau), et au-dessus duquel, ce dernier devient fortement irréversible (« strong form »). Dès que le flux critique est dépassé, même en rediminuant la PTM, il restera du colmatage irréversible sur la membrane (hystérésis) [2].

Il existe également une forme de flux critique dite « weak form » pour laquelle en dessous du flux critique il n'y a pas de colmatage irréversible mais il y a de la polarisation de concentration.

Le cas de la filtration du lait écrémé (et vraisemblablement de tous les fluides alimentaires) est une version particulière de la forme « weak ». Ainsi, Diagne et al. [3] ont démontré dans le cas de la membrane d'UF PES/PVP et du lait écrémé que l'absence totale de colmatage irréversible n'est pas possible. Dans ce cas, le flux critique correspond à une forme « seuil » (« threshold form ») qui est aussi un flux que l'on peut considérer comme « durable », et délimite une zone de colmatage minimum (équivalent à l'adsorption en l'absence de pression) et un colmatage irréversible croissant à mesure que l'on s'éloigne du flux seuil.

Le couple Flux critique/Pression critique, de même que le couple Flux limite/Pression limite, dépend des conditions hydrodynamiques de la filtration. Les conditions hydrodynamiques utilisées avec la membrane plane de 127 cm² montée dans le module Ray Flow X100 (110 L.h⁻¹, vitesse en veine libre = 0.4 m.s⁻¹ en présence d'un espaceur rétentat d'épaisseur = 1 mm) ont été choisies pour se rapprocher des conditions rencontrées dans un module spirale en appliquant la démarche décrite par Rabiller-Baudry et al. [4].

La membrane plane SKM-21 a été colmatée par du lait écrémé UHT durant 9 heures. Pendant toute la durée de l'expérience, la PTM a été augmentée progressivement de 0.8 bar jusqu'à 4 bar. A chaque palier de PTM, le flux J_p a été mesuré jusqu'à l'obtention d'un plateau avant de passer à la PTM suivante (**Figure III.1**). Afin de déterminer le flux critique, les différentes valeurs moyennes au plateau des perméances L_p dans le lait à chaque palier de PTM sont présentées dans le **Tableau III.1** et sur la **Figure III.2**.

La PTM critique se situe entre 1.4 et 1.7 bar, en bon accord avec les résultats obtenus par Diagne et al. [3] sur le même pilote et dans les mêmes conditions hydrodynamiques, mais avec du lait écrémé UHT avec 32 g.L⁻¹ de protéines au lieu de 33 g.L⁻¹ dans le cas de cette étude. De même, le flux limite serait atteint vers 4 bar.

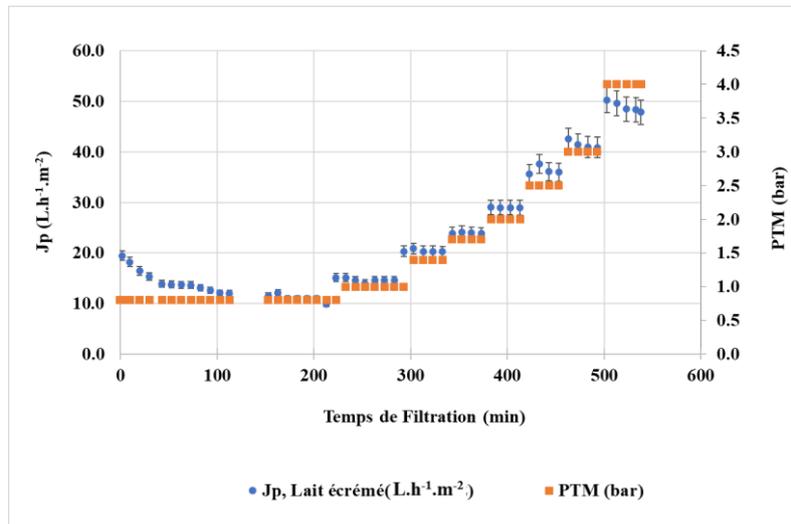


Figure III. 1. Flux de la membrane PES/PVP dans le lait écrémé UHT à 33 g.L⁻¹ de protéines en fonction du temps : 110 L.h⁻¹, 50°C, espaceur rétentat : 31 mil, joint : 1 mm, FRV =1, PTM : 0.8, 1, 1.4, 1.7, 2, 2.5, 3 et 4 bar

Tableau III. 1. Moyenne au plateau des L_p (L.h⁻¹.m⁻², bar⁻¹) dans le lait écrémé (SKM-21)

PTM (bar)	Moyenne de L _p au Plateau dans le Lait écrémé (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)
0.8	13.4 ± 0.6
1.0	14.6 ± 0.0
1.4	14.5 ± 0.0
1.7	14.1 ± 0.1
2.0	14.5 ± 0.0
2.5	14.4 ± 0.0
3.0	13.7 ± 0.1
4.0	12.1 ± 0.1

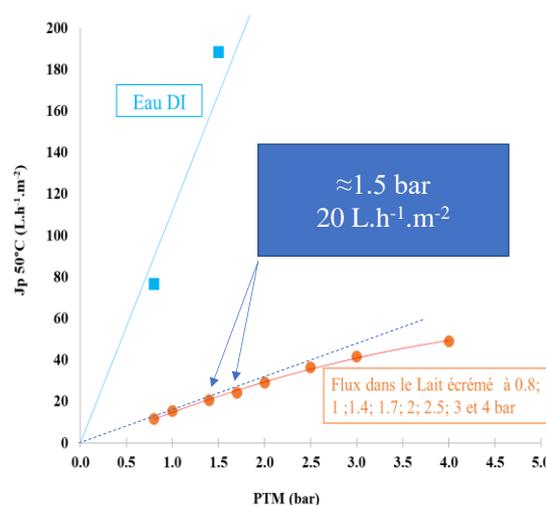


Figure III. 2. Détermination du couple J_p critique/PTM critique dans les conditions standards d'UF de lait écrémé sur membrane plane en PES/PVP (127 cm²), 110 L.h⁻¹, 50°C, FRV = 1, espaceur rétentat : 1 mm, PTM : 0.8 – 4 bar : SKM-21.

La quantification des protéines résiduelles sur la SKM-21 après rinçage a montré une quantité moyenne de $28 \pm 6 \mu\text{g.cm}^{-2}$ ($n=9$ spectres ATR-FTIR), qui correspond à une récupération du flux à l'eau DI de 22% montrant ainsi un colmatage irréversible sévère (**Tableau III.2**).

Tableau III. 2. Suivi des perméances L_p à chaque étape de l'expérimentation pour la détermination du flux critique (SKM-21).

Etapes de l'expérimentation	Moyenne L_p ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$)
L_p Compaction	82.9 ± 1.6
L_p dans à l'eau (J_{1*})	79.7 ± 1.9
L_p dans l'eau (J_{2*}) = L_p^{ref}	80.5 ± 0.5
L_p dans le Lait écrémé (à PTM = 4 bar)	12.1 ± 0.1
L_p dans l'eau (3) - Post Lait	17.4 ± 0.7
$L_p^{\text{Lait}}/L_p^{\text{ref}}$	0.15
$L_p^{\text{eau 3 (post Lait)}}/L_p^{\text{ref}}$	0.22

* J_1 = même jour que la compaction, J_2 = le lendemain de J_1 (ici, même jour que l'UF de lait)

Il est, cependant, intéressant de souligner que la pression exercée dans le protocole de colmatage appliqué dans la présente thèse, à savoir 2 bar, se situe largement en dessous du flux limite. En revanche, elle est légèrement au-dessus du flux critique dont la PTM a été localisée autour de 1.5 bar. Ceci est, *a priori*, en bon accord avec l'existence d'un colmatage irréversible significatif pour aborder l'étude du colmatage. Ce point sera néanmoins validé sans ambiguïté par la suite (voir plus loin).

III.4. Choix des conditions d'UF : 2 bar

Lors du colmatage par du lait écrémé (UHT) des membranes planes d'UF en PES/PVP (HFK-131, Koch) mesurant 127 cm^2 , le suivi des perméances L_p à différentes étapes du protocole de colmatage a été réalisé systématiquement. Nous avons choisi de sélectionner une pression de 2 bar permettant d'atteindre un colmatage global compris entre les conditions critiques et les conditions limites.

Ainsi, les perméances pour 21 membranes pendant la compaction, le flux dans l'eau post compaction, l'UF de lait écrémé et le flux dans l'eau post UF de lait écrémé sont présentées **Figure III. 3**.

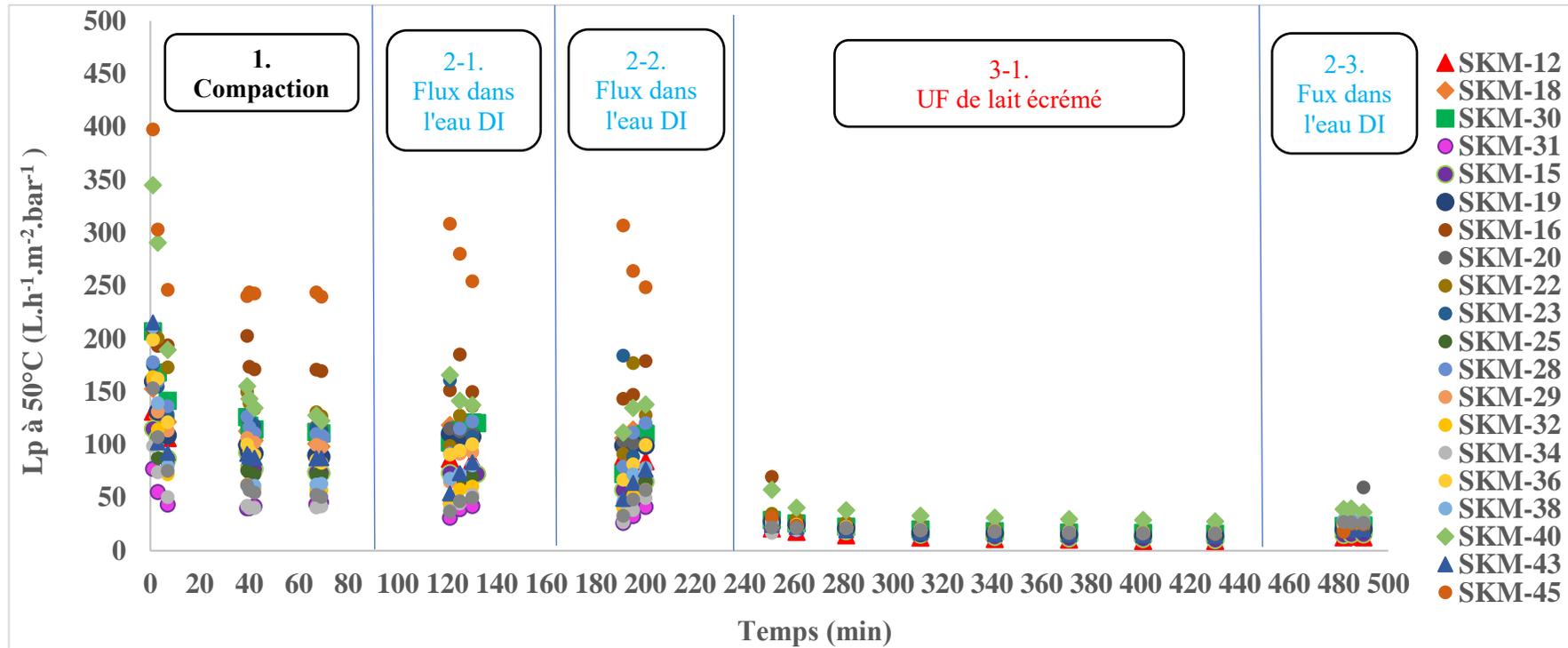


Figure III. 3. Perméances L_p à chaque étape du protocole de colmatage par du lait écrémé : 21 membranes d'UF de 127 cm² (PES/PVP) colmatées (110 L.h⁻¹, 2 bar, 50°C, 180 min, espaceur rétentat : 31 mil, joint 1 mm, FRV=1) puis rincées à l'eau DI

Les différentes membranes ayant été découpées dans différentes feuilles de la membrane spirale S-cut-CIP-2, on constate une hétérogénéité des flux à l'étape de la compaction ainsi que pour le flux de référence post-compaction. Ceci se traduit par des écarts types importants. Ainsi, pour ces deux étapes du protocole, on a des moyennes de $L_p = 90 \pm 80$ et $100 \pm 80 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$, respectivement (**Tableau III.3**). L'hétérogénéité des matériaux membranaires est un fait bien connu qui est parfaitement visible ici.

En revanche, les flux dans le lait écrémé ainsi que dans l'eau post l'UF de lait écrémé sont homogènes, avec des moyennes de 16.6 ± 0.6 et $27 \pm 2 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$, respectivement (**Tableau III.3**). Il est clair ici, que la couche de colmatage joue un rôle de préfiltre au-dessus de la membrane. La perméance en présence dans le lait écrémé dépend essentiellement de la couche du colmatage et non de la membrane elle-même.

Tableau III. 3. Moyennes des perméances L_p sur 21 membranes d'UF PES/PVP (127 cm^2) à chaque étape du protocole de colmatage par du lait écrémé UHT

Etape d'UF	Compaction	Eau (J_{1^*})	Eau (J_{2^*}) (Réf)	UF de Lait	Eau post-Lait
L_p ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$)	90.80	99.78	93.90	16.62	26.68
Ecartype	75.76	78.05	64.91	0.58	1.67
RSD	0.83	0.78	0.69	0.03	0.06
$L_p/L_p^{\text{réf}}$	0.90	0.98	—	0.23	0.37
Ecartype	0.13	0.09	—	0.10	0.16
RSD	0.14	0.09	—	0.44	0.43

* J_1 = même jour que la compaction, J_2 = le lendemain de J_1 (ici, même jour que l'UF de lait)

Lujan-Facundo et al. [5] avaient aussi mis en évidence l'homogénéité des flux lors du colmatage par de la BSA de membranes en PES ayant des seuils de coupure différents (5 et 30 kg.mol^{-1}) ainsi que des hydrophobies légèrement différentes, comme en témoignent les angles de contact à l'eau qui étaient $54^\circ \pm 3^\circ$ et $66^\circ \pm 3^\circ$, respectivement. A l'issue du colmatage, les angles de contact à l'eau étaient semblables pour les deux membranes ($76^\circ \pm 4^\circ$) traduisant la présence massive de la BSA sur la membrane.

Ces résultats sont en accords avec tous ceux obtenus au laboratoire au cours des 30 dernières années dans le cas de l'UF de fluides contenant des protéines.

Pour une meilleure appréciation du colmatage irréversible, les protéines résiduelles ont été quantifiées par ATR-FTIR.

III.5. Colmatage irréversible initial après UF à 2 bar (après rinçage à l'eau DI)

III.5.1. Colmatage moyen

Les membranes planes de 127 cm^2 utilisées ont découpées dans différentes parties des feuilles d'une membrane spirale d'UF en PES/PVP (S-Cut- CIP-2) sont hétérogènes (cf ci-dessus). En outre, pour les NEP en réacteurs, certaines membranes de 127 cm^2 ont été découpées en 9 coupons de 14 cm^2 chacun. Pour être en mesure de comparer les performances de NEP par différents détergents, il est nécessaire de maîtriser la cartographie des dépôts sur les membranes colmatées et de pouvoir s'y reporter après le NEP.

Pour ce faire, 4 membranes planes (SKM-12, SKM-18, SKM-30 et SKM-31) ont été colmatées dans les conditions standards de filtration du lait écrémé UHT (3 h à 2 bar, 50°C, 110 L.h⁻¹, FRV=1) puis rincées à l'eau DI avant d'être rigoureusement séchées puis caractérisées par ATR-FTIR.

Pour quantifier le colmatage moyen sur ces 4 membranes de 127 cm², chacune a été divisée en 9 coupons de 14 cm² chacun. Trois spectres ont été enregistrés sur chaque coupon de 14 cm². Ainsi, il y a eu 27 spectres enregistrés sur chaque membrane de 127 cm². La moyenne du colmatage calculée est donc issue de 108 spectres (équation II. 7, Tableau III.4).

Cette expérience démontre qu'indépendamment de l'hétérogénéité de la perméance de départ, L_p^{ref} (Tableau III.4), le colmatage moyen est homogène sur les 4 membranes (108 spectres ATR-FTIR). La moyenne des résidus protéiques est de $31 \pm 9 \mu\text{g.cm}^{-2}$. Il est également clair que pour une même membrane, on observe une répartition relativement homogène du colmatage. En témoignent les écarts types relativement faibles (Tableau III.4).

Cette quantité est similaire à celle retrouvée sur la membrane SKM-21 après 9 h de colmatage de 0.8 à 4 bar ($28 \pm 6 \mu\text{g.cm}^{-2}$). Ce qui tend à indiquer une limite (plateau) dans le colmatage en dépit du temps prolongé ou de l'augmentation de la PTM.

Tableau III. 4. Caractérisation du colmatage protéique ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) réalisée sur 4 membranes d'UF en PES/PVP de 127 cm² chacune (n = 108 spectres ATR-FTIR)

Membrane	L_p^{ref} (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	Moyenne des résidus protéiques ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)
SKM-12	41	24 ± 9
SKM-18	84	34 ± 8
SKM-30	110	34 ± 2
SKM-31	116	31 ± 7
Moyenne globale	88	31
Ecart type	34	9
RSD	0.4	0.3

III.5.2. Cartographie du colmatage d'une membrane d'UF de lait écrémé

Une étude réalisée par Rabiller-Baudry et al. [4] en 2014 ont mis en évidence l'hétérogénéité plus ou moins importante du colmatage dans une membrane spirale PES/PVP HFK-131 de type 4333 (6.5 m²) utilisée dans des conditions semblables à celles qui sont appliquées au cours de cette thèse. Cette étude avait pointé que pour une PTM supérieure à 2 bar en tout point de la membrane (c'est-à-dire au-delà de la PTM critique dans ce module), le colmatage (protéines déterminé par ATR-FTIR) ne dépendait plus que de la vitesse de recirculation et des turbulences occasionnées par les espaceurs rétentat. Ces auteurs avaient alors divisé chacune des feuilles de la membrane spirale en trois zones principales définies en fonction de leur distance par rapport au collecteur perméat une fois la feuille déroulée.

- dans la zone A, à proximité directe du collecteur perméat (30% de la surface de la membrane), le colmatage était le plus important et coïncidait avec la vitesse et les turbulences les plus faibles. Néanmoins, le colmatage diminuait depuis l'entrée de la membrane jusqu'à la sortie, suggérant une augmentation de la vitesse et des turbulences dans le même sens.
- dans la zone B (50% de la surface totale de la membrane) au centre de la feuille le colmatage était constant suggérant qu'il en était de même de la vitesse et des turbulences
- dans la zone C la plus éloignée du collecteur perméat (20% de la surface de la membrane) le colmatage augmentait dans le sens entrée/sortie de la membrane spirale suggérant une diminution de la vitesse et de la turbulence dans le même sens.

Les auteurs suggèrent qu'il était également possible que la différence dans le comportement entre les zones A et C soit aussi liée à des forces centrifuges [4].

Bien que la surface soit beaucoup plus petite, il a été aussi montré que le colmatage pouvait être plus ou moins bien réparti sur une membrane plane de 127 cm² utilisée dans un module Ray flow X-100. Ainsi, Delaunay et al. [6] en 2008 ont filtré (i) du lait écrémé et (ii) une suspension de charbon de bois sur une membrane installée sur le même pilote que celui utilisé dans cette thèse et dans des conditions hydrodynamiques proches (110 L.h⁻¹, veine liquide 1.5 mm). Dans les deux cas les essais avaient été conduits avec un espaceur (diamant 44 mil ?) ou sans espaceur rétentat dans la veine liquide (**Figure III.4**). En l'absence d'espaceur, ils avaient montré l'existence d'une zone de circulation rapide (zone I) et d'une zone de circulation lente (zone II) qui étaient facilement mises en évidence par le contraste des dépôts colmatant globaux. A contrario, la présence de l'espaceur tendait à homogénéiser le dépôt colmatant global. Néanmoins, lors de l'UF de lait écrémé réalisée pendant 2 h à 50°C l'expérience avec un espaceur avait également démontré, qu'après rinçage post colmatage, la concentration en protéines irréversibles était plus forte à proximité de l'entrée (50 – 100 µg.cm⁻²) que celle sur le reste de la membrane (20 – 50 µg.cm⁻²) [6].

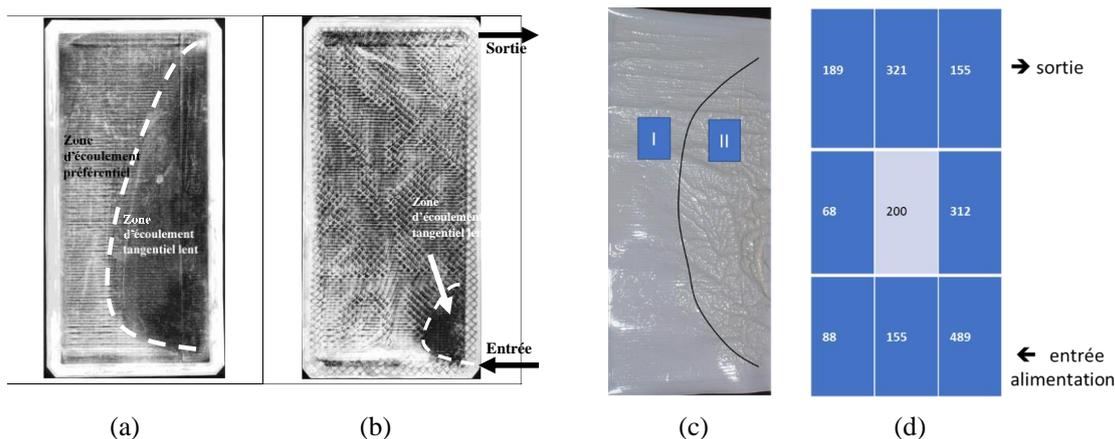


Figure III.4. Photographies de membranes planes obtenues en faisant recirculer une suspension de charbon dans le module plan (a) en absence ou (b) en présence de promoteurs de turbulence (espaceur rétentat (44 mil ?) d'un module spiral HFK-131, UF, 8 pouces, 23 m²). (c) Photographie de la membrane colmatée non-rincée et (d) dosage ATR-FTIR de protéines en µg cm⁻² (± 25) d'une membrane colmatée par du lait écrémé et non rincée (2 bar, 2h, 110 L h⁻¹, sans espaceur, veine liquide de 1.5 mm). Le gel en séchant a craquelé sur la membrane.

Au cours de ce travail, nous avons reproduit le même montage (à l'exception du joint et du type d'espaceur) et les entrée/sortie alimentation/rétentat ainsi que la position de la sortie perméat étaient celles montrées sur la **Figure III.5.b** (montage standard utilisé pendant toute la thèse et les travaux rapportés par Delaunay et al.). Nous avons également ponctuellement testé un changement de position de la sortie perméat tel que montré sur la **Figure III.5.a**.

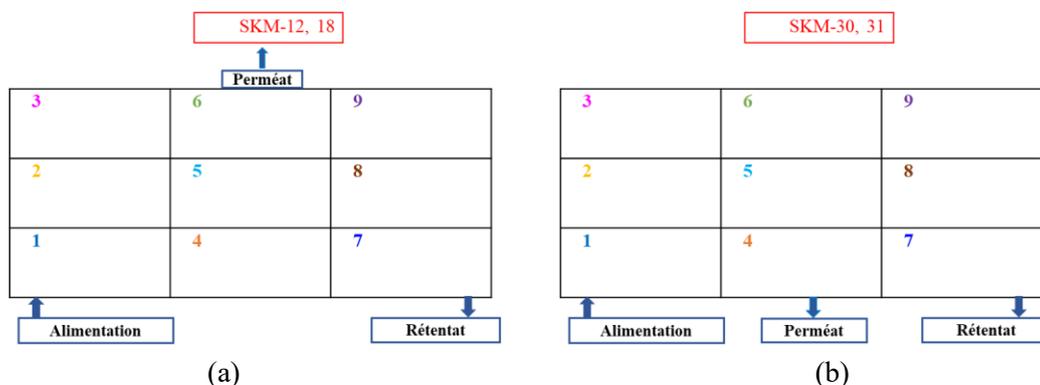


Figure III. 5. Configuration de filtration (avec espaceur rétentat diamant 31 mil, joint: 1 mm) : Position de la sortie perméat par rapport à l'alimentation sur une membrane d'UF de 127 cm² découpée en 9 coupes.

En comparant la **Figure III.4.b** et la **Figure III.5.b**, la position 1 devrait/pourrait être plus colmatée que les autres. Nous espérons que les autres positions auront des niveaux de colmatage très proches.

Une analyse du colmatage par ATR-FTIR a été menée pour cartographier le colmatage sur les 4 membranes (SKM-12, SKM-18, SKM-30 et SKM-31) par rapport au plan de circulation des fluides dans le module plan (**Figure III.6**). Si les membranes SKM-12 et SKM-18 ont été colmatées en recueillant le perméat du côté opposé de l'alimentation, les membranes SKM-30 et SKM-31 ont été colmatées avec l'alimentation et le perméat du même côté (**Figure III.6**). Ceci dans le but d'étudier l'influence de la configuration de circulation du fluide sur la cartographie du colmatage.

Au vu des résultats du **Tableau III.5**, force est de constater que la position de la sortie perméat n'a aucun impact sur le colmatage irréversible ni sur la cartographie du colmatage par position de coupon.

A l'exception de la SKM-30 qui a montré, de façon isolée, plus de colmatage sur le coupon 1 (point d'alimentation) à l'instar des résultats obtenus par Delaunay et al. [6], toutes les autres membranes, à savoir SKM-12, SKM-18, et SKM-31, ont affiché un colmatage relativement homogène sur toute l'étendue de leur surface.

Tableau III. 5. Résidus protéiques ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) par position du coupon sur les membranes de 127 cm^2 (PES/PVP) colmatées (2 bar, 3 h, $110\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 50°C , $\text{FRV}=1$, espaceur rétentat 31 mil, joint: 1 mm)

Membrane	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position 5	Position 6	Position 7	Position 8	Position 9
SKM-12	28	35	18	24	20	19	28	31	16
SKM-18	32	36	30	38	30	28	37	33	39
SKM-30	67	30	32	33	29	31	38	21	24
SKM-31	35	35	32	29	29	27	26	33	33
Moyenne ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	41	34	28	31	27	26	32	30	28
Ecartype	18	3	7	6	5	5	6	6	10
RSD	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4

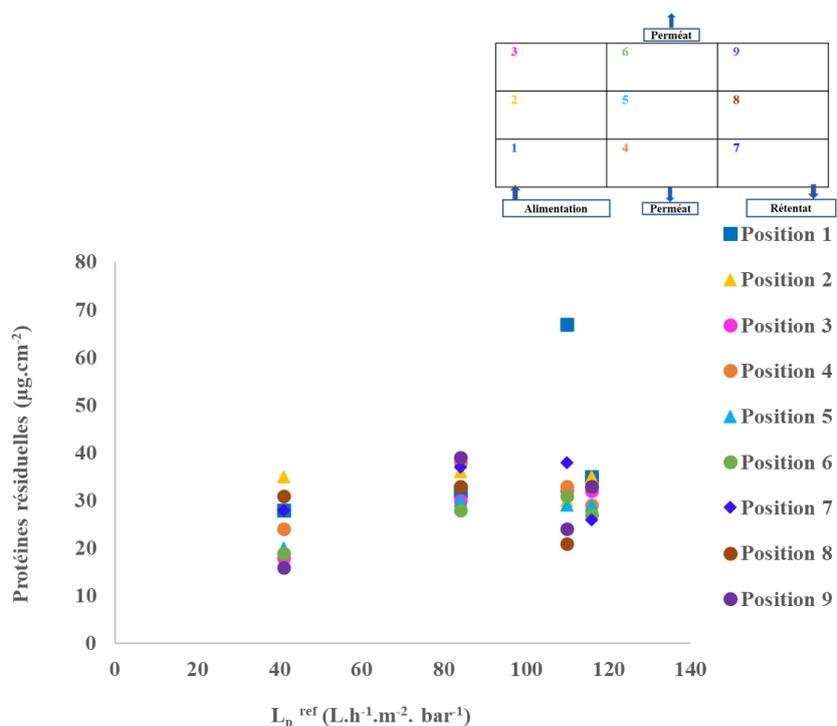


Figure III. 6. Protéines résiduelles ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) par position du coupon sur la membrane (1-9) en fonction de la perméance de référence (L_p^{ref})

Des exemples de cartographie sont montrés sur les **Figure III.7** (PTM finale 4 bar) & **Figure III.8** (PTM 2 bar). Pour les colmatages à 2 bar, à l'exception de la position 1, il sera globalement possible de faire abstraction de la position quand les nettoyages seront réalisés en réacteur sur des coupons. Néanmoins, par précaution, nous avons systématiquement noté les positions tout au long du travail pour être en mesure de rediscuter les résultats si le besoin s'en faisait sentir.

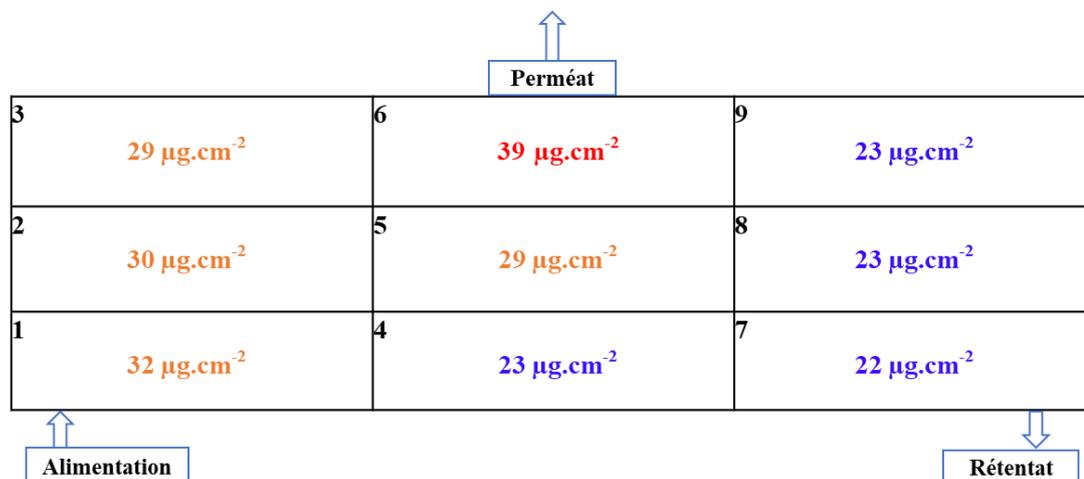


Figure III. 7. Cartographie du colmatage protéique ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) sur la membrane SKM-21 (sortie perméat à l'opposé de l'alimentation) après 9 heures d'UF de lait écrémé à différentes PTM : 0.8 – 4 bar, 50°C, 110 L.h⁻¹, FRV = 1, espaceur rétentat 31 mil, joint: 1 mm

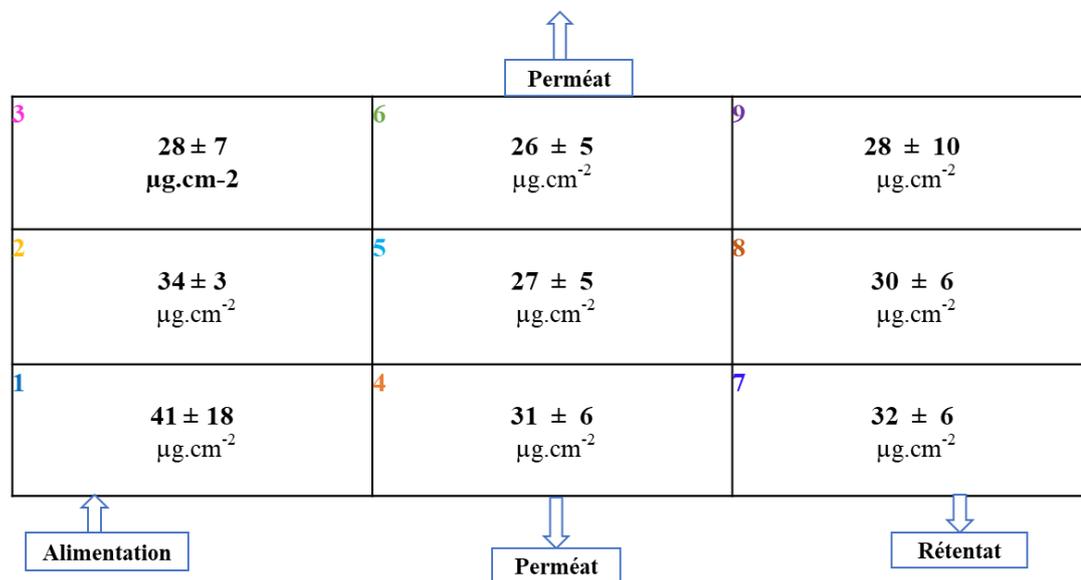


Figure III. 4. Cartographie du colmatage protéique ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) sur les 4 membranes (SKM-12, SKM-18 : sortie perméat à l'opposé de l'alimentation ; SKM-30, SKM-31 : sortie perméat du même côté que l'alimentation) après 3 heures d'UF de lait écrémé à 2 bar, 50°C, 110 L.h⁻¹, FRV = 1, , espaceur rétentat 31 mil, joint: 1 mm

Conclusion du Chapitre III

Dans ce chapitre, l'objectif était d'établir l'état du colmatage irréversible initial pour disposer de cette information afin d'étudier le nettoyage, en espérant que les essais en filtration plane seront aussi représentatifs que possible de ceux qui seront conduits ultérieurement en filtration avec la membrane spirale.

En adoptant la démarche antérieurement mise en place au laboratoire, afin de reproduire au mieux un colmatage irréversible initial similaire à celui qui pourrait être obtenu avec la membrane spirale 4 pouces dont nous disposons, les conditions hydrodynamiques de filtration sur le module plan Ray Flow X100 ont été « ajustées » à celles du module spiral, en choisissant comme critère une vitesse de recirculation « identique ». Ce choix est rendu possible en choisissant une vitesse estimée dans la veine liquide libre de 1 mm à environ 0.4 m.s^{-1} (110 L.h^{-1} , régime laminaire) et en y ajoutant un espaceur rétentat de même type en escomptant que les turbulences provoquées seront du même ordre dans les deux géométries. L'argument majeur de la validité de ce choix réside dans la comparaison du flux dans le lait écrémé à 2 bar qui est le même aux incertitudes près dans les deux géométries.

Une fois les conditions hydrodynamiques fixées, à partir de l'étude du flux de la membrane plane dans le lait écrémé en fonction de la pression, nous avons fixé la PTM à 2 bar pour se positionner entre la PTM_{critique} et la PTM_{limite} et ainsi faire face à un colmatage irréversible initial significatif.

Quelle que soit la perméance initiale de la membrane neuve, qui peut varier du simple au double compte-tenu de l'hétérogénéité des matériaux, la perméance de référence dans le lait écrémé à 50°C et 2 bar est $16.6 \pm 0.6 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$, tandis que la perméance à l'eau post-colmatage et post-rinçage à l'eau déionisée est $27 \pm 2 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$.

Les cartographies du colmatage protéique post rinçage et avant nettoyage ont été établies et ont conduit à une valeur moyenne de référence de $31 \pm 9 \mu\text{g.cm}^{-2}$ ($n= 108$ spectres ATR-FTIR).

Si le besoin s'en fait sentir il sera également possible de se reporter à des valeurs moyennes de référence en fonction de la position sur la membrane plane pour tenir compte de l'hydrodynamique dans le système.

Un résultat original de ce chapitre est celui qui compare le colmatage irréversible résiduel post colmatage & post rinçage après 9 h d'UF entre 0.8 et 4 bar, d'une part, et après 3 h à 2 bar d'autre part. Ces deux valeurs étaient semblables aux incertitudes près. Ceci suggère l'hypothèse d'un plateau de colmatage qui pourrait être atteint après 3h à 2 bar. Cela suggère aussi qu'un produit de nettoyage efficace sur un colmatage obtenu en laboratoire pendant 3 h à 2 bar pourrait être efficace sur un colmatage obtenu en industrie pendant 8 h (durée d'une phase de production à 50°C avant NEP) et à $PTM \geq 2$ bar. Cette dernière remarque renforce la confiance dans la méthodologie que nous utilisons.

Références _ Chapitre III

- [1] M. Rabiller-Baudry, D. Delaunay, L. Paugam, C. Leperoux, N.W. Diagne, H. Dialo, A. Francannet, F. Piquet, A. Bouzin, Reflexions on the meaning of flux measurements of uncrosslinked ultrafiltration PES based membranes used in food industry. Archive de ISCR-CIP, 2015 (Résultats internes non publiés).
- [2] R.W. Field, D. Wu, J. A. Howell, B. B. Gupta, Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Membr. Sci.* 100 (1995) 259–272. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)00265-Z](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)00265-Z).
- [3] N. W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.
- [4] M. Rabiller-Baudry^b, N. W. Diagne, D. Lebordais, How the experimental knowledge of the irreversible fouling distribution can contribute to understand the fluid circulation in a spiral ultrafiltration membrane. *Separation and Purification Technology*, 136 (2014)157-167. [10.1016/j.seppur.2014.08.040](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.040). [hal-01069494](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01069494)
- [5] M. J. Luján-Facundo, J.A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Urbe, S. Álvarez-Blanco, Cleaning efficiency enhancement by ultrasounds for membranes used in dairy industries, *Ultrason. Sonochem.* 33(2016) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.018>.
- [6] D. Delaunay, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, M. Frappart, B. Balannec, J. M. Gozalvez-Zafrilla, Mapping of protein fouling by FTIR-ATR as experimental tool to study membrane fouling and fluid velocity profile in various geometries and validation by CFD simulation. *Chemical Engineering and Processing* 47 (7) (2008) 1106-1117. DOI: [10.1016/j.cep.2007.12.008](https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.12.008)

Chapter IV

Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk

This chapter was submitted to Environmental Technology in January, 2024 and is currently under review. This chapter is thus presented in the form of a pre-article.

This chapter addresses the issue of the selection of the commercial stabilized enzyme for the formulation of formulated enzymatic detergents, which will be developed and discussed throughout the following chapters of this thesis manuscript.

The commercial stabilized enzymes studied in this thesis are all from the subtilisin family, but the strain of bacteria from which they come is not always well identified by the supplier and could therefore be different. In addition, to guarantee their stability, they are marketed in solutions with stabilizing agents that differ from one commercial enzyme to another.

Therefore, this chapter aims to discuss:

- The potential impact of stabilizing agents on the performance of skim milk protein removal by commercial enzymes
- The compatibility of commercial stabilized enzymes with the UF PES/PVP membrane
- The impact of commercial stabilized enzymes (and therefore their stabilizing agents) on the behaviour of fluxes in water post-cleaning in place.
- The importance of formulation in the effectiveness of enzyme detergency

Chapter IV: METHODOLOGY TO SELECT COMMERCIAL ENZYMES INCORPORATED IN FORMULATED DETERGENTS USED IN THE CLEANING OF ULTRAFILTRATION PES/PVP MEMBRANES FOULED BY SKIM MILK

Abstract

PES/PVP polymer membranes are widely used at industrial scale for skim milk ultrafiltration (UF), aiming at protein content standardization before the cheese making process. Membranes are systematically fouled by milk proteins, which are the main cleaning target. Enzymatic detergents are an eco-friendly and desirable solution to remove proteins from the membranes. Nevertheless, enzymes used alone are generally not efficient enough, and formulated detergents have to be proposed for the sake of increased efficiency. They may be decomposed into an enzyme, a buffer, and a matrix containing all the other ingredients. It can be challenging to master all the impacts associated with the choice of enzymes, as only stabilized enzymes are commercially available. To account for the impact of these stabilizing agents, a prototype matrix has been formulated in which one among 3 different stabilized Subtilisins (classical proteases used for membrane cleaning) has been dissolved at a concentration leading to the same hydrolysis activity.

The selected UF membrane (HFK-131, Koch) has been fouled by skim milk in standardized conditions (50°C, 2 bar, 0.4 m. s⁻¹, 180 min). Then, the cleaning efficiency of the prototype detergents was evaluated at 50°C (2 bar, 0.4 m. s⁻¹, 60 min) by the mean of the residual protein quantification on the membrane (ATR-FTIR). All the detergents were very efficient.

As a general trend, the water flux recovery (WFR) was high but generally significantly greater than 1. A de-formulation approach was undertaken, aiming at understanding the origin of this behavior. Based on complementary ATR-FTIR characterization of membranes at every step, the discussion provides a fundamental explanation of the WFR behavior, which is not associated with membrane degradation. The impact of the stabilizing agents was demonstrated together with possible combinations with matrix ingredients and synergetic effects.

Keywords: PES/PVP membrane, skim milk, ultrafiltration, fouling, enzymatic detergents, cleaning, ATR-FTIR.

