

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES ET L'UNIVERSITE LIBANAISE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 602
Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : « Génie des procédés »

ECOLE DOCTORALE
des Sciences et de Technologie
« Biotechnologie »

Par

« **Lisa ZAOUK** »

« **Récupération d'exopolymères issus de surnageants de culture de *Porphyridium cruentum* par techniques membranaires : étude de la filtrabilité des solutions sur une membrane organique et caractérisation du colmatage** »

Thèse présentée et soutenue à « Saint-Nazaire », le « 03 octobre 2018 »

Unité de recherche : Laboratoire GEPEA UMR CNRS 6144

Laboratoire de Biotechnologie Appliquée (LBA 3B) du centre AZM pour la
Recherche en Biotechnologie et ses Applications

Thèse N° : 135698

Rapporteurs avant soutenance :

Philippe Moulin Professeur, Université d'Aix-Marseille
Patrick Dutournié Professeur, Université de Haute Alsace

Composition du Jury :

Président :	Murielle Rabiller-Baudry	Professeur, Université de Rennes 1
Examineurs :	Fawaz El Omar	Professeur, Université Libanaise
	Bastien Seantier	Maître de conférences, Université de Bretagne Sud
Dir. de thèse :	Patrick Bourseau	Professeur, Université de Bretagne Sud et Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Samir Taha	Professeur, Université Libanaise
Co-enc. de thèse :	Anthony Massé	Maître de conférences, Université de Nantes

Nouvelle définition du sigle PhD dans mon dictionnaire d'apprentissage :

Patience – Honorer – Donner

Patience et faire face à toutes les difficultés pour en sortir victorieux.

« La patience est une vertu qui porte toujours sa récompense avec elle. » ~ Axel Oxenstiern

Honorer chaque instant de la vie et profiter des belles opportunités qui s'offrent à nous. Pour ce faire, poser un regard positif sur les événements et les épreuves et garder un esprit ardent ranimé par la foi, la confiance, la volonté, la persévérance et l'ambition afin d'en tirer les éléments utiles pour avancer.

Donner avec amour et travailler de tout cœur.

« Tout labeur est futile s'il n'est pas accompli avec amour. » ~ Gibran Khalil Gibran

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Génie des Procédés – Environnement – Agroalimentaire (GEPEA, UMR-CNRS 6144) de l'Université de Nantes et en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie Appliquée (LBA 3B) de l'Université Libanaise.

En préambule à ce mémoire, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je voudrais commencer par remercier les financeurs de cette thèse : l'École Doctorale des Sciences et de Technologie (EDST) de l'Université Libanaise avec l'association AZM et SAADE par le biais de la bourse AZM-UL ainsi que l'Agence française de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME) dans le cadre du projet Algoraff.

Je remercie Messieurs Jack Legrand, Pascal Jaouen et Jérémy Pruvost anciens et actuel directeurs du laboratoire GEPEA pour m'avoir accueillie au sein de leur établissement. J'adresse une attention toute particulière à Monsieur Mohamad Khalil, directeur du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications de l'Université Libanaise, pour son encouragement et son soutien.

Je remercie également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse :

- Mme Murielle Rabiller-Baudry pour avoir accepté la présidence du jury et participé à l'évaluation de ce travail.

- Messieurs Philippe Moulin et Patrick Dutournié pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, pour l'attention qu'ils ont bien voulu porter à ce travail et pour la pertinence de leurs critiques.

- Messieurs Fawaz El Omar et Bastien Seantier pour leur contribution en tant qu'examineurs et pour la qualité de leurs remarques durant la discussion ayant pris place à la fin de ma soutenance.

J'exprime ma reconnaissance envers les responsables scientifiques de ma thèse pour avoir partagé avec moi leur expertise scientifique dans le domaine de la filtration membranaire. Je leur en sais infiniment gré pour m'avoir prodiguée de leurs conseils judicieux, pour la

confiance qu'ils m'ont accordée et pour leur soutien jusqu'au terme de la thèse en dépit des difficultés affrontées. Je remercie Patrick Bourseau, mon directeur de thèse en France, pour son suivi pendant la durée de mon doctorat, et Samir Taha, mon directeur de thèse au Liban, pour ses conseils importants. Je tiens spécialement à remercier Anthony Massé, mon encadrant de thèse, pour sa disponibilité et sa gentillesse, et à apprécier ses qualités humaines.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Madame Murielle Rabiller-Baudry et Messieurs Pascal Jaouen, Sébastien Jubeau et Benoît Teychené, pour leurs conseils avisés et constructifs.

*Je souhaite remercier encore une fois Madame Murielle Rabiller-Baudry pour la réalisation des analyses d'autopsie membranaire par FTIR-ATR et Monsieur Benoît Teychené pour les analyses d'autopsie par AFM. Je remercie également la plate-forme R&D Algosolis (UMS CNRS 3722) pour la fourniture des surnageants à partir des cultures de *Porphyridium cruentum* réalisées par Jordan Tallec, et M. Meignan (Ecolab, France) pour nous avoir gracieusement fourni des produits de nettoyage Ultrasil et procuré des conseils sur leur utilisation.*

Je tiens à apprécier également l'aide, la motivation et la bonne humeur des membres du personnel technique du laboratoire GEPEA : Raphaëlle Touchard, Delphine Drouin, Laurence Lavenant, Hélène Marec, Emmanuel Dechandol, Guillaume Roelens, Sébastien Chollet et Frank Judic. Merci également à tous les enseignants-chercheurs pour leur gentillesse, leur bienveillance et leurs conseils.

Je remercie Laurette Mouille, Carole Broussard, Marie-Pierre Fuchs et Carole Briard pour leur gentillesse et leur soutien, ainsi que pour l'organisation et la gestion qu'implique une soutenance de thèse. Au terme de l'aide administrative à l'Université Libanaise, je remercie aussi Jana El Hajj et Zeinab Ibrahim.

Une pensée particulière à Jocelyne Nicolleau qui nous a quittés mais dont le sourire, la gentillesse et la motivation resteront à jamais gravés dans mon cœur. Que ton âme repose en paix.

Je ne saurais oublier mes collègues. Sans vous, ces années passées n'auraient pas été les mêmes. Merci à tous les nombreux stagiaires, doctorants, postdoctorants que j'ai rencontrés et

côtoyés au GEPEA : Julie Guilbaud, Wenli, Jian, Astrid, Briec, Emilie, Arnaud, Valéria, Razmig, Rémy, Thomas, Sergio, Benjamin L.G., Romain, Kohei, Armel, Meriem, Rebiha, Ikha, Imma, Eglantine, Antoine, Jérémy, Guillaume, Kashif, Sikandar, Maeva, Borhan...

Merci à mes amis de bureau 226, « le bureau international » pour les beaux moments partagés ensemble et pour leur bonne humeur : Alexandra, Vladimir, Philippe, Rémi et Hengsim.

Merci à mes ANANAS adorables Liliana, Erika, Shuli ma jumelle, Myriam, Antoinette, Rosine, Charlène et Dounia. Je suis sûre et certaine que les liens de notre amitié sont si forts que le temps et le vent ne pourront jamais les briser. Je suis ravie d'avoir partagé une ambiance si sympathique avec vous ! Merci aussi à mes chers amis Adeline, Marlène, Fernando, Bahareh, Camilo, Kabayi, Momo et Sean.

Je tiens à remercier et apprécier la sympathie et le soutien de Rafik Balti, Nicolas Brodu et Marthe Gilbert. Plein d'estime pour vous !

L'esprit et la chaleur de mon petit et beau pays appelé Liban (« Loubnan » signifiant la montagne blanche) ont été toujours présents dans la joie et la sympathie de mes amis et compatriotes libanais. Je remercie Jacqueline Duclou (merci pour tout ce que tu fais pour nous), Mohamad Achour, Hasan, Ghassan, Aumaya, Georgina, Nour, Georgio, Abdelkader, Alaa, Habib, Ramzi, Perla, Stéphanie, Mahdi, Akaber, Fatima, Mohamad Sayegh, Ibrahim, Hussein, Carla, Karim, Mohamad Nehmeh, Mohamad Arnaout, Majd, Darwish, Ali et mes sœurs de cœur Mira et Christelle. Un grand merci aussi s'adresse à mes ami(e)s et mes cousin(e)s au Liban ou ailleurs qui m'ont toujours soutenue sans faille.

Enfin, là encore, les mots vont me manquer. Un immense merci du fond du cœur n'est jamais suffisant pour rendre hommage à ma famille : maman, papa, Lourda, Rouhana, Laurence et mes petits Lara et Rouhana. Humblement, j'aimerais exprimer ma reconnaissance pour les sacrifices qu'ils ont consentis, pour leur soutien moral incommensurable et pour m'avoir toujours encouragée à avancer et avoir guidée mes pas sur les bons chemins de la vie. Votre amour inconditionnel, c'est ce qu'il y a de plus beau et de plus pur. Mes parents, s'il y a une chose dont je suis fière, c'est bien d'être votre fille.

Table des matières

Nomenclature	xix
Introduction Générale	1
Chapitre I. Synthèse Bibliographique.....	5
1. Introduction.....	6
2. Caractéristiques biologiques de la microalgue <i>Porphyridium cruentum</i> et de la cyanobactérie <i>Arthrospira platensis</i>	7
2.1. Qu'est-ce qu'une microalgue ou une cyanobactérie ?	7
2.2. Classification taxonomique	7
2.2.1. <i>Arthrospira platensis</i>	7
2.2.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	8
2.3. Morphologie	8
2.3.1. <i>Arthrospira platensis</i>	8
2.3.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	9
2.4. Composés d'intérêt.....	11
2.4.1. <i>Arthrospira platensis</i>	12
2.4.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	13
3. Exopolysaccharides (EPS).....	15
3.1. Généralités	15
3.2. Etat de l'art sur les EPS d' <i>A. platensis</i> et de <i>P. cruentum</i>	16
3.2.1. Caractéristiques biochimiques des EPS : structure, composition et fonction	16
3.2.1.1. <i>Arthrospira platensis</i>	16
3.2.1.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	17
3.2.2. Conditions de production des EPS	19
3.2.2.1. <i>Arthrospira platensis</i>	19

3.2.2.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	21
3.2.3. Potentiel biotechnologique des EPS.....	23
3.2.3.1. <i>Arthrospira platensis</i>	23
3.2.3.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	24
3.2.4. Techniques de récupération des EPS	26
3.2.4.1. <i>Arthrospira platensis</i>	26
3.2.4.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	29
<i>Conclusion partielle (sections 2 et 3)</i>	30
4. Généralités sur les procédés de filtration membranaire	32
4.1. Principe.....	32
4.2. Configuration des membranes et géométrie des modules	34
4.2.1. Matériaux membranaires.....	34
4.2.2. Géométrie des membranes et des modules membranaires.....	35
4.2.2.1. Module plan.....	36
4.2.2.2. Module spiralé	36
4.2.2.3. Module tubulaire.....	37
4.2.2.4. Module fibres creuses	37
4.3. Caractéristiques des membranes.....	39
4.3.1. Perméabilité (performance hydraulique).....	39
4.3.2. Sélectivité.....	40
4.4. Modes de filtration membranaire	40
4.4.1. Ecoulement du fluide	40
4.4.2. Filtration à pression constante ou à flux constant	41
4.4.3. Conduite de l'opération.....	42
4.4.3.1. Fonctionnement discontinu.....	42

4.4.3.2.	Fonctionnement continu	43
4.4.3.3.	Fonctionnement semi-continu	44
4.5.	Limitations au transfert du solvant et des solutés.....	44
4.5.1.	Polarisation de concentration	44
4.5.1.1.	Théorie du film.....	44
4.5.1.2.	Modèle du gel.....	45
4.5.2.	Colmatage.....	46
4.6.	Moyens de lutte contre la polarisation de concentration et le colmatage.....	46
4.6.1.	Procédés préventifs	46
4.6.2.	Nettoyage de la membrane.....	47
4.7.	Mécanismes et caractérisation du colmatage.....	48
4.7.1.	Définition	48
4.7.2.	Mécanismes de colmatage.....	49
4.7.3.	Modèles de colmatage.....	50
4.7.4.	Typologie du colmatage selon sa facilité à être éliminé	52
4.7.5.	Caractérisation du colmatage	53
5.	Facteurs affectant la filtrabilité de solutions de polysaccharides et la propension au colmatage	58
5.1.	Caractéristiques des membranes.....	58
5.1.1.	Matériau membranaire et hydrophobicité	58
5.1.2.	Taille des pores, distribution de la taille des pores et seuil de coupure	59
5.2.	Caractéristiques physico-chimiques de la solution filtrée	60
5.2.1.	pH.....	60
5.2.2.	Sels et force ionique	61
5.2.3.	Type de colmatant	65