1. Introduction

Ultrafiltration (UF) with polyethersulfone/polyvinylpyrrolidone (PES/PVP) polymer membranes is the main membrane separation used in the dairy industry in order to pre-concentrate skim milk before the cheese making process. However, the membranes are systematically fouled, requiring cleaning in order to both recover membrane performances and guarantee hygienic safety. A simple rinsing with deionized (DI) water can only remove the “reversible fouling” and a significant amount of milk proteins remains on the membrane, hereafter referred to as the initial irreversible fouling. Thus, at industrial scale, twice daily, membrane cleaning & disinfection cycles have to be achieved. These operations represent up to one third of the process time [1] and of the energy consumption [2]. Progresses in cleaning & disinfection are required to turn toward a more sustainable dairy industry, together with a decarbonized one, thanks to minimization of the cleaning time for instance.

The initial irreversible fouling of UF PES/PVP membranes was reported to be mainly due to proteins [3,

4], which are consequently the main cleaning target. Accordingly, as NaOH is not efficient enough at $\text{pH} \approx 11.5\text{-}12.4$, 50°C , 1 h, that are the limiting pH and temperature conditions for PES/PVP membrane industrial cleaning [5], either alkaline formulated detergents or enzymatic ones have to be selected [6-11].

Enzymes are eco-friendly and biodegradable compounds, so they are suitable for membrane cleaning if they do not provoke membrane degradation. However, alone, they are generally not efficient enough, and formulated enzymatic detergents have to be developed.

The formulated detergent may be decomposed into 3 parts: an enzyme, a buffer (to optimize the enzyme activity) and a matrix containing all the other ingredients. Besides the choice of the enzyme that has to be made with respect to its activity toward the fouling to remove, it can be challenging to master all the impacts associated with the enzyme choice because only stabilized enzymes are commercially available. The stabilizing agents (also playing a role on the stability of the overall concentrated detergent before use) could potentially have an impact on the final detergents' performances due to interactions with the matrix ingredients.

This paper aims at a better understanding of the impact of the enzyme stabilizing agents on the membrane cleaning efficiency after the incorporation of the stabilized enzyme in a given detergent matrix. For the sake of the demonstration, a prototype (not fully optimized) liquid detergent matrix provided by our industrial partner (Hypred-Kersia®, France) was used.

The only variation in the prototype detergents' composition was the source of the stabilized enzyme, only knowing the stabilizing agents by the mean of the safety data sheet of the providers. A PES/PVP ultrafiltration (UF) membrane was selected (HKF 131, Koch, $\text{MWCO } 5\text{-}10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) because it is the main worldwide membrane used in skim milk UF, which is our target application. The study includes the characterization of the stabilized enzyme with respect to the commercial source, the chemical and hydraulic evaluation of the cleaning efficiency either on a virgin membrane or on a skim milk fouled one. ATR-FTIR quantification of residual proteins & enzymes on membranes and a first evaluation of the membrane integrity are provided.

2. Enzyme in (membrane) cleaning

The enzyme selection is the first tricky point. Enzymes provoke the hydrolysis of macromolecules that are degraded into smaller fragments (for instance, peptides with variable molecular weights). The fouling layer is expected to become more fragile than the previous cohesive protein layer. Moreover, with respect to their shorter carbon chains, peptides have fewer interactions with the membrane surface than the proteins. Thus, they are expected to be more easily desorbed from the membrane surface to be recovered in the solution.

The UF of skim milk by the selected PES/PVP membrane proved to provoke irreversible fouling mainly made of proteins [1,4,5]. Accordingly, the selected enzyme(s) must be protease(s). Aiming at cost reduction, the selection of only one enzyme has to be preferred to a mixture of several ones if no synergetic effect is absolutely required.

2.1. Subtilisins: a family of proteases commonly used in cleaning

The selected enzyme must be sufficiently stable to be stocked before and after its incorporation in the (liquid) detergent and before its industrial use. Accordingly, alkaline proteases belonging to the Subtilisin family are often selected for membrane cleaning. The name Subtilisin derives from the bacterial species,

Bacillus subtilis, from which the enzyme was first isolated. Today, it is a generic name for alkaline extracellular serine (S8) endopeptidase proteases isolated from related *Bacillus species*.

The Subtilisin variant depends on the strain of bacillus from which it was obtained. Among Subtilisins are, for instance, Amylosacchariticus BPN, Carlsberg (also referred to as A or Alcalase Novo), DY, E, BPN' (or Nagarse), Maxacal, Subtilisin 309, or Savinase®, deriving from *Bacillus Lentus* [23], that can also be used as a food additive [12, 13, 14, 15, 16, 17].

All Subtilisins having the same CAS registry number (9014-01-1), the exact variant cannot be easily identified from the detergent providers' safety data sheets. Except when the trade name seems explicit, as suggested, for instance, in the case of Savinase® Evity 16L provided by Novozyme (Be). According to our knowledge, Subtilisin Carlsberg, derived from *Bacillus licheniformis* as reported by Graycar [23], is one of the most commonly used in detergents (regardless of the application) [59].

Subtilisins' primary sequence contains 274-275 amino acid residues, leading to a MW of about 27 kg.mol⁻¹. This means that, in their native and thus active forms, they cannot enter the pores of the selected UF membrane (MW 5-10 kg.mol⁻¹). Consequently, they are supposed to only clean up the fouling deposited on the membrane surface. This is in good agreement with our objectives, as the proteins' main location is on the surface and not inside the pores of the selected membrane, as reported by Rabiller-Baudry et al., [18].

2.2. Subtilisin specificity and optimum activity vs pH and temperature

Globally, Subtilisins are stable in the 7-10 pH range [23]. Despite their close structure, their isoelectric pH can significantly vary between 7.8 and 11.0; the Carlsberg pI being pI= 9.4 [23, 21]. Each enzyme has its optimum pH and temperature ranges for which its activity is maximum. Outside of these conditions, the enzyme is less or totally ineffective.

Subtilisins are broadly specific but differ markedly with respect to the substrates [19, 20, 21, 22, 23]. For instance, Subtilisin Carlsberg evidences either esterase or protease activities against (i) methylbutyrate or (ii) a variety of proteins, including caseins (the main milk proteins), hemoglobin, ovalbumin, and gelatin, respectively [24]. The optimum pH for caseins' hydrolysis is in the 10-11 range (but the appropriate temperature was not mentioned) [25]. Similarly, Subtilisin BPN' is able to hydrolyze caseins, hemoglobin, and gelatin. Moreover, BPN' oxidizes lysozyme, an enzyme only differing by 4 amino acids in its primary sequence from α -lactalbumin (14.4 kg.mol⁻¹, one of the main milk serum (whey) proteins and the only one able to slightly enter the PES/PVP membrane pores [18]. Lysozyme cleavage by BPN' appeared to occur mainly at the NH₂- and COOH terminal sides of neutral and acidic amino acid residues [26]. Its esterase activity, however, occurs within an optimum pH range of 8.5 - 9.5 [27]. Exhaustive studies achieved on native ribonuclease substrate showed that the amino acid sequence of the protein is important in the enzymatic protein degradation. Carlsberg was reported to produce cleavage of about 25% of the peptide bonds, of which 84% were between residues 20 and 21 (Ala-Ser) [28, 29] (whereas BPN' produced peptide fragments with substantial cleavage at both bonds 20 -21 (Ala - Ser) and 21-22 (Ser-Ser) [30, 31]. Markland et al. [21] reported that it could be possible that BPN' favors cleavage at the bond 21-22 while Carlsberg's preference is at the 20-21 bond.

Nevertheless, the enzymes' specificity explained above leads to expect a possible innocuity of Subtilisins toward the polymer membranes containing amide bonds (chemically similar to peptide bound) as in the PVP minor component of the selected UF membrane (**Figure 1**) or for polyamide membranes useful for nanofiltration and reverse osmosis. However, that has to be checked for the sake of guarantee (see below).



Figure 1: Polymers entering in the active layer of the UF membrane

2.3. Stabilizing agents of commercial Subtilisins

To increase the long-term enzyme stability, they are generally commercialized in stabilized forms, meaning that they are mixed with stabilizing agents having physico-chemical interactions with them. Such a combination will be more or less *in-situ* displaced during the cleaning, allowing the enzyme activation in the presence of its substrate. One has to keep in mind that, in formulated detergents, enzymes are in a rather complex physico-chemical environment due to all the added ingredients (either stabilizing agents or co-formulants of the detergent matrix and buffer), so the optimum conditions for the hydrolysis activity can be modified when compared to a pure un-stabilized enzyme in a single solution.

The stabilizing agents of commercial Subtilisin can be identified from the safety data sheets, but the exact amount of the listed compounds is generally unknown, and it is not clear if all of them are listed or not, especially if they are in low quantity and not submitted to specific regulations associated with a possible toxicity or negative environmental impact.

Among the 3 commercial enzymes used in this study, the components depicted in **Figure 2** were identified. They can be classified into two main groups, one of which is made of preservatives and the other of surfactants.

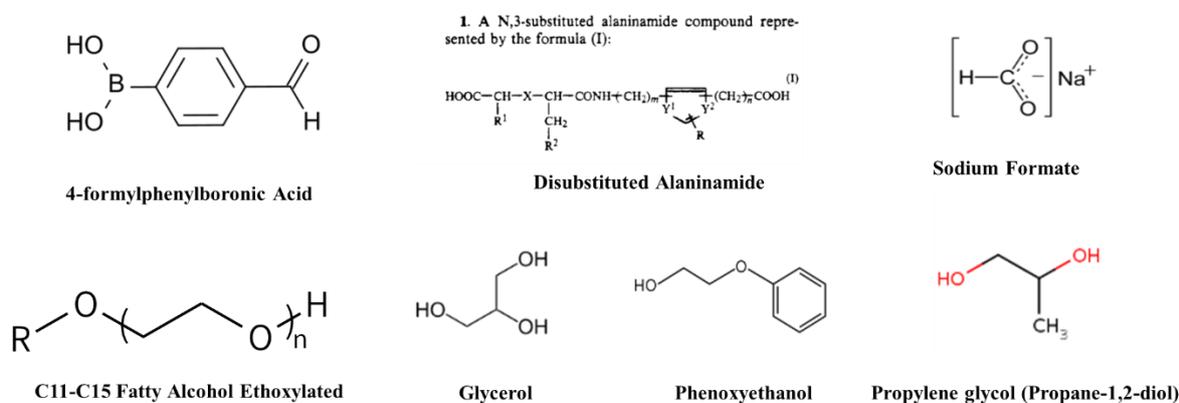


Figure 2. Molecular structures of some stabilizing agents present in commercial Subtilisins.

2.3.1. Preservative and bactericide

- 4-formylphenylboronic acid (hereafter denoted FPBA) is industrially used as a stabilizer, enzyme inhibitor, or bactericide [32]. Generally combined with propylene glycol or glycerol, FPBA inhibits the enzyme active site in a reversible way, with this last one recovering its activity after an appropriate dilution.

- Glycerol (also known as glycerin) is a bio-sourced tri-alcohol used in many fields, such as pharmaceutical and disinfectant mixtures (lubricant, moisturizer), and cosmetics (moisturizer, lubricant, solvent and excipient). It is also used as a food additive (E422), humectant, solvent for flavor carrier, emulsifier,

stabilizer and thickener [33]. Moreover, glycerol is also the common preservative deposited on virgin polymer membranes before their first use to avoid degradation and microorganisms' development.

- Propylene glycol (1,2-propane diol, hereafter denoted PG) is a di-alcohol widely used in the food industry (E1520 additive) as a solvent and an emulsifier, in pharmaceuticals (additive of phenytoin API), in cosmetics (anti-mold humectant, excipient), and in chemicals (anti-agglomerating agent in the manufacture of nanoparticle solutions), but also in textile fibers' fabrication (polyesters), or aeronautics and air conditioning/heating (antifreeze) [34, 35, 36, 37]. In detergents, it could thus help at the conservation in cold conditions.

- Phenoxyethanol (hereafter denoted PhE) is an alcohol widely used for various applications and industrial fields. In cosmetics, hygiene, and dermatology, it is used not only for its preservative properties, but also as a solvent in skin and sun creams, shampoo, etc. In the chemical industry, it is a solvent for paint and dyes, a detergent, and a disinfectant (biocide, insect repellent) for instance. It provides several interests for the mechanical and metallurgical industries, such as anti-corrosion agents and lubricants. It is a coalescing agent for latex glues (textile) and an anesthetic for certain species of fish or use in vaccines (pharmaceutical) [38, 39, 40, 41, 42, 43].

- Sodium formate (hereafter denoted SF) is a long-term biocide that can also be used as an acid buffer ($pK_a = 3.75$). In diluted solution, it is rapidly and completely biodegradable. In structural biology, sodium formate can be used as a cryoprotectant for X-ray diffraction experiments on protein crystals [44]. In mixture with corrosion inhibitors, it is used as a non-corrosive agent in airports for runway de-icing and can also be used for its thawing effect (de-icing agent) [45]. As a food additive (E237), it is not permitted in Europe.

2.3.2. Surfactants

Two types of surfactants were found, either non-ionic or anionic ones, knowing that cationic surfactants are not authorized in such agro-food applications.

- C11-C15 ethoxylated fatty alcohol (hereafter denoted Softanol 90) is a non-ionic surfactant useful for cleaning with a low foaming ability [46, 47].

- Disubstituted Alaninamide (hereafter denoted DAA) is an anionic surfactant. It was initially patented for its antihypertensive and/or heart failure curative activity [48]. Such a component can also act as a chelating agent in alkaline conditions with respect to the two carboxylic acid groups at each end side of the carbon chain.

2.4. Enzyme in a formulated detergent

As already said above, enzymes are generally not efficient enough when used alone. Thus, besides the selection of their optimal pH (that can be mastered by the buffer addition, knowing that a carbonate buffer was preferred here to a phosphate one for environmental issues) and temperature (see above), several ingredients have to be added to improve the penetration of the enzyme in the fouling layer. Typically, the addition of one or more surfactants is required to decrease the surface tension of the formulated detergent solution. These ingredients (hereafter referred to as co-formulants) mixed in the so-called detergent matrix (see above) have to be selected as green as possible to meet both the regulations and the low environmental impact requirements. Note that to detail this part of the optimization of the formulation is out of the scope of the present paper; however, a prototype matrix, further called Matrix D, was formulated by our industrial partner for the purpose of this study. No more details are given for the sake of confidentiality.

For a formulated detergent based on the same matrix and the same buffer, the remaining questions addressed in this paper only deal with possible interferences due to the enzyme stabilizing agents that are not always the same with respect to the 3 selected commercial stabilized Subtilisins.

2.5. Enzyme final deactivation

The enzyme activity resides in its 3D structure (namely the tertiary and quaternary structures of these specific proteins). The loss of this structure systematically implies the loss of the enzyme activity and is called denaturation. Denaturation can be induced by temperature increase up to a certain limit, pH variation in an appropriate range, or the addition of denaturing agents such as urea (breaking the hydrogen bonds) or chelatants (for metallo proteins, the competition between complexation by the specific enzyme site being less efficient than complexing agents such as EDTA at alkaline pH, for instance). Depending on the denaturation mode, it can be either reversible or irreversible.

For cleaning applications, denaturation is voluntarily achieved to obtain an irreversible inactivation by the mean of a final step consisting in a short cleaning at a high alkaline or low acid pH achieved after the enzymatic cleaning. The optimum inactivation pH depends on the enzyme, but a nitric acid treatment at a pH equal to or lower than 2.5 for 30 min is often used on an industrial scale. It can be underlined here that the inactivation step is not expected to contribute to the cleaning efficiency as it was confirmed by Paugam et al. [50]. Accordingly, this step was out of the scope of this study.

2.6. How to prove the enzymatic cleaning efficiency?

The last methodological point deals with the ability to prove the enzymatic detergent efficiency and to evidence possible differences associated with the stabilizing agents.

The most classical way consists in the measurement of the recovery of the membrane water flux (WFR):

$$WFR = \frac{L_{p,post-cleaning}}{L_{p,pristine\ membrane}} \quad (Equation\ 1)$$

With:

$L_{p,post-cleaning}$: the membrane permeance in DI water after fouling and cleaning at a given temperature T.

$L_{p,pristine\ membrane}$: the membrane permeance in DI water of the pristine and never fouled membrane at the same temperature T.

$$L_p = \frac{1}{\eta \times R_m} = \frac{J_p}{TMP} \quad (Equation\ 2)$$

With:

L_p : the membrane permeance ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot bar^{-1}$ or $m \cdot s^{-1} \cdot Pa^{-1}$).

J_p : the permeate flux ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ or $m \cdot s^{-1}$)

TMP: the transmembrane pressure (bar or Pa)

R_m : hydraulic resistance of the membrane (m^{-1}).

η : viscosity of the permeate (Pa.s) which depends on the temperature

The permeance depends on the membrane characteristics as well as those of the filtered fluid. R_m is an intrinsic characteristic of the membrane in a given solvent at a given temperature. For HFK-131, it was previously checked that R_m is constant in the studied temperature range.

When $WFR \geq 0.90$, the “hydraulic cleanliness” was reached. However, we have previously reported that the WFR was not systematically correlated to effective fouling removal [4, 5, 49, 50]. The increase in water flux can sometimes be due to an increase in the hydrophilic/hydrophobic balance of the cleaned membrane with respect to the pristine one. This balance change can be obtained, for instance, by the adsorption of hydrophilic surfactants on the membrane. A $WFR \approx 2$ was previously reported [4] for a pristine and never fouled PES/PVP UF membrane cleaned with an anionic surfactant (SDS) without any membrane degradation. The irreversible adsorption of an active amphiphilic species was reported on a PES/PVP membrane during the development of a formulated biocide, whereas the removal of the same species was easy in the case of a RO polyamide membrane [51].

A WFR greater than 1.00 can thus be due to (i) membrane degradation and pore size increase or (ii) hydrophilization of the membrane due to the adsorption of ingredients that are more hydrophilic than the membrane itself. The rejection of milk proteins can help in evidencing significant degradation associated with pore size increase (no variations were evidenced during the present study). To overcome these misinterpretations, the quantitative determination of residual protein fouling by ATR-FTIR has been previously proposed. Moreover, an appropriate treatment of the raw spectra of the (protein fouled) membrane allowed to simultaneously highlight the chemical degradation of PVP, which is the weak point of the PES/PVP membrane [18, 52]. As enzymes are also proteins, it will be impossible to discriminate between residual enzymes and residual proteins of the initial fouling, but it was not a major issue.

ATR-FTIR also allowed to evidence the rinsing ability of the detergent ingredients when no additional bands that could be attributed to stabilizers, co-formulants and/or buffer were evidenced on the spectra.

3. Experimental

3.1. Solutions

3.1.1. Water and skim milk

Deionized (DI, 18 M Ω) and 1 μ m filter water was used for membrane rinsing and preparation of all solutions.

The skim milk used was a UHT sterilized one (Lait de Montagne, UHT, Carrefour, France). Its average composition is given by the provider: 48 g.L⁻¹ carbohydrates (mainly lactose), 33 g.L⁻¹ proteins, and 8 g.L⁻¹ of overall salts.

3.1.2. Stabilised Enzymes

3 stabilized Subtilisins were selected. They are hereafter denoted X, B, and C. They contain between 2.5 and 7.5 wt% of Subtilisin, the variant of which is not clearly given by the provider. The identified stabilizing agents are depicted in **Table 1**.

Table 1: Different stabilized Subtilisins used for prototype detergent preparation and solution characteristics

Stabilized Subtilisins (variant) and concentration range of commercial products	Subtilisin concentration range in the prototype detergent* (g. L ⁻¹)	Stabilized enzyme concentration in the prototype detergent (g. L ⁻¹)	pH of stabilized enzyme in DI water at the same concentration as in the prototype detergent	pH of stabilized enzyme in matrix D at the same concentration as in DI water (no buffer)	Identified stabilizing agents	in DI water $\lambda_{\text{specific}}$ (\pm 1nm)	Subtilisin Absorbance (concentration) at $\lambda_{\text{specific}}$ in DI water (au)
X (Not identified) 2.5-5.0 wt%	0.006 - 0.013	X ₁ = 0.25	7.3	7.4	FPBA + Softanol 90 + Glycerol + PG	262	0.937 \pm 0.101 (X1)
B (Not identified) 5.0-7.5 wt%	0.013 - 0.019	B ₁ = 0.25	5.3	8.8	PG + SF + DAA	277	0.030 (B1)
C (Not identified) 5.0-7.5 wt%	0.009 - 0.014	C ₁ = 0.18	5.4	7.0	Glycerol + PG + SF + DAA +PhE	275	0.025 (C1)

* Calculated from the safety data sheets of the stabilized enzyme providers and X₁, B₁, and C₁ concentrations selected for the present study, all corresponding to the same A₀ activity.

3.1.3. Prototype detergents

Solutions of concentrated enzymatic detergents (further called “concentrated detergents”) were prepared at a concentration similar to that of a commercial formulation by mixing each stabilized enzyme given in **Table 1** with Matrix D without any buffer. As the exact amount of Subtilisin was not given by the providers, the concentrations of stabilized enzymes X, B, and C were set at X₀, B₀, and C₀ in these “concentrated detergents”, respectively. These concentrations were determined from an enzymatic activity test (azo-casein hydrolysis, Merck) aiming at the determination of concentrations leading to the same A₀ activity. A₀ was selected with respect to the activity of a commercial enzymatic detergent useful for membrane cleaning (not specified for the sake of confidentiality).

A dilution of the “concentrated detergents” was then required to reach the appropriate concentration useful for membrane cleaning. The diluted solutions were hereafter denoted “prototype detergents.” All of them were prepared by dissolving 5 g of a “concentrated detergent” in 1 L of DI water. Except for the test without pH control (see below), the pH was set at 10.5 by addition of a commercial potassium carbonate buffer set at 8 g.L⁻¹ (DEPTA 912L, Hypred-Kersia®, France).

In prototype detergents, the stabilized Subtilisin concentrations were X₁= 0.25 g. L⁻¹, B₁= 0.25 g. L⁻¹, C₁= 0.18 g. L⁻¹ for the X, B and C stabilized enzymes, respectively. The nomenclature for the prepared detergent is detailed in the “Nomenclature” section and is Formula (Matrix)-Enzyme concentration, for instance

Formula D-C1 for the last composition. The buffer was not considered in the prototype formula and was added for cleaning.

An additional detergent was prepared from the stabilized enzyme C, but set at a higher concentration $C_2 = 1.14 \times C_1 = 0.20 \text{ g. L}^{-1}$. Accordingly, the concentrations of the stabilizers were increased in this last prototype detergent.

After the appropriate dilution, regardless of the stabilized enzyme used, the pure enzyme concentration in the cleaning solutions was lower than 1 g.L^{-1} .

3.1.4. Solution characterization by UV

Solutions' characterizations were carried out with the UV-Vis 630 spectrometer (Jasco). Spectra were registered in the 200-800 nm range under the following acquisition conditions: bandwidth: 1.5 nm, scan speed: 400 nm.min^{-1} , data interval: 1 nm. The baseline was previously acquired with DI water. According to the Beer-Lambert law, Absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$ wavelength was proportional to the concentration:

$$\text{Abs}_{\lambda} = \log (I_0/I) = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c \quad (\text{Equation 3})$$

With:

Abs_{λ} : Absorbance at λ wavelength (absorbance unit)

ϵ_{λ} = molar extinction coefficient at λ wavelength ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

l = the thickness of the UV measuring cell (1 cm)

c : the species concentration (mol. L^{-1})

I_0 : the light intensity of the UV source at λ wavelength

I : the transmitted light intensity at λ wavelength

3.2. Membrane and filtration experimental set-up

3.2.1. Membranes

PES/PVP ultrafiltration membranes (HFK-131, MWCO= 5-10 kg.mol^{-1}) manufactured by Koch (USA) were selected because they represent at least 80% of the world market for UF application in the dairy industry. The active layer of these membranes is made of a physical blend of PES and PVP (**Figure 1**).

Small flat membranes (14 cm^2 for batch reactor, 127 cm^2 for cleaning in place (CIP) in filtration condition) were sampled into a spiral membrane (4333 module type, with 6.7 m^2 filtering area, referred to as cut-S-CIP-2 membrane). Before use, each flat membrane was soaked in DI water to remove the preservative (glycerol).

3.2.2. Filtration set-up

A 127 cm^2 flat membrane was inserted in a plate and frame cell (Ray Flow X100, Novasep, France) between a 31 mil (0.79 mm) diamond retentate spacer located in the feed channel and a permeate spacer. Both spacers were collected in the spiral membrane. The free channel thickness was estimated to be 1 mm with respect to the gaskets used in the cell. In standard conditions, UF was achieved at 2 bar and 50°C in a crossflow mode, regardless of the filtered fluid (4 L). The feed flow rate (Q_{feed}) was 110 L.h^{-1} , which corresponds to a crossflow velocity of about 0.4 m. s^{-1} . Both the retentate and permeate fractions were fully recirculated to the feed tank, which corresponds to a batch filtration mode (volume reduction ratio $\text{VRR} = 1$).

3.3. Membrane fouling and cleaning

Prior to any other filtration, each flat membrane underwent a compaction procedure by filtering DI water at $110 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 4 bar, 50°C for 3 h until a plateau value of flux was reached. The permeance at the plateau value was used as a reference: L_p^{ref} .

Preliminary studies based on enzymatic activity have suggested the stability of the stabilized enzymes solutions with and without carbonate buffer (at X_1 , B_1 , and C_2 concentrations) and detergent solutions for at least 1 h (no longer time measurements), whereas studies based on UV suggested at least 2 h of stability (see Supporting Information, §1).

3.3.1. Cleaning of pristine membrane

Aiming at the evaluation of residual adsorbed enzyme and stabilizing agents, if any, pristine membranes have been cleaned by the prototype detergents in batch reactors (14 cm^2) and/or in crossflow filtration standard conditions (127 cm^2). The protocols were similar to the ones achieved with the previously fouled membranes (see below).

3.3.2. Fouling by skim milk in crossflow UF conditions

A typical experiment with a new 127 cm^2 flat membrane was as follows: (1) measurement of the DI water flux after initial compaction; (2) UF of 4 L of skim milk to achieve the fouling step during 180 min at 2 bar, $110 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ and 50°C (L_p^{UF}); (3) careful rinsing with DI water; (4) DI water flux measurement ($L_p^{\text{water, rinsed}}$). After that, depending on the following steps the membrane can be: (1) demounted and dried for analysis by ATR-FTIR (see below); or (2) demounted and cut for cleaning in batch reactor (see below); or (3) directly cleaned on the UF pilot (see below).

3.3.3. Cleaning in place (CIP) by prototype detergents in UF conditions

After fouling with skim milk and a careful rinsing with DI water, the membrane CIP was achieved during 60 min at 2 bar, $110 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ and 50°C with 4 L of a prototype detergent at $\text{VRR}=1$. During the CIP, the permeance at the plateau value of flux was denoted L_p^{CIP} . Then a final careful rinsing with DI water was performed until a neutral pH was obtained, both on the retentate and permeate sides. Finally, the water flux was measured in DI water, leading to a final permeance noted $L_p^{\text{post CIP}}$. Generally, the membrane was then demounted and dried for analysis by ATR-FTIR (see below).

3.3.4. Cleaning by prototype detergents or pure stabilized enzymes in batch reactor

After fouling with skim milk UF and a careful rinsing with DI water, the 127 cm^2 flat membrane was demounted and cut into 9 pieces of 14 cm^2 each. Each membrane coupon was then soaked at 500 rpm for 60 min at 50°C in a closed polypropylene batch reactor containing 130 mL of the detergent prototype under consideration, in the presence of a carbonate buffer. Each coupon was then extensively rinsed with DI water before drying for further analysis by ATR-FTIR (see below).

Moreover, the stabilized enzymes were also tested alone (no Matrix D but with buffer) at the same concentrations as the ones in the corresponding prototype detergents, namely X_1 , B_1 , and C_2 for X, B, and C stabilized enzymes, respectively.

3.4. Membrane characterisation by ATR-FTIR

Fourier transform Infra-Red achieved according to an attenuated total reflection mode (ATR-FTIR) is a relevant technique to evidence polar and polarizable bonds belonging either to the membrane polymer or its degradation products, but also to the fouling and the cleaning solution components, if any.

Spectra were registered with a FTIR Jasco 4100 spectrometer equipped with an ATR accessory (Miracle, diamond crystal (n°4, **Figure 3**), single-reflection, an incidence angle of 45°, and running with the spectra manager software. The acquisition conditions were as follows: 128 scans, resolution: 2 cm⁻¹, range: 4000-600 cm⁻¹. The background was recorded in the air. Membrane samples were maintained on the crystal with a flat tip pressed at the maximum pressure.

Spectra were acquired on membranes (pristine, fouled, and cleaned) that were carefully dried for several days in a desiccator under dynamic vacuum in order to avoid water bands at ≈ 3300 cm⁻¹ and 1660 cm⁻¹, this last one being in the region of interest when dealing with PVP and proteins/enzymes.

3.4.1. Proteins/enzyme quantification

Protein/Enzyme quantification was achieved according to the protocol proposed by [4, 52]. The C=O band located close to 1658 cm⁻¹ assigned to protein/enzyme amide I is superimposed to the C=O band of PVP, which makes the quantification difficult. Consequently, quantification was based on the CN+NH amid II band located at 1536 cm⁻¹. The amide II band has no superimposition with those of the pristine membrane (**Figure 3**). Similarly, the PES band at 1237 cm⁻¹ can be used as an internal standard with no superimposition with skim milk components.

The quantification was obtained from the ratio of the absorbance at 1536 cm⁻¹ (H₁₅₃₆^{protein amide II}) to the one at 1237 cm⁻¹ (H₁₂₃₇^{PES}):

$$H_{1536}^{\text{protein amide II}} / H_{1237}^{\text{PES}} = 0.0034 [P] + 0.0165 \quad (\text{Equation 4})$$

With:

H_x were measured with respect to a baseline selected in the 2240-2060 flat range.

[P]: the proteins or proteins + enzyme concentration in μg.cm⁻² in the 1-350 μg.cm⁻² range, r²=0.99

For every membrane, several spectra were registered over the whole filtering area, and the given result was the average value (n= 3 for 14 cm² coupons and n= 9 for 127 cm² flat membrane).



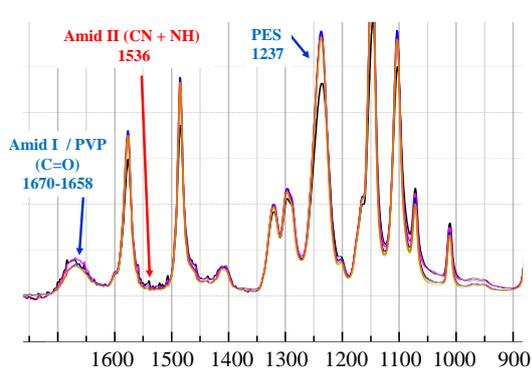
Spectrometer
With a membrane coupon



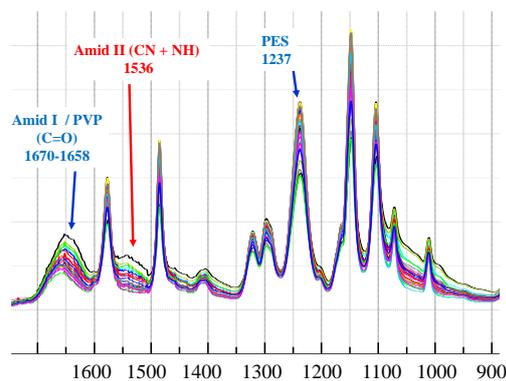
ATR- accessory



Diamond Crystal.
1.8 mm diameter, 45°
incidence angle, single
reflection



Wavenumber (cm⁻¹)
Pristine membrane



Wavenumber (cm⁻¹)
Membrane fouled with proteins

ATR-FTIR spectra = Fouling + active layer + Intermediate layer of the membrane

Figure 3. ATR-FTIR spectrometer and spectra highlighting the main used bands for protein/enzyme quantification.

3.4.2. Membrane degradation

PES/PVP membranes are well-known to be quite stable, either at high or low pHs [53]. However, they are also known to be degraded by NaOCl used either for the cleaning or the disinfection step, depending on the application fields [18, 52, 54, 55, 56, 57]. Roughly, the NaOCl induced degradation concerned first PVP, which tends to be removed from the membrane (with several intermediates, such as carboxylic acid groups obtained after the ring opening or succinimide ones), all of which are evidenced by ATR-FTIR spectra. The second degradation concerned the PES itself with two main possible degradations: (1) the breakage of the sulfone groups leading to a sulfonate and/or (2) the hydroxylation of the phenyl groups, both leading to a same new band located at 1030 cm⁻¹ on the ATR-FTIR spectra. Literature reported that oxidation due to free radicals generated in the NaOCl solution at pH 7-8 and/or anionic initiation at high alkaline pHs (11.5-12.5) could be responsible for these polymer degradations.

Consequently, even if no oxidant will be used in the enzymatic detergent, particular attention will be paid to the PVP and PES integrity. It was assumed that the presence of either proteins or enzymes was not a problem with respect to PES as ATR-FTIR bands were not superimposed. On the other hand, to follow the PVP content in the presence of protein/enzyme fouling required an in-depth analysis of the C=O band, as reported in [52].

3.4.3. Detergent ingredients adsorption

A remaining issue concerned the more or less reversible adsorption of the detergent ingredients on the membrane. Any additional bands appearing on a spectrum when compared to the pristine membrane could be suspected to correspond to this case. However, a careful study has to be achieved in order to discriminate these new bands from the ones due to the PES/PVP potential degradation (see above).

4. Results and Discussion

This paragraph is divided into 3 parts: (1) the characterization of the stabilized enzyme in solution, (2) the determination of the cleaning efficiency of the prototype detergents, and (3) the complementary results and associated discussion to explain the flux behavior after cleaning.

4.1. UV characterization of the stabilized Subtilisins

4.1.1. Stabilized enzymes in DI water

The 3 stabilized enzymes were dissolved in DI water (without any buffer) at X_1 , B_1 , and C_1 concentrations, respectively, leading to the same enzymatic activity. The natural pHs of these solutions were significantly different (**Table 1**), evidencing the significant impact of the different stabilizing agents.

UV spectra were registered for the 3 solutions. Either the local maximum absorbance or its corresponding wavelength ($\lambda_{\text{specific}}$) were different (**Figure 4, Table 2**).

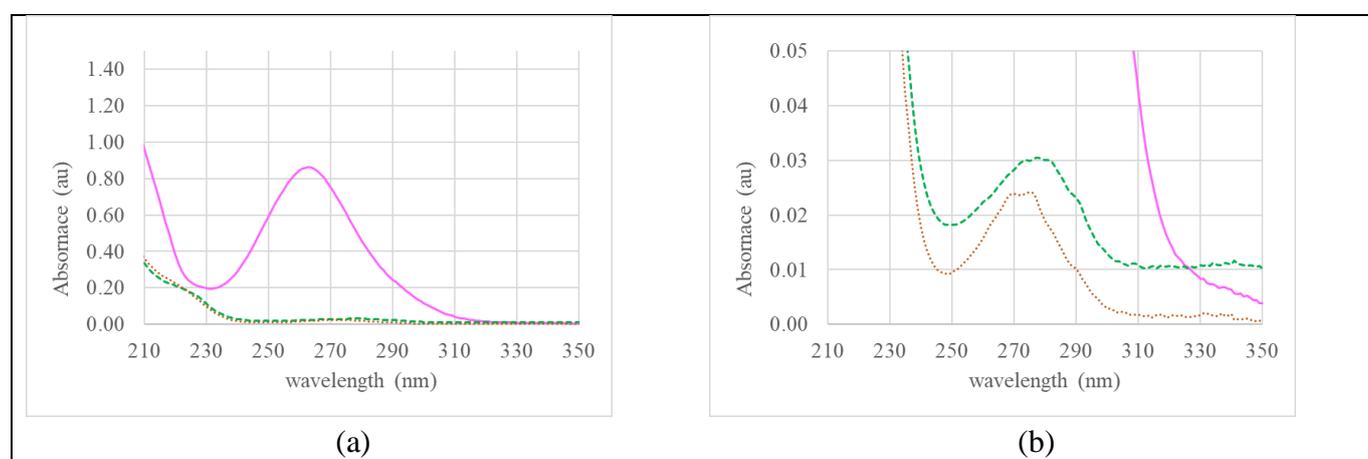


Figure 4: UV spectra of stabilized enzymes X, B, and C in DI water at X_1 , B_1 , and C_1 concentrations (same enzymatic activity A_0) at natural pH (see Table 1) and 50°C. (a) raw spectra; (b) zoom of (a) – caption : pink full line: X; green dashed line: B; brown dotted line: C

The $\lambda_{\text{specific}}$ is expected at 280 nm for a native enzyme with respect to its Tryptophane (Trp) and Tyrosine (Tyr) amino acid content, and the measured values matched the expected ones for B and C stabilized enzymes.

On the contrary, the $\lambda_{\text{specific}}$ decrease evidenced a combination between the Subtilisin(s) and one or more stabilizing agents in the case of X (**Table 2**). Moreover, the absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$ for the stabilized enzyme X at X_1 concentration was about 30-40 times that of the stabilized enzymes B and C set at B_1 and C_1 concentrations, respectively.

Knowing that with respect to the variant, Subtilisins have an average of 1 (Carlsberg) to 3 Trp and 10 to 14 Tyr (13 for Carlsberg) [16] and that Tyr absorbs much less than Trp around 280 nm, the differences in the amino acid sequence cannot fully explain such huge variations.

It is not fully rigorous to assume that the enzymes were strictly at the same concentration because they evidenced the same activity. Nevertheless, if the exact concentrations were close, then it can be drawn that, more likely, for the stabilized enzyme X, the absorbance increase was related to the combination of the enzyme with the stabilizers. Only 2 of them were identified to be present in X and not in B & C (**Table 1**): 4-formylphenylboronic acid (FBPA) and an ethoxylated fatty alcohol (Softanol 90). The first one, owing to a phenyl group that strongly absorbs close to 254 nm, could be responsible for the huge increase in absorbance in X compared to the 2 others (moreover, it is possible to perhaps have several molecules combined per molecule of enzyme).

4.1.2. Stabilised enzyme in carbonate buffer

UV spectra were registered for stabilized enzyme after addition of the carbonate buffer (**Figure 5** and **Table 2**).

For stabilized enzyme C, in the presence of carbonate buffer, $\lambda_{\text{specific}}$ decreased compared to the spectrum in DI water. Moreover, the absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$ was different from the addition of the absorbance of the enzyme and that of the buffer, evidencing an interaction between Subtilisin and carbonate.

Even if the variations were different, either for $\lambda_{\text{specific}}$ or for the absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$, similar conclusions could be drawn for the stabilized enzymes X and B (**Table 2, Figure 6**), suggesting a general behavior toward carbonate.

Such a specific interaction between carbonate (an oxo-anion) and the enzyme was in good accordance with the general properties of proteins suggested in [58].

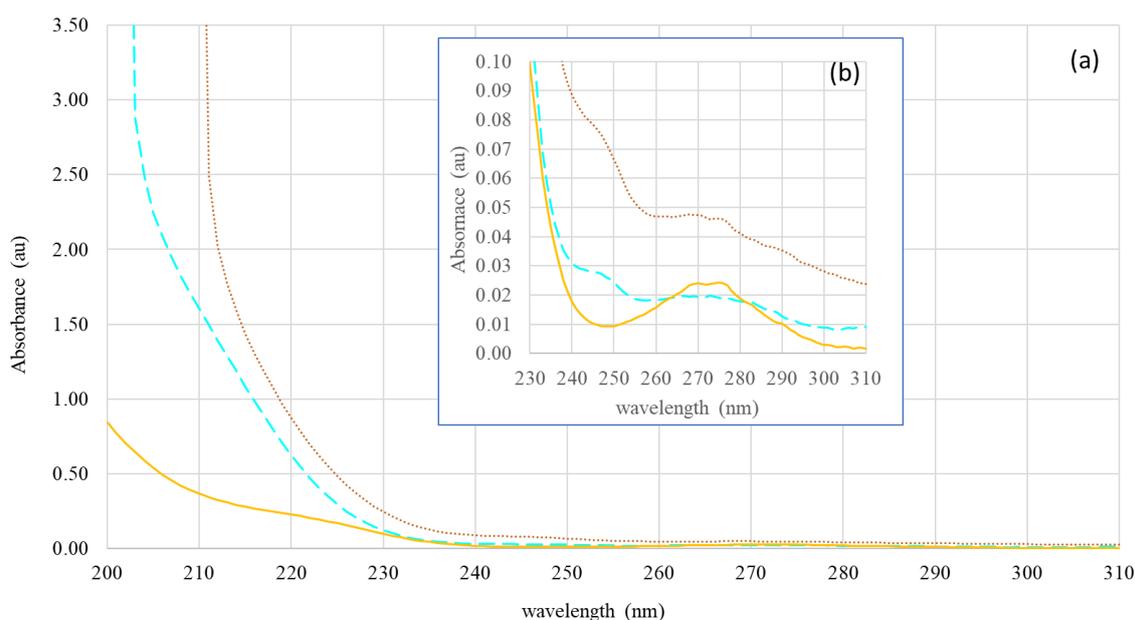


Figure 5: UV analysis of (1) carbonate buffer (dashed blue line - - -) at 8 g.L⁻¹, (2) stabilized enzyme C at C₁ (= 0.18 g.L⁻¹) in DI water at naturel pH 5.4 (orange straight line), and (3) stabilized enzyme C at C₁ in carbonate buffer at pH = 10.5 (dotted brown line

Table 2: UV analysis of solution: $\lambda_{\text{specific}}$ and absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$ of stabilized enzymes depending on the physico-chemical environment
Matrix D at 5 g.L⁻¹- Carbonate buffer at 8 g.L⁻¹.