5.3.	Paramètres opératoires.....	67
5.3.1.	Vitesse tangentielle	67
5.3.2.	Pression transmembranaire et flux de perméation – notion de flux critique.....	68
5.3.3.	Température	70
6.	Filtration tangentielle pour la récupération des EPS produits par les microalgues	70
	<i>Conclusion partielle (sections 4 à 6)</i>	<i>73</i>
	Chapitre II. Matériel et Méthodes.....	76
1.	Introduction.....	77
2.	Culture d' <i>Arthrospira platensis</i>	77
2.1.	Souche et milieu de culture	77
2.2.	Les différentes étapes de la culture.....	78
2.2.1.	Culture en erlenmeyers de 250 mL puis de 2 L	79
2.2.2.	Culture en photobioréacteur airlift de 6 L.....	80
2.2.3.	Culture en photobioréacteur airlift de 130 L.....	82
2.3.	Analyses.....	83
2.3.1.	Concentration en biomasse.....	83
2.3.2.	Dosage des pigments (chlorophylle a et caroténoïdes).....	83
3.	Ultrafiltration des solutions d'EPS de <i>Porphyridium cruentum</i>	84
3.1.	Préparation des solutions d'EPS.....	84
3.1.1.	Eau déionisée.....	84
3.1.2.	Souche et milieu de culture	85
3.1.3.	Solutions d'EPS filtrées	85
3.2.	Analyses et caractérisation des solutions d'EPS	88
3.2.1.	Analyse des sels	88
3.2.2.	Mesure du pH	89

3.2.3.	Dosages des sucres totaux	89
3.2.4.	Dosage des protéines	90
3.2.5.	Mesure des matières sèches.....	90
3.2.6.	Mesure de la turbidité.....	90
3.2.7.	Caractéristiques des solutions d'EPS	91
3.3.	Membrane et pilote d'ultrafiltration	91
3.3.1.	Membranes utilisées	91
3.3.2.	Description de l'installation d'ultrafiltration.....	92
3.4.	Conditions opératoires de conditionnement et de nettoyage de la membrane, et des essais de filtration	96
3.4.1.	Conditionnement de la membrane.....	96
3.4.2.	Conditions opératoires des filtrations des solutions d'EPS.....	97
3.4.2.1.	Conditions générales de filtration.....	97
3.4.2.2.	Détermination des flux limite et critique	98
3.4.2.3.	Calcul des résistances hydrauliques	100
3.4.2.4.	Calcul du taux de rétention.....	102
3.4.3.	Nettoyage de la membrane.....	103
3.4.3.1.	Nettoyage physique	103
3.4.3.2.	Nettoyage en place NEP (nettoyage chimique).....	103
4.	Autopsie des membranes colmatées par FTIR-ATR et AFM.....	103
4.1.	Préparation de la membrane autopsiée	103
4.2.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR).....	105
4.2.1.	Principe de fonctionnement de la méthode et matériel utilisé	105
4.2.2.	Les différents spectres effectués FTIR.....	107
4.3.	Microscopie à force atomique (AFM)	108

Chapitre III. Stratégie expérimentale et premiers essais sur la cyanobactérie

<i>Arthrospira platensis</i>	110
1. Positionnement du sujet et démarche expérimentale	111
2. Premiers essais de récupération d'EPS solubles d' <i>Arthrospira platensis</i>	113
2.1. Suivi de la culture dans le PBR HectoR	113
2.2. Séparation des cellules du milieu de culture	116
<i>Conclusion</i>	119

Chapitre IV. Résultats et Discussion : Filtrabilité des solutions

d'exopolysaccharides solubles de <i>Porphyridium cruentum</i>	121
I. Introduction et résumé du chapitre IV « sur article »	122
II. Filterability of exopolysaccharides solutions from the red microalga <i>Porphyridium cruentum</i> by tangential filtration on a polymeric membrane	126
1. Introduction	128
2. Experimental	131
2.1. Water and preparation of EPS solutions	131
2.2. Assays	134
2.3. Ultrafiltration runs	135
2.3.1. Membrane and ultrafiltration set-up	135
2.3.2. Membrane conditioning and cleaning	137
2.3.3. Ultrafiltration of EPS solutions	137
2.3.4. Determination of limiting and critical permeation fluxes	138
2.3.5. Resistance in series analysis	139
3. Results and discussion	140
3.1. Cleaning protocol assessment	140
3.2. Influence of operating parameters on EPS filtration	143
3.2.1. Cross-flow velocities v and transmembrane pressure TMP	143

3.2.2.	EPS concentration C_0	149
3.2.3.	Temperature T	152
3.3.	Fouling characterization	153
3.3.1.	Hydraulic resistances of membrane and fouling layer	153
3.3.2.	Estimation of the critical flux for irreversibility J_{ci}	156
3.4.	Feasibility of the extraction of EPS from <i>P. cruentum</i> supernatants by organic UF at an industrial scale.....	161
4.	Conclusion	163

Chapitre V. Résultats et Discussion : Caractérisation du colmatage

irréversible par autopsie membranaire (FTIR-ATR et AFM).....169

1.	Introduction.....	170
2.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR).....	171
2.1.	Analyse FTIR-ATR de la membrane vierge.....	171
2.2.	Analyse FTIR-ATR de la membrane colmatée	172
2.2.1.	Plan de la membrane colmatée autopsiée.....	172
2.2.2.	Identification des composés colmatants	173
2.2.2.1.	Recherche des colmatants.....	174
2.2.2.2.	Nature des colmatants 1 et 2.....	175
2.2.3.	Recherche approfondie des EPS	179
2.2.3.1.	Méthodologie de recherche des EPS	179
2.2.3.2.	Mise en évidence de la présence des EPS	179
2.2.4.	Cartographie des colmatants	182
2.2.4.1.	Cartographies du colmatant 1 et du colmatant 2	182
2.2.4.2.	Cartographie des EPS (localisés à 1040 cm^{-1}).....	183
3.	Microscopie à force atomique (AFM)	186

3.1. Topographie de la membrane vierge conditionnée.....	186
3.2. Topographie de la membrane MQ ₂ colmatée et rincée « au milieu »	187
3.3. Topographie de la membrane MQ ₂ colmatée et rincée « en sortie ».....	188
3.4. Conclusion sur la topographie des membranes vierge et colmatée puis rincée.....	188
<i>Conclusion</i>	189
Conclusions Générales et Perspectives	191
Références Bibliographiques.....	198

Liste des figures

Figure I.1. Clichés des formes spiralée (a) et droite (b) d' <i>Arthrospira platensis</i> (MEB, (Rossi, 2005)) et observation microscopique d'une culture de <i>Porphyridium cruentum</i> (c) (Jubeau, 2012).	10
Figure I.2. Organisation structurale d'une cyanobactérie (a) et de la microalgue <i>Porphyridium cruentum</i> (b) (Lee, 2008).	11
Figure I.3. Schéma d'extraction des EPS (adapté de Cornet (1992) et Filali Mouhim <i>et al.</i> (1993)).....	29
Figure I.4. Schématisation de principe de la filtration à travers une membrane permselective. .	32
Figure I.5. Situation des procédés de séparation par membrane en fonction de la taille des particules ou des molécules retenues (Aimar <i>et al.</i> , 2010a).	33
Figure I.6. Comparaison entre filtration frontale et filtration tangentielle (Aimar <i>et al.</i> , 2010a).	41
Figure I.7. Modélisation de la polarisation par la théorie du film (a) et le modèle du gel (b) (Aimar <i>et al.</i> , 2010b).....	46
Figure I.8. Description des principaux mécanismes de colmatage.	49
Figure I.9. Schéma représentant les différents types de colmatage et leur élimination.	53
Figure I.10. Le modèle "egg-box" pour le pontage de molécules d'alginate de sodium par des cations divalents (d'après Katsoufidou <i>et al.</i> , 2007).....	62
Figure I.11. Influence qualitative de la force ionique et du rapport $R = Ca^{2+}/alginate$ sur les interactions Ca – alginate (Listiarini <i>et al.</i> , 2011).	64
Figure I.12. Formes du flux critique (Field <i>et al.</i> , 1995).	69
Figure II.1. Photographies au microscope optique de la cyanobactérie <i>A. platensis</i> (crédits : GEPEA).	77
Figure II.2. Montée en échelle de la culture d' <i>Arthrospira platensis</i> PCC 8005.	79

Figure II.3. Culture de la cyanobactérie <i>A. platensis</i> dans un photobioréacteur Airlift de 6 L avec le panneau de LEDs.	81
Figure II.4. Préparation des solutions d'EPS utilisées lors des essais d'ultrafiltration.	87
Figure II.5. Représentations schématiques du module plan (Rayflow 100) et de l'écoulement dans le module (le schéma complet de l'installation est décrit sur la Figure IV.1 du chapitre IV.).	92
Figure II.6. Variation du débit d'écoulement en fonction de la fréquence de la pompe Quattroflow-150 S pour différentes pressions transmembranaires appliquées.....	94
Figure II.7. Variation du débit d'écoulement en fonction de la fréquence de la pompe Quattroflow-1200 S pour différentes pressions transmembranaires appliquées.....	95
Figure II.8. Choix de la fréquence de la pompe Quattroflow-1200 S en fonction de la pression transmembranaire appliquée pour les différentes valeurs de la vitesse tangentielle utilisées au cours des essais d'UF des EPS.....	95
Figure II.9. Evolution du flux de perméation en fonction de la PTM appliquée, pour une solution réelle.....	99
Figure II.10. Principe de détermination des différentes résistances hydrauliques de colmatage.	102
Figure II.11. Parties (a) et (b) de la membrane MQ ₂ colmatée puis rincée à l'eau déionisée utilisées pour les analyses FTIR-ATR et AFM respectivement.	104
Figure II.12. Les différentes étapes subies par la membrane MQ ₂ avant analyse par autopsie..	105
Figure II.13. Trajet du faisceau IR et principe de la FTIR-ATR.	106
Figure II.14. Photos de l'accessoire MIRacle™ (PIKE) sur le spectromètre Jasco 4100 FT/IR.	107

Figure III.1. Evolution de la concentration en biomasse (matières en suspension) en fonction du temps lors de la culture en mode « batchs répétés » de la cyanobactérie <i>A. platensis</i> ($332 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $\text{pH} = 9,5$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$).....	114
Figure III.2. Evolution de la fraction massique de pigments (chlorophylle a et caroténoïdes) et du rapport des densités optiques à 480 et 665 nm (ratio pigmentaire caroténoïdes / chlorophylle a) en fonction du temps lors de la culture en batchs répétés de la cyanobactérie <i>A. platensis</i> ($332 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $\text{pH} = 9,5$, $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$).....	115
Figure III.3. Tamisage de la culture de la cyanobactérie <i>A. platensis</i> sur un tamis de maille 50 μm , suivi d'une centrifugation/filtration du tamisat.	117
Figure III.4. Filtration sur Büchner avec une toile en nylon de 5 μm	118
Figure IV.1. Schematic diagram of the cross-flow filtration set-up.	136
Figure IV.2 . Steady state permeation flux J against TMP at various cross-flow velocities.	143
Figure IV.3. Limiting permeate flux J_{lim} against the cross-flow velocity v on linear (a) and logarithmic scales (b).	146
Figure IV.4. Evolution of permeate flux versus time during cell-free medium filtration, with a step-by-step increase TMP (a) or at the nominal TMP_n of 0.57 bar (b).	148
Figure IV.5. Effect of EPS concentration C_0 on the steady-state permeation flux at various TMP.	150
Figure IV.6. Curve J_{lim} versus $\ln(C_0)$, with J_{lim} the limiting permeate fluxes and C_0 the EPS concentration.....	151
Figure IV.7. Effect of temperature on steady-state permeation flux J at various TMP.....	153
Figure IV.8. Evolution of hydraulic resistances (R_m , R_{rev} and R_{irrev}).	154
Figure IV.9. Evaluation of the critical flux for irreversibility J_{ci} by the method of square wave of applied pressure, with step amplitude of 0.20 bar (a, exp. No. 10) or 0.10 bar (b, exp. No. 11).158	