Solutions	Subtilisin concentration range * (g. L ⁻¹)	$\lambda_{\text{specific}}$ (nm)	Absorbance At $\lambda_{\text{specific}}$ (au)
Carbonate buffer	0	-	0.017 (275-280 nm)
Matrix D	0	-	0.014 (273-275 nm)
Matrix D + carbonate buffer	0	-	0.029 (275 nm) ($\approx 0.014 + 0.017$)
Stabilized Enzyme C (C₁= 0.18 g. L⁻¹)			
Stabilized enzyme C in DI water	0.009 - 0.014	275	0.025
Stabilized enzyme C + carbonate buffer	0.009 – 0.014	248	0.072 ($\neq 0.025 + 0.017$)
Stabilized enzyme C + Matrix D (= Formula D-C1)	0.009 – 0.014	273-275	0.017 ($\neq 0.025 + 0.014$)
Stabilized enzyme C + Matrix D + carbonate buffer (= Formula D-C1 + buffer)	0.009 – 0.014	272-273	0.022 ($\neq 0.025 + 0.014 + 0.017$)
Stabilized Enzyme B (B₁= 0.25 g. L⁻¹)			
Stabilized enzyme B in DI water		277	0.030
Stabilized enzyme B + carbonate buffer			nd
Stabilized enzyme B + Matrix D (= Formula D-B1)	0.009 – 0.014	275	0.022 ($\neq 0.030 + 0.014$)
Stabilized enzyme B + Matrix D + carbonate buffer (= Formula D-B1 + buffer)	0.009 – 0.014	279	0.031 ($\neq 0.030 + 0.014 + 0.017$)
Stabilized Enzyme X (X₁= 0.25 g. L⁻¹)			
Stabilized enzyme X in DI water	0.006 – 0.013	262	1.008
Stabilized enzyme X + Matrix D (= Formula D-X1)	0.006 – 0.013	256	1.008 ($\neq 1.008 + 0.014$)
Stabilized enzyme X + Matrix D + Carbonate buffer (= Formula D-B1 + buffer)	0.006 – 0.013	268	0.937 ($\neq 1.008 + 0.014 + 0.017$)

*According to safety data sheet of the provider

4.1.3. Stabilised enzyme in Matrix D with or without carbonate buffer

The UV spectra of Matrix D with and without carbonate buffer were registered (**Figure 6a**). Only slight absorbances were evidenced in the 240-300 nm range. At 273 nm - 275 nm (**Table 2**), the Matrix D + carbonate buffer evidenced an absorbance of 0.029 ± 0.003 au that was in good accordance with the addition of both contributions without any interactions between all these compounds.

Two general trends were depicted when adding one of the stabilized enzymes to Matrix D. $\lambda_{\text{specific}}$ remained unchanged for B and C compared to DI water, while it decreased for X. However, for the 3 enzymes, the absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$ was systematically different from the addition of the one of the enzymes in DI water and the one of Matrix D. While absorbance decreased for B and C, it remained constant for X (**Figure 6, Table 2**). Once again, the addition of carbonate buffer was able to modify either $\lambda_{\text{specific}}$ or the absorbance at $\lambda_{\text{specific}}$. This is in good agreement with enzyme interactions, either with carbonate buffer or with some stabilizers of the enzymes.

These spectra analysis bring us to the conclusion that the enzyme form was different in the 3 cleaning prototype solutions, only differing by the stabilized enzyme source. Perhaps because of a variant difference, but probably also because of several sequential combinations that occurred between the enzyme and its (given) stabilizers & with one or more ingredients of Matrix D with carbonate buffer. Could it have an impact on the cleaning efficiency ?

4.2. Efficiency of membrane cleaning

4.2.1. The chemical efficiency point of view

After fouling and rinsing with DI water, the milk protein amount remaining on the membrane was 31 ± 9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ corresponding to the quantity to remove by cleaning (108 ATR-FTIR spectra, **Table 3**).

The skim milk fouled membrane coupons were cleaned in batch reactors with the stabilized enzymes only dissolved in the carbonate buffer. The residual amount of milk proteins + enzyme was 8 ± 1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, regardless of the stabilized enzyme used (**Table 3**). In UF conditions, the cleaning efficiency was a little bit better, evidencing the positive impact of the hydrodynamic.

By adding Matrix D to the previous mixtures, the cleaning efficiency was improved as the residual amount of milk proteins + enzyme was decreased to 3 ± 4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in batch reactors and 1 ± 1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in UF conditions, regardless of the stabilized enzyme used (**Table 3**).

Accordingly, no specific impact was depicted on the cleaning efficiency that could be associated with the chemical nature of the stabilizing agents of the commercial enzymes.

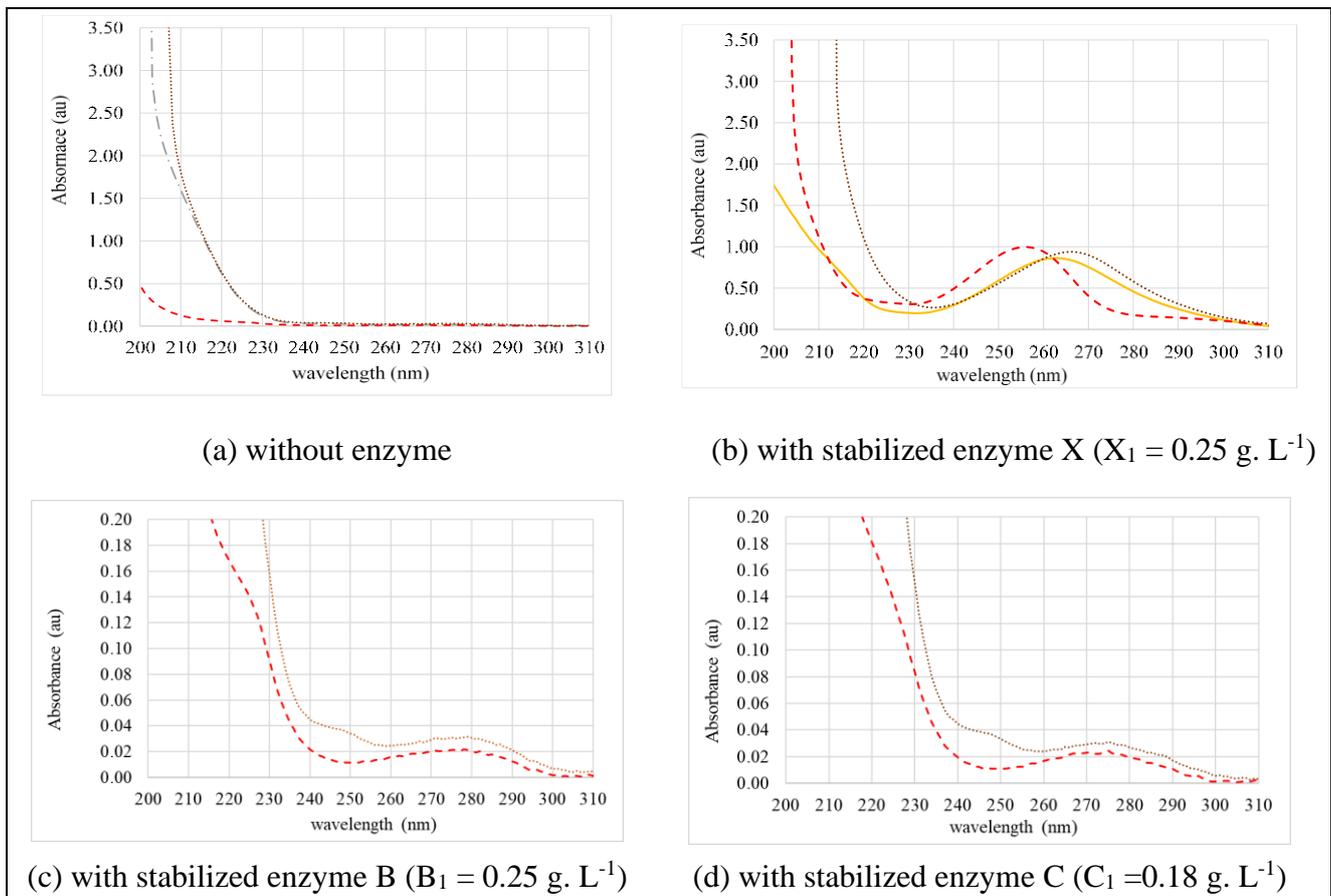


Figure 6: UV analysis of solutions with and without one of the stabilized enzymes

- (a) without enzyme: (1) carbonate buffer (grey dotted line -.- -), (2) Matrix D at natural pH = 7.7 (**dashed red line - - -**), (3) Matrix D + carbonate buffer pH= 10.5 (**dotted brown line**)
- (b) with stabilized enzyme X at $X_1 = 0.25 \text{ g. L}^{-1}$ (1) in DI water enzyme X natural pH= 7.3 (**orange straight line**); (2) in Matrix D without buffer at natural pH = 7.4 = Formula D-X1 (**dashed red line - - -**); (3) in Matrix D + carbonate buffer pH= 10.5 = Formula D-X1 + buffer (**dotted brown line**)
- (c) with stabilized enzyme B at $B_1 = 0.25 \text{ g. L}^{-1}$ (1) in Matrix D without buffer at natural pH = 7.4 = Formula D-B1 (**dashed red line - - -**), (2) Matrix D + carbonate buffer pH= 10.5 = Formula D-B1 + buffer (**dotted brown line**)
- (d) with stabilized enzyme C at $C_1 = 0.18 \text{ g. L}^{-1}$ (1) in Matrix D without buffer at natural pH = 7.4 = Formula D-C1 (**dashed red line - - -**), (2) Matrix D + carbonate buffer pH= 10.5 = Formula D-C1 + buffer (**dotted brown line**)

Table 3: Cleaning performances of UF skim milk fouled membrane with respect to solutions and cleaning conditions (batch reactor or UF)

Cleaning solution	Residual protein + enzyme ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)		Water Flux recovery
DI water	31 ± 9		0.37 ± 0.16
	Batch reactor cleaning	UF cleaning	
Stabilized enzyme + carbonate buffer			
X at X ₁	8±1	<i>Not determined</i>	<i>Not applicable</i>
B at B ₁	8±1		
C at C ₁	nd		
C at C ₂	8±0		
Stabilized enzyme + carbonate buffer + Matrix D			
X at X ₁ (Formula D-X1)	< 1	1±1	2.5 ± 0.4
B at B ₁ (Formula D-B1)	3±4	< 1	3.0 ± 0.8
C at C ₁ (Formula D-C1)	5±1	2±0	1.9 ± 0.4
C at C ₂ (Formula D-C2)	4±3	< 1	2.2± 0.4

4.2.2. The hydraulic cleanliness point of view

The set of 21 flat membranes that have been fouled during the present study has an average permeance of $L_{p,\text{pristine membrane}} = 100 \pm 20 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$.

The average normalized permeance in skim milk at plateau value was $L_{p,\text{skim milk}} / L_{p,\text{pristine membrane}} = 0.23 \pm 0.10 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$, evidencing severe global fouling, as expected.

The average WFR (**Equation 1**) after DI water rinsing was $\text{WFR} = 0.37 \pm 0.16$, also evidencing severe irreversible initial fouling before cleaning.

After cleaning with the prototype detergents (stabilized enzyme + Matrix D + carbonate buffer) and careful DI water rinsing, the WFR was in the 1.9 to 3.8 range, meaning that the membrane flux was at least twice that of the pristine membrane (**Table 3**).

At this moment, the question was: could it be possible that the flux increase was due to the quick membrane degradation after only one cleaning step? Or alternatively, another explanation has to be proposed, such as hydrophilization of the cleaned membrane vs the pristine one?

Achieving several fouling and cleaning cycles (at least 3) allowed to check that the protein rejection remained the same (at ca. 95%) from one cycle to another. Moreover, the flux behavior was also similar from one cycle to another: $\text{WFR} = 2.5 \pm 0.4$ after DI water rinsing, in good agreement with the results depicted after only one fouling & cleaning step, whatever the used enzyme source.

Consequently, two assumptions can be proposed: (1) there was no membrane degradation, or (2) the membrane degradation was compensated by the severe fouling during skim milk UF and allowed to maintain the rejection.

Complementary experiments were achieved, consisting of the cleaning of a pristine and never fouled membrane by the Formula D-C2 + buffer detergent. During the CIP, $L_{p,CIP}/L_{p,ref} = 1.65 \pm 0.05$ over the 3 consecutive cycles. However, the WFR was 7.2 ± 0.2 after DI water rinsing, whatever the cycle, and much higher than for the fouled & cleaned membranes.

It seemed to us that under similar time exposures to the cleaning solutions in the same hydraulic conditions, it could be logical to have more degradation for the pristine membrane than for the fouled and cleaned one. Accordingly, the huge WFR increase on the pristine membrane probably revealed something different than only degradation, if any.

To go ahead with the understanding, ATR-FTIR analyses were performed to determine if any modification was depicted.

Figure 7 depicts the ATR-FTIR spectra of the pristine, fouled, and cleaned membranes. In the 3200-2700 cm^{-1} range, two new bands (2870 and 2950 cm^{-1} , black arrows) can be attributed to the protein fouling. Moreover, the band at 2925 cm^{-1} (blue dashed arrow) for fouled and cleaned membranes increased simultaneously with the decrease of the 2 bands at 2870 and 2950 cm^{-1} . This evidences the presence of at least one ingredient of the detergent that could be either due to the stabilizing agent(s) or to the Matrix D ingredient(s).

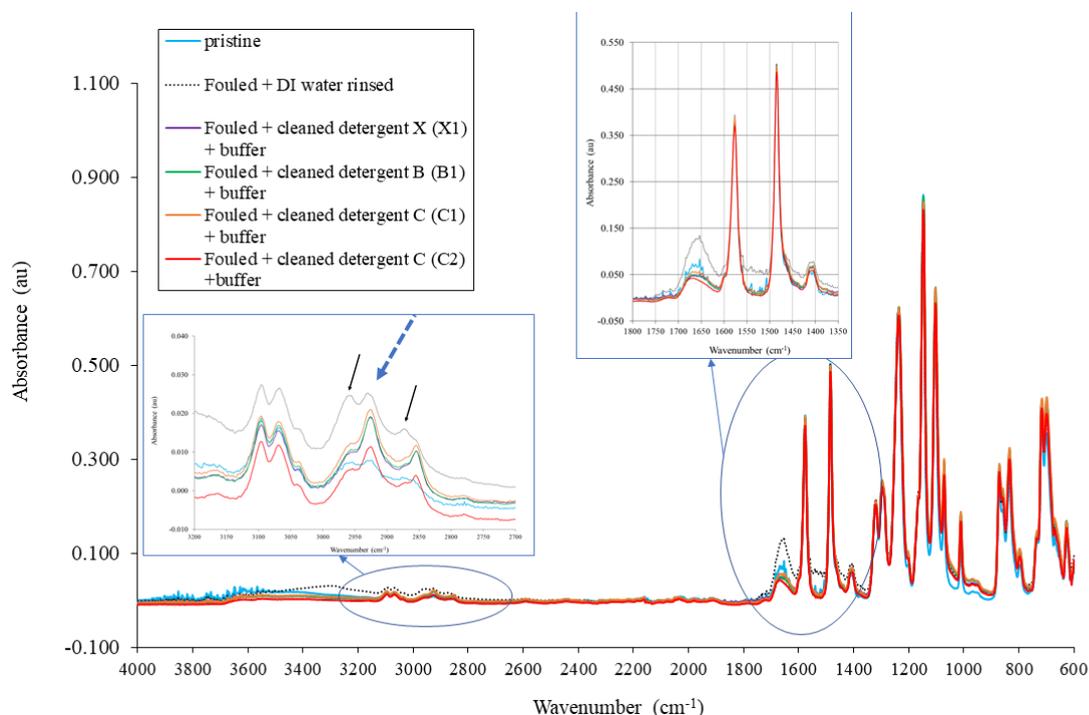


Figure 7: ATR-FTIR spectra of the pristine membrane & skim milk fouled membranes before and after cleaning with the prototype detergents (Matrix D in the presence of carbonate buffer + stabilized enzymes from different sources).

In the 1350-1800 cm^{-1} range, the presence of protein (+ Enzyme) fouling was clearly evidenced on the fouled membrane thanks to the 2 new bands close to 1650-1670 cm^{-1} (amide I) and 1550-1500 cm^{-1} (amide II).

As the PVP band and the Proteins + Enzyme amide I bands were superimposed, it was possible to check the evolution of the PVP band only after subtraction of the Proteins + Enzyme (P+E) contributions to these raw bands. This was done by applying the procedure previously reported in [52]. Accordingly, the P+E amide I band can be estimated at 0.87 x amide II. In the absence of any other superimposed additional band, the remaining band close to 1669 cm^{-1} can be attributed to the PVP.

For all the cleaned membranes, the PVP band intensity was estimated to decrease by 44% compared to the one of the pristine membranes (**Table 4**).

This suggests that membrane degradation started and was totally similar for all the prototype detergents used. At first, the drawn conclusion was that this decrease could be attributed to at least one of the Matrix D ingredients more than to one of the stabilizing agents of the enzymes. Moreover, the WFR were similar (**Table 3**) making this assumption highly probable.

PVP removal by NaOCl was extensively studied in the literature for PES/PVP UF membranes. Some of us have already reported in [18] that a 50% decrease of PVP could correspond to the half-life of a membrane on an industrial scale and did not induce a significant increase in water flux or a significant decrease in the protein rejection.

Two main conclusions were thus drawn:

(i) As a consequence, if the Matrix D composition has, of course, to be questioned, the main purpose would be to identify if the PVP departure will be continuous over cleaning time or if a transient situation could remain for a long time, compatible with the use of such a matrix. This in-depth study is out of the scope of this paper, but preliminary results given in **Table 5** suggest that complex mechanisms of protection against PVP removal could exist.

(ii) The origin of the flux increase does not have a single explanation and has also to be found in the residual adsorption of one or more ingredients of the prototype detergents able to hydrophilize the membrane surface, and more likely in the Matrix D ingredients.

To confirm/ refute this second explanation, an ATR-FTIR study was performed on pristine membranes before and after cleaning with selected components (see below).

Table 4: Estimation of the PVP content in membranes, before and after fouling with skim milk & cleaning – based on the procedure detailed in [52]. P= Proteins; E= Enzyme

Membrane	H_{1669}/H_{1237}	H_{1536}/H_{1237}	H_{1669}/H_{1237}	H_{1669}/H_{1237}	decrease vs reference
	Raw signal:	Raw signal	Treated signal = $0.87 \times H_{1536}/H_{1237}$	Treated signal = Raw signal – $0.87 \times H_{1536}/H_{1237}$	
	PVP + E + P (Amide I)	P (Amide II)	E+ P (Amide I)	Residual PVP	
Pristine = reference membrane					
#60	0.113	0.0109±0.002		0.113	
Formula D – X1 + Buffer					
#15	0.086±0.008	0.016±0.003	0.01392	0.07208	
#23	0.078±0.004	0.016±0.002	0.01392	0.06408	-43%
#25	0.074±0.002	0.015±0.002	0.01305	0.06095	-46%
Formula D – C1 + Buffer					
#16	0.088±0.006	0.024±0.004	0.02088	0.06712	-41%
#20	0.085±0.008	0.023±0.006	0.02001	0.06499	-42%
Formula D – C2 + Buffer					
#28	0.078±0.007	0.02±0.005	0.0174	0.0606	-46%
#29	0.077±0.007	0.017±0.002	0.01479	0.06221	-45%

Table 5 : Preliminary results dealing with PVP removal from membrane versus CIP series using Formula D-C2 + Buffer detergent (CIP: 60 min at 50°C per fouling & cleaning cycle, pH 10.5) in filtration conditions suggesting a non-continuous removal of PVP.

PVP contribution was calculated according to [52].

(H_{1669}/H_{1237}) PVP contribution after (fouling) & cleaning / (H_{1669}/H_{1237}) PVP contribution of pristine membrane	
Single fouling & cleaning	Triple consecutive fouling & cleaning
Pristine & cleaned membranes	
0.78 ± 0.03 (RSD: 4%) (n = 2)	0.61 ± 0.38 (RSD: 15%) (n = 1)
Fouled & cleaned membranes	
0.88 ± 0.01 (RSD: 1%) (n = 2)	0.68 ± 0.23 (RSD: 5%) (n = 1)

4.3. Residual adsorption of detergent components on UF cleaned pristine membranes

In order to better understand the flux behavior depicted just above, a systematic study of the cleaning of pristine membranes without any previous fouling by skim milk was achieved in UF conditions. Besides the PVP removal depicted in **Table 5**, the focus was on the evidencing of additional bands on the ATR-FTIR spectra that could be attributed to the detergent ingredients adsorbed on the PES/PVP membrane, if any.

4.3.1. Pristine membranes cleaned by prototype detergents (stabilized enzymes + Matrix D + Carbonate buffer)

First of all, pristine membranes were cleaned with the 4 prototype detergents in the presence of the carbonate buffer. As expected, no residual enzymes were evidenced on the cleaned pristine membranes ($< 1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). The WFR after cleaning ranged from 1.6 to 4.0, depending on the stabilized enzyme and its concentration in the detergent (**Table 6**).

The WFR was plotted against the proteins + enzymes residual amount on the membrane. **Figure 8** depicts the same trend for the virgin membranes and the fouled + cleaned membranes. This is in good accordance with the assumption of a particular impact of the stabilizing agents and/or Matrix D ingredients in the presence of the carbonate buffer. A de-formulation approach was then applied, which is detailed below.

Table 6 : Cleaning performances of UF pristine membranes with respect to solutions and cleaning conditions (batch reactors or UF)

Cleaning solution	Residual enzyme ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)		Water Flux recovery
	Batch reactor cleaning	UF cleaning	
Stabilized enzyme + carbonate buffer			
X at X ₁	5±1	6±2	0.79
B at B ₁	5±1	7±2	0.99
C at C ₁	<i>Not determined</i>	4±2	0.83
C at C ₂	7±1	4±1	1.70
Stabilized enzyme + carbonate buffer + Matrix D			
X at X ₁ (Formula D-X1)	<i>Not determined</i>	< 1	3.32
B at B ₁ (Formula D-B1)			2.28
C at C ₁ (Formula D-C1)			1.63
C at C ₂ (Formula D-C2)			4.00
Other ingredients			
Carbonate buffer	<i>Not determined</i>	< 1	0.89
Matrix D + carbonate buffer			1.53
Surfactant S1 + carbonate buffer			1.62

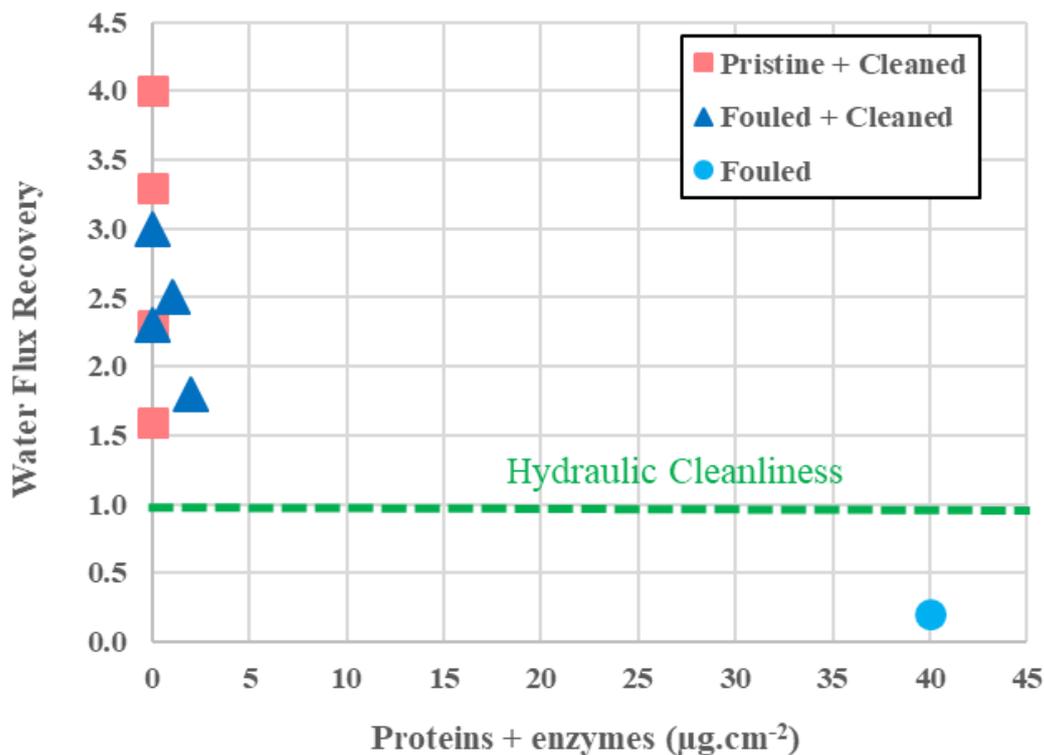


Figure 8: Water Flux Recovery vs Residual proteins + enzymes

4.3.2. Pristine membranes cleaned by stabilized enzymes in carbonate buffer

The pristine membranes were cleaned with all the stabilized enzymes in mixtures with the carbonate buffer. An average of $5 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ of enzyme remained on the membrane, regardless of the stabilized enzyme and the UF or batch reactor cleaning conditions (**Table 6**).

Nevertheless, the WFR after UF cleaning ranged from 0.83 to 1.7, depending on the stabilized enzyme and its concentration.

First, it was checked from the ATR-FTIR spectra that no decrease in the PVP band was evidenced (**Table 7**). Second, ATR-FTIR failed at evidencing new bands on the spectra of the pristine membranes cleaned with the stabilized enzymes in the carbonate buffer compared to the pristine membrane (**Figure 9**). However, a small increase in the intensity of the C=O band located close to 1670 cm^{-1} was shown that could be due either to the residual adsorbed enzyme or the carbonate. Finally, it can be concluded that if any stabilizing agent remained adsorbed on the membrane, the amount was too small to be detected by this technique for X at X₁, B at B₁, and C at C₁ or C₂.

As the WFR was higher after cleaning with the stabilized enzyme C at C₂ concentration, it was drawn that at least one stabilizing agent impacted the flux when used at this slightly higher concentration (**Table 6**), but it cannot be identified as explained just above.

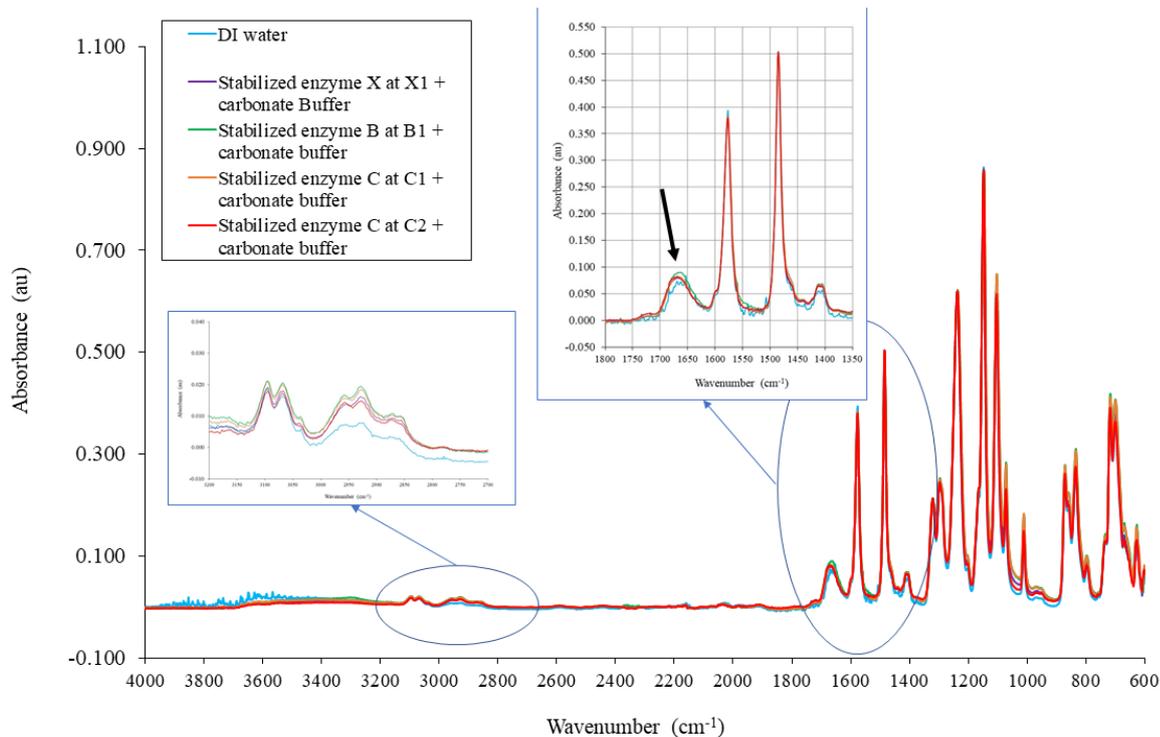


Figure 9: ATR-FTIR spectrum of the virgin membrane and virgin membranes cleaned in carbonate buffer with the different stabilized enzymes.

Table 7: ATR-FTIR results for pristine membranes cleaned with stabilized Enzyme + carbonate buffer. Estimation of the PVP content in membranes, before and after – based on the procedure detailed in [52]. P= Proteins ; E= Enzyme

Membrane	Enzyme in carbonate buffer	H_{1669}/H_{1237} Raw signal = PVP + E (amide I)	H_{1536}/H_{1237} Raw signal = E (amide II)	H_{1669}/H_{1237} treated signal = raw signal – 0.87 x H_{1536}/H_{1237} residual PVP
Pristine membrane = reference				
#60	no	0.113 ± 0.002	0.011 ± 0.002	
Virgin membranes cleaned by enzyme in carbonate buffer				
#48	X at X ₁	0.136 ± 0.005	0.036 ± 0.005	0.105 ± 0.014
#49	B at B ₁	0.140 ± 0.011	0.039 ± 0.007	0.106 ± 0.019
#50	C at C ₁	0.134 ± 0.008	0.030 ± 0.006	0.108 ± 0.022
#44	C at C ₂	0.131 ± 0.004	0.029 ± 0.003	0.106 ± 0.011

4.3.3. Pristine membranes cleaned by Matrix D + carbonate buffer

The pristine membranes were cleaned with Matrix D at the same concentration as in prototype detergents and in a mixture with carbonate buffer (**Table 6**).

The WFR after cleaning was 1.53, compared to 0.89 with the single carbonate buffer. At least one ingredient of the matrix had an impact on the flux. The corresponding ATR-FTIR spectra evidenced a new band at 2925 cm^{-1} that was further attributed to one of the matrix ingredients hereafter denoted surfactant S1 (no more detail on this component for the sake of confidentiality) (**Figure 10**). Cleaning with surfactant S1 in a mixture with carbonate buffer led to a similar flux increase with $\text{WFR} = 1.62$ (**Table 6**) and a similar additional band on the ATR-FTIR spectrum (**Figure 10**).

However, the WFR reached a lower value than with the full prototype detergent mixtures (being systematically greater), except with Formula D-C1 + buffer.

This suggests that addition or synergy occurred between at least one ingredient of Matrix D and one or several stabilizing agents of the stabilized enzyme, even at low concentrations of these last ones.

Either after cleaning with Matrix D or surfactant S1, the PVP band located close to 1669 cm^{-1} simultaneously decreased and evidenced a new shoulder on the side of the lower wavenumber. This means that PVP was partly removed, but also that the surfactant S1 remained adsorbed on the cleaned membranes. An average of 44% of PVP removal was calculated by the same procedure as the one used above ([52]), in good accordance with the results calculated above for the fouled and cleaned membranes.

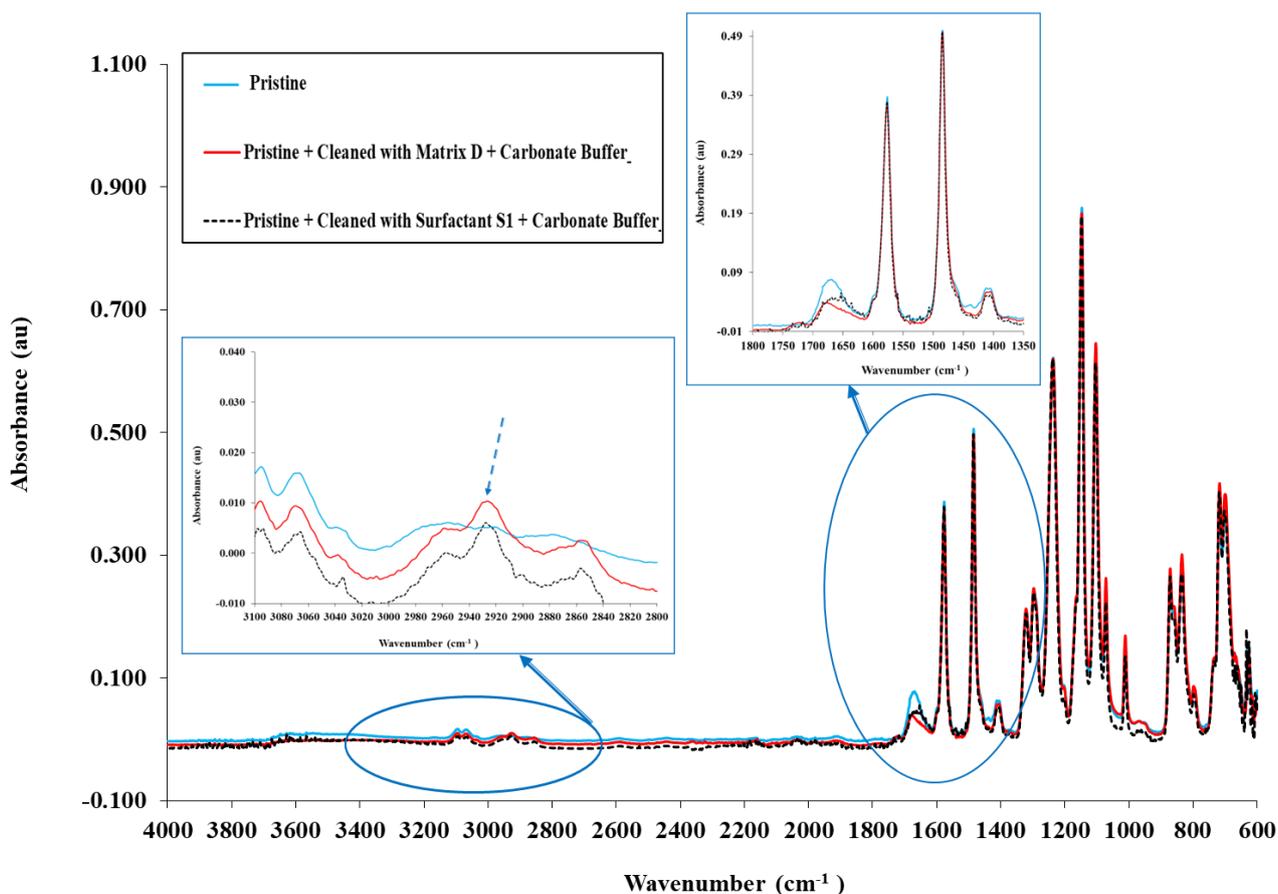


Figure 10: ATR-FTIR spectra of the pristine membrane and pristine membranes cleaned with Matrix D or surfactant S1 in a mixture with carbonate buffer.

5. Conclusion

This paper aimed at studying the potential impact of the stabilizing agents in a series of commercial subtilisins useful as protease sources for the formulation of enzymatic detergents.

The UV analysis of the stabilized enzymes clearly evidenced that the stabilizing agents were different for the 3 sources used, but also that complex displacements can occur in the presence of the stabilizing agents and the carbonate buffer that will be added to improve the membrane cleaning. The 3 stabilized enzymes (X, B, and C) were then added to the same model, Matrix D, made of several ingredients (not optimized), aiming at the preparation of detergent prototypes to which the carbonate buffer has to be added to obtain the appropriate cleaning solution.

The PES/PVP membranes were fouled during a skim milk ultrafiltration experiment achieved in standard conditions. The cleaning efficiency was evaluated either in batch reactors or in UF conditions. The results were in good agreement, whatever the protocol, and evidenced a high quality of cleaning, as proved by the ATR-FTIR quantification of residual proteins and enzymes on the cleaned membranes. The cleaning efficiency was improved by adding the formulated matrix to the enzyme at the given pH.

A particular attention was paid to the water flux recovery (WFR) reached after the membrane cleaning. As a general trend, WFR was higher than 1, but it was evidenced that this cannot be attributed to a severe membrane degradation (even if some PVP was sometimes removed). Once again, the WFR was shown to be an insufficient and potentially misleading information when dealing with the membrane cleaning.

More likely, the explanation of the flux behavior was partly in the residual adsorption of one of the stabilizing agents as depicted with the enzyme C at its higher concentration, C_2 , or at least the adsorption of one of the ingredients of Matrix D (surfactant S1). A systematic study based on “de-formulation” of the detergents has suggested that synergy occurred between the ingredient(s) of Matrix D and the stabilizing agent(s) of the stabilized enzyme, even at low concentrations of these last ones.

Nomenclature

The prototype detergents are denoted as follows:

Formula D- X1; meaning Formule made of Matrix D + Enzyme X at X_1 concentration

Formula D- B1; meaning Formule made of Matrix D + Enzyme B at B_1 concentration

Formula D- C1; meaning Formule made of Matrix D + Enzyme C at C_1 concentration

Formula D- C2; meaning Formule made of Matrix D + Enzyme C at C_2 concentration

The buffer made of carbonate is not included in the formula composition but was systematically added in standard cleaning conditions, except when specified.