Figure IV.10. Evolution of the irreversible fouling resistance R_{irrev}^* against the transmembrane pressure with the technique of the square wave of applied pressure.	160
Figure V.1. Spectre FTIR-ATR de la membrane vierge MQ.	172
Figure V.2. Photographie de la demi-membrane MQ ₂ (colmatée et rincée) autopsiée par FTIR-ATR, avec la disposition des 88 points analysés (a), et numérotation des points et des spectres effectués en ces points (b).	173
Figure V.3. Spectres FTIR-ATR de la membrane vierge MQ (en rose) du point 9 de la membrane colmatée MQ ₂	176
Figure V.4. Spectres FTIR-ATR de la membrane vierge MQ (en rose) et au point 59 de la membrane colmatée MQ ₂	177
Figure V.5. Spectres FTIR-ATR aux points 9 (en vert) et 59 (en bleu) de la membrane colmatée MQ ₂	178
Figure V.6. Spectres FTIR-ATR d'un coupon MQ vierge et du coupon MQ trempé dans la solution S0 (5,4 kg.m ⁻³ d'EPS lyophilisés).	180
Figure V.7. Spectres FTIR-ATR de la membrane vierge (en rose), de la membrane trempée dans la solution S0 à 5,4 kg.m ⁻³ d'EPS lyophilisés (en noir), ainsi qu'aux points 9 (en vert) et 59 (en bleu) de la membrane MQ ₂ colmatée.	181
Figure V.8. Cartographies des trois colmatants identifiés.	185
Figure V.9. Topographie (à gauche) et image de phase (à droite) de la membrane vierge conditionnée.	186
Figure V.10. Topographie (à gauche) et image de phase (à droite) de la membrane colmatée puis rincée « au milieu ».	187
Figure V.11. Topographie (à gauche) et image de phase (à droite) de la membrane colmatée puis rincée « en sortie ».	188

Liste des tableaux

Tableau I.1. Fractions de matières sèches de la cyanobactérie <i>A. platensis</i> et de la microalgue <i>P. cruentum</i>	12
Tableau I.2. Composition des EPS capsulaires d' <i>A. platensis</i> (en % de la masse sèche des EPS) (Filali Mouhim <i>et al.</i> , 1993).....	17
Tableau I.3. Exemples de méthodes d'extraction des EPS et des teneurs obtenus dans différentes conditions de cultures d' <i>A. platensis</i>	27
Tableau I.4. Caractéristiques des matériaux membranaires (adapté de Remigy et Desclaux (2007)).....	35
Tableau I.5. Performances comparées des différents modules membranaires (adapté de Remigy et Desclaux (2007)).....	38
Tableau I.6. Quelques classes de produits entrant dans la composition des détergents pour le nettoyage des membranes et leurs modes d'action (adapté de Aimar (2006) et Rabiller-Baudry (2009)).....	48
Tableau I.7. Quelques exemples de méthodes d'autopsie membranaire avec leurs fonctions, avantages et inconvénients.....	55
Tableau II.1. Composition du milieu de culture « Zarrouk modifié» d' <i>A. platensis</i>	78
Tableau II.2. Caractéristiques de la membrane MQ (Synder).	91
Tableau III.1. Conditions opératoires de la centrifugation suivant le tamisage (50 µm) et caractéristiques des surnageants récupérés, en termes de densité optique à 750 nm, concentration des matières en suspension et concentration des EPS.	117
Table IV.1. Composition of the modified BBM culture medium.....	132
Table IV.2. Characteristics of the EPS solutions filtered.	133

Table IV.3. Experiments carried out and their operating conditions	142
Table IV.4. Limiting permeate fluxes and TMP obtained during EPS fouling experiments at 20 °C, with the membrane sample MQ ₂	151
Table IV.5. Comparison of filtration performance of EPS solution and skim milk at close temperatures.....	163
Table IV.A.2.1. Hydrodynamic conditions considered in spiral-wound, plate and frame and tubular modules;.....	168

Nomenclature

Abréviations

AA	Acide arachidonique
AC	Acétate de cellulose
AFM	Microscopie à force atomique
APC	Allophycocyanine
BBMm	milieu Basal de Bold modifié
B-PE	B-phycoérythrine
CFD	Computational Fluid Dynamics
Chla	Chlorophylle a
CIP	Clean-In-Place
C-PC	Phycocyanine
CR	Cellulose régénérée
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
DOTM	Observation directe à travers la membrane
EDTA	Ethylènediaminetétraacétate
EPA	Acide eicosapentaéonique
EPS	Exopolysaccharides
FAO	Food and Agriculture Organization
FTIR-ATR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalA	Acide galacturonique
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse
Glc	Glucose
GlcA	Acide glucuronique
ICP	Spectrométrie à plasma à couplage inductif
Man	Mannose
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEBE	Microscopie électronique à balayage environnemental

MEB-EDS	Microscopie électronique à balayage - Spectrométrie à rayons X à dispersion d'énergie
MELiSSA	Micro Ecological Life Support System Alternative
MF	Microfiltration
MOE	Matières organiques extracellulaire
NEP	Nettoyage en place
NF	Nanofiltration
OI	Osmose inverse
PA	Polyamide
PAN	Polyacrylonitrile
PBR	Photobioréacteur
PES	Polyéthersulfone
PFD	Photons Flux Density
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PS	Polysulfone
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PVDF	Polydifluorure de vinyle
PVP	Polyvinylpyrrolidone
Rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R-PC	R-phycoyanine
R-PE	R-phycoérythrine
UF	Ultrafiltration
Xyl	Xylose

Lettres Latines

A_0	Surface utile de la membrane	m^2
C_0 (ou C_A)	Concentration en soluté dans le cœur de la solution, <i>ou</i> concentration initiale du soluté dans le rétentat	$g.L^{-1}$ ou $kg.m^{-3}$
C_{Chla}	Concentration en chlorophylle	$\mu g.mL^{-1}$ ou $g.m^{-3}$
$C_{caroténoïdes}$	Concentration en caroténoïdes	$\mu g.mL^{-1}$ ou $g.m^{-3}$
C_g	Concentration de gel	$g.L^{-1}$ ou $kg.m^{-3}$
C_m (ou C_w)	Concentration en soluté à la surface de la membrane	$g.L^{-1}$ ou $kg.m^{-3}$
C_p	Concentration en soluté dans le perméat	$g.L^{-1}$ ou $kg.m^{-3}$
$C(t)$	Concentration du soluté dans le rétentat à un instant t	$g.L^{-1}$ ou $kg.m^{-3}$
C_x	Concentration en biomasse sèche (concentration de matières en suspension), exprimée en matière sèche	$g.L^{-1}$ ou $kg.m^{-3}$
D	Coefficient de diffusion du soluté, <i>ou</i> Diamètre du tube cylindrique (membrane tubulaire)	$m^2.s^{-1}$ mm
d_h	Diamètre hydraulique	m
DM	Matières sèches	$kg.m^{-3}$
DO (ou O.D.)	Densité optique	-
e	Épaisseur de la veine fluide	mm
f	Facteur de friction	-
FRV (ou VRR)	Facteur de réduction volumique	-
FC	Facteur de concentration d'un soluté	-
H	Hauteur d'une bande sur un spectre FTIR-ATR	cm
I_r	Intensité relative de la bande d'absorbance caractéristique d'une substance sur le spectre FTIR- ATR de la membrane colmatée	-
I_r^*	Intensité relative de la bande d'absorbance caractéristique d'une substance sur le spectre FTIR- ATR de la membrane neuve	-
J	Flux de perméat	$L.h^{-1}.m^{-2}$
J_c	Flux critique	$L.h^{-1}.m^{-2}$
J_{ci}	Flux critique pour l'irréversibilité	$L.h^{-1}.m^{-2}$

J_{cs}	Forme forte du flux critique	$L.h^{-1}.m^{-2}$
J_{cw}	Forme faible du flux critique	$L.h^{-1}.m^{-2}$
J_{lim}	Flux limite	$L.h^{-1}.m^{-2}$
J_{w0}	Flux de perméation à l'eau déionisée de la membrane avant la filtration	$L.h^{-1}.m^{-2}$ ou $m.s^{-1}$
$J_{w,rincée}$	Flux de perméation à l'eau déionisée de la membrane colmatée et rincée	$L.h^{-1}.m^{-2}$ ou $m.s^{-1}$
$J_{w,t}$	Flux de perméat à la température T de l'expérience	$L.h^{-1}.m^{-2}$
$J_{w,Tréf}$	Flux de perméat corrigé à la température de référence $T_{réf}$	$L.h^{-1}.m^{-2}$
k	Coefficient de transfert de masse	$m.s^{-1}$
K	Coefficient de résistance (constante du modèle d'Hermia)	m^{-3}
Lp_0	Perméabilité de la membrane à faible PTM	$L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$
Lp_{w0}	Perméabilité hydraulique de la membrane	$L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ ou $m.s^{-1}.Pa^{-1}$
m_1	Masse du l'ensemble pilulier et papier filtre	g
m_2	Masse de l'ensemble pilulier, papier filtre et matières en suspension	g
n	Indice de colmatage (dans le modèle d'Hermia)	-
P_e (ou P_f)	Pression à l'entrée du module (ou de l'alimentation)	bar
P_p	Pression du perméat	bar
P_s (ou P_r)	Pression à la sortie du module (ou du rétentat)	bar
PTM (ou TMP)	Pression transmembranaire	bar ou Pa
q_0	Flux de lumière incident	$\mu mol \text{ photons}.m^{-2}.s^{-1}$
Q	Débit volumique de l'alimentation	$m^3.s^{-1}$
r_{irrev}^*	Résistance due au colmatage irréversible relative à une étape de pression supérieure	m^{-1}
R	Rapport entre la concentration de calcium et la concentration d'alginate	-
R_a	Rugosité de la surface de la membrane	nm
Re	Nombre de Reynolds	-

R_m	Résistance hydraulique de la membrane	m^{-1}
$R_{rév}$ (ou R_{rev})	Résistance due au colmatage réversible (éliminé par simple rinçage à l'eau)	m^{-1}
$R_{irrév}$ (ou R_{irrev})	Résistance due au colmatage irréversible (nécessitant une étape de nettoyage chimique pour être éliminé)	m^{-1}
R_{irrev}^*	Résistance du colmatage total irréversible à une étape de pression supérieure (méthode de l'onde rectangulaire)	m^{-1}
R_f	Résistance due au colmatage total	m^{-1}
R_t	Résistance totale à l'écoulement	m^{-1}
S	Section droite du canal d'écoulement	m^2
Sc	Nombre de Schmidt	-
SC (ou $MWCO$)	Seuil de coupure (Molecular Weight Cut-Off)	kDa
Sh	Nombre de Sherwood	-
t	Temps de filtration (dans le modèle d'Hermia)	s
T	Température	$^{\circ}C$
$T_{réf}$	Température de référence	$^{\circ}C$
TMP_{lim}	Pression transmembranaire au flux limite	bar
TMP_n	Pression transmembranaire nominale	bar
TR	Taux de rétention (ou de rejet)	-
TR_{obs}	Taux de rétention observé	-
v	Vitesse tangentielle du fluide	$m.s^{-1}$
V	Volume de perméat (dans le modèle d'Hermia)	m^{-3}
V_0	Volume de la solution d'alimentation	m^{-3} ou L
$V_{culture}$	Volume de culture (pour le dosage des pigments)	m^{-3} ou mL
$V_{méthanol}$	Volume de méthanol	m^{-3} ou mL
$V_P(t)$	Volume du perméat cumulé à l'instant t	L
$V_R(t)$	Volume du rétentat cumulé à l'instant t	L
V_s	Volume de la suspension de cyanobactérie	L
Z	Hauteur de pixel (analyse AFM)	m
\bar{Z}	Hauteur moyenne des pixels	m

Lettres Grecques

δ	Epaisseur de la couche limite de diffusion	μm
ΔP	Perte de charge sur le module membranaire	bar
η	Viscosité dynamique du fluide (perméat assimilé à l'eau dans les équations de J, <i>ou</i> fluide d'alimentation dans l'équation de Re)	Pa.s
η_T	Viscosité de l'eau à la température T de l'expérience	Pa.s
$\eta_{\text{Tréf}}$	Viscosité de l'eau à la température de référence	Pa.s
ρ	Masse volumique du fluide	kg.m^{-3}
τ_w	Contrainte de cisaillement à la surface de la membrane	Pa

Introduction Générale

Ce travail porte sur la récupération d'exopolysaccharides de microalgues par filtration sur une membrane organique.