References_Chapitre IV

- [1] L. Bégoïn, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, C. Faille, P. Blanpain-Avet, T. Bénézech, T. Doneva. Methodology of analysis of a spiral-wound module. Application to PES membrane for ultrafiltration of skimmed milk, *Desalination*. 192 (2006) 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.10.010>.
- [2] G. Gésan-Guiziou, A.P. Sobańtka, S. Omont, D. Froelich, M. Rabiller-Baudry, F. Thueux, D. Beudon, L. Tregret, C. Buson, D. Auffret. Life Cycle Assessment of a milk protein fractionation process: Contribution of the production and the cleaning stages at unit process level, *Separation and Purification Technology*. 224 (2019) 591–610. doi:10.1016/j.seppur.2019.05.008.
- [3] L. Bégoïn, Analyse de modules spirales industriels d’ultrafiltration de fluides laitiers. Physico-chimie du nettoyage de membranes en polyéthersulfone d’ultrafiltration de lait écrémé, Thèse de l’université de Rennes 1 (France), 2004 <http://www.theses.fr/2004REN10042>
- [4] M. Rabiller-Baudry, L. Bégoïn, D. Delaunay, L. Paugam, B. Chaufer, A dual approach of membrane cleaning based on physico-chemistry and hydrodynamics: Application to PES membrane of dairy industry, *Chem. Eng. Process*. 47 (2008) 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.01.026>.
- [5] N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.
- [6] H.S. Olsen, P. Falholt, The role of enzymes in modern detergency, *J. Surfactants Deterg.* 1 (1998) 555-567. <https://doi.org/10.1007/s11743-998-0058-7>.
- [7] M.J. Muñoz-Aguado, D.E.b Wiley, A.G. Fane, Enzymatic and detergent cleaning of a polysulfone ultrafiltration membrane fouled with BSA and whey, *Journal of Membrane Science*. 117 (1996) 175–187. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/0376-7388(96)00066-X)
- [8] M.A. Argüello, S. Álvarez, F.A. Riera, R. Álvarez, Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins, *Separation and Purification Technology*. 41 (2005) 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.05.005>.
- [9] H. Petrus, H. Li, V. Chen, N. Norazman, Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by protein mixture solutions, *Journal of Membrane Science*. 325 (2008) 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.09.004>.
- [10] C. Regula, E. Carretier, Y. Wyart, G. Gésan-Guiziou, A. Vincent, D. Boudot, P. Moulin, Chemical cleaning/disinfection and ageing of organic UF membranes: A review, *Water Research*. 56 (2014) 325–365. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.050>.
- [11] A.E. Guerrero-Navarro, A.G. Ríos-Castillo, C. Ripolles-Avila, A. Zamora, A.-S. Hascoët, X. Felipe, M. Castillo, J.J. Rodríguez-Jerez, Effectiveness of enzymatic treatment for reducing dairy fouling at pilot-plant scale under real cleaning conditions, *LWT*. 154 (2022) 112634. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112634>
- [12] S. Bautista-Exposito, C. M. D. Martinez-Villaluenga, J. Silvan, J. Frias, E. Penas, Combination of pH-controlled fermentation in mild acidic conditions and enzymatic hydrolysis by savinase to improve metabolic health-promoting, *Journal of Functional Foods*. 48 (2018) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.019>

- [13] F.S. Markland, E.L. Smith, Subtilisin BPN', *Journal of Biological Chemistry*. 242 (1967) 5198–5211. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99412-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99412-3).
- [14] E.L. Smith, R.J. De Lange, W.H. Evans, M. Landon, F.S. Markland, Subtilisin Carlsberg, *Journal of Biological Chemistry*. 243 (1968) 2184–2191. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93461-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93461-7).
- [15] F.S. Markland, D.M. Brown, E.L. Smith, Subtilisin Amylosacchariticus, *Journal of Biological Chemistry*. 247 (1972) 5596–5601. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81146-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81146-6).
- [16] N. Genov, M. Shopova, R. Boteva, G. JORI, F. RICCHELLI, Chemical, photochemical and spectroscopic characterization of an alkaline proteinase from *Bacillus subtilis* variant DY, *Biochem. J.* 207 (1982) 193-200.
- [17] R. Affleck, Z.F. Xu, V. Suzawa, K. Focht, D.S. Clark, J.S. Dordick, Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 1100–1104. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.3.1100>.
- [18] M. Rabiller-Baudry, P. Loulergue, J. Girard, M. El Mansour El Jastimi, A. Bouzin, M. Le Gallic, A. Moreac, P. Rabiller, Consequences of membrane aging on real or misleading evaluation of membrane cleaning by flux measurements, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021) 118044, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118044>
- [19] P. Nedkov, W. Oberthur, G. Braunitzer, Determination of complete amino-acid sequence of Subtilisin DY and its comparison with the primary structures of the Subtilisins BPN', *Carlberg and Amylosacchariticus*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 (1985) 421–430.
- [20] E. L. Smith, F. S. Markland, C. B. Kasper, R. J. Delange, M. Landon, W. H. Evans, The complete Amino Acid Sequence of two types of Subtilisin, BPN' and Carlsberg, *J. Biol. Chem.* 24(241) (1996) 5974–5976. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96365-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96365-9).
- [21] S. Francis, J.R. Markland, E.L. Smith, [The enzymes] Hydrolysis: Peptide Bonds || 16 Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties (Vol. 3). (P. D. Boyer, Ed.) New-York, 1971: pp. 561-608. doi: [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60407-2](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60407-2)
- [22] Wells J.A., David A. E. (1988). Subtilisin-an enzyme designed to be engineered. *TIBS*, 13, 291-297. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90121-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90121-1)
- [23] T. P. Graycar, Subtilisins, Chap. 693, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.) 3rd ed., Vol. 1, Academic Press, London, UK, 2013: pp. 3148-3155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00693-1>.
- [24] J. Graae, Esterase Activity Shown by Subtilisin, a Proteolytic Enzyme from *Bacillus subtilis*, *Acta Chem. Scand.* 8 (1954) 356-357. 10.3891/acta.chem.scand.08-0356.
- [25] A.V. Giintelberg, M. Ottesen, *CompL. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* 29 (1954) 36.
- [26] K. Okunuki, H. Matsubara, S. Nishimura, B. Hagihara, Specificity of crystalline bacterial proteinase, *J. Biochem (Tokyo)* 43 (1956) 857. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/43/6/43_6_857/article/-char/ja/

- [27] H. Matsubara, B. Hagihara, M. Nakai, T. Komaki, T. Yonetani, K. Okunuki, Crystalline bacterial proteinase ii. General properties of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*, N'.J . Biochem. (Tokyo) 45 (1968) 251.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/45/4/45_4_251/_article/-char/ja/
- [28] M. Ottesen, M. Székely, Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 32 (1962) 319.
- [29] F.M. Richards, Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim. 29 (1955) 322
- [30] E. Gross, B. Witkop, The Heterogeneity of the S Peptide of Bovine Pancreatic Ribonuclease A, Biochemistry 6 (1967) 745. <https://doi.org/10.1021/bi00855a014>.
- [31] M. S. Doscher, C. H. W. Hirs, The heterogeneity of bovine pancreatic ribonuclease S., Biochemistry 6,1 (1967) 304. <https://doi.org/10.1021/bi00853a047>
- [32] X. Ji, Y. Zheng, W. Wang, J. Sheng, J. Hao, M. Sun, Virtual screening of novel reversible inhibitors for marine alkaline protease MP, Journal of Molecular Graphics and Modelling. 46 (2013)125-131.
<https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2013.10.004>
- [33] European Parliament and Council of Europe : La Directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants, Journal officiel de l'Union européenne, no L 61, 1-56, 1995.
<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1995L0002:19970404:FR:PDF>
- [34] R. Holfield, Glycol coolants improve heat transfer and corrosion control, Pipeline & gas journal. 222(3) (1995) 28-30. <https://www.osti.gov/biblio/49311>
- [35] F. Bonet, V. Delmas, S. Grugeon, R. Herrera Urbina, P. Y. Silvert, K. Tekaiia-Elhsissen, Synthesis of monodisperse Au, Pt, Pd, Ru and Ir nanoparticles in ethylene glycol, NanoStructured Materials. 11(8) (1999) 1277-1284. [https://doi.org/10.1016/S0965-9773\(99\)00419-5](https://doi.org/10.1016/S0965-9773(99)00419-5)
- [36] Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail (CNESST) : Répertoire toxicologique : Fiche complète pour le glycol de propylène, 2007.
https://reptox.cnesst.gouv.qc.ca/pages/fiche-complete.aspx?no_produit=8235 . Website Visited on August 11th, 2022.
- [37] B. Borrell, How does ice cause a plane to crash? Scientific American. (2009).
<https://www.scientificamerican.com/article/ice-flight-3407/>. Website visited on August 11th, 2022.
- [38] A. Tosti, L. Guerra, F. Bardazzi, F. Gasparri, Euxyl K 400: a new sensitizer in cosmetics, Contact Derm. 25(2) (1991) 89-93. DOI : [10.1111/j.1600-0536.1991.tb01794.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1991.tb01794.x)
- [39] A. Tosti, C. Vincenzi, P. Trevisi, L. Guerra, Euxyl K 400: incidence of sensitization, patch test concentration and vehicle, Contact Derm. 33(3) (1995) 193-195. DOI: [10.1111/j.1600-0536.1995.tb00544.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00544.x)
- [40] H. Wahlkvist, A. Boman, J. Montelius, J.E. Wahlberg, Sensitizing potential in mice, guinea pig and man of the preservative Euxyl K 400 and its ingredient methyldibromo glutaronitrile, Contact Derm. 41(6) (1999) 330-338. DOI: [10.1111/j.1600-0536.1999.tb06182.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1999.tb06182.x)

- [41] C. Mylonas, G. Cardilanetti, I. Sigelaki, A. Polzonetti-Magni, Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures [archive], *Aquaculture*. 246, 1-4 (2005) 467-481. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.046>
- [42] Institut national de recherche et de sécurité (INRS), édition de janvier 2022 : Base de données : Fiche toxicologique (FT) n°269 du 2-phénoxyéthanol. https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_269-1/FicheTox_269.pdf
- [43] H. Tsantilasa, A.D. Galatosa, F. Athanassopouloub, N.N. Prassinosa, K. Kousoulaki, Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C, *Aquaculture*. 253, 1-4 (2006) 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.034>
- [44] G. Bujacz, B. Wrzesniewska, A. Bujacz, Cryoprotection properties of salts of organic acids: a case study for a tetragonal crystal of HEW lysozyme, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 66 (7) (2010) 789–796. DOI:10.1107/S0907444910015416.
- [45] Perstorp, Sodium Formate Deicer. Product data sheet. (2016). https://www.perstorp.com/-/media/files/perstorp/pds/sodium_formate_deicer/pds_sodium_formate_deicer_eng-2720.pdf
- [46] H. Sanderson, R. V. Compennolle, S. D. Dyer, B. B. Price, A. M. Nielsen, M. Selby, D. Ferrer, K. Stanton, Occurrence and risk screening of alcohol ethoxylate surfactants in three U.S. River sediments associated with wastewater treatment plants, *Science of Total Environment*. 463-464 (2013) 600-610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.047>
- [47] Interchimie : Alcools gras éthoxylés propoxylés (ROKANOL LP 3943), 2018. <https://www.interchimie.fr/produits/tensio-actifs-non-ioniques/alcools-gras-ethoxyles-propoxyles/>
- [48] K-I. Nunami, T. Iwasaki, K. Matsumoto, K. Yano, I. Yamaguchi, S.C. Tanabe, N,3-Disubstituted Alaninamide derivatives, United States Patent. Number: 5 312 826 (USA). May 17, 1994. <https://www.freepatentsonline.com/5312826.html>
- [49] M. Rabiller-Baudry, M. Le Maux, B. Chaufer, L. Bégoïn, Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR-FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane, *Desalination*. 146 (2002) 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00503-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00503-9).
- [50] L. Paugam, D. Delaunay, N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: On the real effect of nitric acid step, *J. Membr. Sci.* 428 (2013) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>.
- [51] L. Le Petit, M. Rabiller-Baudry, R. Touin, R. Chataignier, P. Thomas, O. Connan, R. Périon, Efficient and rapid multiscale approach of polymer membrane degradation and stability: Application to formulation of harmless non-oxidative biocide for polyamide and PES/PVP membranes, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021) 118054, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118054>.
- [52] M. Rabiller-Baudry, A. Bouzin, C. Hallery, J. Girard, C. Leperoux, Evidencing the chemical degradation of a hydrophilised PES ultrafiltration membrane despite protein fouling, *Sep. Purif. Technol.*, 147 (2015) 62–81. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.056>.

- [53] L. Bégoïn, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, M.-C. Hautbois, T. Doneva, Ageing of PES industrial spiral-wound membranes in acid whey ultrafiltration, *Desalination*. 192 (2006) 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.10.009>.
- [54] S. Rouaix, C. Causserand, P. Aimar, Experimental study of the effects of hypochlorite on polysulfone membrane properties, *J. Membr. Sci.* 277 (2006) 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.10.040>
- [55] K. Yadav, K.R. Morison, M.P. Staiger, Effects of hypochlorite treatment on the surface morphology and mechanical properties of polyethersulfone ultrafiltration membranes, *Polym. Degrad. Stab.* 94 (2009) 1955–1961. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.027>
- [56] R. Prulho, A. Rivaton, S. Therias, J.L. Gardette, Ageing mechanism of polyethersulfone/polyvinylpyrrolidone membranes in contact with bleach water, *Proc. Eng.* 44 (2012) 1031–1034. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.08.666>
- [57] Y. Kourde-Hanafi, P. Loulergue, A. Szymczyk, B. Van der Bruggen, M. Nachtnebel, M. Rabiller-Baudry, J.-L. Audic, P. Pölt, K. Baddari, Influence of PVP content on degradation of PES/PVP membranes: Insights from characterization of membranes with controlled composition, *Journal of Membrane Science*. 533 (2017) 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.03.050>
- [58] M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, Small molecular ion adsorption on proteins and DNAs revealed by separation techniques, a Review, *Journal of Chromatography B*. 797 (2003) 331–345. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00488-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00488-4)
- [59] O. Ward, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition): 3.49 - Proteases (2nd Ed., Vol. 3)*. (M. Moo-Young, Ed.) Waterloo, ON, Canada (2011). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1>

Supporting information

§1: Enzymatic detergents' solutions stability

UV studies of these enzymes' solutions were conducted (i) to ensure the solutions' stability during storage before experiments and (ii) to study the interactions between the Subtilisins and their stabilizing agents, as well as with the formulant prototype ingredients and those of the buffer. Several solutions were tested for a period of 1 or 2 hours at room temperature or 50°C, with or without buffer, incorporated in Matrix D or not. The results showed that the absorbance was stable, independently from the enzymatic solution tested, for at least 1 or 2 hours (**Figure §1.1**).

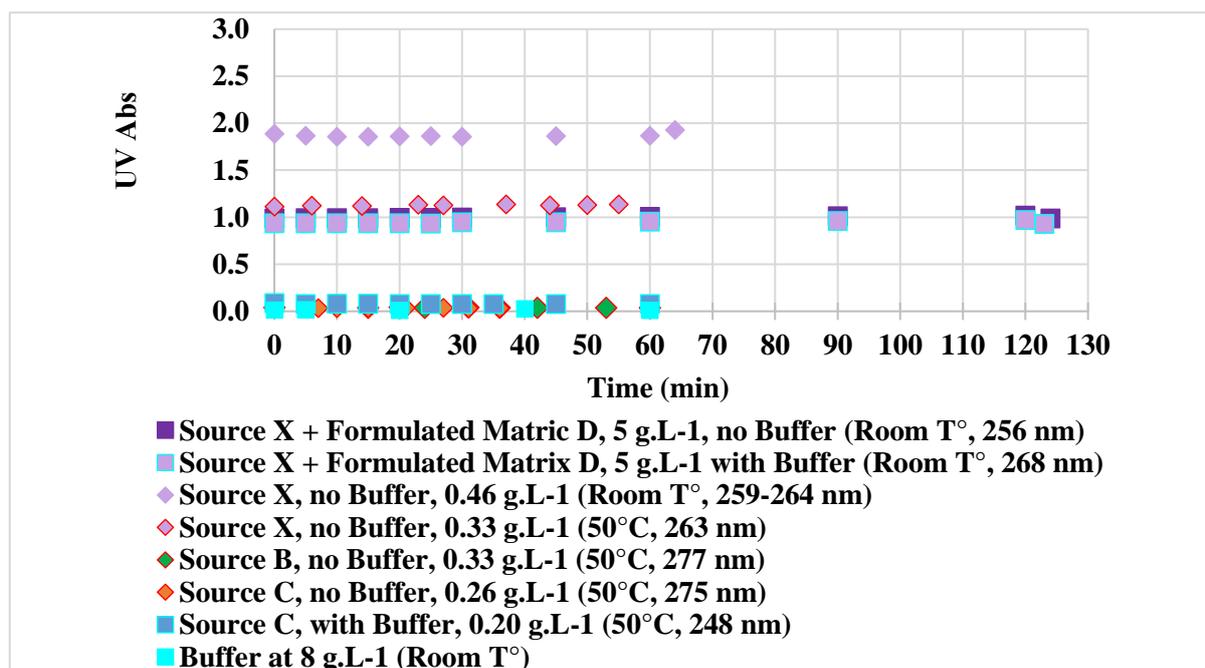


Figure §1. 1. UV Absorbance Stability of enzymatic solutions

Chapter V

De-formulation for reformulation of the surfactant system for more efficient enzymatic detergents: from batch reactor to spiral ultrafiltration validation.

In Chapter IV, we saw that the formulated enzymatic detergents were all very effective, independently of the commercial stabilized enzymes used. For the following steps, the choice made together with our industrial partner fell on formulas based on the stabilized Enzyme C set at concentration $C_2 = 0.20 \text{ g. L}^{-1}$.

We also evidenced the need to mix the enzyme in a matrix to improve cleaning performances. Nevertheless, Matrix D of Chapter IV presented disadvantages associated with the loss of PVP. However, we were not able to conclude whether this loss was continuous or not with the contact time between the membrane and the cleaning solution.

In the following, we will adopt a de-formulation approach of Matrix D to identify problematic ingredients and replace them in the next reformulation step.

Where possible, alternative ingredients will be chosen to improve the environmental footprint of new detergents. Nevertheless, they must be chosen from ingredients approved in France and Europe for the enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes used in the dairy industry.

In this Chapter, the focus was only on the selection of the surfactant system and the comprehension of the behavior of the selected mixture, which was only made on approved surfactants.

However, experiences with surfactants that are not yet approved have been engaged, aiming at future developments.

The optimization of the overall matrix with the different selected surfactant systems, either approved or pending, will be discussed in Chapter V with all the surfactant systems selected at the end of this chapter.

This chapter is presented in the form of an article in preparation.

N.B.: For clarity, in the following, the terms “detergent” or “concentrated detergent” were used when dealing with the potential commercial mixture, namely the concentrated formula.

In diluted form at 5 g. L^{-1} , that would be the concentration of use at the industrial scale, the solution was called “cleaning solution”.

Chapter V: DE-FORMULATION FOR REFORMULATION OF THE SURFACTANT SYSTEM FOR MORE EFFICIENT ENZYMATIC DETERGENTS: FROM BATCH REACTOR TO SPIRAL ULTRAFILTRATION VALIDATION

Abstract

PES/PVP membranes are widely used for skim milk ultrafiltration. Membranes are systematically fouled by proteins, which can only be removed by cleaning.

Eco-friendly enzymes can be used in the cleaning process thanks to their hydrolysis propriety. Nevertheless, enzymes are generally not efficient enough, and formulated enzymatic detergents must be developed. Besides the enzyme, they contain several ingredients, among which are surfactants, which are at the core of this study. Aiming at the formulation of new enzymatic detergents, five different commercial surfactants were selected to enter the formulation, either alone or in mixture. Most of them were eco-friendly, going toward a more sustainable cleaning process.

All the formulated detergents proved to be efficient (no more protein was detected on the cleaned membranes). However, the water flux recovery after cleaning was quasi systematically greater than 1. The paper discussed the origin of this behavior and proved that it was mainly due to hydrophilization of the membrane by surfactant adsorption and very little by PVP partial removal due to certain surfactants.

Finally, a new enzymatic formulated detergent was proved to be efficient in the cleaning of a spiral membrane (6.8 m² filtering area) and tested for 52 h to evidence the stability of the membrane performances in skim milk.

Keywords: enzyme, cleaning, surfactant, skim milk ultrafiltration, ATR-FTIR, flux

1. Introduction

Membrane separations are widely used in the worldwide dairy industry. The concentration of skim milk by ultrafiltration (UF) before cheese making is the most important one. The membranes industrially used for this process are made of polyethersulfone/polyvinylpyrrolidone (PES/PVP, MWCO = 5-10 kg.mol⁻¹). The main drawback is that the membranes are systematically fouled by milk proteins, therefore requiring twice a day cleaning with several chemical detergents followed by a disinfection step. These operations represent up to one third of the process time [1] and of the energy consumption [2]. Accordingly, improving the cleaning & disinfection process would contribute to a more sustainable and decarbonized dairy industry.

The selection of enzymatic detergents instead of chemical ones could be an eco-friendlier solution as enzymes are biodegradable. However, though enzymes have a certain capacity to hydrolyze and remove protein foulants, it was reported that their efficiency can be improved when mixed in a formulated matrix [3,4]. A simple scheme of an enzymatic detergent composition can be found in **Figure 1**.

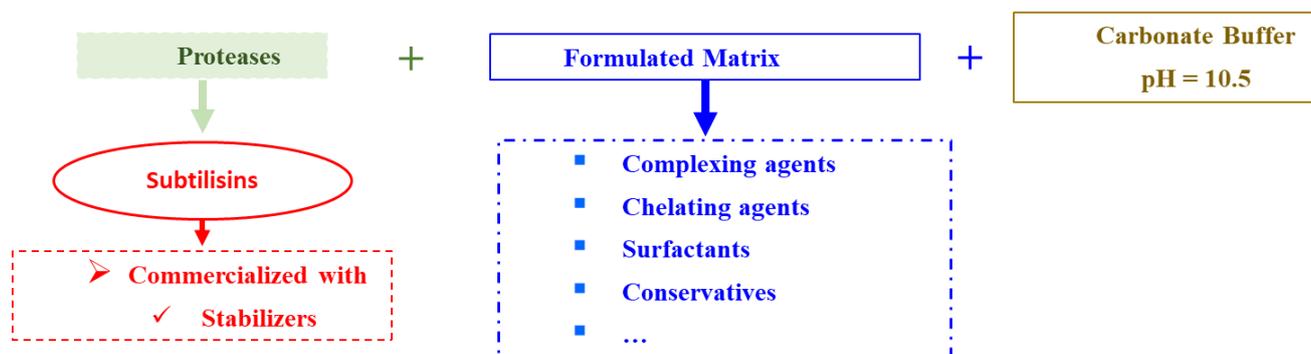


Figure 1. Simple scheme of an enzymatic detergent composition useful for proteins removal. The buffer is required to optimize the enzyme efficiency but can be selected among different chemicals (pH is given at 50°C).

Each ingredient is likely to impact the overall performances of the detergent. Thus, the choice of ingredients is a crucial task for the formulation, which is still an art not totally driven by fundamental understanding.

First is the enzyme selection. Enzymes are often commercialized with stabilizing agents, the impact of which on cleaning performance was discussed in our previous studies [3,4]. In the case of 3 commercial sources of a selected protease called Subtilisin, we have proved that stabilizers have no impact on the reached cleanliness (quantification of the residual proteins). Nevertheless, mixtures of some stabilizer(s) and ingredients of the selected matrix seemed to behave in synergy and strongly impact the membrane flux. As a consequence, the performances of the membrane cleaning were evidenced to be significantly different.

Second is the surfactant system, whose selection in the French positive list of substances authorized for the cleaning of surfaces in contact with food processes can be tricky, as some surfactants were suggested to be responsible for PVP partial removal from the membrane either for enzymatic [3,4] or chemical detergents [5]. The surfactant mixture of Matrix D (in development, provided by Kersia) was used as a starting system to improve by following a de-formulation/re-formulation approach.

Third are all other ingredients of the detergent entering the matrix composition. Their main role is to provide long-term conservation of the commercial (concentrated) detergent, but also to mitigate the eventually “poor” quality of the water used for the cleaning (diluted) solution preparation.

The present study only focuses on simplified matrixes made of surfactant mixtures at the matrix concentration of use (5 g. L⁻¹ of the concentrated detergent). The other ingredients of the matrix were out of the scope of this paper. Nevertheless, the same stabilized enzyme (a protease called Subtilisin, from a given provider and thus given stabilizers) was dissolved at 0.20 g. L⁻¹ in the new simplified matrixes to prepare the cleaning solutions. Accordingly, the prototype cleaning solutions only contained the surfactant(s) and the (stabilized) enzyme, with no other ingredients entering the classical matrix composition. The carbonate buffer was added at the last moment and was not an ingredient of the matrixes.

After a theoretical background aiming at the understanding of the surfactants’ selection, cleaning of pristine and skim milk fouled membranes has been achieved with a series of prototype cleaning solutions specially formulated for the sake of in-depth comprehension.

2. Background on surfactants

Fifteen million tons of surfactants were estimated to be produced each year around the world. About half of this production were soaps. The other surfactants included linear alkylbenzene sulfonates (1.7 million

tons), lignin sulfonates (600 000 tons), fatty alcohol ethoxylates (700 000 tons), and alkylphenol ethoxylates (500 000 tons) [6].

Surfactants are essential components of a detergent and correspond to its main active matter (AM), except enzyme in enzymatic detergents (see above). Amphiphilic compounds, surfactants have a polar head attracted to water (hydrophilic) and a hydrophobic tail attracted to fats (**Figure 2**). This amphiphilic nature allows them to alter the surface tension at interfaces. Thus, the lipophilic tails attach to organic soil/foulant (hydrophobic), while the hydrophilic heads turn toward the aqueous phase. This configuration traps soil/foulant in the heart of the clusters thus formed, which are called micelles (**Figure 2.a**). Thanks to the micelles, the trapped soil remains in suspension in the solution without being able to redeposit on the surface. Water can rinse them away.

Moreover, surfactants, thanks to their wetting ability, allow the water of the cleaning solution to penetrate the fouling layer and make it possible to spread over the surface, to cover the surface, and to provoke the soil detachment and its removal (**Figure 2.b**).

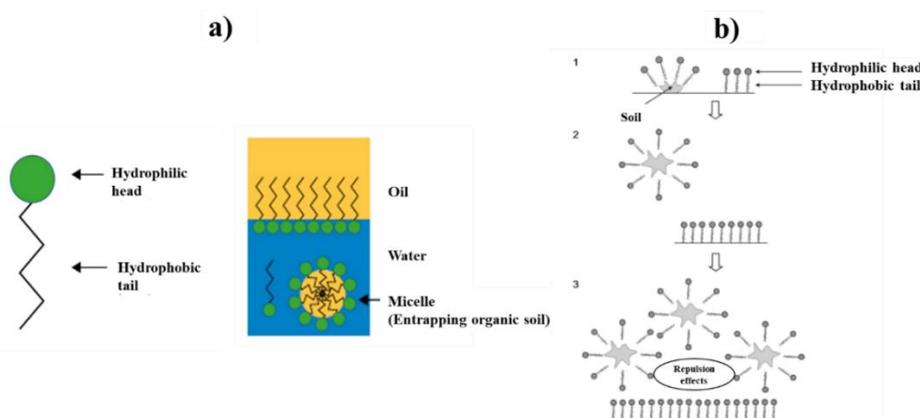


Figure 2. Surfactant behavior at interfaces.

(a) Surfactants and micelles formation at water/oil interface, as adapted from [7]

(b) Mechanism of action of surfactants explaining the cleaning effects as reported in [8]: a surfactant acts in three steps: 1) adhesion/adsorption to the surface of the material and the soil to be removed; 2) separation/detachment and 3) repulsion by the formation of micelles.

2.1. CMC and Micelles formation

Micelles can only be formed when the critical micellar concentration (CMC) of the surfactant is exceeded [5]; however, the presence of soil is not required. Above CMC, any additional surfactants will participate in the micelles' formation while the free surfactants remain at the same concentration (**Figure 3**).

Different methods of determining the CMC of a solution exist, and among them, the most common are tensiometry and conductivity (this last one being only useful for ionized surfactants).

Several factors have an impact on the reduction of the CMC: for example, the addition of salt implies an increase in the ionic strength and a screening of the charges in the case of an ionic surfactant. Consequently, a "poor quality" of the water (insufficient deionization) used for the cleaning solution preparation has to be anticipated at the formulation step. Generally, formulators increase the surfactant concentration by close to 1.5 times the CMC in deionized (DI) water. It must be underlined that a mixture of several surfactants has its own CMC that is not a simple combination of the individual CMCs, as synergies can occur.

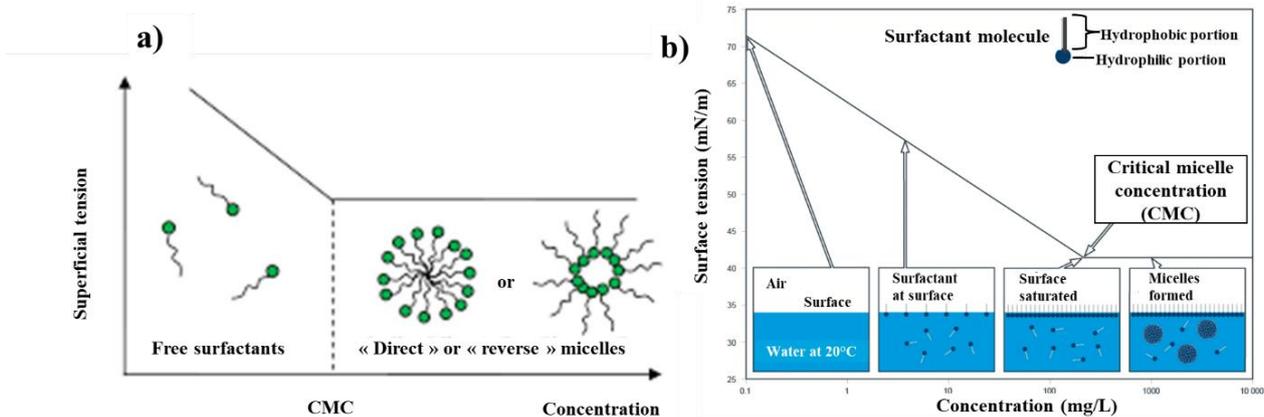


Figure 3. (a) Free surfactant and micelles vs surfactant concentration
Formation of micelles with respect to CMC in water (direct micelles) and consequence on the superficial tension of the solution adapted from [9]
(b) Determination of CMC by surface tension measurements as reported in [10]

2.2. Hydrophilic/ Lipophilic Balance (HLB)

The Hydrophilic/Lipophilic Balance (HLB) can be correlated to the surfactant solubility in water. The higher the HLB is, the more hydrophilic the surfactant is [11,12]. Several methods exist to theoretically calculate the HLB of a given surfactant, depending on its chemical structure (see **Supporting S1 for more information**).

Surfactants can play different roles depending on their adsorption properties, governed by their HLB. Thus, they can act as detergents, be used as foaming agents, or serve as solubilizers, wetting agents, emulsifiers, dispersants, or even antiseptics [11,12] (see **Figure S1.1 in Supporting S1**). For cleaning, two properties are necessary to select surfactants: the ability to detergency (HLB in the 13 -15 range) and the solubilizing one (HLB in the 15-18 range). This last category can also help with the solubilization of a surfactant by another in a complex mixture.

It can be underlined that, depending on their HLB, surfactants would be able to more or less adsorb on (hydrophobic) polymer membranes. Low HLB appeared to not be suitable to avoid irreversible adsorption. However, the exact limit to be confident with the total desorption is not well known, and special attention has to be paid to this behavior.

2.3. Surfactants in formulated detergents for membrane cleaning

Formulated detergents contain many ingredients that are often kept secret by formulators for intellectual property (IP) reasons. However, some general trends can be given for the sake of comprehension.

2.3.1. Classification of surfactants by family

There are four general classes of surfactants. The classification is dictated by the charge of the hydrophilic head of the surfactant. As such, the head could be anionic, cationic, non-ionic, or amphoteric (**Table 1**).

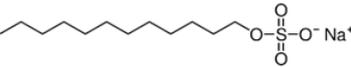
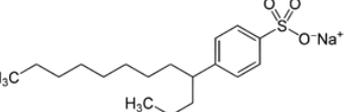
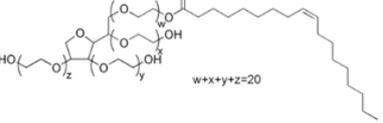
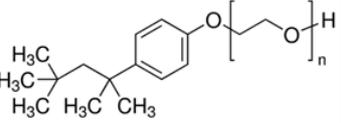
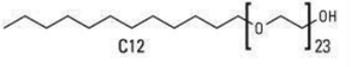
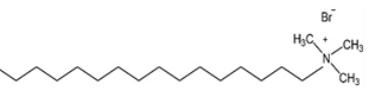
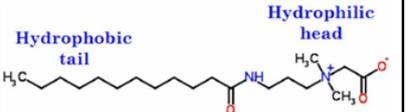
Anionic surfactants (55% of world production) have a negative charge when dissociated in water and are generally sold as sodium, potassium, or ammonium salts. They are the largest surfactant group and are

mainly used as detergents, foaming agents, and emulsifiers [5]. Their polar heads can be carboxylate, sulfate, or sulfonate functions.

One example is sodium dodecyl sulfate (SDS) with HLB=40 making it very soluble in water and prone to be easy to rinse with water. SDS is widely used as a model surfactant in academic studies [13,14]. Another example is that of sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS), an alkylbenzene sulfonate slightly less hydrophilic than SDS but widely used in the cleaning of polymeric UF membranes in the dairy industry, as evidenced by the product safety data sheet of Ultrasil 10® (Ecolab) [15].

However, the very strong foaming properties of anionic surfactants constitute their major drawback. Of course, anionic surfactants adsorb extensively on positively charged surfaces, but UF polymer membranes are generally negatively charged. However, Rabiller-Baudry *et al.* [16] reported that SDS is able to adsorb on a hydrophilized and negatively charged PES/PVP UF membrane, thus making the cleaned membrane more hydrophilic than the pristine one. Consequently, as the compatibility toward water increased, the water flux of the SDS-adsorbed-membrane increased [16]. Similarly, SDS has been shown to be able to strongly impact a polyamide RO membrane flux [14]. Such variation in the water flux can make it difficult to use the water flux recovery (WFR) as the single tool to appreciate the cleaning efficiency, as it can be difficult to make the difference between hydrophilization and membrane degradation.

Table 1. Examples of surfactants according to their family

Name	Formular	HLB	CMC (mmol. L ⁻¹) at 25°C
Anionic Surfactants			
SDS Sodium dodecyl sulfate		40	8
SDBS Sodium Dodécylbenzensulfonate		11.7	1.2
Non-ionic Surfactants			
Tween 80- Polyoxyethylene (80) sorbitan monooleate		15	0.01
Triton X-100 octylphénoxy polyethoxye thanol Type		13.5	0.9
Brij-35 Polyoxyethyleneglycol dodecyl ether		16.9	0.1
Cationic Surfactants			
CTAB Cetrimonium bromide		10	0.9
Amphoteric Surfactants			
CAPB Cocamidopropylbetaine		11	0.07

Crypto-anionic surfactant refers to anionic surfactants that are capable of being anionic, non-ionic, or mixtures of both due to the existence of a pKa for the polar head function. The transformation from one to the other being achieved by the adjustment of the pH, crypto anionic surfactants are mostly in a non-ionic state when $\text{pH} < 3$ [17,18]. Typically, they bear a weak acid polar function, such as carboxylic acid (*e.g.*, citric acid) or phosphoric acid.

Non-ionic surfactants (25% of world production) are surfactants that are not ionized in solution; they are thus pH independent and reputed to be easy to rinse. Depending on their hydrophobic tails, they can be good degreasers. They are generally believed to be less effective than anionic agents for cleaning purposes. However, they can be used in mixtures to significantly improve the performance of anionic surfactants [19]. Their polar heads having an OH- function, they are generally used in the form of linear ethoxylated alcohols such as Tween®, Triton®, or Brij® (Table 1). Given their versatility, varying their HLB can be easy, allowing to obtain foaming, low-foaming, or even de-foaming molecules. High pressure or spray cleaning require low-foaming agents; non-ionic surfactants are therefore well suited for this type of use [5]. Accordingly, for membrane cleaning, mixtures of anionic and non-ionic surfactants can be a way to reach a good compromise between efficiency and foam limitation.

Cationic surfactants (4% of world production) have a positive polar head and are often ammoniums, particularly quaternary ammoniums such as benzalkonium chloride and domiphen bromide. Associated with anionic surfactants, they form insoluble combinations and are therefore incompatible [20]. On the other hand, despite having low detergent power, they have strong biocidal power and are thus mainly used as disinfectants. In addition, they have good emulsifying properties and are used as antistatic agents, fabric softeners, corrosion inhibitors, etc. However, since polymeric membranes are generally negatively charged, these types of surfactants are not used in membrane cleaning to prevent cationic surfactants from adsorbing onto the membranes. Moreover, they are generally not authorized as food additives, which is a general requirement for dairy membrane cleaning substances.

Amphoteric (or zwitterionic) surfactants simultaneously bear both negative and positive charges, generating functions, the number of which varies with the pH. They are generally in zwitterion form. At the isoelectric pH, the positive and negative charges offset each other. An example is the betaine family (Table 1). Some of them may have biocidal properties and be used in association with cationic surfactants as disinfecting agents when their positive charges are predominant. Conversely, if the negative charge predominates, their wetting and cleaning power increase. Despite their low detergent power and the fact that they are slightly irritating to the skin, thanks to their foaming properties, they are mainly used in cosmetics (shampoos, other body care products), household detergents, disinfection, etc. [5]. Very foaming but not very emulsifying, amphoteric surfactants are less used than the previous ones in detergents.

2.3.2. Surfactants in formulated detergents for membrane cleaning

Because of the differences in surfactant properties, it is common to combine several ones in a formulation according to their complementarities. For example, one can help to solubilize the other, which in turn serves as a detergent (or a biocide). The safety data sheets of commercial detergent give some lacunar data, aiming both at user information and IP protection.

Since surfactants are generally used in mixtures, it is necessary to understand their interactions in solution, as their properties are not systematically strictly additive. The strongest interactions are observed between anionic and cationic surfactants (high electrostatic attraction between opposite charges) [21]. However, they are out of the scope of membrane detergent applications, as explained above. Only the one between anionic and non-ionic surfactants has to be considered here. Indeed, besides the addition of properties, synergy may exist, leading to the surface tension properties of the mixture being better than those of the surfactants taken

separately. This implies that surfactants attract each other, either by van der Waals forces (for instance, between hydrophobic groups) or polar interactions or hydrogen bonding.

Besides the cleaning efficiency, the main raised question is that of membrane integrity for long contact time with the cleaning solution. This study also aimed at evidencing if any significant degradation could be induced by the surfactants entering the composition, as mentioned above. Aiming at such a demonstration, acceleration of membrane potential degradations can be made by using microwave (MW) activation, as reported in [22,23,24].

Finally, surfactants adsorption can constitute a weak point when they remain adsorbed on membranes even after water rinsing. This question raises the possibility of the leaking of surfactants as well as other constituents of formulated detergents in post-cleaning processes, namely in skim milk, for instance. Unfortunately, to date, there is no reliable way of quantifying the release of such residues. An attempt at risk evaluation has been reported by some of us based on the quantification of the adsorbed amount of a given surfactant [5,25]. The current alternative consists of using only compounds approved as food additives in detergents intended to be used on equipment in contact with food. With respect to the regulation, positive lists of such components exist [26,27].

3. Materials and Methods

3.1. Solutions

3.1.1. Water and skim milk and their analytical tools

All solutions, including membrane rinsing water, were prepared using 1 μm filtered deionized (DI) water (18 M Ω).

The skim milk used was a sterilized commercial one (Lait de Montagne, UHT, Carrefour, France). Its average composition as given by the provider was: 48 g.L⁻¹ carbohydrates (mainly lactose), 33 g.L⁻¹ proteins, and 1 g.L⁻¹ of NaCl (but about 8 g.L⁻¹ of overall salts have to be considered knowing the average composition of milk).

A UV-Vis spectrometer (630 model, Jasco) was used to characterize both the skim milk UF permeate and retentate. Registration of spectra was realized in the 200-800 nm range with the following acquisition conditions: bandwidth: 1.5 nm, scan speed: 400 nm.min⁻¹, data interval: 1 nm. The baseline was previously acquired with DI water. According to the Beer-Lambert law, the absorbance at 280 nm was proportional to the proteins' concentration:

$$\text{Abs}_{280} = \log(I_0/I) = \epsilon_{280} \cdot \ell \cdot c \quad (\text{Equation 1})$$

With:

Abs₂₈₀: Absorbance at 280 nm (absorbance unit)

ϵ_{280} = molar extinction coefficient at 280 nm (L.mol⁻¹.cm⁻¹)

ℓ = the thickness of the UV measuring cell (1 cm).

c: the proteins' concentration (mol. L⁻¹)

I₀: the light intensity of the UV source at 280 nm

I: the transmitted light intensity at 280 nm.

The observed retention was deduced according to **Equation 2** with an accuracy better than 3%.

$$\text{Retention} = \left(1 - \frac{C_{\text{perméat}}}{C_{\text{rétentat}}}\right) \quad (\text{Equation 2})$$

3.1.2. Prototype cleaning solutions

A stabilized commercial protease called Subtilisin (CAS registry number: 9014-01-1) was used as the cleaning target aimed at the proteins' removal. The Subtilisin family has been widely used in commercial enzymatic detergents; however, the variants are generally not clearly given by the providers. The commercial enzyme hereafter denoted Enzyme C was not pure and only contained between 5.0 and 7.5 wt% of Subtilisin. Certain stabilizers were listed in the safety data sheet (**Table 2**).

Table 2: Stabilized commercial Subtilisin used for prototype detergent preparation according to provider data

Stabilized Subtilisin Protease concentration range of commercial products	Identified stabilizing agents
C (Not identified genetic variant) 5.0-7.5 wt%	Glycerol + Propylene glycol + Sodium formate + Disubstituted Alaninamide + Phenoxyethanol

Aiming at the preparation of a concentrated liquid detergent, and as the exact amount of Subtilisin was not given by the provider, its C_0 concentration was set in order to reach the same activity as that of another commercial enzymatic detergent useful for membrane cleaning.

The composition of Matrix D used at the start as the reference was a non-optimized formulation made for the purpose of this study by our industrial partner. All simplified matrixes formulated here for the sake of comprehension only contained a single surfactant or 2 surfactants in a mixture and were aimed at being added to Enzyme C at C_0 to prepare the concentrated simplified detergents, which must further be evaluated in terms of long-term stability before a final validation of the composition before commercialization (if any) and for stock purposes.

For the evaluation of the cleaning efficiency, only diluted solutions were useful. Their preparation is given below, referring to a concentrated detergent requiring dilution, but from a concrete point of view, they were prepared by mixing the ingredients directly at the concentration of use. This means that, at this early stage of development, the stability of the concentrated detergents was not within the scope and was studied only with promising mixtures.

The diluted solutions, at the appropriate pH, hereafter denoted “cleaning solutions”, were prepared by dissolving 5 g of the concentrated simplified detergent in 1 L of DI water together with a commercial potassium carbonate buffer set at 8 g.L^{-1} (DEPTA 912L, Hypred-Kersia®, France) to reach $\text{pH} = 10.5$ at 50°C . In the cleaning solutions, the Enzyme C concentration was $C_2 = 0.20 \text{ g.L}^{-1}$. Accordingly, the pure Subtilisin concentration in the cleaning solutions was thus lower than 1 g.L^{-1} .

Preliminary studies have suggested the stability of the stabilized enzyme C solutions at a 0.20 g.L^{-1} concentration with and without added carbonate buffer at $\text{pH} = 10.5$ for at least 2 h. Similar conclusions were reached for the (diluted) cleaning solutions using (diluted) Matrix D [4].

3.1.3. Commercial Surfactants entering the Matrix composition

Various surfactants were selected based on several criteria, including environment friendliness (eco-toxicity), eco-life cycle, biodegradability, origin (natural or petroleum source), food and environment safety, European and French regulations, compatibility with membrane integrity, industrial users' requirements, etc.

Due to formulation confidentiality, the surfactants' names and structures are not fully detailed here. However, their given code names as well as their HLB and CMC range can be found in **Table 3** and appeared to us as sufficient to understand the approach. All of them can be considered green.

Table 3. Code names of commercial surfactants and their properties in DI water

Surfactant code	Family	HLB	CMC* (g.L ⁻¹)
S1	Zwitterionic	nd	0.051-0.443 [28] low to high C number 0.435-0.506 [29] - high C number
S2	Non-ionic (glucide-based) biodegradable	10.0-12.7 [30,31,32,33,34,35]	0.026-0.050 [30,31,35,36]
S3	Non-ionic (glucide-based) biodegradable	13-15 [30,31, 32,33,35,37,38]	0.022 [38] – low C number 0.241 [30,31] – intermediate C number 0.468-0.491 [36] - intermediate C number 1.012 [35] – high C number
S4	Anionic (Rhamnolipid based) Biodegradable biosourced	9.5 [39]	0.02 at pH 5.5 (main component of the mixture) 0.004 at pH 9.0 [40] (main component of the mixture)
S5	Crypto-Anionic (Etoxylated surfactant)	14.8 [41]	0.002 [42] (main component of the mixture)

*CMC is given in DI water at natural pH, except for added specifications. As a general trend, the surfactants are not pure and are commercialized as several members of the same family with a more or less long carbon chain; thus, the given values are the lower and greater ones found in the literature, and no information from the provider is available to understand the exact proportions.

Surfactants used in this study were commercially available in aqueous solutions. They are generally mixtures of similar surfactants with the same polar head but different hydrophobic tail lengths, not precisely given by the providers.

Hereafter, the global surfactant species concentration was designated as the total active matter (AM_{tot}). They were used at the same AM_{tot} concentration because CMCs of commercial surfactants (being themselves mixtures) were not known but could be in the same range (**Table 3**). First, the AM_{tot} concentrations were selected for the cleaning solutions at 0.75 g.L^{-1} corresponding to the surfactant system of the initial (diluted) Matrix D and greater than the CMC of individual possible surfactants (except one in S3). Second, AM_{tot} concentration was reduced to 0.25 g.L^{-1} in order to evaluate the possibility of saving on surfactant quantities, either for cost or environmental considerations, knowing that the CMC of certain individual possible surfactants was of this order (**Table 3**).

Table 4: Surfactant mixture of the (diluted) cleaning solutions in which stabilized Enzyme C (0.20 g.L^{-1}) has been added as well as carbonate buffer (8 g.L^{-1}) to reach $pH= 10.5$.

Surfactants Code	AM_{tot} in cleaning solution (g.L^{-1})	Label of the cleaning solution (Enzyme + Surfactant(s) + Buffer)	Label of the diluted matrix (surfactant system alone)	Label of the corresponding concentrated simplified matrix (surfactant system alone)
S1	0.25	#1	#1M	#1C
	0.75	#2	#2M*	
S2	0.25	#3	#3M	#3C
	0.75	#4	#4M	
S3	0.25	#5	#5M	#5C
	0.75	#6	#6M	
S2 + S3	0.10/0.15 → 0.25	#7	#7M	#7C
	0.10/0.19 → 0.29	#8	#8M	#8C
S4	0.15	#9	#9M	#9C
	0.25	#10	#10M	
	0.75	#11	#11M	
S3 + S4	0.13/0.15 → 0.28	#12	#12M	#12C
S5	0.25	#13	#13M	#13C
	0.75	#14	#14M	

* The diluted Matrix D contains the same surfactant at the same concentration but also additional ingredients (complexing agents, etc.) that are not given here for the sake of confidentiality

With respect to the surfactants' overall concentration, 14 simplified diluted matrixes labeled from #1M to #14M have been tested. The #2M matrix contained the same surfactant system as the initial diluted Matrix D (#diluted D) used as the reference. The corresponding cleaning solutions (diluted matrix + enzyme + buffer) were labeled from #1 to #14, while the corresponding concentrated simplified matrixes were labeled from #1C to #13C (**Table 4**). Note that for the UF test, cleaning solutions were used as well, while for batch reactor experiments, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at 0.015 g.L^{-1} ($0.1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) was added to the cleaning solutions but had no impact on the results (see below).

3.2. Membrane and filtration experimental set-up

3.2.1. Membranes

HFK-131 membrane (MWCO= 5-10 kg.mol⁻¹) manufactured by Koch (USA) was selected because it represents at least 80% of the world market for UF application in the dairy industry. The active layer of this membrane is made of a physical blend of PES and PVP [43] (**Figure 4**).

Small flat membranes (3 cm² for accelerated aging under microwave, 14 cm² for batch reactors, and 127 cm² for cleaning in place (CIP) in filtration conditions) were sampled into a spiral membrane (4333 module type, with a 6.8 m² filtering area, referred to as cut-S-CIP-2 membrane).

Before use, each flat membrane was carefully soaked in DI water to remove the preservative (glycerol; removal was regularly checked by ATR-FTIR).

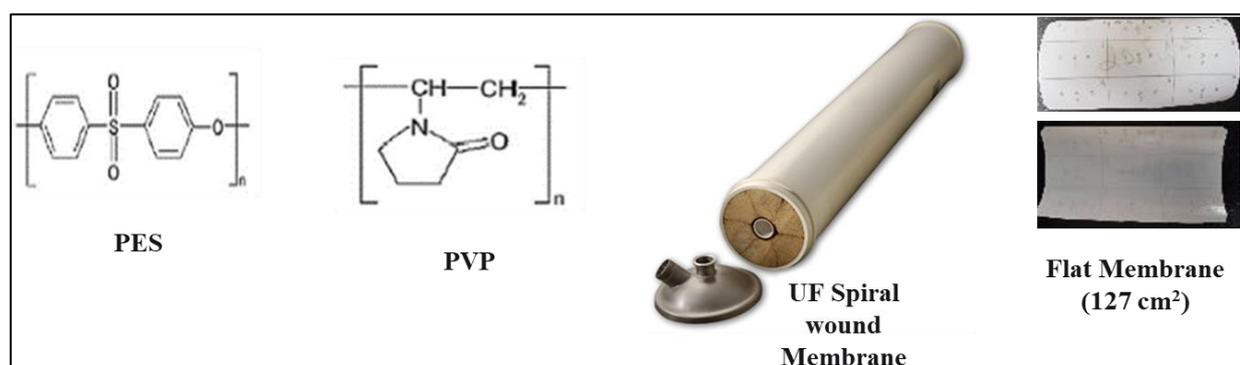


Figure 4. UF selected membrane: polymers of the active layer, UF spiral wound membrane module, and flat membrane pictures

3.2.2. Filtration set-up with flat membranes

A 127 cm² flat membrane was inserted in a plate and frame module (Ray Flow X100, Novasep, France) between a 31 mil (0.79 mm) diamond retentate spacer located in the feed channel and a permeate spacer. Both spacers were collected in the spiral membrane. The free channel thickness was estimated to be 1 mm with respect to the gaskets used in the cell. In standard conditions, UF was achieved at 2 bar and 50°C in a cross-flow mode, regardless of the filtered fluid (4 L). The feed flow rate (Q_{feed}) was 110 L.h⁻¹, which corresponded to a crossflow velocity of about 0.4 m. s⁻¹ as estimated in the free channel and was close to the velocity that can be encountered in a spiral membrane. Both the retentate and permeate fractions were fully recirculated to the feed tank, which corresponded to a batch filtration mode (volume reduction ratio VRR= 1).

3.2.3. Filtration set-up with spiral membrane

A 6.8 m² spiral wound membrane was installed (4333 module denoted spiral-CIP-4, Koch, USA) on a TIA spiral pilot (Bollène, France). The spiral membrane was made of 6 double membrane flat sheets. On the feed/retentate side were inserted 31 mil (0.79 mm) diamond retentate spacers, corresponding to the feed channel thickness. In standard conditions, skim milk (24 L) UF was achieved in a cross-flow mode at 50°C in the 2 - 4 bar range, DI water rinsing (requested amount, room temperature) and cleaning (25 L, 50°C) were achieved at 2 bar. Whatever the filtration step, the feed flow rate (Q_{feed}) was 10.5 m³.h⁻¹, corresponding to a cross-flow velocity of about 0.4 m. s⁻¹ as estimated in the free channel according to the procedure

explained in [44]. The retentate and permeate fractions were both fully recirculated to the feed tank, which corresponded to a batch filtration mode (volume reduction ratio VRR= 1).

3.3. Membrane Fouling and Cleaning

A new membrane was used for each experiment (except when multiple fouling/cleaning steps were achieved).

Prior to any other filtration, each flat membrane underwent a compaction procedure by filtering DI water at 110 L.h⁻¹, 4 bar, 50°C for 3 h until a plateau value of flux was reached. The permeance at the plateau value was used as a reference: L_p^{ref} .

3.3.1. Cleaning of pristine flat membranes in UF conditions

Aiming at the evaluation of any residuals tending to adsorb, pristine compacted membranes have been cleaned in the presence of carbonate buffer in cross-flow filtration standard conditions by (i) solutions of single stabilized Enzyme C at $C_2= 0.20 \text{ g. L}^{-1}$, (ii) diluted simplified matrixes with carbonate buffer (#1M to #14M, **Table 4**). For the sake of comparison, carbonate buffer and #diluted D were also tested as “single” solutions.

3.3.2. Fouling with skim milk in UF conditions

A typical experiment with a new 127 cm² flat membrane was as follows: (1) measurement of the DI water flux after initial compaction; (2) UF of 4 L of skim milk to achieve the fouling step during 180 min at 2 bar, 110 L.h⁻¹ and 50°C (average permeance at plateau value is denoted $L_{p,UF}$); (3) careful rinsing with DI water; (4) DI water flux measurement ($L_{p,water,rinsed}$). After that, depending on the following steps, the membrane can be: (i) demounted and dried for analysis by ATR-FTIR (see below); (ii) demounted and cut for cleaning in batch reactors (see below); or (iii) directly cleaned on the UF pilot (see below).

3.3.3. Cleaning of fouled flat membranes in batch reactors

The 127 cm² fouled & rinsed membrane was demounted and cut into 9 equivalent pieces of 14 cm² each. Each membrane coupon was then soaked at 500 rpm for 15 min at 50°C in a closed polypropylene batch reactor containing 130 mL of the cleaning solution under consideration in the presence of carbonate buffer. Each coupon was then extensively rinsed with DI water before careful drying in a desiccator under dynamic vacuum for further analysis by ATR-FTIR (see below).

Notice that the kinetic experiments achieved on the cleaning mixture made of #2 cleaning solution revealed that the maximum cleaning efficiency was reached after 15 min in batch reactors. Complementary experiments with surfactant mixtures but without enzyme & carbonate buffer (#8M, #12M, **Table 4**) evidenced that 70% of cleanable proteins were removed in 15 min, while 45 min were required to remove all the cleanable proteins. It was concluded that 15 min were a priori sufficient for the relative evaluation of all the cleaning solutions.

3.3.4. Cleaning in place (CIP) of fouled flat membranes in UF conditions

The flat fouled & rinsed membrane CIP was achieved at VRR= 1 during 60 min at 2 bar, 110 L.h⁻¹ and 50°C with 4 L of the cleaning solution under consideration. During the CIP, the permeance evolved, and the one at the plateau value of flux was denoted L_p^{CIP} . Then a final careful rinsing with DI water was performed until a neutral pH was obtained both on the retentate and permeate sides. Finally, the water flux

was measured in DI water, leading to a final permeance noted $L_{p,post-cleaning}$. The membrane was then demounted and dried for analysis by ATR-FTIR (see below).

3.3.5. Hydraulic Cleanliness: The Water Flux Recovery (WFR) Method

It is important to check the cleanliness of the membrane to prove the cleaning efficiency. However, there are three types of cleanliness depending on the tools used for the determination: hydraulic cleanliness, chemical cleanliness, and microbiological cleanliness. In this study, only the first two were used.

The determination of the membrane hydraulic cleanliness is based on the recovery of the water flux (WFR, **Equation 3**). This method is the most commonly used in academia and the only one that is easy to handle online on an industrial scale.

$$WFR = \frac{L_{p,post-cleaning}}{L_{p,Pristine\ Membrane}} \quad (\text{Equation 3})$$

With:

$L_{p,post-cleaning}$: the membrane permeance in DI water after fouling and cleaning at a given temperature T.

$L_{p, pristine\ membrane}$: the membrane permeance in DI water of the pristine and never fouled membrane at the same temperature T (**Equation 4**).

$$L_p = \frac{1}{\eta R_m} = \frac{J_p}{TMP} \quad (\text{Equation 4})$$

With:

L_p : the membrane permeance ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot bar^{-1}$ or $m \cdot s^{-1} \cdot Pa^{-1}$)

J_p : the permeate flux in DI water ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ or $m \cdot s^{-1}$)

TMP: the transmembrane pressure (bar or Pa)

R_m : the hydraulic resistance of the membrane (m^{-1}). R_m is an intrinsic characteristic of the membrane in a given solvent at a given temperature. For HFK-131 membranes, it was previously checked that R_m was roughly constant in the studied temperature range: 20-50°C

η : the viscosity of the permeate (Pa.s) which depends on the temperature

When $WFR \geq 0.90$, the so-called “hydraulic cleanliness” is reached. However, we have previously reported that the WFR was not systematically correlated to effective fouling removal [16,45,46,47]. The increase in water flux can sometimes be due to an increase in the hydrophilic/hydrophobic balance of the cleaned membrane with respect to the pristine one. This balance change can be obtained, for instance, by the adsorption of hydrophilic surfactants on the membrane. A $WFR \approx 2$ was previously reported [16] for a pristine and never fouled PES/PVP UF membrane cleaned with an anionic surfactant (SDS) without any membrane degradation. The irreversible adsorption of the active amphiphilic species was reported on a PES/PVP membrane during the development of a formulated biocide, whereas the removal of the same species was easy on a RO polyamide membrane [22].

A WFR greater than 1.00 can thus be due to (i) membrane degradation and pore size increase, (ii) hydrophilization of the membrane due to adsorption of ingredients more hydrophilic than the membrane itself, or (iii) a combination of the two previous ones. The rejection of milk proteins can help in evidencing degradation associated with pore size increase (no significant variations were evidenced during the present study). However, with respect to the pre-filtration achieved by the fouling, only advanced degradation can be evidenced from these rejections.

To overcome misinterpretations of WFR, the quantitative determination of residual protein fouling by ATR-FTIR has been previously proposed, knowing that the same tool is able to evidence significant chemical modification of the membrane polymers (see below).

3.4. How to prove membrane chemical cleanliness

The chemical cleanliness means that no residual compounds can be found on the membrane, neither milk proteins (that are the foulant at cleaning start) nor any ingredients of the cleaning solution. ATR-FTIR was used for this purpose.

3.4.1. Membrane characterization by ATR-FTIR

Fourier Transform Infra-Red achieved according to an Attenuated Total Reflection mode (ATR-FTIR) is a relevant technique to evidence polar and polarizable bonds belonging either to the membrane polymer (or its degradation products) or also to the fouling/cleaning solution components that are adsorbed, if any.

Spectra were registered with a FTIR Jasco 4100 spectrometer equipped with an ATR accessory (Miracle, diamond crystal ($n^{\circ}4$, **Figure 5**), single-reflection, an incidence angle of 45° , and running with the spectra manager software. The acquisition conditions were as follows: 128 scans, 2 cm^{-1} resolution, $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ range. The background was recorded in the air. Membrane samples were maintained on the crystal with a flat tip pressed at the maximum pressure.

Spectra were acquired on membranes (pristine, fouled, cleaned) that were carefully dried for several days in a desiccator under dynamic vacuum in order to avoid water bands at $\approx 3300\text{ cm}^{-1}$ and $\approx 1660\text{ cm}^{-1}$, this last one being in the region of interest when dealing with PVP and proteins/enzymes.

3.4.2. Proteins/enzyme quantification: cleaning efficiency

As enzymes are also proteins, it will be impossible to discriminate between residual enzymes and residual proteins of the initial fouling, but it is not a major issue. As a consequence, only the sum of proteins and Enzyme C (if any are used during cleaning) can be quantified.

Protein/Enzyme quantification was achieved according to the protocol reported in [16, 48]. The C=O band located close to 1658 cm^{-1} assigned to protein/enzyme amide I is superimposed to the C=O band of PVP, making quantification impossible when using this band. Consequently, quantification was based on the CN+NH amid II band located at 1536 cm^{-1} . The amide II band has no superimposition with those of the pristine membrane (**Figure 5**). Similarly, the PES band at 1237 cm^{-1} can be used as an internal standard with no superimposition with skim milk components. The quantification was obtained from the ratio of the absorbance at 1536 cm^{-1} ($H_{1536}^{\text{protein amide II}}$) to the one at 1237 cm^{-1} : (H_{1237}^{PES}):

$$H_{1536}^{\text{protein amide II}} / H_{1237}^{\text{PES}} = 0.0034 [P] + 0.0165 \quad (\text{Equation 5})$$

With:

H_x : the band height at $x\text{ cm}^{-1}$ that was measured with respect to a baseline selected in the $2240\text{-}2060$ flat range.

[P]: the proteins or proteins + enzyme concentration in $\mu\text{g.cm}^{-2}$ in the $1\text{-}350\text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$ range, $r^2=0.99$

For every membrane, several spectra were registered over the whole filtering area, and the given result is an average value (average of 3 values for 14 cm^2 coupons or of 9 values for 127 cm^2 flat membranes).



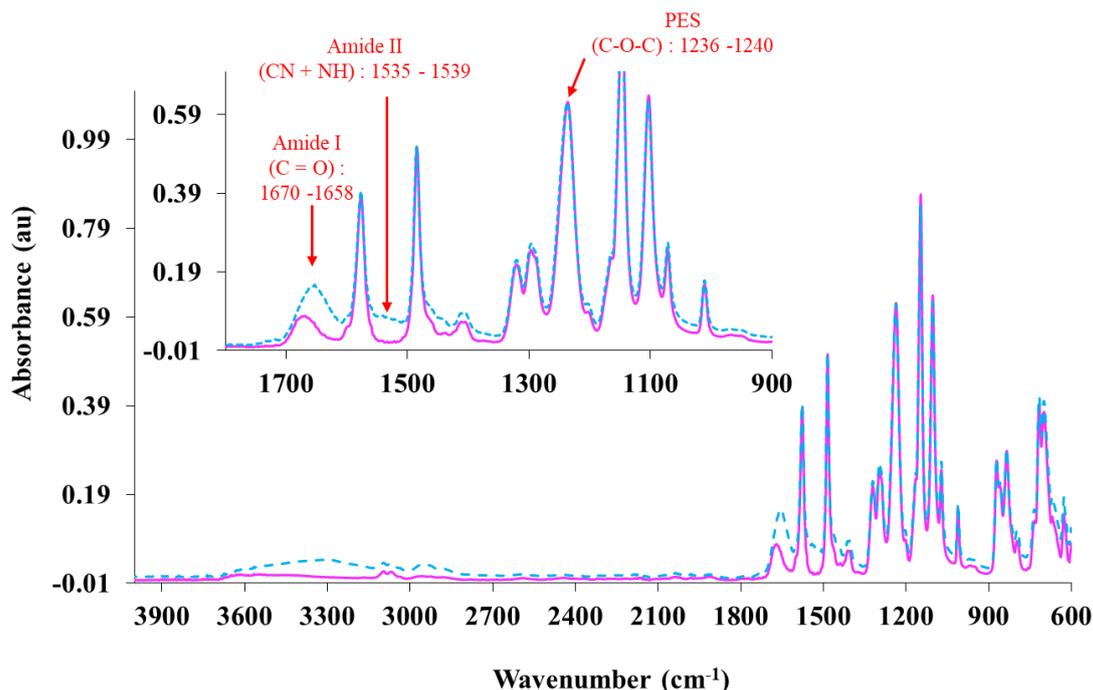
Spectrometer with a membrane coupon



ATR- accessory



Diamond Crystal.
1.8 mm diameter, 45° incidence angle,
single reflection



ATR-FTIR spectra = Fouling + active layer + Intermediate layer of the membrane

Figure 5. ATR-FTIR spectrometer and spectra highlighting the main used bands for protein/enzyme quantification. **Dashed line (blue)** = Fouled + DI water rinsed membrane, **Full line (Pink)** = Pristine membrane of reference.

3.4.3. Detergent ingredients adsorption: advanced chemical cleanliness

ATR-FTIR allowed to evidence the rinsing ability of the detergent ingredients when no additional bands that can be attributed to enzyme stabilizers, co-formulants, and/or the buffer are evidenced on the spectra besides the one due to proteins/enzymes.

Any additional bands appearing on a spectrum when compared to the pristine membrane could be suspected to correspond to this case. However, a careful study must be achieved in order to discriminate these new bands from the ones due to PES/PVP degradation (see results).

3.5. Membrane integrity

The membrane integrity can be considered at two complementary levels. One deals with the overall membrane 3D structure, roughly impacting the pore size and the flux. The second deals with the chemical integrity of the constituting polymers.

The membrane chemical integrity means that no degradation can be evidenced on the membrane material, neither the removal of one of the polymers (PES, PVP) nor the appearance of degradation tracers of them. Once again, ATR-FTIR was the relevant tool.

For instance, PVP was evidenced to be the weak point of the PES/PVP membranes exposed to NaOCl oxidation unintentionally achieved during the disinfection step following the chemical cleaning at industrial scale [43, 48]. As PVP and proteins' amide I bands are superimposed, an appropriate treatment of the raw spectra of the protein fouled membranes was proposed to highlight the chemical degradation of PVP, if any [48].

Such an analytical tool was not able to evidence if the pore radius evolved; that can be estimated from (protein) rejections if the size increased significantly (because of severe fouling, potentially screening slight variations, see above).

When dealing with integrity, the kinetics of potential degradation is a concern. At the detergent development scale, short-term integrity has to be checked. While promising prototypes emerge for which the short-term integrity is no longer a question, the long-term-integrity must be evaluated. Aiming at providing valuable answers to these different questions, several approaches have been followed.

3.5.1. Membrane short-term integrity: from one to four UF cleanings

PES/PVP membranes are well-known to be quite stable, either at high or low pHs [20]. However, very little is known about such membrane degradation except for NaOCl used either for the cleaning or the disinfection step, depending on the application fields [43,48,49, 50,51,52].

Roughly, the NaOCl induced degradation concerned first PVP, which tends to be removed from the membrane (with several intermediates such as carboxylic acid groups obtained after the ring opening or succinimide ones), all of which are evidenced from ATR-FTIR spectra, either by the disappearance of the PVP band or by changes in the 1660 cm^{-1} band profile.

To follow the PVP content in the presence of protein/enzyme fouling required an in-depth analysis of the C=O band, as reported in [48]. That is why a fundamental study involving pristine unfouled membranes was also necessary. A complementary procedure was proposed in the present study to rapidly highlight any change in the C=O band profile in the absence of adsorbed proteins/enzymes (enlargement, shoulder appearance at higher or lower wavenumbers compared to the one of the maximum of this large band, etc.), whatever the origin(s) of the modification. It consisted of the determination of the area of the overall C=O region between 1620 and 1720 cm^{-1} : any increase would show adsorption, while any decrease would be due to PVP degradation/removal (considering the same IR absorption/reflexion coefficient for all the C=O groups: PVP, carboxylic groups, and succinimide groups). When the area remained constant, to support the non-compensation between ingredients/adsorption and PVP departure, the displacement of the C=O region maximum absorbance above or below that of the pristine membrane could also be used, any change supporting the occurrence of an adsorption.

The second NaOCl induced degradation concerned the PES itself, with two main possible degradations: (1) the breakage of the sulfone groups leading to a sulfonate, and/or (2) the hydroxylation of the phenyl groups, both leading to the same new band located at 1030 cm^{-1} on ATR-FTIR spectra.

Literature reported that oxidation due to (i) free radicals generated in high amount in the NaOCl solution at pH 7-8 and/or (ii) anionic initiation at high alkaline pHs (11.5-12.5) could be responsible for these polymer degradations, but no radicals are supposed to form during cleaning with non-oxidant substances. However, even if no oxidant will be used during the enzymatic cleaning and even if the cleaning pH will be set at 10.5, particular attention has to be paid to the PVP and PES integrity. Our prior experiments have shown that no degradation of PES and PVP was evidenced by the stabilized enzyme for short-term cleaning (long-term cleaning has not been in-depth studied) [4]. As a consequence, if any degradation occurred during cleaning, the origin was mainly to be found in the matrix ingredients (or in synergetic effects between enzyme stabilizers and matrix ingredients).

3.5.2. Accelerated aging of PES/PVP Membranes under Microwave (MW) to evaluate long-term integrity

A methodology for accelerated ageing of PES/PVP membranes in NaOCl has been studied over the years by Rabiller-Baudry *et al.* [23,24,53]. This method involved a combination of NaOCl immersion and microwave (MW) irradiation to accelerate degradation reactions, knowing that membranes in DI water were not degraded in the same conditions under MW. This approach was inspired by synthesis MW acceleration from days to hours in organic chemistry laboratories [54,55].

The procedure used in this study for membranes ageing used a 23 L domestic microwave oven (Mandine) at 400 Watt and 2450 MHz pulsation (**Figure 6**). Following the optimized protocol used with NaOCl, the selected concentrations were 4 times the usual concentrations used in CIP (**Table 5**).

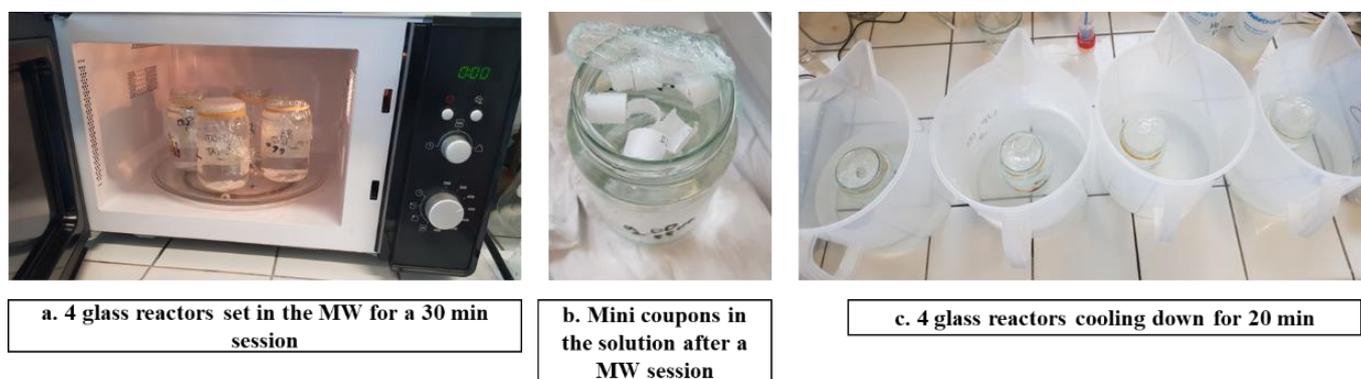


Figure 6: Some pictures during the process of accelerated ageing under MW

Each glass reactor was filled with a 350 mL solution and hosted 10 membrane mini coupons of 3 cm^2 each. It was covered with a plastic film resistant to MW and maintained with elastic rubber to limit evaporation. Every 30 min, the MW irradiation was stopped, and one mini coupon was sampled from the reactor and rinsed with DI water before drying for ATR-FTIR characterization. Then the reactor was left to cool down in a cold tap water basin for 20 min and reintroduced in the MW oven for the next 30 min treatment. This cycle was repeated so that the last remaining 3 coupons underwent a MW accelerated aging of 240 min in total.

Table 5. Experimental conditions applied to the accelerated ageing of flat membrane mini coupons (3 cm²) under 400 W MW. No enzyme, no buffer, no calcium (except specification)

Ingredient	Diluted matrix of Table 4	AM _{tot} of surfactant for the ageing experiment (g. L ⁻¹)	pH
DI Water		0	-
S1	#2M	0.75 x 4 = 3	5.78
Matrix D	#diluted D	0.75 x 4 = 3	5.70
Formule D-C2	# diluted D + Enzyme C at 0.20g.L ⁻¹	0.75 x 4 = 3	7.58
S2 + S3	#8M	0.29 x 4 = 1.16	10.02
S4	#9M	0.15 x 4 = 0.6	5.57
NaOCl 800 ppm natural pH= 11.3	nd	0	11.30
NaOCl 800 ppm pH = 8.0 *	nd	0	8.00*

*The NaOCl pH was adjusted by adding HCl.

The application of MW power in such a discontinuous mode, together with the presence of 4 glass reactors simultaneously in the oven, was meant to avoid a significant evaporation of the solution. The glass reactors were regularly weighted to check the actual evaporation.

4. Results and Discussions

After fouling with skim milk and DI water rinsing, the average amount of proteins was evidenced to be $31 \pm 9 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (n=108; see previous chapter & [4]). This is the fouling amount to remove by cleaning.

4.1. Cleaning efficiency in batch reactors at 50°C, pH 10.5

4.1.1. With Enzyme C in the presence of buffer

To evidence the efficiency of the stabilized enzyme alone, cleaning was achieved using an Enzyme C solution at 0.20 g. L⁻¹ in the presence of carbonate buffer at pH 10.5 either with fresh cleaning solutions or with cleaning solutions prepared 30 min before use or 60 min before use. After 15 or 30 min of cleaning, the residual amount of proteins/enzyme was $11 \pm 2 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (n=24) while it slightly decreased to $8 \pm 1 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (n=9) after 60 min cleaning.

The presence of 0.1 mmol. L⁻¹ CaCl₂ had no impact on the cleaning efficiency (see S2 supplementary, Table S2.1 for details).

4.1.2. With cleaning solutions (Enzyme C+ surfactant system + buffer + calcium)

The cleaning was achieved with every solution labeled from #1 to #7 and #10 to #14 of Table 4, aiming at the comparison of the efficiency of the stabilized enzyme alone or in the presence of the surfactant system.

Whatever the surfactant system, the residual amount of proteins/enzyme after 15 min of cleaning was lower than $5 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n=72$, **Table 6**), which was half the residual amount when cleaning was achieved only by the enzyme ($11 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=24$).

The removal efficiency was quite similar with $\text{AM}_{\text{tot}} = 0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $\text{AM}_{\text{tot}} = 0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the cleaning solution, evidencing that surfactant concentration could be significantly decreased. Accordingly, a decrease in the environmental impact can be expected; however, the exact evaluation of the surfactant impact by Life Cycle Assessment was out of the scope of this study.

All the surfactants used alone were shown to be efficient. Nevertheless, S2 and S3 seemed less efficient than the others. It must be underlined that initially S2 was selected for its detergency properties, but the #3C concentrated matrix (**Table 4**) was found to be unstable. To overcome this limitation, S3 was added to help solubilize S2 at a higher concentration. S3 was also tested alone for the sake of comparison. The S2+S3 combination at $\text{AM}_{\text{tot}} = 0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ was more efficient than when each one of the surfactants was used alone at the same AM_{tot} (**Table 6**).

Similarly, S4 was efficient, but the concentrated matrix #9C was found to be unstable. Once again, S3 was used to help with solubilization at a high concentration. The stability of the S3+S4 mixture leading to the #12C concentrated matrix (**Table 4**) was found satisfying. The cleaning efficiency of this mixture has not been evaluated.

Despite its efficiency, S5, the sole crypto-anionic & ethoxylated surfactant of the set, was removed from the selection due to stability challenges during prototype detergent formulations that have been encountered after this good efficiency evaluation.

Up to now, only simplified matrixes were used during the cleaning tests. Nevertheless, on an industrial scale, for the sake of long-term stability and to overcome potential poor water quality, other ingredients such as chelating agents, inhibitors, etc. have to be added.

Aiming at a quick answer, the same cocktail of additional ingredients as the one existing in Matrix D was added to all the cleaning solutions to prepare full detergents. The obtained mixtures were called Formula D when the surfactant was S1, Formula A when the surfactant mixture was S2+S3, Formula V with S4, and Formula G with S4+S3.

Table 6 gives the remaining proteins after 15 min cleaning in batch reactors and evidences the high efficiency of all these Formulas, even if the results appeared a little less good than without the additional ingredients. This suggested that the reformulation of these additional ingredients could be a next objective, but it was out of the scope of the present study.

The test with half the amount of enzyme and half the amount of surfactant (Formula A/2-C2/2) evidenced promising high efficiency, close to the one reached with a commercial formulated alkaline detergent at pH 12.4 that led to proteins/enzyme residual amount of $5 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n=6$) (**Table 6**).

Finally, it can be concluded that S1, S2+S3, and S3+S4 surfactant systems appeared to be promising for formulations. As a complement, it was checked that the S2+S3 and S3+S4 systems were not efficient enough when used alone and that the presence of the enzyme was mandatory in batch reactors (**Table 6**), contrary to S1, which was sufficiently efficient by itself. However, S1 exhibited some drawbacks with respect to membrane integrity (see below).

As only S1, S2, and S3 are currently on the French Positive List of products authorized for the cleaning of surfaces in contact with food, the next step consisting of cleaning evaluation in UF conditions only focused on these surfactants.

Table 6: Residual proteins/enzyme after 15 min cleaning of fouled membrane **in batch reactors** at 50°C. The cleaning solutions contained the surfactants detailed in Tables 3 & 4 + Carbonate Buffer (pH 10.5). Enzyme is only present in simplified and full detergents. Additional matrix ingredients are only present in full detergents.

Label of the solution	Surfactants Code	AM _{tot} in cleaning solution (g. L ⁻¹)	Residual Skim milk Proteins + Enzyme (µg. cm ⁻²)
Reference fouled membrane			
DI Water	<i>Not applicable</i>	0	31 ± 9 (n=108)
Buffer			
Carbonate buffer	-	0	15 ± 1 (n=6)
Surfactant cleaning + Buffer - (no enzyme)			
#2M + buffer	S1	0.75*	0 ± 1 (n=9)
#8M+ buffer	S2 + S3	0.10/0.19 → 0.29	14 ± 2 (n=6)
#12M+ buffer	S3+S4	0.13/0.15 → 0.28	12 ± 2 (n=6)
Simplified enzymatic detergents (surfactants + buffer + 0.20 g. L⁻¹ enzyme + 0.1 mmol. L⁻¹ CaCl₂)			
#1	S1	0.25	0 ± 3 (n=6)
#2	S1	0.75	0 ± 3 (n=9)
#3	S2	0.25	3 ± 2 (n=9)
#4	S2	0.75	3 ± 2 (n=6)
#5	S3	0.25	5 ± 2 (n=6)
#6	S3	0.75	3 ± 1 (n=6)
#7	S2 + S3	0.10/0.15 → 0.25	0 ± 2 (n=6)
#8	S2 + S3	0.10/0.19 → 0.29	nd
#9	S3	0.15	nd
#10	S4	0.25	1 ± 2 (n=6)
#11	S4	0.75	0 ± 1 (n=6)
#12	S3+S4	0.13/0.15 → 0.28	nd
#13	S5	0.25	0 ± 1 (n=6)
#14	S5	0.75	0 ± 1 (n=6)
Enzymatic full detergents (surfactants + buffer + 0.20 g. L⁻¹ enzyme + additional matrix ingredients)			
Formula D-C2 (#2 + ingredients)	S1	0.75	1 ± 1 (n=6)
Formula A-C2 (#8 + ingredients)	S2+S3 0.10/0.19	0.29	3 ± 1 (n=6)
Formula A/2-C2/2** (½ #8 + ingredients)	S2+S3*** 0.05/0.10	0.15	4 ± 1 (n=6)
Formula V-C2/2** (#10 + ingredients)	S4	0.25	3 ± 2 (n=6)
Formula G-C2 (#12+ ingredients)	S3+S4 0.13/0.15	0.28	2 ± 2 (n=6)
Alkaline formulated detergent			
Deptal UFL1			5 ± 2 (n=6)

*+ 0.1 mmol. L⁻¹ CaCl₂

** Enzyme was at C2/2 = 0.10 g. L⁻¹ concentration instead of 0.20 g. L⁻¹ in all other solutions

***S2+S3 with the same proportion as in #8M, but overall concentration divided by two Formula D: S1 surfactant; Formula A: S2+S3 surfactants; Formula V: S4 surfactant; Formula G: S4+S3

4.2. Transposition to flat UF: cleaning with full detergents

Cleaning of fouled flat membranes was achieved in UF conditions. Only two surfactant systems were studied: S2+S3 with an $AM_{tot} = 0.29 \text{ g. L}^{-1}$ and S1 at $AM_{tot} = 0.75 \text{ g. L}^{-1}$ for the sake of comparison (the surfactant system of Matrix D was used as the reference).

Aiming at a quick answer for further industrial applications, prototype detergents made with full matrixes were directly tested (Table 7). This means that additional ingredients (chelating agents, inhibitors, etc.) were added to the cleaning solutions. This added cocktail was the same as the one in full Matrix D used as the reference.

Hereafter, the full detergent containing the S1 system was denoted Formula D, whereas the one containing S2+S3 was denoted Formula A. When the enzyme concentration was $C2 = 0.20 \text{ g. L}^{-1}$, the notation was Formula (A or D)-C2. When the surfactant concentration was divided by 2 without any other modification (same additional ingredients at the same concentration), the notation was Formula A/2-C2. When the enzyme concentration was also divided by two, the notation was Formula A/2-C2/2. All cleanings were achieved in the presence of a carbonate buffer.

As expected from batch reactor experiments, cleaning with Formula A-C2 and Formula D-C2 were very efficient at removing proteins. An attempt to simultaneously divide by two the surfactant amount and the enzyme (Formula A/2-C2/2) with the S2+S3 system gave similar protein removal (Table 7). However, the water flux recovery after cleaning & rinsing were very different and systematically greater than 1.0. Such behavior had to be studied in-depth for understanding.

Formula D-C2 (Table 8) was used to clean skim milk fouled membranes just once (2 membranes) or for 3 fouling & cleaning consecutive cycles (1 membrane). First, the protein retention remained stable at $96 \pm 1\%$ over the different fouling & cleaning cycles (Table 8). Second, the residual proteins on membranes were similar after one and 3 cycles, close to $2 \pm 1 \mu\text{g.cm}^{-2}$.

This suggests that neither the skim milk proteins nor the enzymes did not accumulate on the membrane over time. Finally, the WFR did not vary significantly over the 3 consecutive cycles, remaining close to $WFR = 2.5 \pm 0.4$.