Depuis plusieurs années, la culture et le bioraffinage des microalgues et des cyanobactéries constituent une filière en pleine émergence, ces microorganismes produisant divers métabolites à haute valeur. Parmi ces microorganismes, la microalgue rouge *Porphyridium cruentum* et la cyanobactérie *Arthrospira platensis* sont capables d'excréter hors de la cellule des polymères, principalement des polysaccharides (exopolysaccharides ou EPS), hétéropolymères polyanioniques sulfatés, dotés de vertus biologiques et de propriétés technofonctionnelles valorisables dans différents secteurs industriels (médical, pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, etc.). Les polysaccharides excrétés par les microalgues se présentent sous deux formes : les EPS capsulaires (liés) qui restent associés à la surface cellulaire, et les EPS solubles qui sont relargués dans le milieu de culture (Arad et Levy-Ontman, 2010 ; De Philippis et Vincenzini, 1998). Le potentiel biotechnologique des polysaccharides naturels est en train de gagner une reconnaissance accrue suite à la tendance des marchés mondiaux à passer de produits synthétiques à des produits naturels. La demande croissante des polysaccharides naturels de l'industrie ne peut pas être satisfaite par ceux provenant des sources traditionnelles que sont les macroalgues rouges et brunes, récoltées dans leurs habitats naturels et épuisées par les récoltes intensives et les conditions environnementales préjudiciables. Une alternative intéressante peut être trouvée dans les EPS des microalgues et des cyanobactéries (Arad et Levy-Ontman, 2010 ; Delattre *et al.*, 2016).

Après la récolte de la biomasse, se pose la question de la gestion et du devenir du surnageant du milieu de culture résiduel. La récupération des EPS solubilisés dans le surnageant permet de valoriser ce dernier et peut faire partie d'une stratégie de bioraffinage de ces microalgues. Les EPS solubilisés peuvent être concentrés, fractionnés et pré-purifiés par filtration tangentielle sur membrane. Cette technique se trouve en concurrence avec des techniques plus conventionnelles comme par exemple la précipitation avec de l'alcool ou avec un surfactant cationique (Patel *et al.*, 2013). Mais ces techniques-là sont souvent inappropriées pour isoler et purifier des EPS à grande échelle en raison de leur durée et des grandes quantités de solvants organiques nécessaires lors de la précipitation. De plus, dans le cas d'EPS provenant des microalgues marines comme *P. cruentum*, les précipités d'EPS sont contaminés par des copécipités de sels et des composés non-sucre de faible poids moléculaire (Patel *et al.*, 2013). Par

contre, la filtration membranaire qui est une technologie mature sur le plan industriel présente un certain nombre d'avantages. Elle respecte les molécules fragiles car elle peut opérer dans des conditions relativement douces (température, contrainte de cisaillement) et ne fait intervenir ni de réactifs chimiques pour la séparation ni de changement de phase. La filtration membranaire est par ailleurs relativement facile à automatiser. Toutefois, en raison des interactions molécules/molécules et molécules/membrane, le colmatage est un point critique de la mise en œuvre des procédés membranaires car il impacte les performances de la membrane (perméabilité, sélectivité et nettoyabilité). Lors de la filtration des solutions d'exopolysaccharides, les groupements carboxylés et sulfatés de ces derniers d'une part, la viscosité des solutions d'EPS et leur propension à former des gels visqueux d'autre part, peuvent jouer un rôle majeur dans le colmatage de la membrane (Villacorte *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, le travail présenté ici a pour objectif d'étudier la filtrabilité de solutions d'EPS issues de cultures de *P. cruentum* sur une membrane organique à l'échelle du laboratoire. Sur un plan applicatif, il s'agit de cerner les conditions hydrodynamiques dans lesquelles des surnageants de milieux de culture pourront être filtrés sur membrane organique pour récupérer et concentrer leurs EPS solubles, et quel(s) type(s) de module, spiralé, plan ou tubulaire, pourraient être mis en œuvre. Sur le plan scientifique, il s'agit de mobiliser des techniques de caractérisation des matériaux pour appréhender la mise en place du colmatage lors de la filtration de solution d'EPS.

Ce mémoire est divisé en 5 chapitres. Le **Chapitre I** est consacré à une synthèse bibliographique présentant en premier lieu les microorganismes mis en œuvre dans ce travail, la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et la microalgue *Porphyridium cruentum*, ainsi que leurs exopolysaccharides (EPS). Ce chapitre s'attache également à décrire les principes généraux et les procédés de filtration membranaire, le colmatage des membranes, ainsi que les applications de l'ultrafiltration à des solutions de polysaccharides provenant de microalgues ou d'autres origines. Les outils d'autopsie membranaire utiles pour caractériser le colmatage sont également décrits.

Le **Chapitre II** présente le matériel utilisé et les méthodes expérimentales appliquées dans cette étude. Il s'agit de la culture des souches utilisées, de la récupération, de la préparation et de la caractérisation des solutions d'EPS, ainsi que de la description du matériel de filtration et des conditions opératoires des différents essais. L'influence des principaux paramètres de

filtration (vitesse tangentielle du fluide, pression transmembranaire, concentration en EPS et température) sur les flux de perméation et sur le colmatage sera étudiée sur un module de petite taille équipé d'une membrane plane organique en PES de 50 kDa. Ce seuil de coupure a été choisi pour assurer une rétention quasi complète des EPS, macromolécules ayant un haut poids moléculaire. Les essais d'ultrafiltration sont effectués en mode de recyclage total du rétentat et du perméat afin d'étudier l'évolution du flux de perméation stabilisé en fonction de la pression transmembranaire appliquée.

Le **Chapitre III** présente la stratégie suivie au cours de la thèse et les premiers résultats obtenus sur la culture de la cyanobactérie *A. platensis*. Il expose également les problèmes rencontrés et les raisons pour lesquelles l'objectif initial de la thèse a été réorienté vers la filtrabilité des solutions d'EPS de *P. cruentum*, étude qui sera présentée dans le Chapitre IV.

Le **Chapitre IV** présente les résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude paramétrique de la filtrabilité des solutions d'EPS de *P. cruentum*. L'étude a été effectuée sur un pilote de laboratoire (Rayflow, Orelis) équipé d'une membrane plane et d'un espaceur côté alimentation, en mode de recyclage total du perméat et du rétentat. Les courbes flux-pression transmembranaire ont été établies jusqu'à l'obtention du flux limite, pour différentes valeurs de la vitesse tangentielle du fluide (de 0,3 à 1,2 m.s⁻¹), de la concentration en EPS (de 0,10 à 1,06 kg GlcEq.m⁻³) et de la température (20 et 40 °C). Les résistances hydrauliques de colmatage ont également été déterminées et le flux critique pour le colmatage irréversible a été évalué pour un jeu des paramètres opératoires. Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article accepté dans la revue scientifique *Environmental Technology*.

Dans le **Chapitre V**, le colmatage irréversible de la membrane a été caractérisé par le biais de cartographies FTIR-ATR (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée), réalisées dans l'équipe du Professeur Murielle Rabiller-Baudry à l'ISCR UMR 6226, équipe Chimie et Ingénierie des Procédés de l'Université de Rennes 1, ainsi que par AFM (Microscopie à Force Atomique), ces analyses ayant été réalisées par Benoît Teychené à l'IC2MP UMR 7285 de l'Université de Poitiers.

Enfin, la dernière partie de ce mémoire présente la conclusion générale de ces travaux et propose quelques perspectives.

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

1. Introduction

La première partie de cette synthèse bibliographique présente les caractéristiques biologiques des souches mises en œuvre dans ce travail, la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et la microalgue *Porphyridium cruentum* (section 2). La section 3 s'attache ensuite à définir ce qu'on entend par exopolysaccharides (EPS) puis à présenter un état de l'art sur les EPS d'*A. platensis* et de *P. cruentum*. Cela englobe les caractéristiques biochimiques de ces EPS, les conditions de leur production, leur potentiel biotechnologique et les techniques de leur récupération.

La deuxième partie est consacrée à la filtration membranaire, technique la plus prometteuse pour la récupération des EPS de microalgues. Dans la section 4, sont décrits tout d'abord les concepts fondamentaux de la filtration membranaire, le colmatage et les moyens de lutte contre ce dernier. Les différentes techniques d'autopsie membranaire utilisées pour la caractérisation du colmatage sont également présentées, en insistant sur celles qui seront mises en œuvre au chapitre V de ce manuscrit pour caractériser le colmatage d'une membrane organique lors de la filtration de solutions d'EPS de *P. cruentum*. La section 5 de cette bibliographie fait le point sur les différents facteurs promouvant le colmatage et influençant la filtrabilité des solutions de polysaccharides provenant des microalgues ou d'autres origines. Certains éléments de cette section seront repris au chapitre IV lors de l'étude paramétrique de la filtrabilité des solutions d'EPS de *P. cruentum* sur une membrane organique. Enfin, la section 6 énumère les études antérieures effectuées sur la récupération et la purification des EPS produits par des microalgues, en particulier *P. cruentum*, et récapitule leurs résultats principaux.

Par ailleurs, deux paragraphes de synthèse et de conclusion partielle sont situés respectivement après les sections 2 et 3 et après les sections 4, 5 et 6 de cette étude bibliographique.

2. Caractéristiques biologiques de la microalgue *Porphyridium cruentum* et de la cyanobactérie *Arthrospira platensis*

2.1. Qu'est-ce qu'une microalgue ou une cyanobactérie ?

Les microalgues et les cyanobactéries sont deux organismes différents d'un point de vue biologique puisque les premières sont des eucaryotes et les autres des procaryotes c.à.d. des organismes dépourvus de noyau. Quand on parle des microalgues et de leur valorisation ou bioraffinage, on intègre ces deux microorganismes puisque tous les deux sont des microorganismes photosynthétiques. Grâce au processus de la photosynthèse, ces microorganismes transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et fixent le carbone minéral (le dioxyde carbone). Il en résulte la synthèse de leur propre matière organique et la production d'oxygène. Ceci a lieu en présence d'eau et de nutriments (ions phosphates, nitrates, etc.). Les microalgues et les cyanobactéries sont parmi les plus anciennes formes de vie sur la terre. Elles sont présentes partout sur le globe dans des milieux (préférentiellement aquatiques) très variés en termes de salinité, température et pH. On estime leur nombre entre 50 000 et plusieurs millions d'espèces dont seulement 30 000 ont été décrites (Richmond, 2004).

2.2. Classification taxonomique

Parallèlement aux changements de noms qu'ont subis les différentes souches de microalgues et de cyanobactéries, leur position dans l'arbre phylogénétique a elle aussi été modifiée au cours du temps. Dans la suite du texte, seule la nouvelle classification taxonomique (*Algaebase*) de Guiry et Guiry (2018) est prise en compte.

2.2.1. *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis PCC 8005 (anciennement appelée *Spirulina platensis*) est une cyanobactérie classée dans la sous-classe des *Oscillatoriophyceae*, dans l'ordre des *Oscillatoriales*. Elle appartient à la famille des *Microcoleaceae* et au genre *Arthrospira* (Guiry et Guiry, 2018).

2.2.2. *Porphyridium cruentum*

Porphyridium cruentum est une microalgue rouge unicellulaire eucaryote nommée ainsi pour la première fois par Nägeli en 1849. Elle appartient à la classe des *Porphyridiophyceae*, l'ordre des *Porphyridiales* et la famille des *Porphyridiaceae* (Guiry et Guiry, 2018).

2.3. Morphologie

2.3.1. *Arthrospira platensis*

Cette cyanobactérie de couleur bleu-verte, se présente sous forme de filaments pluricellulaires, appelés trichomes, plus ou moins spiralés, enveloppés d'une gaine mucilagineuse. Les trichomes sont d'une longueur de 200 à 500 μm et de diamètre variant entre 6 et 12 μm (Vonshak, 1997). La dénomination pratique « Spiruline » largement utilisée, désignant tous les genres d'*Arthrospira* tels que *platensis* et *maxima*, est due à l'aspect de filament spiralé (morphologie). Cependant, selon D. Fox (1986), une même souche peut passer d'une forme en bâtonnet (longiligne) à une autre spiralée et vice versa en fonction notamment des conditions de culture pour se protéger de la photolyse (Figures I.1a et I.1b).

Le cytoplasme d'*A. platensis* comprend en particulier des granules de polyglucanes, des granules de polyphosphates (réserves de phosphates), des carboxysomes (inclusions cytoplasmiques contenant des enzymes impliquées de la fixation du carbone inorganique lors de la photosynthèse) et de nombreux thylacoïdes, siège de la photosynthèse. Ces thylacoïdes sont des membranes lipoprotéiques qui portent les différents pigments photosynthétiques. Il existe également des cyanophycines qui semblent servir de réserves azotées et des vacuoles gazeuses qui permettent la mobilité des trichomes selon des déplacements verticaux (Figure I.2a). En revanche, cette cyanobactérie ne possède pas d'hétérocystes, cellules dédiées à la fixation d'azote.

Les cellules sont entourées d'une enveloppe qui comprend une membrane cytoplasmique, une paroi cellulaire et des couches externes. La paroi cellulaire est composée de quatre couches de mucopolymères (Van Eykelenburg, 1977). Elle est de type Gram négatif bien qu'elle présente également certaines caractéristiques des parois des bactéries Gram positif. Elle est composée de peptidoglycanes, de protéines et de lipopolysaccharides. La paroi cellulaire représente la quasi-totalité des carbohydrates (glucosamine, acide muramique), hormis des réserves intracellulaires

de glycogène sulfaté et des polysaccharides excrétés en quantité variable selon les conditions de culture. Ces derniers sont des polysaccharides sulfatés (5 % d'ions sulfates en masse) riches en acides uroniques (Cornet, 1992 ; Filali Mouhim *et al.*, 1993).

Les couches externes consistent en une gaine, une capsule et un mucilage (« *slime* ») (De Philippis et Vincenzini, 1998 ; Pereira *et al.*, 2009). La gaine est un feuillet fin et uniforme, d'épaisseur d'environ 0,5 μm (Vonshak, 1997). Ce feuillet, dense en électrons et de structure fibrillaire homogène, suit le contour de la paroi cellulaire et est visible au microscope optique sans coloration. La capsule est un feuillet non uniforme qui entoure la gaine, elle n'est pas visible au microscope optique sans coloration. C'est une couche épaisse et visqueuse intimement associée à la surface cellulaire avec des contours nets. Le « *slime* » est la zone externe. Il se réfère à la matière mucilagineuse dispersée autour de l'organisme mais n'épousant pas la forme des cellules. Cette matière n'a donc pas de forme définie. De plus, elle est très faiblement attachée à la cyanobactérie. Pendant la croissance, des matériaux polysaccharidiques de la capsule et du « *slime* » peuvent être libérés dans le milieu environnant provoquant alors une augmentation progressive de sa viscosité.

2.3.2. *Porphyridium cruentum*

Les cellules de *P. cruentum* présentent une forme sphérique dont le diamètre varie entre 4 et 9 μm selon leur âge (Nägeli, 1849 ; Guiry et Guiry, 2018) (Figure I.1c). Elles sont encapsulées dans une gangue polysaccharidique (couche de gel) qui est plus épaisse chez les cellules les plus vieilles (Ramus, 1972). La majorité de la cellule est occupée par un chloroplaste étoilé présentant un pyrénoïde (structure cellulaire concentrant les enzymes responsables de la photosynthèse) en position centrale. L'aspect granuleux des thylakoïdes contenus à l'intérieur du chloroplaste est lié à la présence de phycobilisomes (voir § 2.4) à la surface de ces derniers. Au cours de la croissance de la microalgue, des granules d'amidon floridéen et des petites vacuoles peuvent apparaître dans le cytoplasme de la cellule. Les autres organites caractéristiques des eucaryotes, noyau, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique et mitochondries sont également présents (Figure I.2b). Sa forte tolérance aux variations des conditions environnementales explique qu'elle peut se développer aussi bien en milieu aquatique marin que dans des sols humides.

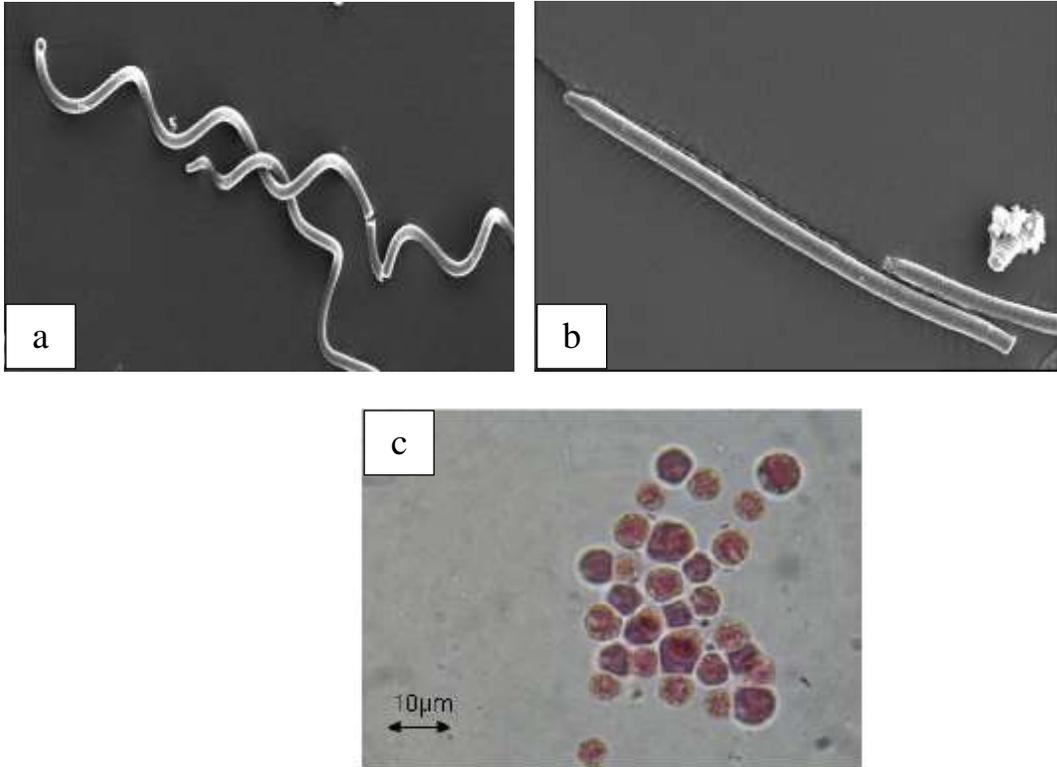


Figure I.1. Clichés des formes spiralée (a) et droite (b) d'*Arthrospira platensis* (MEB, (Rossi, 2005)) et observation microscopique d'une culture de *Porphyridium cruentum* (c) (Jubeau, 2012).

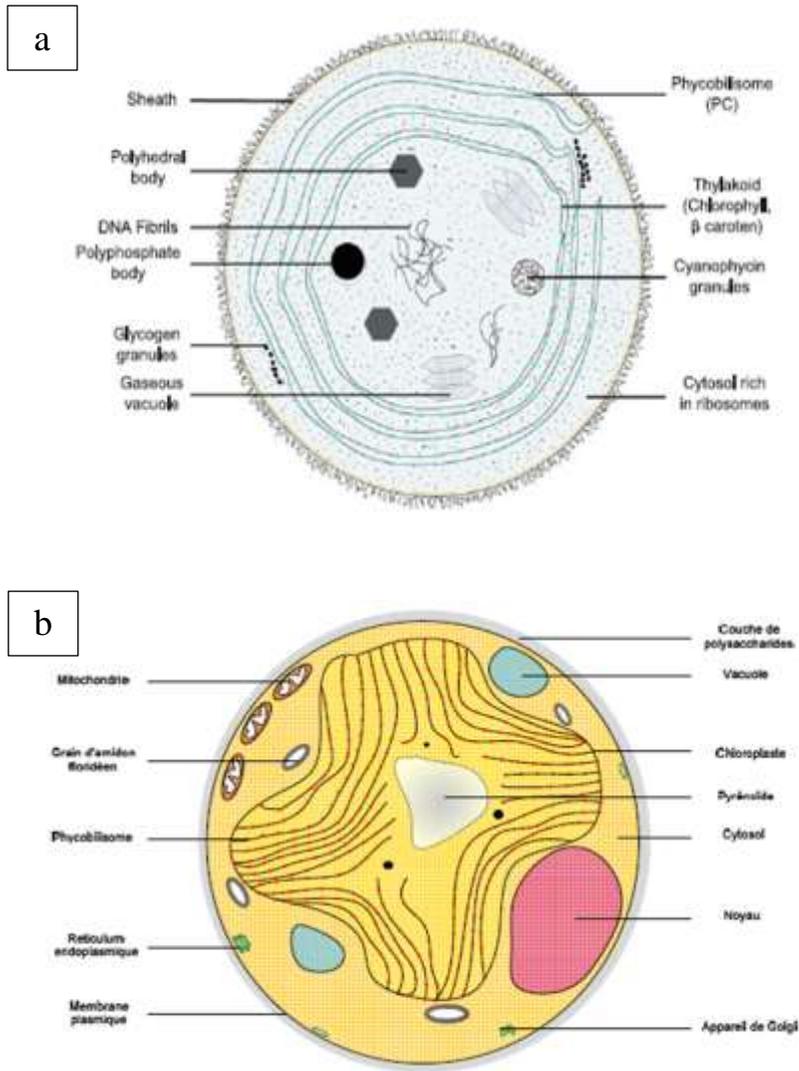


Figure I.2. Organisation structurale d'une cyanobactérie (a) et de la microalgue *Porphyridium cruentum* (b) (Lee, 2008).

2.4. Composés d'intérêt

Les compositions biochimiques de la cyanobactérie *A. platensis* (Cogne *et al.*, 2003a ; Cornet, 1992 ; D. Fox, 1986 ; Vonshak, 1997) et de *P. cruentum* (Jubeau, 2012 ; Reboloso Fuentes *et al.*, 2000 ; Spolaore *et al.*, 2006) sont récapitulées dans le tableau I.1.

Tableau I.1. Fractions de matières sèches de la cyanobactérie *A. platensis* et de la microalgue *P. cruentum*.

Composant	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>
Pigments	Chlorophylle a (Chla) 1 % Caroténoïdes Phycobiliprotéines : - phycocyanines C (C-PC) - allophycocyanines	Chlorophylle a (Chla) 0,25 % caroténoïdes (0,1 %) Phycobiliprotéines : - B-phycoérythrine (B-PE) - R-phycoérythrine (R-PE) - R-phycocyanine (R-PC) - Allophycocyanine (APC)
Protéines	50 - 74 %	28 - 39 %
Carbohydrates	12 - 16 %	40 - 57 % 32,1 % hormis les EPS (Reboloso Fuentes <i>et al.</i> , 2000)
Lipides	8 - 12 %	9 - 14 %
Acides nucléiques	4 % (78 % ARN et 22 % ADN (Cornet, 1992))	ARN 1,7 %

Nous présentons ci-dessous, les différents composés valorisables (pigments, protéines, polysaccharides et lipides) mais nous décrivons plus en détails l'intérêt des exopolysaccharides qui font l'objet de ce travail, dans le paragraphe 3.