Table 8: Reproducibility of protein retention and protein/enzymes residual throughout three cycles of flat membrane cleaning (60 min / cycle) with Enzymatic full detergent Formula D-C2 (surfactants + buffer + 0.20 g. L^{-1} enzyme + additional matrix ingredients) in UF conditions at 50°C .

$$WFR = L_{p, \text{post-cleaning}} / L_{p, \text{pristine membrane}}$$

Label of the solution	Protein retention (%)	Residual protein/enzyme after final cleaning ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	Average WFR on “n” consecutive fouling & cleaning
DI water		$31 \pm 9^*$ (108 spectra)	0.37 ± 0.16 (n=1) (21 membranes)
		nd	0.25 ± 0.04 (n=1 to n=3) (3 membranes)
Formula D-C2	97 ± 1	1 ± 2 (18 spectra)	2.4 ± 0.4 (n=1) (3 membranes)
	96 ± 1	nd	2.5 ± 0.6 (n=2) (1 membrane)
	97 ± 1	1 ± 1 (9 spectra)	$2.7 \pm ?$ (n=3) (1 membrane)

*Only fouling & DI water rinsing; no enzymatic nor chemical cleaning

Table 7: Residual proteins/enzyme after 60 min cleaning of the fouled membrane **in UF conditions** at 50°C. The cleaning solutions systematically contained the surfactants detailed in Tables 3 & 4 + Carbonate Buffer (pH 10.5). Enzyme is present in both simplified and full detergents. Additional matrix ingredients are only present in full detergents. $WFR = L_{p,post-cleaning}/L_{p,pristine\ membrane}$

Label of the solution	Surfactants Code	AM _{tot} in cleaning solution (g.L ⁻¹)	Residual Skim milk Proteins + Enzyme (µg.cm ⁻²)	WFR
Reference fouled membrane				
DI Water	Not applicable	0	31 ± 9 (n=108)	0.37 ± 0.16 (n=21 membranes)
Buffer				
Carbonate buffer			nd	nd
Surfactant cleaning + Buffer -(no enzyme)				
#2M + buffer	S1	0.75*	nd	nd
#8M+ buffer	S2 + S3	0.10/0.19 → 0.29	nd	nd
#12M + buffer	S3+S4	0.13/0.15 → 0.28	nd	nd
Simplified enzymatic detergents (surfactants+ buffer + 0.20 g. L⁻¹ enzyme + 0.1 mmol.L⁻¹ CaCl₂)				
#1	S1	0.25	nd	nd
#2	S1	0.75	nd	nd
#3	S2	0.25	nd	nd
#4	S2	0.75	nd	nd
#5	S3	0.25	nd	nd
#6	S3	0.75	nd	nd
#7	S2 + S3	0.10/0.15 → 0.25	nd	nd
#8	S2 + S3	0.10/0.19 → 0.29	nd	nd
#10	S4	0.25	nd	nd
#11	S4	0.75	nd	nd
#12	S3+S4	0.13/0.15 → 0.28	nd	nd
#13	S5	0.25	nd	nd
#14	S5	0.75	nd	nd
Enzymatic full detergents (surfactants + buffer + 0.20 g. L⁻¹ enzyme + additional matrix ingredients)				
Formula D-C2 (#2 + ingredients)	S1	0.75	0 ± 2 (n= 18)	2.2 ± 0.4 (n=2 membranes)
Formula A-C2 (#8 + ingredients)	S2+S3 0.10/0.19	0.29	0 ± 2 (n=9)	2.0 (n=1 membrane)
Formula A/2-C2/2** (½ #8 + ingredients)	S2+S3*** 0.05/0.10	0.15	1 ± 1 (n=9)	1.6 (n=1 membrane)
Formula V-C2/2** (#10 + ingredients)	S4	0.25	nd	nd
Formula G-C2 (#12+ ingredients)	S3+S4 0.13/0.15	0.28	nd	nd
Alkaline formulated detergent				
Deptal UFL1			nd	nd

*+ 0.1 mmol. L⁻¹ CaCl₂

** Enzyme was at C2/2 = 0.10 g. L⁻¹ concentration instead of 0.20 g. L⁻¹ in all other solutions

***S2+S3 with the same proportion as in #8M, but overall concentration divided by two Formula D: S1 surfactant; Formula A: S2+S3 surfactants; Formula V: S4 surfactant; Formula G: S4+S3

4.3 Transposition to the spiral membrane: fouling & cleaning up to 53 h in enzymatic detergents

The spiral membrane was used for ten UF of skim milk with intermediate alkaline cleanings, either with Ultrasil 10® or Deptal UF L1®. From UF n°1 to UF n°10, the behavior in skim milk was similar (**Figure 7**), despite up to 75 h in cleaning solutions (cumulative time). The average retention of proteins was 95 ± 1 % over these experiments, while the membrane permeance at plateau value (4 bar) was 15 ± 2 L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹ at 50°C and the one in water after cleaning remained at 55 ± 5 L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹ at 50°C (July 2013 - October 2023, **Figure 8**).

The membrane was then cleaned during 4 supplementary hours in alkaline conditions and 6 h with Formula A-C2 before UF n°11, followed by 1 h enzymatic cleaning with the same solution. Then UF n°12 and UF n°13 were achieved in the same conditions, except that the enzymatic cleaning was made using Formula A/2-C2/2 and Formula D-C2, respectively. The behavior in skim milk remained unchanged (**Figure 7**) as well as the protein retention, while the membrane permeance in water after cleaning increased to 65 ± 5 L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹ at 50°C (**Figure 8**).

WFR reached up to 1.4 with the spiral membrane cleaned by Formula A-C2, which was lower than values reached with Formula D-C2 with flat membranes. This could be either due to the surfactant system change and/or to the membrane area to cleaning solution volume ratio moving from $4 \text{ L}/127 \text{ cm}^2 = 315 \text{ L.m}^{-2}$ (flat membrane) to $25 \text{ L}/6.8 \text{ m}^2 = 3.7 \text{ L.m}^{-2}$ (spiral membrane), this last proportion favoring less adsorption than the first one.

Because the WFR was greater than 1, it was decided to clean the membrane with alkaline detergent to check the water flux behavior, expecting the desorption of surfactant if any; however, no significant impact was evidenced on the membrane permeance (**Figure 9**). Nevertheless, the use of enzymatic cleaning appeared validated for at least 53 h of contact between the membrane and the enzymatic detergents, of which 51 h were with Formula A-C2. The next step might be a test in industrial conditions.

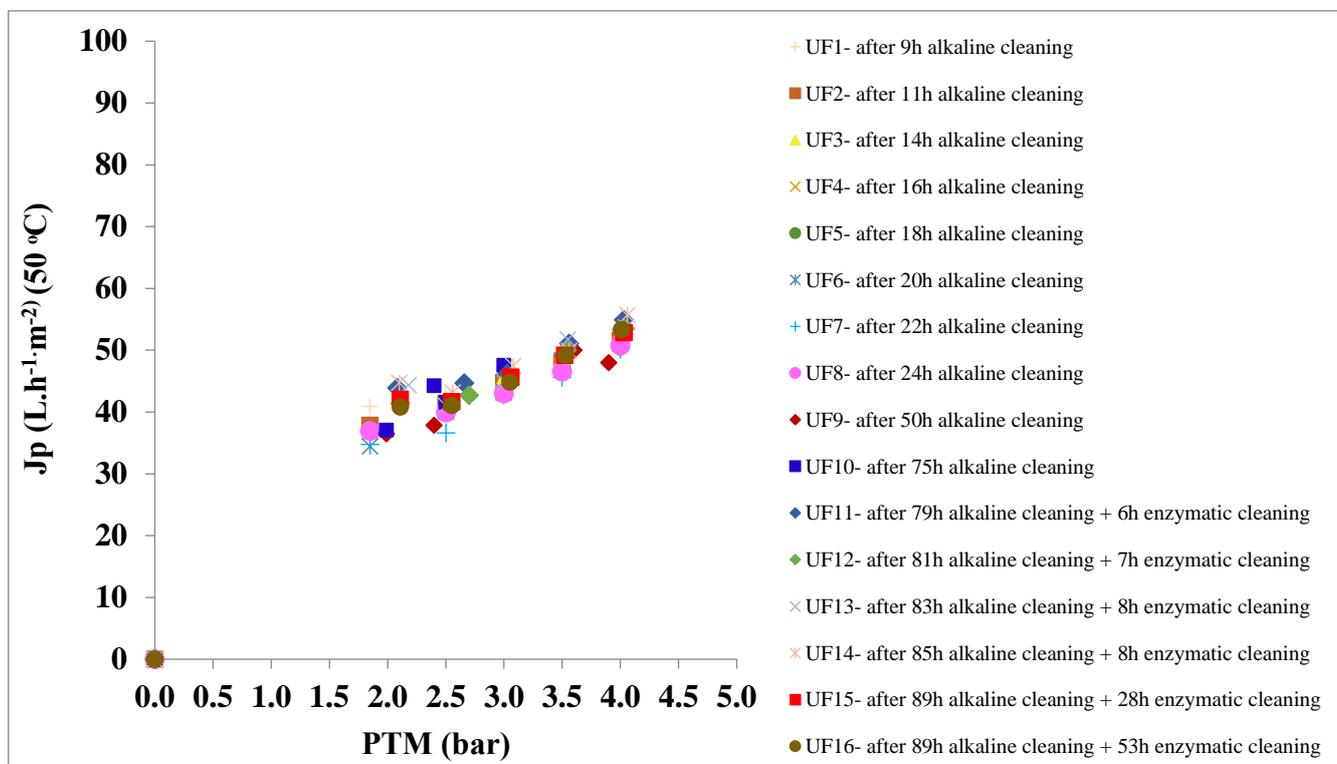


Figure 7: Skim milk UF conducted after several hours in cleaning solutions (alkaline and/or enzymatic; cumulative duration) with the S-CIP4 spiral membrane (6.8 m², HFK-131, Koch). Cleaning with enzymatic detergent Formula A-C2 for a cumulative duration of 51 h was achieved between UF11 and UF16.

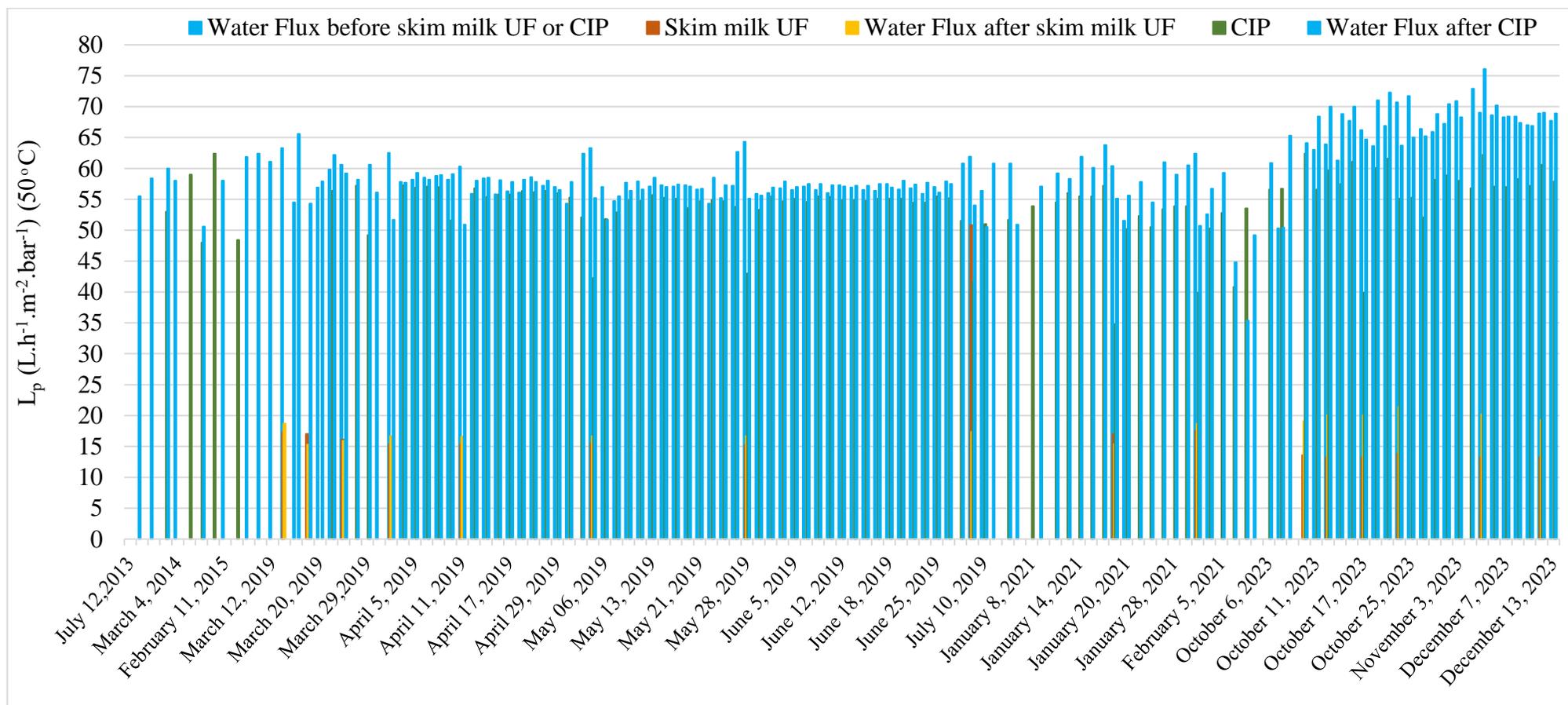


Figure 8. History of permeances on the spiral wound membrane S-CIP-4 (6.8 m^2 , HFK-131, Koch) since its installation in July 2013 up to December 2023. All CIP are given in green without any detail about the used detergent. Over July 2013 - October 2023, $L_{p_{\text{water}}} = 55 \pm 5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$ at 50°C . October 10, 2023, is the first cleaning with enzymatic detergents. Over October 2023 - December 2023, $L_{p_{\text{water}}} = 65 \pm 5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$ at 50°C .

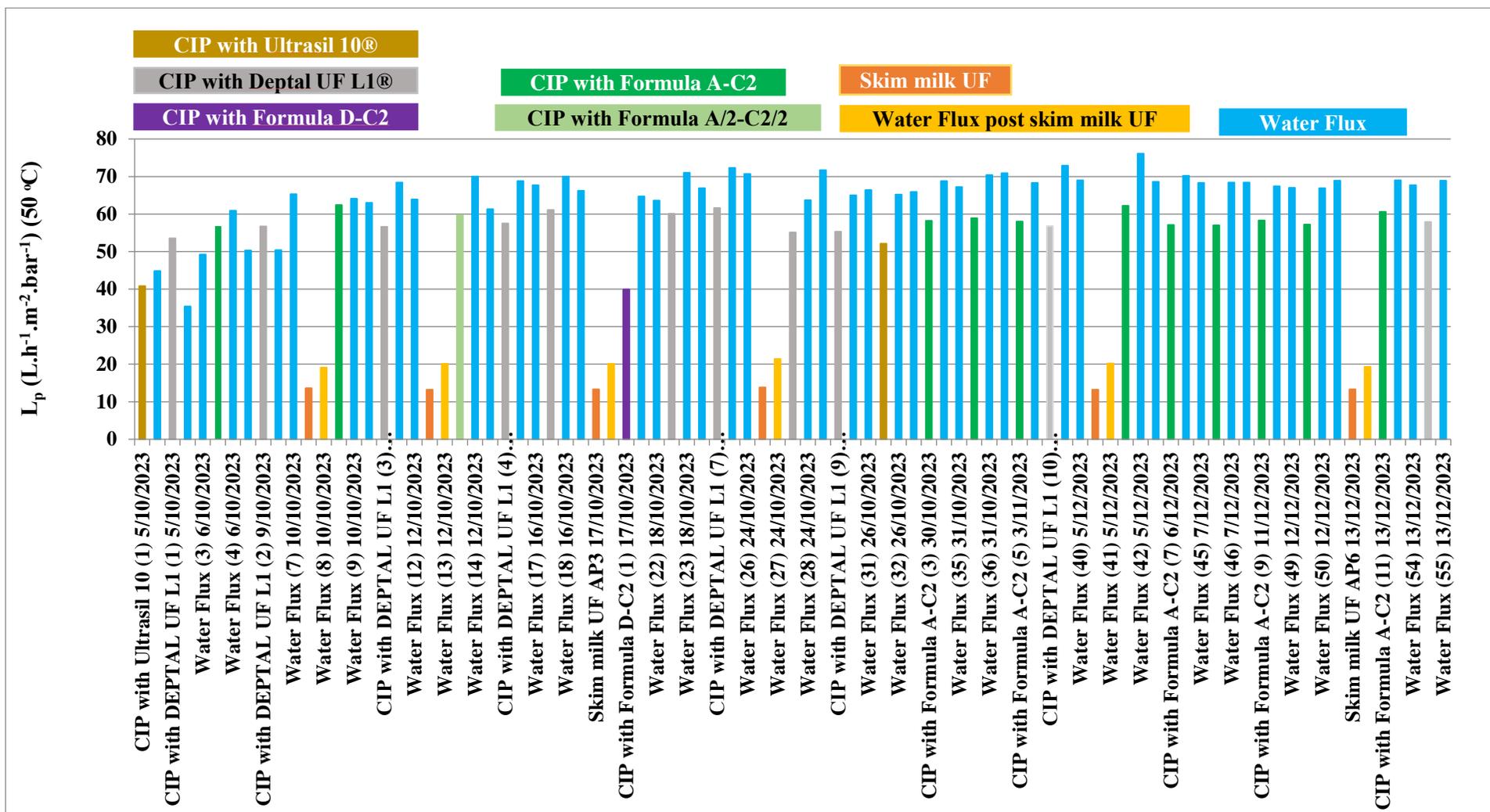


Figure 9. Focus on the permeances monitoring on the spiral wound membrane S-CIP-4 (6.8 m², HFK-131, Koch) during the enzymatic cleaning validation study. Skim milk UF was from UF n°11 to UF n°16. Over October 2023 - December 2023, $L_{p\text{water}} = 65 \pm 5 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2.\text{bar}^{-1}$ at 50°C.

4.4. Quid of the membrane integrity? Analysis of flat cleaned pristine membranes

4.4.1. Impact of the surfactants on the water flux recovery

To better understand the flux behavior and simplify the membrane analysis, cleaning of pristine and never fouled membranes was achieved. **Table 9** depicts that the WFR was lower than 1.0 after cleaning the pristine membrane with the carbonate buffer, while it was greater than 1.0 in all other cases. Accordingly, carbonate did not modify the membrane hydrophilicity, while surfactants systematically induced a flux increase. A similar conclusion can be drawn with the enzyme C; however, we thought that the origin of the flux increase would be in the stabilizers, more probably than the enzyme itself.

Note that the WFR were greater than the ones reached with the fouled & cleaned membranes (**Table 8**) and that the WFR did not increase with the number of cleaning cycles (up to 3 or 4).

4.4.2. Ingredients adsorption evidenced by ATR-FTIR

A systematic ATR-FTIR analysis of the membranes has been made for a better understanding.

One way to track down the ingredients' adsorption is to evidence the existence of new bands on the ATR-FTIR spectra that must, of course, be distinguished from degradation products of the membrane.

First, an easy way to evidence the adsorption of organic ingredients on the membrane is to follow new bands located close to 2925 cm^{-1} that could be attributed to the stretching of their C-H bonds (C sp^3 , **Figure 10 & Figure 11**).

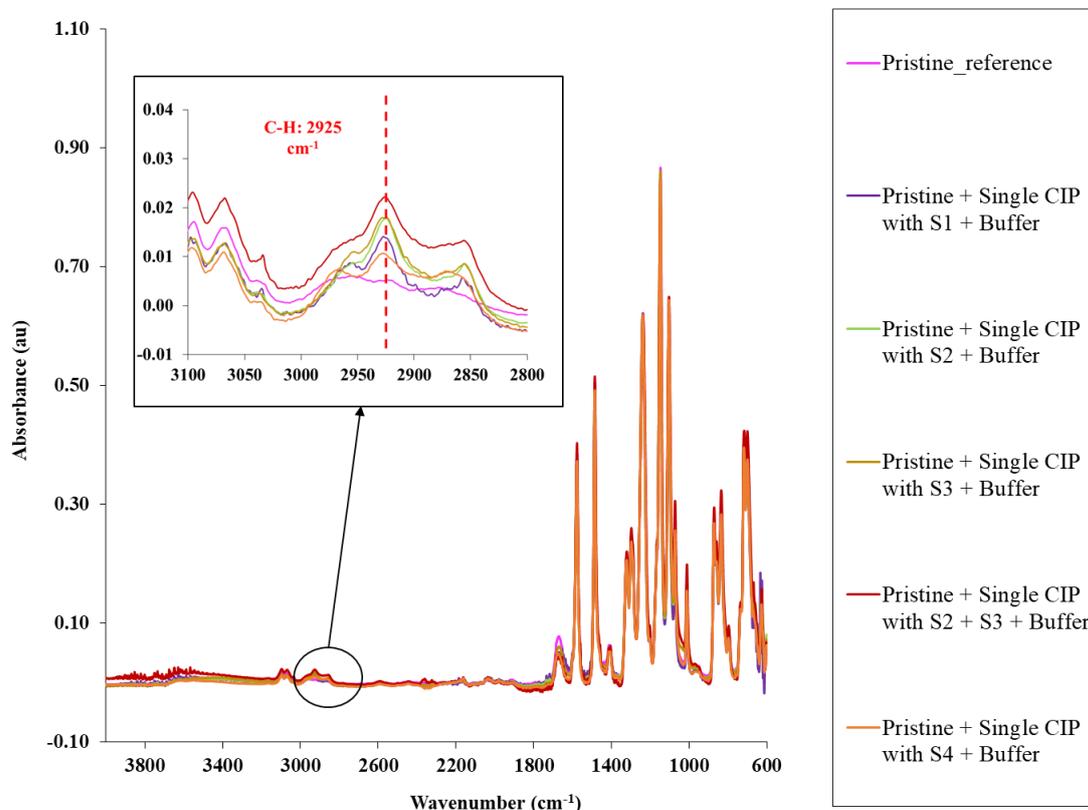


Figure 10. ATR-FTIR Spectra of pristine PES/PVP membranes showing C-H bonds adsorption around 2925 cm^{-1} after a single CIP with surfactants solutions + DI water rinsing.

Table 9: Flux behavior after 60 min of cleaning pristine and never fouled flat membranes in UF condition at 50°C with the surfactants detailed in Table 3. Enzyme is present in both simplified and full detergents. Additional matrix ingredients are only present in full detergents. $WFR = L_{p,post-cleaning}/L_{p,pristine\ membrane}$

Label of the solution	Surfactants Code	AM _{tot} in cleaning solution (g.L ⁻¹)	Average WFR on “n” consecutive cleanings
Reference pristine membrane			
DI water	Not applicable	0	0.99 ± 0.02 (n=4)
Buffer at pH= 10.5			
Carbonate buffer	Not applicable	0	0.83 ± 0.05 (n=4)
Enzyme C2+ buffer			1.70 (n=1)
Surfactants - (no buffer, no enzyme)			
#2M	S1	0.75	3.13 ± 0.11 (n=4)
Surfactants + Buffer (no enzyme)			
#2M + buffer	S1	0.75	3.00 ± 0.10 (n=4)
#3M +buffer	S2	0.25	1.17 ± 0.01 (n=4)
#5M +buffer	S3	0.25	0.88 ± 0.01 (n=4)
#10M+buffer	S4	0.25	1.66 ± 0.04 (n=4)
#8M + buffer	S2 + S3	0.10/0.19 → 0.29	nd
#7M+buffer	S2 + S3	0.10/0.15 → 0.25	1.23 ± 0.02 (n=4)
#12M+ buffer	S3+S4	0.13/0.15 → 0.28	nd
Simplified enzymatic detergents (surfactants+ buffer + 0.20 g.L⁻¹ enzyme)			
#1	S1	0.25	nd
#2		0.75	nd
#3	S2	0.25	nd
#4		0.75	nd
#5	S3	0.25	nd
#6		0.75	nd
#7	S2 + S3	0.10/0.15 → 0.25	nd
#8		0.10/0.19 → 0.29	nd
#10	S4	0.25	nd
#11		0.75	nd
#12	S3+S4	0.13/0.15 → 0.28	nd
#13	S5	0.25	nd
#14		0.75	nd
Matrix D (#2M+buffer+ingredients)			1.53 (n=1)
Enzymatic full detergents (surfactants+ buffer + 0.20 g. L⁻¹ enzyme + additional matrix ingredients)			
Formula D-C2 (#2 + ingredient)	S1	0.75	4.00 ± 1.07 (n=1, but 2 membranes)
Formula A-C2 (#8 + ingredients)	S2+S3 0.10/0.19	0.29	nd
Formula A/2-C2/2** (½ #8 + ingredients)	S2+S3*** 0.05/0.10	0.15	nd
Formula V-C2/2** (#10 + ingredients)	S4	0.25	nd
Formula G-C2 (#12+ ingredients)	S3+S4 0.13/0.15	0.28	nd

** Enzyme was at C2/2 = 0.10 g. L⁻¹ concentration instead of 0.20 g. L⁻¹ in all other solutions –

***S2+S3 with the same proportion as in #8M, but overall concentration divided by two -

Formula D: S1 surfactant; Formula A: S2+S3 surfactants; Formula V: S4 surfactant; Formula G: S4+S3 –

Regardless of the cleaning solution, ingredients adsorption was evidenced (**Figure 11**).

Moreover, no significant difference was depicted between single and quadruple CIP, and no correlation was obtained with the WFR (**Figure 12**), in good accordance with the literature [16,45,46,47]. Nevertheless, all solutions leading to $WFR \geq 2$ contained the S1 surfactant, which was the sole being in zwitterion form; its positive charge could be attracted by the negatively charged membrane.

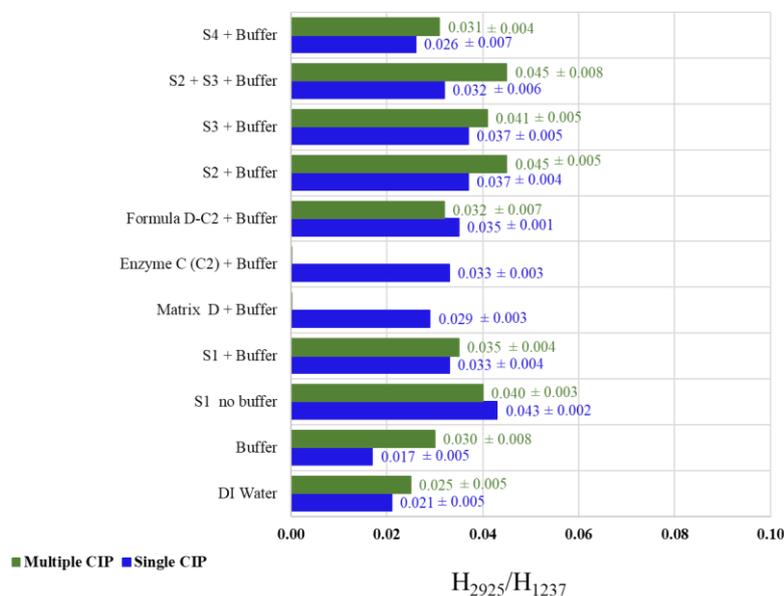


Figure 11. Evolution of the absorption of ingredients having C-H bonds located at 2925 cm^{-1} , evidencing their presence on the pristine membrane after single and multiple CIP with solutions of individual ingredients (surfactants, buffer, enzyme), Matrix D, and the prototype detergent Formula D-C2. A DI water rinsed pristine membrane was used as the reference.

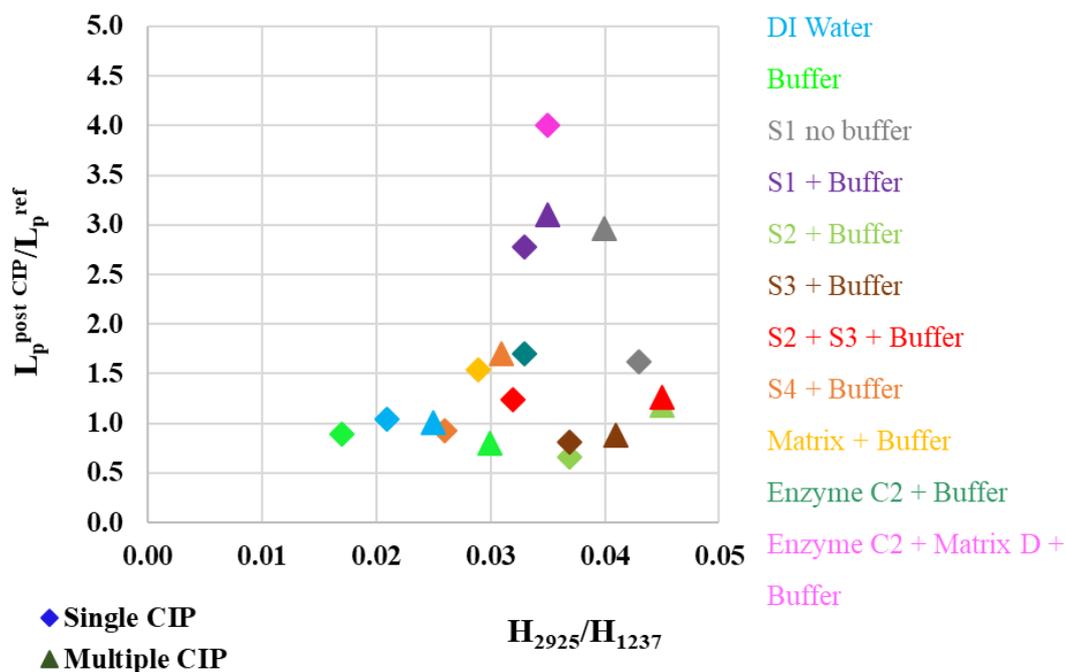


Figure 12. WFR of pristine membrane as a function of C-H adsorption (2925 cm^{-1}) after single and quadruple CIP series with solutions of carbonate buffer, Matrix D, Enzyme C (C2), Formula D-C2, Surfactants S1, S2, S3, S2+S3, S4, and DI water.

To trace the adsorption of ingredients containing C=O bonds, such as carboxylate, for instance, an easy way can be to observe the displacement of the wavenumber at maximum absorbance ($\bar{\nu}_{\max}$), which could decrease to a lower value than the one due to PVP close to 1669 cm^{-1} . **Figure 13** & **Figure 14** evidenced no variation except with cleaning solutions containing S1, for which the band was clearly enlarged.

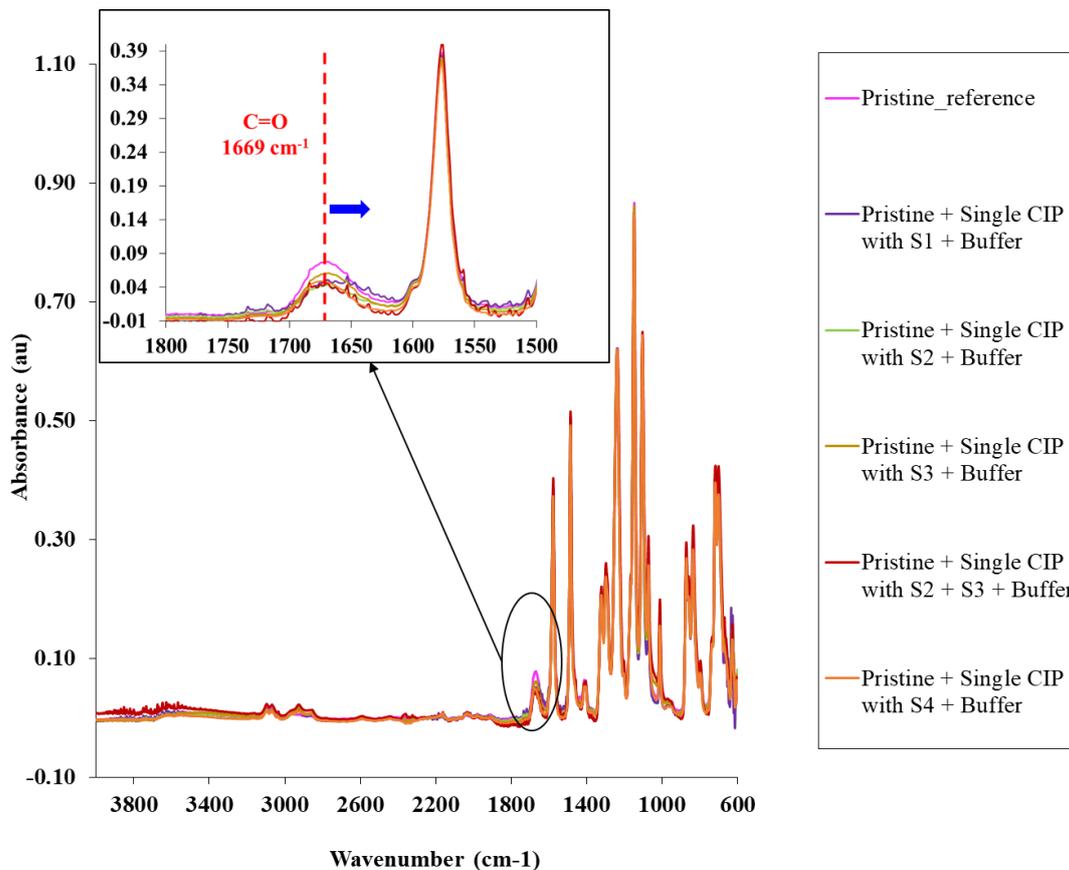


Figure 13. ATR-FTIR Spectra showing the C=O band region of PES/PVP pristine membranes after a single CIP with different surfactants' solutions

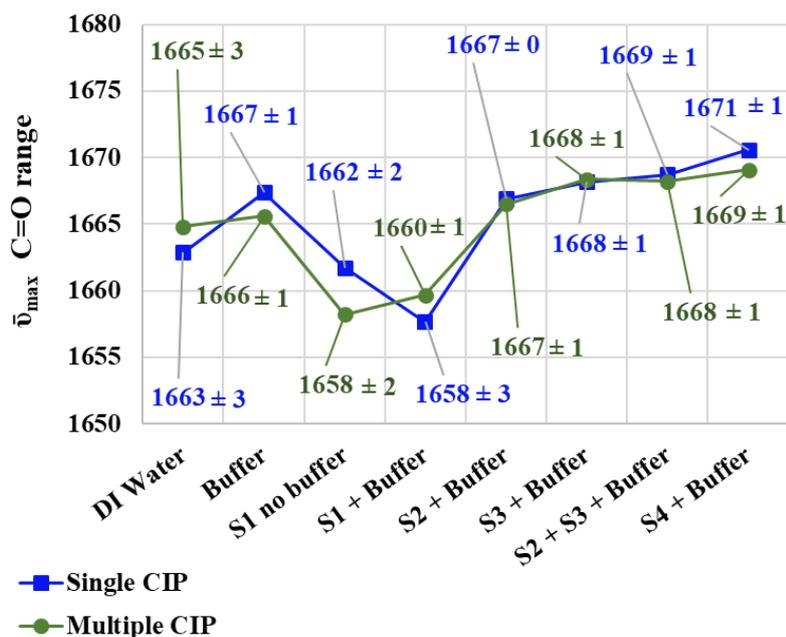


Figure 14. $\bar{\nu}_{\max}$ of the C=O band after single and multiple CIP on pristine PES/PVP membranes. A DI water rinsed membrane was used as the reference.

4.4.3. Impact of surfactants on the membrane chemical integrity

To appreciate the removal (if any) of PVP can be tricky when the C=O band accounts both for PVP and for ingredients' adsorption (**Figure 15**). On the contrary, integration of the band over the 1720-1620 cm^{-1} range gave nice information at first sight (**Figure 16**). Any decrease in this area unambiguously evidenced PVP removal, as for S1. However, buffer adsorption (HCO_3^-) was able to partly compensate for the absorption decrease (S1+buffer). This suggested that S2 and S4 were also able to partly remove PVP. However, the PVP removal was the same after one to four cleanings, suggesting a stabilization of the membrane after the first cleaning.

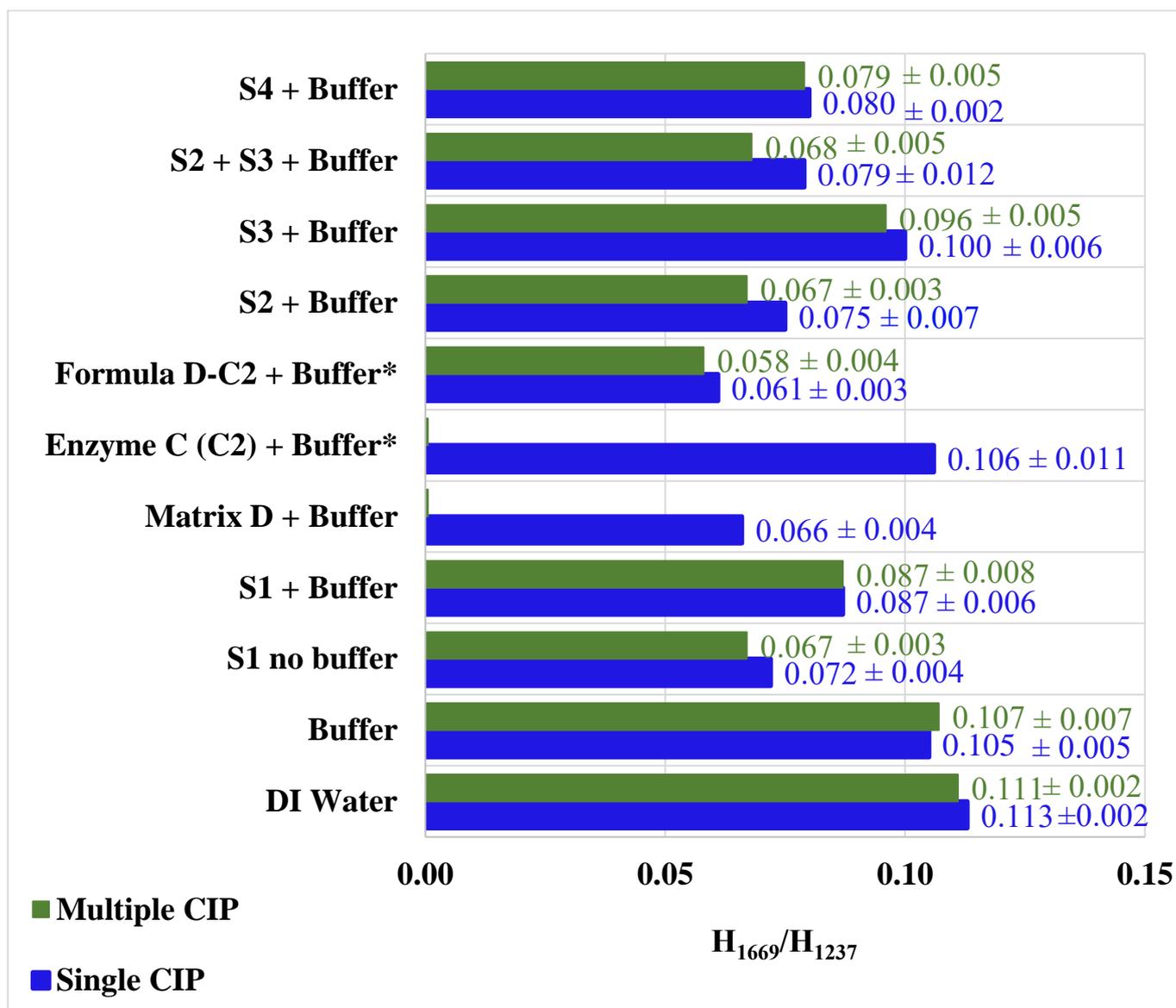


Figure 15. Evolution of the C=O band located close to 1669 cm^{-1} of the pristine PES/PVP membranes after single and multiple CIP with individual ingredients (surfactants, enzyme, buffer, and DI water), Matrix D, and Formula D-C2. A DI water rinsed pristine membrane was used as the reference. Note that residual PVP = Treated signal = H_{1669}/H_{1237} Raw signal - 0.87 x H_{1536}/H_{1237} Raw signal, according to [48].

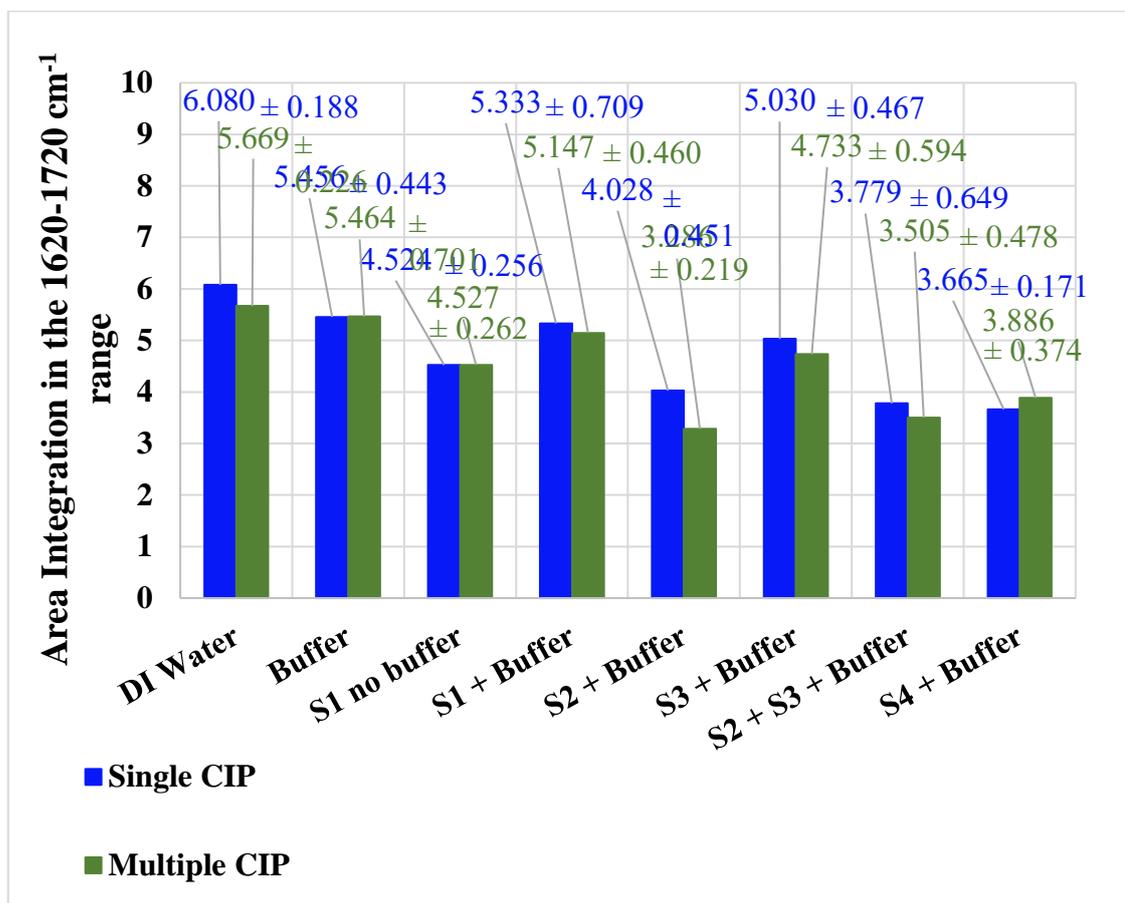


Figure 16. ATR-FTIR Area integration in the 1620 -1720 range /1236 -1237 cm^{-1} of pristine PES/PVP membranes after single and four CIP with individual ingredients (surfactants, buffer, DI water). A DI water rinsed pristine membrane was used as the reference.