Outre les pigments actifs principaux (la chlorophylle a) et les caroténoïdes, *A. platensis* et *P. cruentum* contiennent des pigments photosynthétiques accessoires, les phycobiliprotéines. Ces phycobiliprotéines, qui sont regroupées au sein de granules appelées phycobilisomes situées à la surface des thylacoïdes, jouent le rôle d'antennes collectrices de la lumière. Les pigments accessoires permettent d'élargir le spectre d'absorption de la lumière par les organismes au-delà de celui de la chlorophylle.

2.4.1. *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis est l'un des microorganismes photosynthétiques les plus cultivés dans le monde et d'un usage commercial le plus grand. Elle est exploitée dans presque tous les secteurs de la valorisation des phytoplanctons tels que la cosmétique (métabolites), l'alimentation humaine et animale, l'aquaculture, les engrais et l'environnement. En plus de sa très forte teneur en protéines, la biomasse d'*A. platensis* contient tous les acides aminés

essentiels. Initialement, la cyanobactérie *A. platensis* constituait une nourriture traditionnelle pour les populations du lac Tchad ou pour les populations aztèques du Mexique, qui la consomment encore actuellement pour lutter contre la malnutrition et la famine. D'ailleurs, dans les pays développés, elle est commercialisée sous forme d'un complément diététique naturel vu ses qualités nutritionnelles particulières (comme son impressionnante teneur en protéines et sa richesse en vitamines et minéraux) répondant aux normes de la FAO (Food and Agriculture Organization). Un autre champ d'application concerne les boucles biorégénératives de vie dans l'espace comme dans le programme MELiSSA (Micro Ecological Life Support System Alternative) de l'Agence Spatiale Européenne où *A. platensis* est cultivée dans le quatrième et dernier compartiment d'un microécosystème artificiel pour produire une nourriture de qualité, aisément digestible tout en participant au recyclage de l'eau (Cornet, 1992 ; Rossi, 2005).

A. platensis est également exploitée pour ses pigments, comme les phycocyanines utilisables en tant qu'agent colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire et dans celle des cosmétiques. La Spiruline est ainsi utilisée dans les masques cryogéniques et les crèmes anti-âge pour le visage, pour sa richesse en protéines ainsi que son action sur le renouvellement cellulaire et sur la tonicité des tissus. En synergie avec d'autres algues, elle agit comme agent cicatrisant et antiseptique et entre dans la constitution des gels, des shampooings et des laits corporels. La phycocyanine est la protéine dominante et représente 25 % des protéines totales.

Dans le domaine des biocarburants, *A. platensis* est capable de produire du glycogène qui peut être transformé en bioéthanol (Aikawa *et al.*, 2013) ou en bio-hydrogène (Cheng *et al.*, 2012). Par ailleurs, cette cyanobactérie produit des polysaccharides extracellulaires (EPS) aux vertus mentionnées dans le paragraphe 3.2.3.1.

A. platensis est l'une des rares sources de deux acides gras essentiels, l'acide linoléique et l'acide γ -linoléique (oméga-6), connus pour leurs nombreux effets bénéfiques pour la santé.

2.4.2. *Porphyridium cruentum*

Comme toute microalgue rouge, *P. cruentum* est une source potentielle d'une large gamme de produits biochimiques, tels que les polysaccharides, les acides gras, les pigments (les phycobiliprotéines) et les stérols.

Les phycobiliprotéines sont classées selon leur séquence d'acides aminés et la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance : la B-phycoérythrine (B-PE), la R-phycoérythrine (R-PE) et la R-phycoocyanine et l'allophycoocyanine. La BPE est le pigment majoritaire, entre 2 et 6 % de la matière sèche, et représente la fraction ayant la plus forte valeur ajoutée chez *P. cruentum* (Jubeau, 2012). Des phycobiliprotéines purifiées, notamment la B-PE, sont employées, liées par exemple avec des anticorps, comme marqueurs immunofluorescents des cellules cancéreuses. Les teneurs en caroténoïdes, et plus particulièrement en zéaxanthine de *P. cruentum*, en font une des sources les plus riches, en comparaison avec les végétaux terrestres supérieurs. En plus de leur fort pouvoir colorant (jaune d'œuf, maïs), les caroténoïdes possèdent un fort potentiel pour des applications pharmaceutiques et nutritionnelles, notamment par leur fort pouvoir antioxydant.

L'amidon floridéen (0,4 % de la masse sèche) est stocké sous forme de grains dans le cytoplasme de la cellule. Il constitue un polysaccharide de réserve pour le stockage du carbone. Il n'existe pas aujourd'hui, à notre connaissance, de voie de valorisation spécifique de l'amidon floridéen. Il est cependant possible que sa composition et son arrangement spécifique lui confèrent des propriétés, notamment rhéologiques, particulières. En plus de produire des polysaccharides intracellulaires, *P. cruentum* sécrète de grandes quantités de sucres que l'on appelle exopolysaccharides (EPS) et aux vertus mentionnées dans le paragraphe 3.2.3.2.

Porphyridium cruentum se distingue des autres microalgues, du point de vue de sa production de lipides, par sa capacité à synthétiser à la fois de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 ω 3) et de l'acide arachidonique (AA, 20:4 ω 6), en quantités significatives. Ces acides gras polyinsaturés ont été largement étudiés à cause de leur importance pour la santé humaine. L'acide eicosapentaénoïque, par exemple, a un effet bénéfique sur la prévention des maladies coronariennes, de l'hyperglycémie, de l'agglomération des plaquettes sanguines et il diminue la cholestérolémie. L'acide arachidonique quant à lui est un précurseur de la synthèse de la prostaglandine PGE₂ qui a un rôle hypotenseur, des thromboxanes ou encore des leucotriènes qui ont un rôle dans les systèmes sanguin et nerveux central. Il est également valorisé dans l'alimentation du nourrisson en tant composant naturel du lait maternel (Cohen et Cohen, 1991).

3. Exopolysaccharides (EPS)

3.1. Généralités

Les polysaccharides sont présents dans tous les organismes vivants et présentent une grande variété de structures biochimiques basées sur des liaisons glycosidiques de différents monosaccharides, y compris de nombreux sucres complexes. Divers substituants tels que des acides aminés et des sulfates peuvent également être fixés sur ces squelettes. D'abord exploités par l'industrie pour leurs propriétés rhéologiques remarquables en tant qu'épaississants ou gélifiants, les polysaccharides ont récemment fait l'objet d'attention particulière en raison de leurs activités biologiques intéressantes.

Les substances polymériques extracellulaires sécrétées par les phytoplanctons et les bactéries sont des composés de haut poids moléculaire. Elles garantissent l'intégrité fonctionnelle et structurale des biofilms. Elles sont constituées principalement de polysaccharides (« polymères colloïdaux riches en polysaccharides ») et de protéines mais peuvent inclure aussi des lipides, des acides nucléiques et des hétéropolymères variés. Ces substances sont souvent notées EPS (ExoPolymeric Substances), en particulier dans le domaine du traitement biologique des eaux usées, mais le sigle sera réservé dans cette thèse aux polysaccharides excrétés ou exopolysaccharides.

Plusieurs espèces de microalgues et de cyanobactéries (telles que *P. cruentum* et *A. platensis*) sont connues pour produire et excréter hors de la cellule de grandes quantités de polysaccharides (les exopolysaccharides). Ces EPS, contrairement aux polysaccharides de la paroi cellulaire et aux sucres intracellulaires, ont des structures très complexes comprenant parfois jusqu'à 9 à 12 monosaccharides différents avec plusieurs substituants « non sucres » (Delattre *et al.*, 2016). La composition de certains EPS est variable d'une espèce à l'autre et est parfois affectée par les conditions de croissance. Toute cette complexité limite l'identification complète de la structure des EPS malgré le grand intérêt pour leurs activités biologiques, rhéologiques, pharmaceutiques, etc. (de Jesus Raposo *et al.*, 2013, 2015).

3.2. Etat de l'art sur les EPS d'*A. platensis* et de *P. cruentum*

3.2.1. Caractéristiques biochimiques des EPS : structure, composition et fonction

Les exopolysaccharides se présentent sous deux formes : les EPS capsulaires (liés) qui restent associés à la surface cellulaire, et les EPS solubles relargués dans le milieu de culture (Arad et Levy-Ontman, 2010 ; De Philippis et Vincenzini, 1998).

La gangue polysaccharidique protège les microalgues et les cyanobactéries de la dessiccation, offre une protection mécanique aux cellules et leur permet de survivre dans des conditions environnementales extrêmes (Arad *et al.*, 1988). Elle peut également jouer le rôle de stockage ou d'échangeur d'ions. De plus, les polysaccharides de la gangue ont une fonction antioxydante qui leur permet de dégrader les radicaux libres (Arad et Levy-Ontman, 2010). Les EPS jouent également un rôle dans l'adhésion des cyanobactéries sur différents types de surfaces/supports. Ceci leur permet de coloniser de nouveaux milieux mais aussi de se protéger contre des substances toxiques grâce à la formation de biofilms. Les EPS sont également impliqués dans l'organisation des trichomes, la mobilité des cyanobactéries et la régulation du métabolisme énergétique cellulaire.

3.2.1.1. *Arthrospira platensis*

Dans leur revue portant sur les exopolysaccharides des cyanobactéries, Pereira *et al.* (2009) ont défini deux groupes : celui des EPS totalement libérés dans le milieu environnant et celui des EPS associés à la surface cellulaire, lui-même subdivisé en 3 sous-groupes : gaines, capsulaires et « *slimes* » (*cf.* § 2.3.1).

Les polysaccharides capsulaires font partie intégrante des cellules. Ils sont intimement associés à la surface cellulaire et peuvent être liés de manière covalente à la membrane externe. Tandis que les polysaccharides libres forment une phase visqueuse appelée « *slime* » (De Philippis et Vincenzini, 1998). Sous forme de « *slime* », ces polysaccharides sont faiblement associés à la surface ou libres dans le milieu de culture.

Les EPS d'*A. platensis* sont considérés comme des hétéropolymères polyanioniques sulfatés contenant des protéines, des carbohydrates (pentoses et hexoses) et des groupements sulfatés (Trabelsi *et al.*, 2009a). La charge négative globale leur est apportée par les acides

uroniques (acides glucuroniques et galacturoniques), des groupements inorganiques tels que les phosphates, les sulfonyles et les sulfates ou organiques comme le pyruvate. La structure de ces EPS est assez complexe en raison de la présence de différents composés et groupes fonctionnels (Filali Mouhim *et al.*, 1993 ; Trabelsi *et al.*, 2009a). Le complexe exopolysaccharidique sulfaté est de composition élémentaire $C_{64,970}H_{99,760}O_{59,973}S_{1,001}$. (Cogne *et al.*, 2003a).

Le tableau I.2 donne la composition des EPS capsulaires de la souche *S. platensis* 8005, cultivée pendant 15 jours en batch dans un milieu Zarrouk de pH 9,5 et dans un photobioréacteur de 7 L sous un flux lumineux de $368 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$, telle que rapportée par Filali Mouhim *et al.* (1993) Différentes compositions en EPS (solubles ou capsulaires) sont également rapportées dans la littérature (Filali Mouhim *et al.*, 1993 ; Lee *et al.*, 2012 ; Majdoub *et al.*, 2009 ; Trabelsi *et al.*, 2009a ; Villay, 2013). La différence entre ces valeurs peut être due aux différences entre les souches et les conditions de culture. Néanmoins, en général, les monosaccharides majoritaires détectés sont l'acide glucuronique, l'acide galacturonique, le glucose, le galactose, le rhamnose et le xylose, alors que les oses minoritaires sont quant à eux le fucose, le fructose, le mannose, le ribose, ainsi que quelques sucres inconnus.

Tableau I.2. Composition des EPS capsulaires d'*A. platensis* (en % de la masse sèche des EPS) (Filali Mouhim *et al.*, 1993).