The membrane performances would not be affected after this first removal, in good agreement with the flux behavior and protein retention stability observed with the spiral membrane (see above and **Figure 7**). Except for the band at 2925 and the one at 1669 cm^{-1} , no new band was observed on the spectra. As expected, in the absence of oxidants, no new band was evidenced at 1030 cm^{-1} due to the PES oxidation. So far, surfactants seem not to be able to degrade the PES like NaOCl did.

4.4.4. Long-term: Micro-wave ageing acceleration (coupons)

Micro-wave activation was previously used to accelerate membrane ageing induced by NaOCl. The same approach has been used to track long-term degradation due to the enzymatic detergent ingredients, if any. For this purpose, six solutions were selected for this study, besides NaOCl, for the sake of comparison (**Table 6**).

First, the evaporation of the solutions was followed up during the process and was found to be lower than 9% as an average after 240 min under microwaves at 400 W. Accordingly, the solution compositions were roughly constant over the experiment duration.

4.4.5. Organic ingredients adsorption

As already discussed above, organic ingredients from detergents were adsorbed on the aged membranes, as evidenced by the new band at 2925 cm^{-1} (**Figure 17** & **Figure 18**).

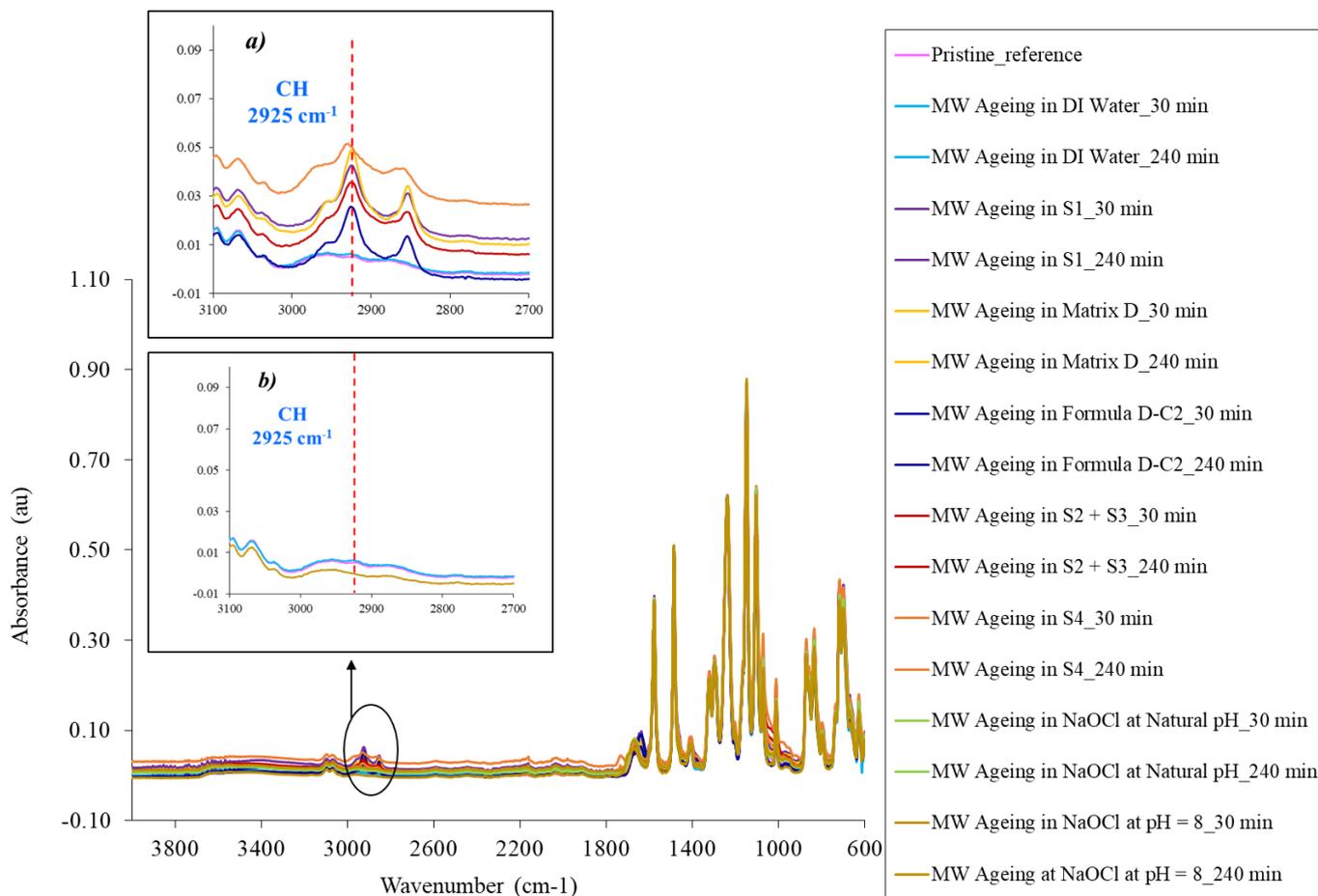


Figure 17. Adsorption of C-H bonds traced close to 2925 cm^{-1} band on pristine PES/PVP membranes (HFK-131) mini coupons ATR-FTIR spectra after accelerated ageing in a) surfactants containing solutions, b) NaOCl (pH=8), DI water under MW (t=30 -240 min)

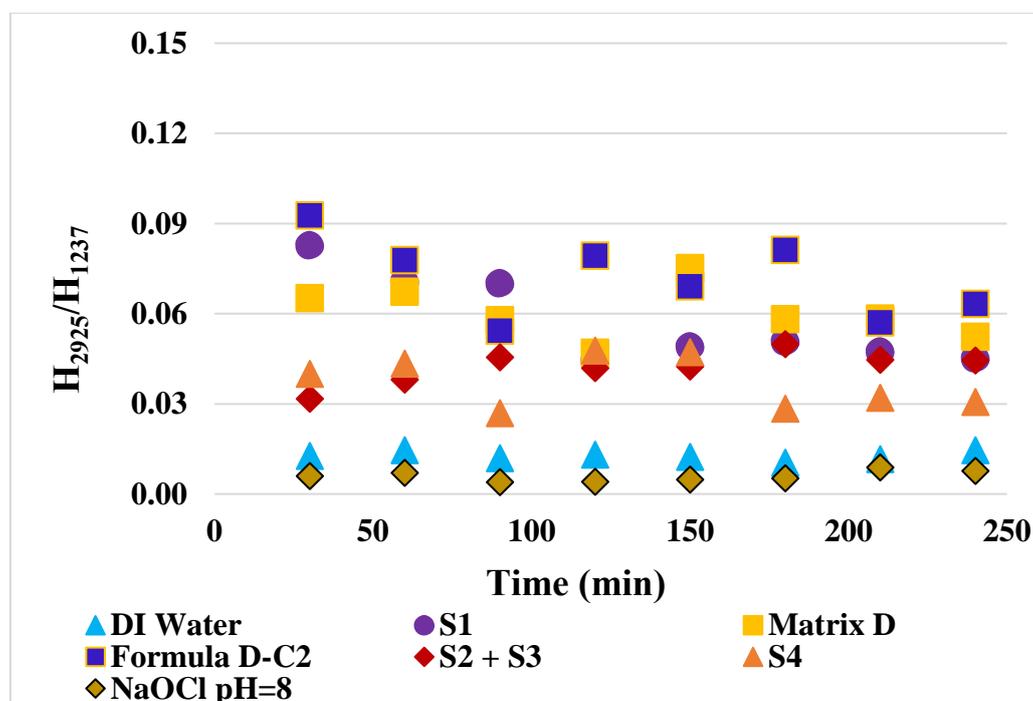


Figure 18. Adsorption of organics containing C-H bonds on pristine PES/PVP membranes evidenced at 2925 cm^{-1} on ATR-FTIR spectra versus microwave exposition time in various solutions. The membrane immersed in DI water was used as the reference.

Three groups can be observed from **Figure 18**: First, the membrane mini coupons aged in solutions containing surfactants S1 (S1, Matrix D, and Formula D-C2) had the highest 2925 cm^{-1} band heights but decreased with time, at least from $t=30$ min. The second group is composed of DI water and NaOCl pH=8 for which the 2925 cm^{-1} band height was the lowest, comparable to a pristine membrane and stable all along the time. Finally, it was observed that the band height at 2925 cm^{-1} of mini coupons aged in S2+S3 and S4 surfactants containing solutions had increased in the first time between $t=30$ min and $t=150$ min but then started to decrease, particularly starting from $t=210$ minutes (**Figure 18**).

Shinoda et al. [56] introduced the concept of Phase Inversion Temperature (PIT) and defined it as the change in affinity of a surfactant in an emulsified system. The same authors also defined T_{HLB} as the temperature at which an ethoxylated surfactant presents the same affinity for oil and water in a surfactant-oil-water equilibrated system [57,58]. According to Ontiveros et al. [59], the PIT corresponds to the temperature at which the affinity of a non-ionic ethoxylated surfactant for water and oil switches by dehydration of the polyoxyethylene units during heating. This then leads to the inversion from O/W to W/O in the emulsion. Based on these concepts, it is clear that there exists a temperature at which the affinity of an ethoxylated surfactant changes. In the case of this study, surfactants are shared between the PES/PVP membrane and the water in the cleaning solution. If a parallel with PIT and T_{HLB} concepts is made, one could suggest that there is a temperature T_{HLB} at which the affinity of a surfactant is the same with water as it is with the membrane, hence the stability of adsorption (no more accumulation on the membrane). Below this temperature (at the beginning of the experiment, for example), the affinity of the surfactant would then go towards the membrane, and an accumulation of adsorption would be observed, whereas beyond the T_{HLB} temperature, the surfactant affinity would switch towards water, hence the desorption would occur.

Thus, for a better comprehension, in addition to membrane mini coupon characterization (adsorption tracking), analysis of surfactant concentration would be of interest to quantify the dynamic of surfactants present in the solution

4.4.6. Adsorption of ingredients containing C=O vs PVP stability

Of course, as explained above, in the $1720\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ region, several phenomena can be evidenced, either PVP removal/degradation or the adsorption of ingredients with C=O bonds.

First of all, no enzyme was detected (amide II band at 1536 cm^{-1}) on the membrane when using Formula D-C2. Accordingly, the enzyme could be assumed to have no contribution to the C=O band for pristine and cleaned membranes (except if presence of milk proteins induced an increase in enzyme adsorption, that cannot be checked with the used tools, however this impact is expected to be very low with respect to the enzyme low concentration in the detergent).

Figure 19 & Figure 20 clearly evidenced the adsorption of S1 and Matrix D ingredients (new band at 1640 cm^{-1}) on pristine cleaned membranes, in good agreement with the full detergent of Formula D-C2.

Note that the analysis of the membranes immersed in NaOCl was carefully made, allowing to conclude that PVP was degraded and led to succinimide functions (evidenced by a new band located at 1725 cm^{-1}), while PES was also attacked (no new band located at 1030 cm^{-1} was evidenced, not shown), in good accordance with literature data.

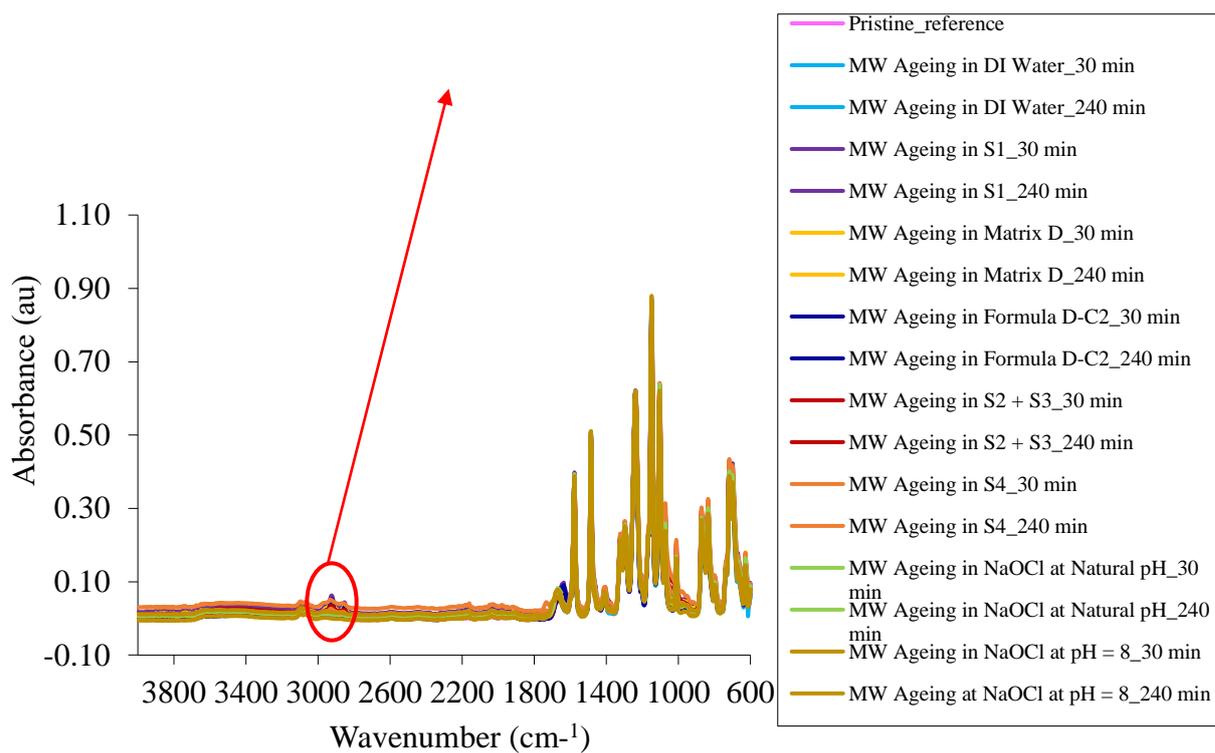
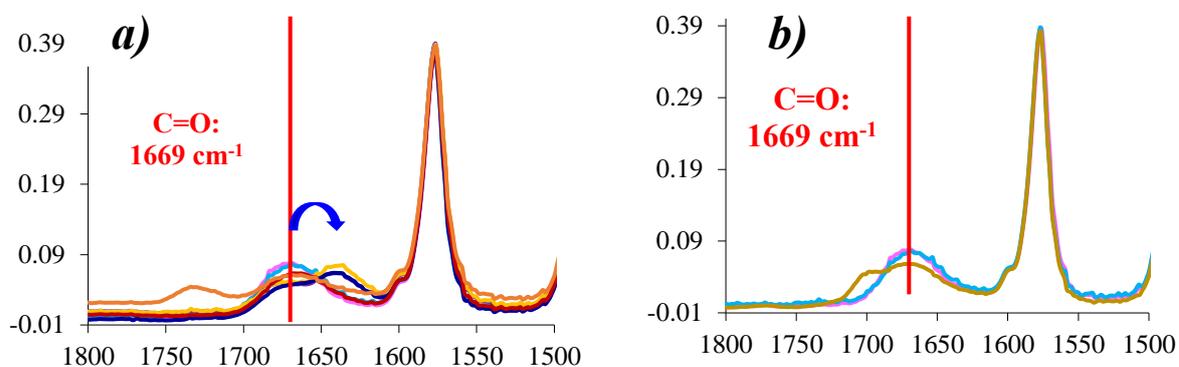


Figure 19. The displacement of $\bar{\nu}_{\max}$ 1669 cm⁻¹ showed on pristine PES/PVP membranes (HFK-131) mini coupons ATR-FTIR spectra after accelerated aging in a) surfactants containing solutions, b) NaOCl (pH=8), and DI water under MW (t=30 min & 240 min).

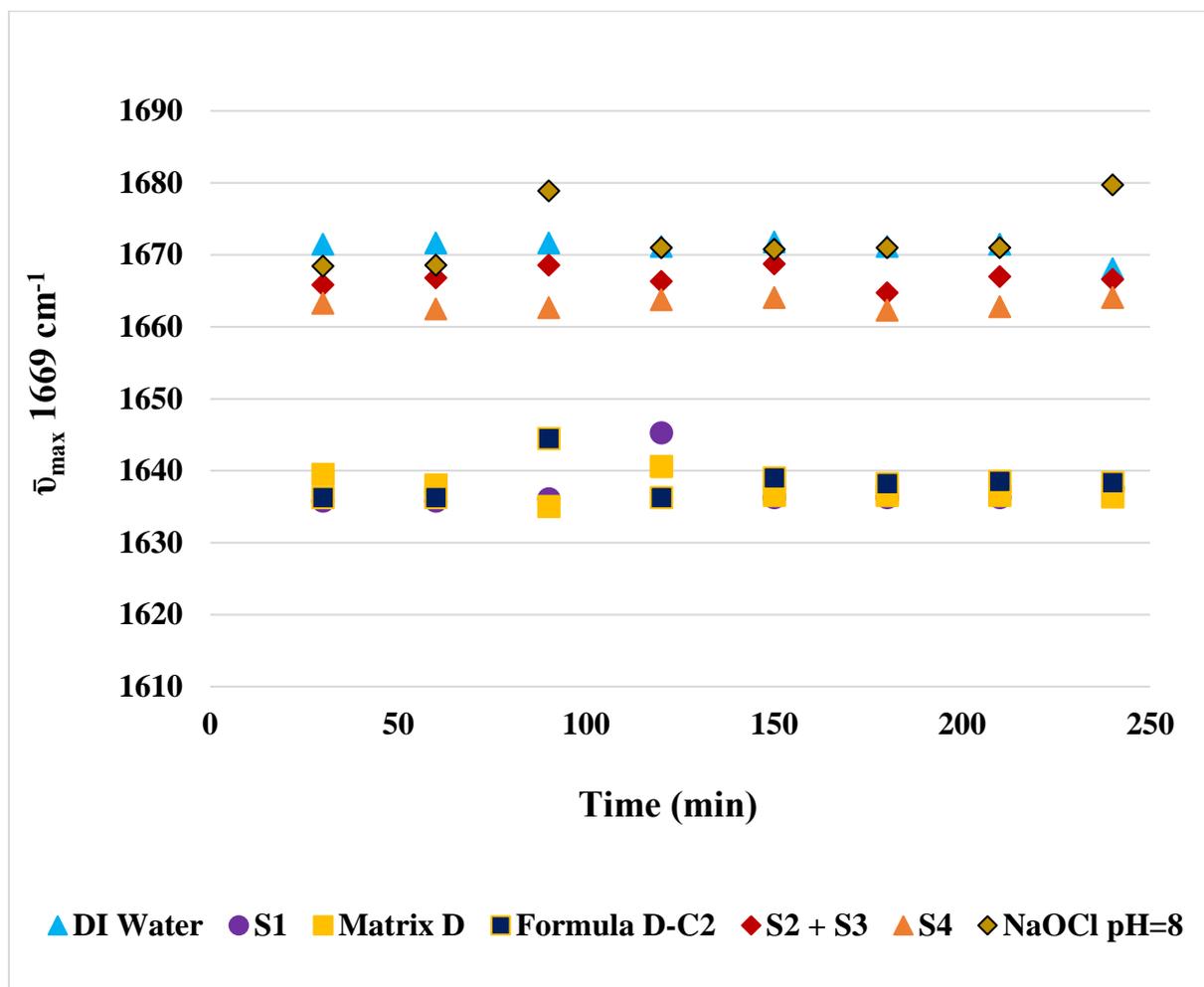


Figure 20. Adsorption traced by displacement of $\bar{\nu}_{\max}$ 1669 cm^{-1} on pristine PES/PVP membranes on ATR-FTIR spectra after accelerated aging in surfactants containing solutions, NaOCl (pH=8) under microwaves. A membrane immersed in DI water was used as the reference.

The in-depth analysis of the band located at 1669 cm^{-1} was achieved to deal with the PVP amount. **Figure 20** underlines the complexity of different signals' superimposition; however, combined with **Figure 19**, several trends can be depicted. Except in DI water, the PVP amount decreased with the MW exposition time for all solutions containing surfactants. The PVP decrease observed within the height of the band 1669 cm^{-1} was corroborated by the decrease in the integrated area of the same band (1620-1720 cm^{-1}) (**Figure 21 & Figure 22**).

As a general trend, the membrane degradation was in the same amount as with NaOCl pH=8.0, which mimicked the degradation that could be reached at the industrial scale for a membrane at half of its industrial life. Thus, even if any PVP removal was observed, this was not a limitation for the further use of the detergents.

Figure 19 suggested that the S2+S3 surfactant mixture was the best one with respect to membrane stability and that some ingredients of Matrix D could be changed to increase the harmlessness of the overall detergent.

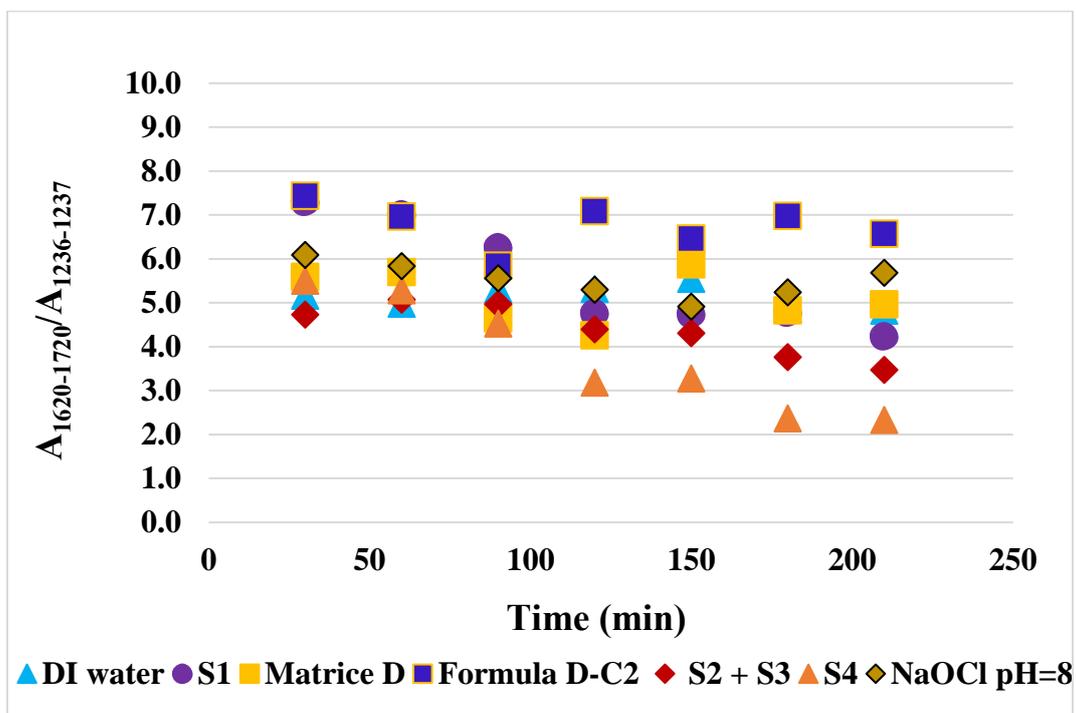


Figure 21: ATR-FTIR Integrated Area 1620-1720 /1236-1237 of mini coupons from pristine PES/PVP membranes (HFK-131) after each session of MW aging process in surfactants containing solutions and NaOCl (pH=8). DI water was used as the reference.

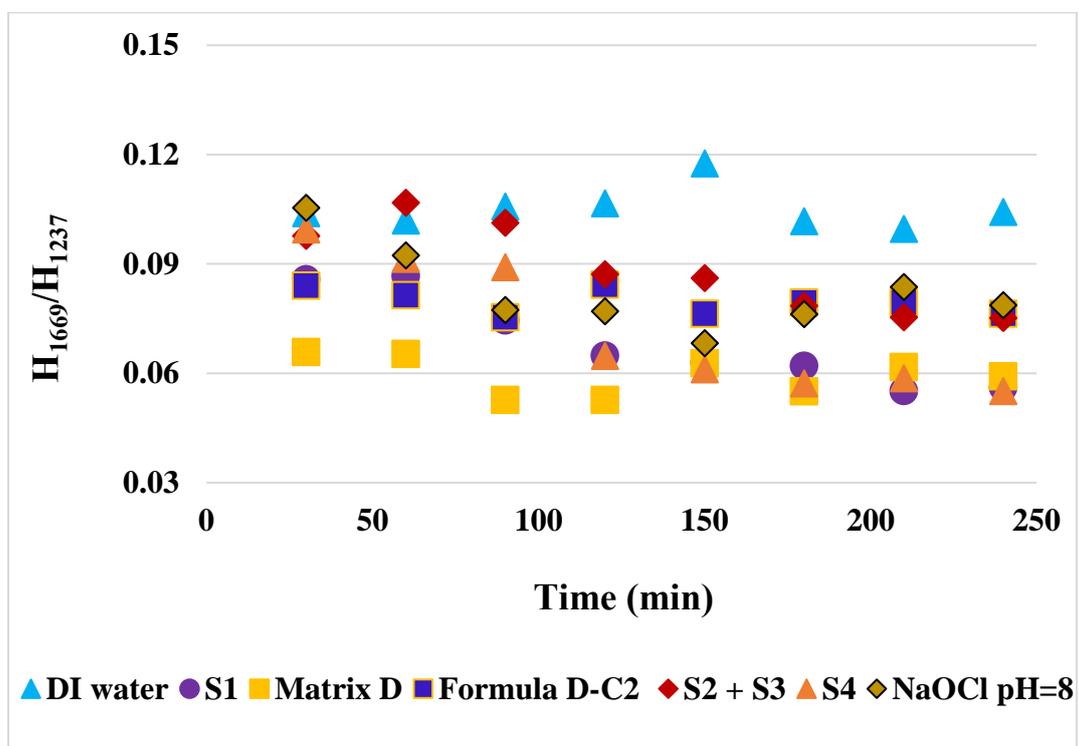
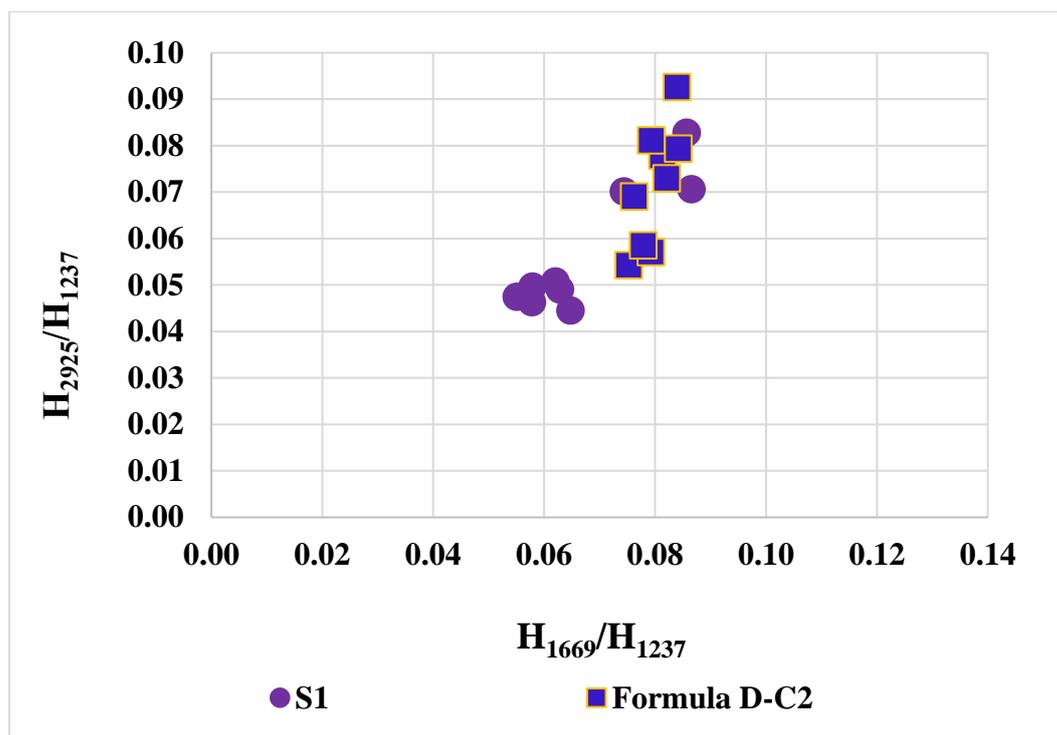
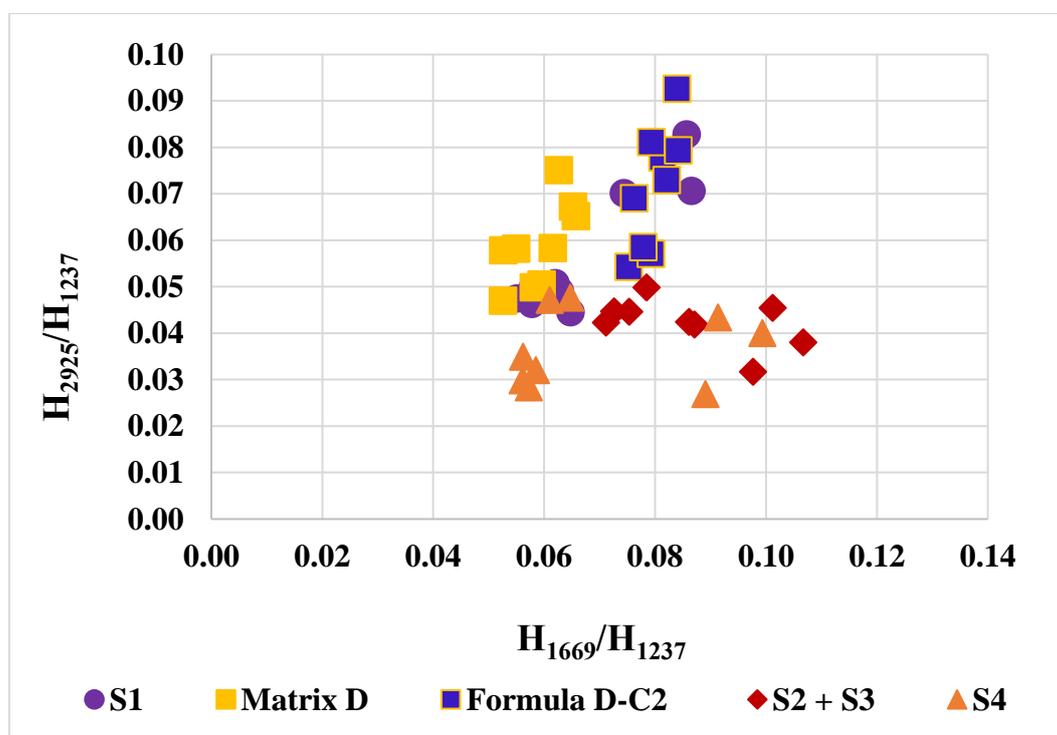


Figure 22. ATR-FTIR ratios H_{1669}/H_{1237} of pristine PES/PVP membranes versus microwave exposition time either in surfactants containing solutions or NaOCl (pH=8). A membrane in DI water was used as a reference.

The adsorption around 2925 cm^{-1} (C-H bonds) seemed to be correlated with the presence of PVP (**Figure 23**). This phenomenon was particularly true for solutions containing the surfactant S1 (the only zwitterionic surfactant on the list), which is already known for its affinity (adsorption) with the PES/PVP membrane.



(a) Solutions containing S1



(b) All solutions

Figure 23. Correlation between the C-H bonds adsorption decrease around 2925 cm^{-1} with the decrease of PVP (1669 cm^{-1}) on pristine PES/PVP membranes (HFK-131) mini coupons after accelerated ageing in surfactants containing solutions under MW ($t=30 - 240\text{ min}$).

5. Conclusion

The aim of this study was to explore the impact of individual ingredients in an enzymatic detergent on PES/PVP membrane cleaning.

Different cleaning solutions were tested for skim milk proteins removal efficiency. While it appeared that Enzyme C (C2) tested alone removed up to 69% of the skim milk protein, the addition of surfactant(s) improved the removal efficiency up to 100%.

One tricky point was the analysis of the flux behavior, as generally the water flux recovery was greater than 1 after the membrane cleaning. De-formulation by testing each ingredient of the enzymatic prototype detergent revealed that the increase in WFR can probably be mainly attributed to surfactants.

PVP removal was sometimes evidenced; however, this removal appeared limited and probably comparable to the one provoked by NaOCl commonly used at industrial scale (microwave activation for ageing acceleration). In addition, in the reached range, the PVP removal did not affect the membrane performances (proteins retention, WFR reproductivity, and stability of permeance in skim milk).

As expected, no PES degradation/alteration was observed (no band at 1030 cm^{-1} on ATR-FTIR spectra, no new other bands) after cleaning with surfactants containing solutions.

Finally, the use of the detergent Formula A-C2, which contained about 3 times less surfactant AM_{tot} than the reference (0.75 g. L^{-1}), was validated on a spiral membrane for at least 51 h of contact time in filtration conditions without impacting further performances in skim milk ultrafiltration. This is in favor of a more environment-friendly and economical formulation of cleaning detergents.

References_Chapitre V

- [1] L. Bégoïn, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, C. Faille, P. Blanpain-Avet, T. Bénézech, T. Doneva. Methodology of analysis of a spiral-wound module. Application to PES membrane for ultrafiltration of skimmed milk, *Desalination* 192 (2006) 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.10.010>.
- [2] G. Gésan-Guiziou, A.P. Sobańtka, S. Omont, D. Froelich, M. Rabiller-Baudry, F. Thueux, D. Beudon, L. Tregret, C. Buson, D. Auffret. Life Cycle Assessment of a milk protein fractionation process: Contribution of the production and the cleaning stages at unit process level, *Separation and Purification Technology* 224 (2019) 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.05.008>.
- [3] S. Kavugho Mission, A. Javelle, M. Rabiller-Baudry, Impact of enzyme stabilizers and formulation on the real efficiency of enzymatic detergent useful to clean polymer membrane fouled in skim milk ultrafiltration, The special Edition of Euromembrane 2022 to celebrate the 40th EMS Anniversary, November 20-24, 2022, Naples, Italy. Poster presentation.
- [4] S. Kavugho Mission, A. Javelle, L. Le Petit, O. Connan, R. Périon, M. Rabiller-Baudry, Methodology to select commercial enzyme incorporated in formulated detergents used in the cleaning of ultrafiltration PES/PVP membrane fouled by skim milk, Submitted to *Environmental Technology* (2024).
- [5] L. Le Petit, Développement de méthodologie, conception et validation de détergents/biocides pour le nettoyage en place de membranes polymères de l'industrie laitière. Thèse de l'Université de Rennes 1 (France), 2020. <https://www.theses.fr/2020REN1S011>.
- [6] K. Kosswig, "Surfactants" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, 2005, Weinheim. https://doi.org/10.1002/14356007.a25_747
- [7] Aspa Ingrecos: Union of cosmetic ingredients & Surfactants, Surfactants. Website visited on November 23, 2023). <https://aspa-ingrecos.com/en/surfactants/>
- [8] L. Suárez, M.A. Díez, R. García, F.A. Riera, Membrane technology for the recovery of detergent compounds: A review, *J. Ind. Eng. Chem.* 18 (2012) 1859–1873. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.05.015>.
- [9] S. Nait Tahar, Extraction par coacervat de polluants inorganiques : UO₂²⁺, Sm³⁺ et La³⁺/ optimisation du procédé, Thèse de l'université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen (Algérie), 2016. <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/9356/1/EXTRACTION-PAR-COACERVAT.PDF>
- [10] KRUSS, Critical micelle concentration (CMC) and surfactant concentration. (Website visited on November 23rd, 2023). <https://www.kruss-scientific.com/en/know-how/glossary/critical-micelle-concentration-cmc-and-surfactant-concentration>
- [11] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by HLB, *J Soc Cosmet Chem* N°1 (1949) 311–26.
- [12] W.C. Griffin, Calculation of HLB values of non-ionic surfactants, *J Soc Cosmet Chem* N°5 (1954) 249–56.
- [13] M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, L. Bégoïn, D. Delaunay, M. Fernandez-Cruz, Phina-C. Ziebin, C. Laviades-Garcia de Guadiana, B. Chaufer, Alkaline cleaning of PES membranes used in skimmed milk ultrafiltration: from reactor to spiral-wound module via a plate-and-frame module, *Desalination* 191 (2006) 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.07.028>

- [14] Z. Mai, V. Butin, M. Rakib, H. Zhu, M. Rabiller-Baudry, E. Couallier, Influence of bulk concentration on the organisation of molecules at a membrane surface and flux decline during reverse osmosis of an anionic surfactant, *J. Membr. Sci.* 499 (2016) 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.10.012>.
- [15] Safety Data Sheet of Ultrasil 10, Ecolb, (2019). <https://elapierre.com/wp-content/uploads/2022/01/ULTRASIL-10-EN.pdf>
- [16] M. Rabiller-Baudry, L. Bégoin, D. Delaunay, L. Paugam, B. Chaufer, A dual approach of membrane cleaning based on physico-chemistry and hydrodynamics: Application to PES membrane of dairy industry, *Chem. Eng. Process Intensif.* 47 (2008) 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.01.026>.
- [17] T. O’Lenick, R. Diez, Comparatively Speaking: Anionic vs. Crypto Anionic surfactants, *Cosmetics & Toiletries*, March 30th, 2022. (Accessed 2023, June 09) <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulas-products/formulating-basics/article/22144357/comparatively-speaking-anionic-vs-crypto-anionic-surfactant>
- [18] R. Diez, J. Giblin, Perfume compositions. U.S. Patent 9,988,591 B2, June 5th, 2018. (accessed 2023, June 09). <https://patentimages.storage.googleapis.com/28/ba/72/c6064fce55c39a/US9988591.pdf>
- [19] N. D’Souza, A. Mawson, Membrane Cleaning in the Dairy Industry: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (2005) 125–134. <https://doi.org/10.1080/10408690490911783>
- [20] A. Honciuc, *Chemistry of Functional Materials Surfaces and Interfaces: Chapter 4-Surfactants and amphiphiles, Fundamentals and Applications* (2021) 43-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821059-8.00011-9>
- [21] C. Rondel, Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives, Thèse de l’Université de Toulouse (France) 2009. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000737/>
- [22] L. Le Petit, M. Rabiller-Baudry, R. Touin, R. Chataignier, P. Thomas, O. Connan, R. Périon, Efficient and rapid multiscale approach of polymer membrane degradation and stability: Application to formulation of harmless non-oxidative biocide for polyamide and PES/PVP membranes, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021) 118054, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118054>.
- [23] M. Rabiller-Baudry, C. Lepéroux, D. Delaunay, H. Diallo, L. Paquin, On the use of microwaves to accelerate ageing of an ultrafiltration PES membrane by sodium hypochlorite to obtain similar ageing state to that obtained for membranes working at industrial scale. *Filtration* 14 (1) (2014), 38–48. https://www.researchgate.net/publication/281502584_Using_microwaves_to_accelerate_ageing_of_an_ultrafiltration_PES_membrane_by_NaOCl_to_obtain_a_similar_ageing_state_to_that_for_membranes_working_at_the_industrial_scale
- [24] M. Rabiller-Baudry, C. Lepéroux, H. Diallo, How micro-waves can help to study membrane ageing and consequences on fouling. In: *Proceeding of the Fouling and Cleaning Conference, Lund, Sweden* (April 2018) 5–17. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1564072>.
- [25] M. Rabiller-Baudry, L. Le Petit, S. Kavugho Mission, S. El Morr, Evidencing strengths and weaknesses of alkaline detergents to formulate efficient mixtures useful for polymer membranes’ cleaning, proceeding-fouling and cleaning in food processing, March 28-30, 2022, Lille, France.
- [26] Liste positive française: NOR: ECOC9900090A
<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000383874>

- [27] REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) Européen: <https://www.ecologie.gouv.fr/reglementation-reach>
- [28] C. R. Birnie, D. Malamud, R.L. Schnaare, Antimicrobial Evaluation of N-Alkyl Betaines and N-Alkyl-N, N-Dimethylamine Oxides with Variations in Chain Length. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(9) (2000) 2514-2517. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2514-2517.2000>
- [29] Merck, Empigen® BB detergent. N, N-Dimethyl-N-dodecylglycine betaine, N-(Alkyl C10-C16)-N, N-dimethylglycine betaine, 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/30326>
- [30] V. B. Rodriguez, E. J. Alameda, J. F.M. Gallegos, A. Reyes, A.I. Garcia-Lopez, J. Cabral, P. Fernandes, L.P. Fonseca, Modification of the activity of an α -amylase from *Bacillus licheniformis* by several surfactants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (5) (2006) 567 -571. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue5-fulltext-16>
- [31] D. A. Vaz, E. J. Gudiña, E. J. Alameda, J. A. Teixeira, L. R. Rodrigues, Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants, *Colloids Surf. B*. 89 (2012)167–174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.009>
- [32] ChemBK, D-Glucopyranose, oligomers, decyl octyl glycosides- Names and Identifiers, 2015. <https://www.chembk.com/en/chem/Decyl%20Glucoside>
- [33] ChemBK, D-Glucopyranose, oligomeric, C10-16 Alkyl Glycosides- Lauryl glucoside: Physico chemical properties, 2015. <https://www.chembk.com/en/chem/D-Glucopyranose,%20Oligomeric,%20C10-16-Alkyl%20Glycosides>
- [34] Connect to Beauty, Emulsifiers & surfactants: Glucoside 600, 2021. <https://connectchemicals.com/cosmetics/product-finder/glucoside-600>
- [35] F. R. Ruiz, Comportamiento ambiental de tensioactivos comerciales anionicos y no ionicos. Master universitario en ciencia y tecnologia de coloides e interfaces, Universidad de (Granada) 2010. https://www.academia.edu/94855278/Comportamiento_ambiental_de_tensioactivos_comerciales_ani%C3%B3nicos_y_no_i%C3%B3nicos
- [36] V. Bravo, E. Jurado, A.I. García, A. Gálvez, A. Reyes, N. Sabahi, J.F. Martínez, Foaming Power and Foam Stability of Several Alkyl Polyglycosides. *Tenside Surfactants Detergents*, 45 (2008) 186 - 192. <https://doi.org/10.3139/113.100375>
- [37] A. Magnaldo, P. Marc, P. Olivier, Method for selective dissolution using a non-ionic surfactant, Patent (2017) N° WO 2017/137432 A1. <https://patents.google.com/patent/WO2017137432A1/fr>
- [38] J. Chen, J. Li, K. Liu, M. Hong, R. You, P. Qu, M. Chen, Subcritical Methanolysis of starch and Transglycosidation to produce docedyl polyglucosides. *Amercian chemical society omega*, 4 (15) (2019) 16372-16377. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01617>
- [39] R. Hajimohammadi, S. Johari-Ahar, Synergistic Effect of Saponin and Rhamnolipid Biosurfactants systems on foam behavior. *Tenside Surfactants Detergents*, 55 (2) (2018)1-6. DOI: [10.3139/113.110546](https://doi.org/10.3139/113.110546)
- [40] Evonik cleaning solutions, 2021. Rewoferm®. <https://www.ulprospector.com/knowledge/media/2021/11/evonik-presentation-12-02-21.pdf>
- [41] D.J. Ricketts, Bovine teat dip, United States Patent (1996) 5,534,2666. <http://www.everypatent.com/comp/pat5534266.html>

- [42] P. K. S. M. Rahman, G. Pasirayi, V. Auger, Z. Ali, Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS I 0 - I 29 in a microfluidic bioreactor, *Biotechnol. Appl. Biochem* 55 (2010) 45-52. <https://doi.org/10.1042/BA20090277>
- [43] M. Rabiller-Baudry, P. Loulergue, J. Girard, M. El Mansour El Jastimi, A. Bouzin, M. Le Gallic, A. Moreac, P. Rabiller, Consequences of membrane aging on real or misleading evaluation of membrane cleaning by flux measurements, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021) 118044, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118044>
- [44] M. Rabiller-Baudry, N.W. Diagne, D. Lebordais, How the experimental knowledge of the irreversible fouling distribution can contribute to understand the fluid circulation in a spiral ultrafiltration membrane, *Separation and Purification Technology*. 136 (2014) 157–167. <https://doi:10.1016/j.seppur.2014.08.040>
- [45] L. Paugam, D. Delaunay, N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: On the real effect of nitric acid step, *J. Membr. Sci.* 428 (2013) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>.
- [46] N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.
- [47] M. Rabiller-Baudry, M. Le Maux, B. Chaufer, L. Bégoïn, Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR-FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane, *Desalination* 146 (2002) 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00503-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00503-9).
- [48] M. Rabiller-Baudry, A. Bouzin, C. Hallery, J. Girard, C. Leperoux, Evidencing the chemical degradation of a hydrophilised PES ultrafiltration membrane despite protein fouling, *Sep. Purif. Technol.*, 147 (2015) 62–81. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.056>.
- [49] S. Rouaix, C. Causserand, P. Aimar, Experimental study of the effects of hypochlorite on polysulfone membrane properties, *J. Membr. Sci.* 277 (2006) 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.10.040>
- [50] K. Yadav, K.R. Morison, M.P. Staiger, Effects of hypochlorite treatment on the surface morphology and mechanical properties of polyethersulfone ultrafiltration membranes, *Polym. Degrad. Stab.* 94 (2009) 1955–1961. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.027>
- [51] R. Prulho, A. Rivaton, S. Therias, J.L. Gardette, Ageing mechanism of polyethersulfone/polyvinylpyrrolidone membranes in contact with bleach water, *Proc. Eng.* 44 (2012) 1031–1034. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.08.666>
- [52] Y. Kourde-Hanafi, P. Loulergue, A. Szymczyk, B. Van der Bruggen, M. Nachtnebel, M. Rabiller-Baudry, J.-L. Audic, P. Pölt, K. Baddari, Influence of PVP content on degradation of PES/PVP membranes: Insights from characterization of membranes with controlled composition, *Journal of Membrane Science* 533 (2017) 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.03.050>.
- [53] M. Rabiller-Baudry, L. Paquin, C. Lepéroux, H. Diallo, H. Al Jawad, C. Sepré, How microwaves can help to study membrane ageing, *Environ Technol.* (2019) 1–46. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1564072>.
- [54] A. Loupy, *Microwaves in Organic Synthesis*, Second Edition, Vol 1, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany: Wiley-VCH., 2006. ISBN: 3-527-31452-0

- [55] L. Perreux, A. Loupy, A. Petit, Nonthermal effects of microwaves in organic synthesis. In: De la Hoz A, Loupy A, eds. *Microwaves in organic synthesis*. 3rd. ed. Weinheim, Germany, Wiley-VCH, 2012, 127–207. ISBN: 978-3-527-33116-1
- [56] K. Shinoda, H. Arai, The Correlation between Phase Inversion Temperature in Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier, *J. Phys. Chem.* 68,12, (1964) 3485–3490. <https://doi.org/10.1021/j100794a007>
- [57] H. Kunieda, K. Shinoda, Phase behavior in systems of nonionic surfactant/ water/ oil around the hydrophile-lipophile-balance-temperature (hlb-temperature), *J. Dispers. Sci. Technol.* 3 (1982) 233-244. <https://doi.org/10.1080/01932698208943639>
- [58] R.E. Antón, P. Castillo, surfactant-oil-water systems near the affinity inversion part iv: emulsion inversion temperature, J.L. Salager, *J. Dispers. Sci. Technol.* 7 (1986) 319-329. <https://doi.org/10.1080/01932698608943463>
- [59] J. F. Ontiveros, C. Pierlot, M. Catté, V. Molinier, J-L. Salager, J-M. Aubry, Structure-interfacial properties relationship and quantification of the amphiphilicity of well-defined ionic and non-ionic surfactants using the PIT-slope method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 448 (2015) 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.028>
- [60] K. Holmberg, D.O. Shah, M. J. Schwuger, eds., *Handbook of applied surface and colloid chemistry*, Wiley, Chichester, England; New York, 2002. https://library.samdu.uz/files/784369c69c589fbfe042ecde9b46ee6c_HANDBOOK%20OF%20APPLIED%20SURFACE%20AND%20COLLOID%20CHEMISTRY.pdf
- [61] T. Chutrakul, N. Rangton, R. Daochot, N. Sattayathitikul, P. Saikhwan, Enzyme-based integrated solution to cleaning of coconut milk foulants, *Food and Bioproducts Processing* 113 (2019) 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.09.006>

Supporting information

S1 Supplementary: Hydrophilic/Lipophilic Balance (HLB)

Surfactants can play different roles depending on their adsorption properties, which are governed by their HLB (Hydrophilic/Lipophilic Balance). Thus, they can act as detergents, be used as foaming agents, or serve as solubilizers, wetting agents, emulsifiers, dispersants, or even antiseptics [11,12]. **Figure S1.1** evidences the potential use of surfactants with respect to their HLB.

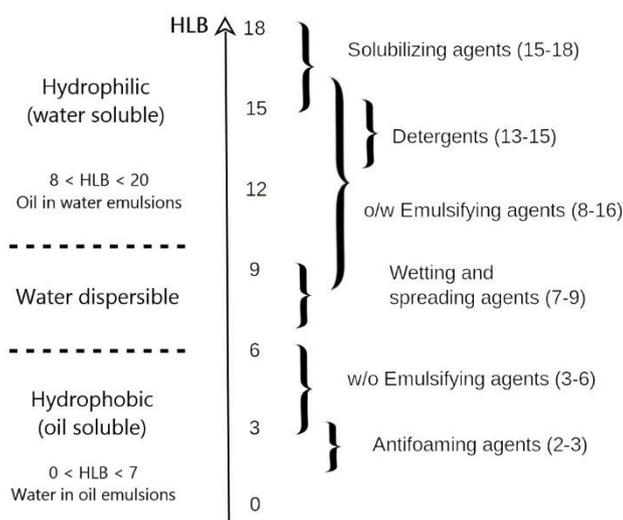


Figure S1.1. Surfactants functions and their HLB values [60].

The hydrophilic/Lipophilic balance (HLB) makes it possible to quantify the balance existing between the hydrophilic part and the lipophilic part of a surfactant. It is, thus, correlated to its solubility in water. The higher the HLB, the more hydrophilic the surfactant is [11,12].

Several methods exist to calculate the HLB of a given surfactant, depending on its chemical structure.

The one proposed by Griffin in 1949 [11,12] and dedicated to ethoxylated non-ionic surfactant with a HLB scale from 0 to 20 is widely used:

$$HLB = 100 \times [MW_{\text{polar fragments}} / MW_{\text{surfactant}}] / 5 \quad (\text{Equation S1.1})$$

With:

$MW_{\text{polar fragments}}$: the molecular weight of the polar fragment, considering the entire ethylene oxide fragment $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ($MW = 44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) in the polar part.

$MW_{\text{surfactant}}$: the molecular weight of the surfactant

Among other methods to calculate the HLB, the one proposed by Davies [60] is useful for ionic surfactants with a scale up to 40. Accordingly, HLB can be expressed by

$$HLB = (\sum HLB \text{ of hydrophilic groups} + \sum HLB \text{ of hydrophobic groups}) + 7 \quad (\text{Equation S1.2})$$

With:

The contribution to HLB of hydrophilic groups (positive contributions) and hydrophobic groups (negative contributions) is given in **Table S1.1**.

Table S1. 1. Contribution to HLB of some chemical groups according to the Davies method [60] – (HLB scale up to 40)

Hydrophilic group	HLB	Lipophilic group	HLB
-SO ₄ Na	38.7	-CH-	-0.475
-COOK	21.1	-CH ₂ -	
-COONa	19.1	-CH ₃ -	
Sulfonate	~ 11.0	-CH=	
-N (tertiary amine)	9.4	-(CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-)	-0.15
Ester (sorbitan ring)	6.8		
Ester (free)	2.4		
-COOH	2.1		
-OH (free)	1.9		
-O-	1.3		
-OH (sorbitan ring)	0.5		

S2 Supplementary: Cleaning in batch reactors

S2.1. Kinetics of skim milk protein removal in batch with enzyme C2

Table S2.1: Skim milk proteins removal with enzyme C2 in batch reactor at pH = 10.5, 50°C

Cleaning solution Age under agitation at 50°C	Duration of cleaning in batch reactors (min)	DI Water	Enzyme C at 0.20 g. L ⁻¹ + Carbonate buffer		Enzyme C at 0.20 g. L ⁻¹ + Carbonate buffer + 0.1 mmol. L ⁻¹ CaCl ₂
			SKM-34	SKM-54	SKM-55
			Residual skim milk Proteins + cleaning solution Enzymes C2 (µg.cm ⁻²)		
Fresh Solutions	15	25 ± 8* (n=12)	–	12 ± 2 (n=6)	9 ± 2 (n=6)
	30	25 ± 7* (n=12)	–	12 ± 1 (n=6)	6 ± 3 (n=6)
	60	22 ± 7* (n=18)	8 ± 0 (n=6)	–	–
30 min aged Solutions	30	–	–	13 ± 2 (n=3)	13 ± 2 (n=3)
60 min aged solutions	30	–	–	10 ± 1 (n=3)	8 ± 2 (n=3)

*in good accordance with the average value measured on 108 spectra: 31 ± 9 µg. cm⁻²

The time preceding coupon addition in the cleaning solution did not have an impact on the skim milk proteins removal efficiency. This suggests that even after 60 minutes of agitation at 50°C, the cleaning solution remains as efficient as a fresh solution at time t = 0. This is in accordance with a previous study that showed the stability of enzymes in solution as well as prototype detergents solutions for up to 2 hours [4].

Looking at the results in **Table S2.1**, regardless of the cleaning solution, the kinetics of skim milk proteins removal within the same membrane shows that after time t =15 min, the average amount of skim milk protein removed did not increase significantly

A study conducted by our industrial partner, Kersia, showed a fast and progressive decrease of the enzymatic activity over time, going from 100% at t = 0 to 90% at 15 min, 60% at 60 min, and beyond 15 hours, the enzymatic activity was null. This could explain why efficiency kinetics show better results within 15 min and that additional time does not significantly improve those results.

S2.2. Kinetics of skim milk protein removal in batch with surfactant S1

Coupons fouled with skim milk and cleaned with solutions of surfactant S1 (in the presence of Calcium) without Enzyme C (C2) had the residual proteins + enzyme amount < 0 µg.cm⁻² after 15 minutes of cleaning, thus reaching a removal efficiency of 100 %. This means that the removal obtained by S1 without

enzyme is similar to that obtained with S1 + Enzyme C (C2) (**Table S2.2**). For this reason, cleaning in batch was conducted for 15 minutes in the experiments that followed (§ 4.2.).

Similar results were observed by Chutrakul et al. when they used enzymes with surfactants compared to surfactants alone in the cleaning of coconut milk foulants [61].

But this was not the case for other surfactants tested in our study (**Table S2.3**).

Table S2.2. Kinetics of skim milk proteins removal by surfactant S1 in the presence of Calcium and Carbonate buffer at 8 g. L^{-1} (pH = 10.5, 50°C) : a) with enzyme; b) without enzyme

Cleaning solution Age under agitation at 50°C	Duration of cleaning in batch reactors (min)	DI Water	Skim milk Fouled Membranes coupons	a) Enzyme C2 at 0.20 g. L^{-1} + S1 at 0.75 g. L^{-1} (MA_{tot}) + Carbonate buffer + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at 0.015 g. L^{-1}	b) + S1 at 0.75 g. L^{-1} (MA_{tot}) + Carbonate buffer + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at 0.015 g. L^{-1}
				SKM-56	SKM-57
				Residual skim milk Proteins + cleaning solution Enzymes C2 ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)	Residual skim milk Proteins ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)
Fresh Solutions	15	25 ± 8 (n=12)	Coupons 4 & 6	$(-1) \pm 3$	0 ± 1
	30	25 ± 7 (n=12)	Coupons 5 & 7	$(-2) \pm 1$	1 ± 2
	60	22 ± 7 (n=18)	Coupons 6 & 8	–	–
30 min aged Solutions	30	–	Coupon 8	$(-4) \pm 1$	0 ± 1
60 min aged solutions	30	–	Coupon 9	$(-3) \pm 0$	0 ± 1

S2.3. Effect of surfactants mixtures S2 + S3 and S3 + S4 on the skim milk protein removal efficiency compared to S1

Like kinetics with Enzyme C (C2) or surfactant S1 previously presented, skim milk proteins removal kinetics with surfactants mixtures S3 + S4 show that the most important amount of proteins is removed during the first 15 min, while for S2 + S3, it is within the first 30 min (**Table S2.3**).

However, removal continues with time to a lower extent, going from a removal efficiency of about 48% for S2 + S3 and 56% for S3 + S4 after 15 min to about 73% and 77% removal efficiency after 60 min for S2 + S3 and S3 + S4, respectively. Thus, in opposition to S1, when used alone, these surfactants mixtures are better used for 60 min than for 15 min.

Table S2.3. Skim milk proteins removal efficiency and kinetics of surfactants mixtures S2 + S3 and S3 + S4 without enzyme, but in the presence of buffer in comparison to surfactant S1 (with calcium)

Fresh Cleaning solution under agitation at 50°C →	DI water rinsed Coupons	S1 at 0.75 g. L ⁻¹ * + CaCl ₂ . 2H ₂ O at 0.015 g. L ⁻¹ + Carbonate buffer at 8 g. L ⁻¹ , pH = 10.5, 50°C	S2 at 0.10 g. L ⁻¹ * + S3 at 0.19 g. L ⁻¹ * + Carbonate buffer at 8 g. L ⁻¹ , pH = 10.5, 50°C	S3 at 0.13 g. L ⁻¹ * + S4 at 0.15 g. L ⁻¹ * + Carbonate buffer at 8 g. L ⁻¹ , pH = 10.5, 50°C
Membrane	SKM-34, 57, 83, 84	SKM-57	SKM-83/SKM-84	
Duration of cleaning in batch reactor (min)	Residual skim milk Proteins (µg.cm ⁻²)			
15	27 ± 5	0 ± 1 <1	14 ± 2	12 ± 3
30	23 ± 3	1 ± 2	10 ± 1	9 ± 2
45	18 ± 1	–	8 ± 2	8 ± 2
60	26 ± 4	–	7 ± 2	6 ± 2

*Surfactant AM_{tot}

Conclusion générale et Perspectives

CONCLUSION GENERALE

L'IAA occupe 20 – 30 % des 250 millions de chiffre d'affaires de l'industrie mondiale des membranes. L'utilisation des procédés membranaires dans l'industrie laitière qui a débuté dans les années 1960 représente 40% des membranes de l'IAA. Plus de 400 000 m² de ces membranes servent à l'UF de lait qui permet la standardisation ou la concentration des protéines totales du lait.

L'UF de lait écrémé utilise principalement des membranes en polymère à base de PES hydrophilisée ; la membrane en PES/PVP de référence HFK-131 (Koch, USA) représente plus de 80% du marché mondial de cette application.

Le colmatage des membranes est systématique et provoque la diminution des performances de la filtration (baisse de perméance, évolution de la sélectivité). Le colmatage expose aussi les installations et les produits filtrés au risque sanitaire, car il peut constituer un nutriment pour les micro-organismes. Pour éliminer le colmatage, restaurer les performances des membranes et assurer la sécurité sanitaire, il est indispensable de procéder à une étape de nettoyage/désinfection ; celle-ci se reproduit deux fois par jour dans le cas de l'UF de lait conduite à 50°C. Cette étape occupe jusqu'à 30% du temps d'exploitation durant lequel la production est arrêtée. De plus, elle est consommatrice d'eau, de détergents formulés, d'énergie et génère des effluents plus ou moins polluants, selon la nature des détergents utilisés. Le nettoyage industriel est actuellement géré à travers des stations de nettoyage en place (NEP) automatisées qui fonctionnent sur des bases empiriques et non optimisées. Il est par conséquent encore un frein pour l'extension plus importante de l'utilisation des procédés membranaires.

En terme général, le NEP est réalisé en utilisant une cascade de produits, incluant des détergents alcalins et acides et un désinfectant. L'efficacité du nettoyage dépend de multiples facteurs : le fluide filtré, le matériau membranaire, des conditions de colmatage pendant la phase de production, des produits de nettoyage ainsi que des conditions de nettoyage. Des études antérieures conduites au laboratoire ISCR ont montré qu'un nettoyage est d'autant plus efficace que le colmatage a été réalisé en dessous des conditions critiques de filtration. Or, industriellement, l'UF de lait écrémé est réalisée à flux constant au-dessus du flux critique, et le plus souvent au flux limite. Ainsi, plus la membrane vieillit, plus la tendance est d'augmenter la pression transmembranaire, ce qui est contre-productif, car le colmatage global et le colmatage irréversible initial, cible du NEP, s'aggravent au fil des filtrations. Le colmatage irréversible initial sévère peut faire l'objet d'un nettoyage agressif qui peut être délétère pour les membranes, dont la durée de vie diminue alors trop rapidement. Il impacte également négativement l'environnement.

Le nettoyage enzymatique, plus coûteux, intervient plus rarement que le nettoyage alcalin, et généralement en cas de force majeure lorsque le colmatage résiste aux détergents chimiques. Il est réputé plus efficace et respectueux du développement durable. Cependant, il existe très peu d'études fondamentales publiées sur ce nettoyage et son impact tant sur la membrane que sur l'environnement.

L'étude conduite dans cette thèse avait pour but de : (i) développer des détergents enzymatiques formulés efficaces, (ii) développer une méthodologie pour la formulation et la validation des détergents enzymatiques, (iii) étudier leur impact sur l'intégrité de la membrane d'UF en PES/PVP et de seuil de coupure 5-10 kg.mol⁻¹.

La méthodologie du développement de détergents chimiques formulés a été mise en place auparavant par l'équipe CIP de l'ISCR. Elle est ici transposée pour la première fois au développement des détergents enzymatiques.

Elle se déroule en plusieurs étapes successives, qui sont expliquées ci-dessous.

-La 1^{ère} étape est la formulation de détergents enzymatiques prototypes initiaux par notre partenaire industriel, le Groupe Kersia.

-La 2^{ème} étape, réalisée à l'ISCR-CIP, consiste en des tests de nettoyage en réacteur fermé sur des petits coupons de membrane préalablement colmatés en UF par du lait écrémé et rincés pour une évaluation rapide de l'efficacité de différents prototypes de détergents formulés. Cette étape permet également l'évaluation de l'intégrité, à court terme, de la membrane.

-La 3^{ème} étape permet une évaluation des performances de NEP en condition de filtration et une évaluation à moyen terme de l'intégrité de la membrane (3 à 4 cycles colmatage/nettoyage).

-La 4^{ème} étape consiste en une transposition sur une membrane spirale, n'utilisant que les détergents prototypes prometteurs détectés lors des étapes précédentes. Le NEP jusqu'à 51 h dans le détergent, combiné à des études de vieillissement accéléré grâce à l'activation micro-onde sur des petits coupons de membrane, permet d'évaluer la stabilité à long terme en conditions représentatives des conditions d'usage industriel.

L'ensemble de la démarche fonctionne grâce à des analyses ATR-FTIR des membranes à toutes les étapes de leur vie : vierges, colmatées, rincées, nettoyées, en complément des mesures de flux de perméats, qui sont parfois difficiles à analyser. En particulier, les augmentations de flux peuvent être dues à différents phénomènes : (i) soit la dégradation de la membrane, (ii) soit l'évolution de la balance hydrophile/hydrophobe de la membrane par adsorption de différents constituants des solutions détergentes, notamment certains tensioactifs.

Les résultats obtenus en réacteur fermé prédisaient de façon satisfaisante ceux obtenus en condition de filtration dans le cas des détergents chimiques [1] et il en est de même dans le cadre de cette thèse avec les détergents enzymatiques. De cette façon, il est possible d'identifier rapidement les ingrédients d'une formulation qui sont problématiques vis-à-vis de la membrane.

Dans le cas d'un détergent enzymatique, le premier choix concerne celui de l'enzyme. En raison de la nature protéique du dépôt colmatant cible du NEP, il est logique de sélectionner une protéase. Comme toutes les formules commerciales que nous avons pu étudier via les fiches de sécurité des détergents, notre choix s'est porté sur une subtilisine.

Cependant, il s'agit en réalité d'une famille de protéases répondant toutes au même numéro CAS. Ceci constitue probablement une difficulté mineure en comparaison du choix d'une subtilisine commerciale. Ces dernières sont stabilisées, les stabilisants sont plus ou moins bien identifiés. A priori, ils pourraient interférer avec la formulation du fabricant de détergent qui ne peut pas agir directement sur les stabilisants.

Le questionnement généré par les stabilisants a fait l'objet des études présentées dans le **chapitre IV**.

En s'appuyant sur la méthodologie décrite ci-dessus, nous avons utilisé une même formule (Formule D) en ne modifiant que la subtilisine commerciale stabilisée qui entraine dans la composition du détergent final.

Les trois enzymes commerciales utilisées dans cette thèse et dont les références exactes sont tenues confidentielles pour des raisons de propriété industrielle, ont été dénommées X, B et C. Dans cette thèse, l'exercice a été d'évaluer l'impact des stabilisants sur :

- ✓ L'efficacité des enzymes commerciales sur le nettoyage (élimination des protéines de lait écrémé).

- ✓ La rinçabilité de l'enzyme commerciale (adsorption de l'enzyme et/ou des stabilisants) sur la membrane.
- ✓ L'intégrité de la membrane (dégradation de la PVP ou de la PES).

Ces travaux ont montré que le niveau d'élimination des protéines du colmatage était très élevé (en présence d'un tampon carbonate à pH 10.5 à 50°C) et indépendant des trois enzymes commerciales, ce qui implique que les stabilisants des enzymes n'altéraient pas l'action de l'enzyme (concentration choisie pour avoir la même activité enzymatique dans un test modèle sur les caséines).

L'enzyme commerciale C a été choisie sur la base de critères supplémentaires, à savoir la possibilité de désactivation acide ou alcaline de l'enzyme, alors que l'enzyme B ne peut être désactivée qu'en milieu acide. En outre elle ne contient pas de bore contrairement à l'enzyme X.

Des tests en condition de filtration sur membranes vierges ou colmatées avec les 3 enzymes commerciales seules ou incorporées dans la Matrice D ont mis en évidence que la récupération des flux à l'eau au-delà de 100% provenait de la Matrice D et non des enzymes commerciales (et donc pas de leurs stabilisants non plus, sauf pour l'enzyme C à la concentration 0.20 g.L⁻¹ dont un/des stabilisants pourraient avoir des synergies avec d'autres ingrédients de la formule).

L'existence d'ingrédients problématiques dans la Matrice D a logiquement conduit à la seconde question majeure étudiée dans cette thèse, qui est leur identification et leur substitution pour une formule plus optimale. Ceci a conduit à la dé-formulation de la Matrice D en vue de tester un à un les ingrédients séparément. Les résultats ont permis d'identifier la cause de la dégradation de la membrane par extraction sélective d'une partie de la PVP (40%) mais aussi l'hydrophilisation de la membrane par adsorption, notamment du tensioactif S1. Encore fallait-il le remplacer par un autre système tensioactif, sans lequel les enzymes ne sont pas aussi efficaces. En effet, L'ajout du tensioactif S1 à l'enzyme a augmenté significativement son efficacité d'élimination des protéines, passant de 69 % à 100%.

Par conséquent, le **Chapitre V** a été consacré à la question : « Quels tensioactifs faut-il sélectionner pour qu'ils soient compatibles avec l'enzyme, tout en tenant compte des différentes contraintes (environnementales et écologiques, économiques, efficacité et compatibilité avec la membrane) ? » en partant du détergent constitué de la Matrice D avec l'enzyme C à la concentration C2= 0.20 g.L⁻¹ du chapitre précédent (Formule D-C2).

Ainsi, Kersia a présélectionné des tensioactifs (TA) en vue de développer de nouvelles formules enzymatiques en remplaçant le tensioactif S1 dans la Matrice D par de nouveaux tensioactifs pour améliorer le profil environnemental du détergent formulé et son innocuité vis-à-vis de la membrane.

Quatre nouveaux tensioactifs ont ainsi été utilisés, seuls ou en mélange, notés S2, S3, S4, et S5, pour des raisons de confidentialité.

- ✓ Les résultats ont montré que l'efficacité d'élimination des protéines était proche de 100% pour 3 des nouveaux TA (S2, S4 et S5). S3 était moins efficace, mais son rôle dans la formulation étant plutôt de solubiliser S2 ou S4, nous ne nous sommes donc pas attardés sur son efficacité détergente propre.
- ✓ En l'absence d'une connaissance précise des CMC des différents TA, la teneur globale avait été initialement ajustée plus ou moins arbitrairement sur celle de S1 dans la formule initiale, soit à

une matière active total $MA_{tot} = 0.75 \text{ g. L}^{-1}$. Des essais de diminution de cette concentration ont été conduits, via des dilutions plus ou moins arbitraires ; la faible concentration en TA ($MA_{tot} = 0.25 \text{ g. L}^{-1}$) testée a obtenu les mêmes performances en réacteur que la concentration élevée ($MA_{tot} = 0.75 \text{ g. L}^{-1}$). Au regard de ces résultats, il sera possible de faire des économies de TA.

- ✓ L'extraction de la PVP par S2, S3, S4 et S5 a été observée par la diminution de la hauteur de la bande 1669 cm^{-1} sur les spectres ATR-FTIR.
- ✓ Une adsorption résiduelle de tous les TA a été montrée par l'existence d'une bande (C-H) à 2926 cm^{-1} sur les spectres ATR-FTIR, mais elle n'était pas de la même ampleur pour tous : Elle était bien plus importante pour S1 que pour tous les autres TA.

L'extraction de la PVP dès le 1^{er} NEP en présence de S1 a conduit à se poser la question de la vitesse de dégradation de la membrane par des tensioactifs et son impact sur la durée de vie de la membrane. Dans ce cadre, 4 séries consécutives de NEP ont été réalisées et les résultats ont démontré que la perte de la PVP n'augmentait pas après le 1^{er} NEP avec les nouveaux prototypes. De même, l'adsorption des TA (liaisons C-H) et la récupération des flux sont restées constantes au fil des 4 séries. Ceci semble indiquer que :

- ✓ La PVP qui part au 1^{er} NEP est une PVP facilement extractible. Ce phénomène rappelle les dégradations de PVP en 2 temps par NaOCl qui suggéraient déjà 2 types de PVP distinctes dans les membranes.
- ✓ Il existerait un maximum d'adsorption des TA porteurs de ces liaisons C-H sur la membrane. Ceci est en accord avec l'hypothèse d'une adsorption monocouche qui saturerait la surface de la membrane.

Une étude de vieillissement accéléré des membranes sous microonde (MW) jusqu'à 240 min a été réalisée avec 7 différentes solutions dont les tensioactifs S1, S2+S3, S4, la Matrice D, NaOCl à pH = 8, le détergent enzymatique Formule D-C2 et l'eau DI. Les résultats ont montré que tous les produits contenant les TA attaquent modérément la PVP, mais pas la PES, tandis que NaOCl attaque les deux polymères. Le niveau de disparition de la PVP pourrait être comparable à celui obtenu à la demi-vie de la membrane avec NaOCl utilisée en désinfection, ce qui n'empêche pas ce produit d'être utilisé à l'échelle industrielle avec des durées de vie des membranes généralement comprises entre 2 et 4 ans.

Ces bons résultats ont été confortés par un essai de NEP de 51 h cumulées par le détergent contenant S2+S3 (Formule A-C2) avec une membrane spirale 4'' dont les performances de filtration du lait écrémé UHT (flux dans le lait écrémé, rétentions) n'ont pas été significativement modifiées.

Sur la base des travaux de cette thèse, trois détergents enzymatiques ont été formulés qui sont désormais en cours de commercialisation par le Groupe Kersia, tandis que deux autres formules sont en attente d'homologation du tensioactif S4 pour la Liste Française des produits autorisés pour le nettoyage des surfaces en contact avec les denrées alimentaires (Arrêté du 8 Septembre 1999) pour être commercialisées à leur tour.

Ainsi, à l'issue de cette thèse, nous pouvons donc revendiquer à la fois des résultats expérimentaux d'intérêt pour le fabricant de détergents, et des avancées sur la méthodologie à suivre et les questions fondamentales qui relèvent de l'activité de l'ISCR. Cette collaboration a donc été fructueuse pour les deux parties et va se poursuivre à l'avenir.

PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, la caractérisation des résidus protéiques par ATR-FTIR après le NEP des membranes colmatées et nettoyées par des solutions enzymatiques ne pouvait pas discriminer les enzymes du détergent des protéines du lait écrémé. Les futurs travaux pourraient creuser la question de la différenciation des protéines de lait *vs* enzymes des détergents en effectuant par exemple des analyses en solution par chromatographie d'exclusion stérique. Cette méthode avait été utilisée par Argüello et al. [2]. Dans le même esprit, une autre étude a utilisé la méthode d'électrophorèse sur gel pour distinguer les protéines (BSA et β -Lg), des enzymes colmatées sur une membrane en PES [3].

Par ailleurs, une étude a montré que plus un nettoyage avec une solution enzymatique (non formulée) est prolongé (60, 120 min), plus il y a d'enzymes déposées sur la membrane [3]. Dans la présente étude, nous avons pu observer un dépôt enzymatique sur les membranes vierges nettoyées pendant 60 min en réacteur fermé et en condition d'UF avec des solutions enzymatiques non formulées, mais une fois incorporées à la Matrice D (contenant le surfactant S1), les résidus protéiques (supposément enzymes + protéines de lait écrémé) étaient quasi nuls. Les résultats d'une étude préliminaire de la cinétique de nettoyage en réacteur fermé effectuée durant cette thèse, mais non communiqués dans ce manuscrit, ont suggéré que l'élimination des protéines pourrait être obtenue en un temps très court de l'ordre de 5 min pour la Formule D-X1 et la Formule D-C1, 15 min pour la Formule D-B1 et 25 min pour la Formule D-C2. Sous réserve de transposition en conditions d'UF, la durée du NEP pourrait être significativement réduite à moins de 30 min selon l'enzyme utilisée dans la formulation, permettant une économie de temps et d'énergie (au lieu de 45-60 min habituellement utilisées en NEP chimique).

Le nettoyage enzymatique est réputé plus écologique, car générant peu d'effluents en volume et moins polluants pour l'environnement. Cette réputation est basée sur des études réalisées avec des enzymes seules diluées dans l'eau. Or, la présente thèse a souligné l'intérêt du développement des détergents enzymatiques formulés, ce qui peut leur faire perdre une partie de leur caractère biodégradable si le choix des tensioactifs et autres co-formulants (conservateurs, inhibiteur de corrosion/entartrage, etc.) n'est pas fait avec soin. Il serait donc intéressant de mener une étude de l'impact environnemental du nettoyage enzymatique à travers une analyse de cycle de vie (durée, volume, pH, et composition des effluents) en comparaison d'un nettoyage alcalin et/ou acide. Par ailleurs, une analyse de cycle de vie combinée à une optimisation multicritère (écologie, économie, efficacité, innocuité vis-à-vis de la membrane...) aurait pour bénéfice de positionner clairement les détergents enzymatiques formulés par rapport aux détergents chimiques formulés.

Après un nettoyage enzymatique, une solution alcaline ou acide est utilisée dans le but de dénaturer les enzymes forcément sensibles au pH, enfin de les rendre inoffensives vis-à-vis du fluide filtré au cours de la production post-NEP suivante. Cependant, si le nettoyage enzymatique est censé être moins polluant, ajouter des étapes alcalines/acides pourrait-il être contreproductif vis-à-vis de la question de pollution ? Il est clair qu'une élévation de température n'est pas forcément envisageable pour des raisons de stabilité thermique des membranes polymères. En outre, la dénaturation pourrait s'accompagner d'une augmentation de l'adsorption des enzymes sur la membrane. Quelle alternative pourrions-nous alors envisager ? Cette question est ouverte.

Dans la présente thèse comme dans nombre d'autres travaux ayant étudié les enzymes dans le cadre du nettoyage en IAA, à notre connaissance, aucun n'a étudié le caractère biocide des enzymes. En effet, les enzymes sont capables d'attaquer les bactéries en hydrolysant les protéines des membranes de ces dernières. L'effet biocide de certaines protéases a été vérifié sur un grand nombre de microorganismes [4,5]. Par conséquent, le développement des biocides enzymatiques pour les IAA reste un sujet vaste à explorer.

Références_Conclusion générale & Perspectives

- [1] L. Le Petit, Développement de méthodologie, conception et validation de détergents/biocides pour le nettoyage en place de membranes polymères de l'industrie laitière. Thèse de l'Université de Rennes 1 (France) 2020. <https://www.theses.fr/2020REN1S011>.
- [2] M. A. Arguello, D. Elzo, F.A. Riera, R. Alvarez, Optimisation de l'hydrolyse des protéines du lactosérum en utilisant des détergents commerciaux enzymatiques et non-enzymatiques, The Canadian Journal of Chemical Engineering 76 (2) (1998) 276 – 280. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450760216>
- [3] H.B. Petrus, H. Li, V. Chen, N. Norazman, Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by protein mixture solutions, J Memb Sci. 325(2) (2008) 783-92. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.09.004>
- [4] Y. Lequette, C. Faille, A. Ronse, C. Slomianny, E. Garénaux, Y. Guerardel, Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel, International Journal of Food Microbiology 143 (2010) 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.038>.
- [5] M. Kukhtyn, K. Kravcheniuk, L. Beyko, Y. Horiuk, O. Skliar, S. Kernychnyi, Study of the influence of savinase Evity 16L enzyme on biofilms formation of staphylococcus aureus on stainless steel with different roughness, Food science and Technology 2 (2019) 26-32. <https://media.neliti.com/media/publications/297383-study-of-the-influence-of-savinaseevity1-6936ee00.pdf>

Titre : Formulation et étude de nouveaux détergents enzymatiques pour le nettoyage de membranes d'ultrafiltration de l'industrie laitière – Développement et validation de méthodologies associées.

Mots clés : Membrane d'ultrafiltration en PES/PVP, Lait écrémé, Colmatage protéique, Nettoyage en place, Nettoyage enzymatique, Formulation

Résumé :

L'ultrafiltration (UF) de lait écrémé pour la standardisation de la teneur en protéines avant fabrication fromagère est un procédé membranaire très répandu à l'échelle industrielle. Cependant, le colmatage des membranes par des protéines du lait écrémé provoque une baisse de la productivité et constitue un verrou de ce procédé.

Ainsi, l'étape de nettoyage/désinfection bi-quotidienne est indispensable afin de restaurer les performances de la membrane et d'assurer la sécurité sanitaire ainsi que la qualité des produits. Elle est en général réalisée avec des détergents formulés alcalins et acides mais il est également possible d'utiliser des détergents enzymatiques formulés ayant la réputation d'être plus efficaces.

Cependant, peu d'études fondamentales existent à ce sujet, ce que cette thèse se propose de contribuer à combler. Ainsi, l'objectif de cette thèse a été de développer de nouveaux détergents enzymatiques efficaces et compatibles avec la membrane en PES/PVP mondialement utilisée pour l'UF de lait écrémé.

La cible du nettoyage est un dépôt de protéines. La démarche s'est appuyée sur une méthodologie d'aide à la formulation de détergents fondée sur la mesure des dépôts résiduels sur la membrane par ATR-FTIR: que ce soit les protéines, les enzymes ou les autres constituants des détergents étudiés.

De multiples prototypes ont été formulés en collaboration avec le Groupe Kersia. Leur évaluation a suivi 3 étapes: (i) des tests rapides en réacteur fermé (14 cm²) pour sélectionner les détergents prometteurs selon leur efficacité d'élimination du colmatage protéique, leur rinçabilité et le respect de l'intégrité de la membrane à court terme, (ii) la transposition des résultats prometteurs en condition de filtration (127 cm²) validant également la filtrabilité des détergents, (iii) enfin, la validation de la compatibilité détergent/membrane sur le long terme grâce au vieillissement accéléré sous micro-onde (3 cm²), et au nettoyage d'une membrane spirale (6.8 m²) pendant au moins 50h.

Title: Formulation and study of new enzymatic detergents for the cleaning of ultrafiltration membranes in dairy industry – Development and validation of associated methodologies

Keywords: PES/PVP UF membrane, Skim milk, Protein fouling, Cleaning in Place, Enzymatic cleaning, Formulation

Abstract:

Ultrafiltration (UF) of skim milk for standardization of the protein content for cheese making is a very common membrane process. However, fouling of the membranes with skim milk proteins causes a drop in productivity and constitutes a bottleneck to this process.

On an industrial scale, the cleaning/disinfection step is essential to restore the performances of the membrane and ensure health safety and product quality. It is generally carried out with alkaline and acidic formulated detergents. However, sometimes these detergents are unable to restore the membrane performances.

Manufacturers then resort to formulated enzymatic detergents which enjoy the reputation of being more effective. However, few fundamental studies exist on this topic.

The objective of this thesis was to rely on a methodology for detergents formulation assistance to develop new enzymatic detergents which are efficient and compatible with the PES/PVP membrane widely used for skim milk UF. Several prototypes have been formulated in collaboration with Kersia Group. Their validation consisted of 3 steps: (i) rapid tests in a batch reactor (14 cm²) to select promising detergents according to their effectiveness in eliminating protein fouling, their cleanability and the integrity of the membrane, (ii) validation of promising results in filtration conditions (127 cm²) and the filterability test of detergents, (iii) finally, validation of detergent/membrane compatibility over the long term thanks to accelerated ageing under microwave (3 cm²) and cleaning of a spiral membrane (6.8 cm²) during at least 50 h.