Souche	Sucres neutres						Acides uroniques		Non-sucres	Non identifiés
	Xyl	Rha	Fuc	Gal	Man	Glc	GalA	GlcA	Sulfate	Acide uronique et sucre O-méthylé
<i>Spirulina platensis</i> 8005	10,2 %	2,4 %	5,5 %	21,2 %	Traces	15,7 %	40 %		5 %	

3.2.1.2. *Porphyridium cruentum*

En plus de produire des polysaccharides intracellulaires, *P. cruentum* sécrète de grandes quantités d'EPS à l'extérieur de la cellule. Les cellules sont ainsi comme encapsulées dans une gangue polysaccharidique dont l'épaisseur varie au cours du temps. L'épaisseur est assez fine en phase exponentielle de croissance de la microalgue et elle augmente lors de la phase stationnaire (chez les cellules les plus vieilles). En effet, c'est à ce moment-là que la production d'EPS

s'effectue principalement et leur taux est alors supérieur à celui de leur solubilisation dans le milieu de culture (Thepenier et Gudin, 1985). Pendant la croissance, le milieu de culture devient rapidement visqueux du fait du relargage des EPS à partir de la paroi cellulaire. En fait, la partie externe de la capsule qui se dissout dans le milieu de culture constitue la fraction hydrosoluble des EPS tandis que la partie qui reste accrochée à la cellule (fraction majoritaire ~ 50 – 70 %) constitue la fraction liée et forme la gangue protectrice de la cellule (Pignolet *et al.*, 2013).

La fraction soluble des EPS de *Porphyridium* sp. possède une masse moléculaire moyenne de $2-7 \times 10^6$ Da (Arad et Levy-Ontman, 2010). Le haut poids moléculaire est dû aux ponts ioniques formés par les cations divalents. Les EPS solubles sont principalement constitués d'un hétéropolymère sulfaté complexe composé d'environ dix sucres différents, parmi lesquels trois oses sont majoritaires : le xylose, le galactose et le glucose (Geresh *et al.*, 1992 ; Geresh et Arad, 1991). Les teneurs en chacun de ces oses varient selon les auteurs, traduisant peut-être un effet des techniques d'extraction ou d'analyse, ou encore des conditions de culture de la microalgue. D'autres sucres minoritaires sont également trouvés tels que l'arabinose, le mannose, le rhamnose, des méthyl-pentoses et des méthyl-hexoses (Geresh *et al.*, 1992 ; Geresh et Arad, 1991). La présence de groupements sulfates sur les glucoses et galactoses en position 6 ou 3 ainsi que celle d'acide glucuronique confère à ces polysaccharides un caractère anionique et acide (Arad et Levy-Ontman, 2010 ; Geresh *et al.*, 1992 ; Lupescu *et al.*, 1991). Les EPS de *P. cruentum* contiennent environ 9 % d'acides uroniques et de 10 % de sulfates (Geresh *et al.*, 1992). Patel *et al.* (2013) ont également trouvé que la fraction soluble des EPS de *P. cruentum* est composée d'une seule famille de polysaccharides avec une large polydispersité. La présence d'une faible quantité de protéines au sein des EPS a également été révélée (Heaney-Kieras *et al.*, 1977 ; Shrestha *et al.*, 2004).

Bien que la composition des EPS soit relativement documentée, leur structure n'est quant à elle pas encore entièrement déterminée à cause de sa complexité. Gloaguen *et al.* (2004) ont réussi à caractériser par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la structure chimique d'une partie d'un polymère anionique issu de la fraction liée produite par *Porphyridium* sp. Geresh *et al.* (2009) ont pu déterminer toujours par RMN un motif élémentaire de la structure des EPS de la fraction soluble.

3.2.2. Conditions de production des EPS

Chez les microalgues, la synthèse des polysaccharides a lieu dans l'appareil de Golgi alors qu'elle a lieu dans le cytoplasme des cyanobactéries. Les étapes principales de la synthèse des EPS sont la production de sucres activés (molécules précurseurs), leur assemblage par les glycosyltransférases (enzymes clés impliquées dans la biosynthèse des EPS), le traitement et l'exportation des polymères dans le compartiment extracellulaire ou bien comme composants endomembranaires (Rossi et De Philippis, 2016).

La production, le rôle ainsi que la composition des EPS dépendent de la souche (Pereira *et al.*, 2009), du stade de croissance (De Philippis et Vincenzini, 1998) et des conditions environnementales pour lesquelles la réponse physiologique diffère selon la souche considérée. Cela implique que l'optimisation de la production d'EPS doit être réalisée pour chaque souche (De Philippis et Vincenzini, 1998). La production d'EPS par une souche cultivée en croissance photosynthétique peut être modulée en modifiant les paramètres de culture tels que les sources d'azote, de phosphate ou de sulfate, la concentration en chlorure de sodium NaCl, l'aération, la température et le flux lumineux (Pereira *et al.*, 2009). Il est à signaler que la croissance cellulaire peut diminuer dans certaines conditions de culture. Par conséquent, un compromis doit être trouvé entre le taux de croissance et la production élevée d'EPS pour aboutir à une productivité importante en EPS.

3.2.2.1. *Arthrospira platensis*

La production d'EPS par les cyanobactéries peut être induite par des conditions de stress car ces molécules ont notamment un rôle de protection physiologique et de régulation énergétique du métabolisme (De Philippis et Vincenzini, 1998 ; Filali Mouhim *et al.*, 1993).

Plusieurs conditions favorables à la production d'EPS ont été identifiées chez *A. platensis*. La concentration en sels dans le milieu de culture peut générer un stress salin pour *A. platensis* et entraîner un changement métabolique, ce qui impacte la production et la sécrétion en EPS. Ces derniers sont sécrétés par la cyanobactérie qui se protège contre le stress osmotique à partir d'une concentration critique en sels (D. Fox, 1999). En revanche, l'augmentation de la salinité du milieu a un impact négatif sur la croissance (Lee *et al.*, 2012 ; Vonshak, 1997).

La température aurait un impact sur certaines souches mais peu de données sont disponibles car en général, la température optimale est utilisée pour la croissance (Pereira *et al.*, 2009). Lee *et al.* (2012) ont observé une augmentation de la teneur en EPS liés d'*A. platensis* de 5,9 % à 12,6 % de la matière sèche lorsque la température augmente de 28 à 38 °C. Cela s'accompagne d'une diminution du taux de croissance de la biomasse. De même, d'après Trabelsi *et al.* (2009b), lorsque la température augmente de 30 à 40 °C, le taux de croissance d'*A. platensis* (souche Compère 1968/3786) diminue tandis que la concentration en EPS solubles atteint sa valeur maximale (210 mg.L⁻¹) à 35 °C.

La carence en azote permet l'augmentation de la production d'EPS chez certaines espèces de cyanobactéries (De Philippis et Vincenzini, 1998). La carence en azote induit un déséquilibre du rapport carbone-azote (C/N), le carbone étant alors présent en excès. Cet excès est redirigé vers la synthèse de composés de réserve carbonée tels que le glycogène intracellulaire et les EPS, au détriment de celle des protéines (De Philippis et Vincenzini, 1998 ; Deschoenmaecker *et al.*, 2016).

Selon certains auteurs, la quantité d'EPS produits par unité de masse de matière sèche augmenterait avec le flux lumineux incident (Cogne *et al.*, 2003a ; Cornet, 1992). En effet, la quantité d'EPS augmenterait avec la quantité d'énergie lumineuse reçue par les pigments de la cellule et qui est dépendante de plusieurs facteurs tels que la géométrie du réacteur, la concentration en biomasse, la pigmentation des cellules, etc. Dans l'étude réalisée par Lee *et al.* (2012), quand l'intensité de la lumière passe de 24 à 192 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le taux de croissance de la biomasse augmente et la teneur en EPS s'accroît de 6,6 % à 11,3 %. Les travaux de Cogne *et al.* (2003a) montrent aussi un effet positif des forts flux lumineux sur la production d'EPS. Cornet (1992) a développé un modèle permettant d'estimer l'évolution de la fraction massique en EPS dans la biomasse totale en fonction de l'intensité du flux lumineux. Les résultats expérimentaux de Cogne *et al.* (2003a), en adéquation avec le modèle de J.F. Cornet (1992), montrent que dans les conditions de densité de flux maximale à 1058 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la valeur maximale de la fraction massique des EPS est égale à 0,53 alors qu'elle n'était que de 0,14 à 92 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

La cyanobactérie *A. platensis* est capable de produire des EPS dans toutes les conditions trophiques (photoautotrophie, hétérotrophie et mixotrophie) mais à des concentrations différentes

et pendant des phases de croissance différentes. En photoautotrophie, la seule source d'énergie est la lumière tandis qu'en hétérotrophie, il s'agit de carbone organique (le glucose par exemple) ; enfin, en mixotrophie, l'énergie lumineuse et le carbone organique sont tous deux disponibles. Trabelsi *et al.* (2013) ont trouvé que la concentration en EPS obtenue en mixotrophie est de 1,3 fois et 9,6 fois supérieure à celles obtenues respectivement en photoautotrophie et en hétérotrophie. Cependant, c'est en mode photoautotrophe que la productivité spécifique en EPS est maximale. De plus, la cinétique de production des EPS et celle de croissance cellulaire sous conditions photoautotrophes et hétérotrophes sont dissociées et aucune relation ne peut être établie entre la productivité spécifique en EPS et le taux spécifique de croissance cellulaire. Dans ces deux modes, les productivités spécifiques maximales en EPS sont obtenues pendant la phase stationnaire lorsque la croissance cellulaire est inhibée. En photoautotrophie, lorsque la lumière (seule source d'énergie) est en excès, elle constitue un stress oxydatif pour les cellules. Pour éviter de causer des dommages aux cellules, l'excès d'énergie est alors redirigé vers la biosynthèse d'EPS (Cogne *et al.*, 2003a). En revanche, dans des conditions d'hétérotrophie, la croissance cellulaire et la synthèse d'EPS sont en concurrence pour l'assimilation du glucose à la fois comme source de carbone et comme source d'énergie. Sous conditions de mixotrophie en revanche, la productivité spécifique en EPS et la croissance de la biomasse sont associées.

3.2.2.2. *Porphyridium cruentum*

Certains auteurs ont montré que la carence en azote permet l'amélioration de la production d'EPS par les souches de *Porphyridium* (Arad *et al.*, 1988 ; Ramus, 1972) à condition que la concentration initiale en azote dans l'alimentation soit suffisante. La production d'amidon intracellulaire et d'EPS (liés + solubles) augmente lentement durant la phase exponentielle et rapidement dès l'épuisement de l'azote en phase stationnaire de croissance, que ce soit en mode discontinu ou continu (Adda *et al.*, 1986 ; Arad *et al.*, 1988). Cependant, la solubilisation des EPS n'est pas accélérée durant la phase stationnaire. Les EPS solubles ne constituent que 20 à 30 % des EPS totaux (Adda *et al.*, 1986 ; Arad *et al.*, 1988). Par suite, l'épuisement en azote affecte la distribution des EPS entre les fractions liée et soluble.

La concentration en CO₂ dissous dans le milieu influence également la croissance cellulaire ainsi que la production d'EPS et la répartition entre les fractions liée et soluble. Li *et*

al. (2000) ont trouvé qu'un bullage de la culture avec un air enrichi à 5 % en CO₂ permet de multiplier par 6 la production d'EPS en comparaison avec un bullage à l'air (0,03 % CO₂). Cependant, la fraction d'EPS soluble et le rapport fraction soluble sur fraction liée sont plus importants avec un bullage à l'air seul. La composition chimique des EPS est également affectée par la quantité de CO₂ dissous. Dans le cas d'un bullage classique à l'air, le ratio galactose sur xylose est deux fois supérieur à celui obtenu lors d'une culture avec un air enrichi à 5 % en CO₂. Iqbal et Zafar (1993), quant à eux, ont obtenu des valeurs maximales des taux de croissance et de production d'EPS en présence de 2,5 % de CO₂. Avec ce bullage, la production d'EPS est améliorée de 80 % et de 59 % par rapport à celle obtenue en absence de CO₂ ou avec un bullage à 10 % de CO₂, respectivement.

Le taux d'aération a aussi un impact sur la croissance cellulaire car il influence indirectement la photosynthèse en affectant la disponibilité de la lumière pour les cellules et l'assimilation des nutriments. Par conséquent, il est important de bien régler ce paramètre pour atteindre une production maximale d'EPS par *P. cruentum*. En étudiant l'influence du taux d'aération compris sur la gamme 125 – 1000 mL.min⁻¹.L⁻¹, Iqbal et Zafar (1993) ont obtenu une croissance cellulaire et une production d'EPS maximales à 500 mL.min⁻¹.L⁻¹.

Dans les conditions photoautotrophiques, la production d'EPS chez *Porphyridium* est renforcée par l'utilisation d'un flux lumineux continu et des intensités lumineuses élevées (Friedman *et al.*, 1991 ; Merchuk *et al.*, 1998). Cela signifie que la production d'EPS sera plus faible en éclairage solaire qu'en éclairage artificiel. D'après les travaux de Iqbal et Zafar (1993), quand la densité du flux lumineux augmente de 25 à 75 μmol photons.m².s⁻¹, la densité cellulaire augmente de 80 % et la teneur en EPS de 89 %. Un effet inhibiteur a été observé avec une intensité lumineuse plus forte. Ces résultats sont en accord avec ceux de You et Barnett (2004).

La longueur d'onde de la lumière affecte également l'activité photosynthétique et la production de polysaccharides. Les lumières bleue et rouge ont été trouvées plus efficaces pour la production d'EPS par *Porphyridium cruentum* que la lumière blanche (You et Barnett, 2004).

La production d'EPS par *P. cruentum*, s'effectue principalement en phase stationnaire de croissance. En présence de lumière, cette production est continue mais lors d'un passage de la culture à l'obscurité, la solubilisation des EPS semble plus importante que leur excrétion

(Thepenier *et al.*, 1985). Un passage à l'obscurité permettrait donc d'accroître la récupération des EPS dans le milieu de culture. Ainsi, après 24 h de passage à l'obscurité d'une culture de *P. cruentum* en phase stationnaire, Jubeau (2012) a remarqué que la concentration cellulaire moyenne est restée la même mais que la teneur en sucres solubles avait augmentée, atteignant $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ contre $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ seulement pour les cultures laissées à la lumière.

3.2.3. Potentiel biotechnologique des EPS

Les polysaccharides naturels présentent actuellement un intérêt croissant surtout suite à la tendance des marchés mondiaux à passer des produits synthétiques aux produits naturels. Dans ce contexte, les polysaccharides des macroalgues ont fait l'objet d'études pendant de nombreuses années. Cependant, la demande croissante du marché pour les polysaccharides naturels notamment de la part des industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques ne peut pas être satisfaite par les seules ressources traditionnelles que sont les macroalgues rouges et brunes. Ces ressources peuvent être épuisées par les récoltes intensives et les conditions environnementales préjudiciables. Une alternative intéressante peut être trouvée dans les polysaccharides sulfatés des microalgues qui offrent une large gamme d'applications potentielles pour une variété d'industries (Arad et Levy-Ontman, 2010). Toutefois, les technologies de production, de récolte et de bioraffinage sont encore en cours de développement à cause des verrous technologiques qui subsistent. Mais, si les technologies de production autotrophique des microalgues à hautes densités cellulaires et leurs traitements par des procédés spécifiques en aval atteignaient le seuil de rentabilité, le grand marché des hydrocolloïdes s'ouvrirait aux EPS de microalgues qui pourraient alors rivaliser avec ceux des macroalgues et des plantes terrestres (Delattre *et al.*, 2016).

3.2.3.1. *Arthrospira platensis*

Les solutions diluées d'EPS anioniques d'*A. platensis* présentent des propriétés rhéologiques de type pseudoplastique plus intéressantes pour l'industrie que celles du xanthane. Une concentration de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ d'EPS dans une solution de NaCl 0,1 M possède ainsi un indice de pseudoplasticité de 0,36 alors que le xanthane nécessite une concentration dix fois plus élevée pour obtenir la même valeur (Filali Mouhim *et al.*, 1993).

Par ailleurs, les EPS sulfatés d'*A. platensis* ont une large gamme de propriétés biologiques. Des activités anti-athérogènes et anti-thrombogéniques ont été rapportées (Kaji *et al.*, 2002b, 2004). *A. platensis* a également été étudiée pour ses propriétés antivirales (Ayehunie *et al.*, 1998 ; Hayashi *et al.*, 1993 ; K. Hayashi *et al.*, 1996 ; T. Hayashi *et al.*, 1996 ; Rechter *et al.*, 2006), qui semblent être liées au polysaccharide sulfaté, nommé « calcium-spirulane » (Ca-SP) (K. Hayashi *et al.*, 1996 ; T. Hayashi *et al.*, 1996). Le « sodium-spirulane » (Na-SP) est un autre polysaccharide sulfaté, isolé à partir d'*A. platensis* et présentant une activité antithrombine par l'activation de l'héparine cofacteur II (Hayakawa *et al.*, 2000). En outre, Na-SP influe sur les fonctions des cellules endothéliales vasculaires telles que leur prolifération (Kaji *et al.*, 2002a), leur réparation après la blessure (Kaji *et al.*, 2002b) et le métabolisme des protéoglycanes (Kaji *et al.*, 2002c). Des extraits d'EPS d'*A. platensis* présentent des activités antibactériennes et antioxydantes (Challouf *et al.*, 2011).

Cependant, beaucoup de travail est encore nécessaire pour élucider la structure des EPS d'*A. platensis* et la relation entre leur structure et leur fonction.

En outre, dans le domaine environnemental et particulièrement celui du traitement des eaux, *A. platensis* est susceptible d'éliminer certains polluants comme les métaux par adsorption sur sa paroi et sa gangue mucilagineuse ainsi que les composés azotés et/ou phosphorés par métabolisation (De Philippis *et al.*, 2011 ; Vonshak, 1997).

3.2.3.2. *Porphyridium cruentum*

Bien que la structure des EPS de la microalgue *Porphyridium cruentum* n'ait pas encore été parfaitement caractérisée, de nombreuses propriétés techno-fonctionnelles spécifiques ont été mises en évidence, les rendant particulièrement intéressants pour de nombreuses applications industrielles (de Jesus Raposo *et al.*, 2013 ; Delattre *et al.*, 2016).

La valeur industrielle des polysaccharides consiste en premier lieu dans leur aptitude à modifier les propriétés rhéologiques des solutions aqueuses. A faible concentration, les EPS sulfatés donnent des solutions aqueuses hautement visqueuses présentant des propriétés rhéologiques comparables à celles des polysaccharides industriels tels que le xanthane et le carraghénane. En effet, Geresh et Arad (1991) ont trouvé des viscosités de 0,032, 0,045 et 0,008 Pa.s pour des solutions à 0,25 % (w/w) d'EPS de *P. cruentum*, de gomme de xanthane et de

kappa-carraghénane, respectivement et à un taux de cisaillement de $39,6 \text{ s}^{-1}$. Ces solutions d'EPS se comportent comme des fluides non newtoniens ayant des propriétés pseudoplastiques (de Jesus Raposo *et al.*, 2014 ; Eteshola *et al.*, 1998 ; Geresh *et al.*, 2002 ; Geresh et Arad, 1991) qui les rendent similaires aux épaississants tels que les carraghénanes, la gomme de caroube et la gomme de xanthane (Geresh et Arad, 1991). Elles montrent aussi des interactions synergiques intéressantes avec la caroube et l'exsudat muqueux sans fibres de l'aloë vera (Geresh et Arad, 1991 ; Yaron *et al.*, 1992). Les EPS de *P. cruentum* ont donc des utilisations potentielles dans l'industrie alimentaire, comme agents gélifiants, épaississants et stabilisants (Ramus, 1972). Ces EPS ont également un potentiel biotechnologique en tant que biolubrifiant grâce à leurs propriétés de réduction de la friction, d'absorption et de stabilité, qui sont supérieures à celles de l'acide hyaluronique, hydrogel lubrifiant le plus utilisé (Arad *et al.*, 2006 ; de Jesus Raposo *et al.*, 2013). Dans leur brevet, Arad et Atar (2007) ont indiqué que les EPS de *Porphyridium* pourraient être également utilisés pour l'élaboration de solutions de lubrification des articulations osseuses pour atténuer les troubles articulaires dégénératifs causés par l'arthrite.

En parallèle, les EPS des microalgues rouges peuvent être exploités dans l'industrie pétrolière comme agents épaississants pour améliorer la récupération du pétrole emprisonné dans les pores des roches réservoirs (Arad et Levy-Ontman, 2010).

Les polysaccharides sont aussi valorisables dans la nutrition, agissant comme des fibres ; leur efficacité a été démontrée dans l'alimentation animale.

De plus, les polysaccharides extracellulaires du genre *Porphyridium* sont connus pour leurs activités biologiques. C'est le groupement sulfate qui est supposé être le groupement bioactif thérapeutique (Geresh *et al.*, 2002, 2009). La non-toxicité des polysaccharides sulfatés de *Porphyridium* vis-à-vis des cellules animales permet d'autres possibilités de développement pharmaceutique (Arad *et al.*, 2006). Les EPS de *Porphyridium* sp. présentent des activités antioxydantes (Sun *et al.*, 2009 ; Tannin-Spitz *et al.*, 2005), antivirales (de Jesus Raposo *et al.*, 2014 ; Fabregas *et al.*, 1999 ; Huleihel *et al.*, 2001 ; Huleihel et Arad, 2001), antibactériennes (de Jesus Raposo *et al.*, 2014), anticarcinogènes (Gardeva *et al.*, 2009 ; Shopen-Katz *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2012), anti-inflammatoires (Matsui *et al.*, 2003) et anti-irritantes. D'autres activités biologiques ont été également révélées telles que la diminution de la cholestérolémie (Dvir *et al.*, 2009, 2000) et la réduction significative des taux de glucose dans le sang (Huang *et al.*, 2006

dans (de Jesus Raposo *et al.*, 2015)). Les polysaccharides de *Porphyridium* sont déjà utilisés dans des produits cosmétiques (Arad et Levy-Ontman, 2010).

3.2.4. Techniques de récupération des EPS

Avant d'être valorisés industriellement, les EPS de microalgues ou de cyanobactéries devront être isolés du milieu de culture. Il est nécessaire de disposer pour cela de technologies d'extraction et de purification des EPS qui soient économiques, efficaces et respectueuses de l'environnement.

3.2.4.1. *Arthrospira platensis*

Des exemples de méthodes d'extraction des EPS (liés et/ou solubles) d'*A. platensis* sont représentés dans le tableau I.3.

Il est à noter que la séparation des cellules d'*A. platensis* du milieu de culture contenant les EPS solubles, peut être réalisée par centrifugation (Cornet, 1992 ; Filali Mouhim *et al.*, 1993), microfiltration (Majdoub *et al.*, 2009 ; Trabelsi *et al.*, 2009a, 2009b) ou tamisage (Li *et al.*, 2011).

Tableau I.3. Exemples de méthodes d'extraction des EPS et des teneurs obtenus dans différentes conditions de cultures d'*A. platensis*.

Conditions de culture			Extraction des EPS et type d'EPS	Quantité d'EPS (% MS)	% oses acides dans les EPS	Référence
Milieu de culture	Intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Température (°C)				
Zarrouk	368	36 °C	Chauffage dans l'eau (cf. figure I.3) EPS liés	17	40	Filali Mouhim <i>et al.</i> , 1993
-	-	-	UF/diafiltration du milieu de culture dépourvu de cellules (100 kDa) EPS solubles	-	-	Majdoub <i>et al.</i> , 2009
Zarrouk	100	32	Concentration du filtrat par UF tangentielle (30 kDa) EPS solubles	3,4 (*)	14,4	Trabelsi <i>et al.</i> , 2009a
Zarrouk	-	-	MF (membrane en propylène 0,3 μm) – UF tangentielle à 0,6 bar et à T = 32 ou 34 °C sur une membrane en PES (5 kDa) avec FRV = 20 - 40 EPS solubles	Rendement en EPS 77 - 200 mg.L^{-1} selon les conditions	-	Li <i>et al.</i> , 2011
Zarrouk + 0,75 M NaCl	192	28 ou 38	Chauffage dans l'eau EPS liés	3 à 27	-	Lee <i>et al.</i> , 2012
Zarrouk modifié (Cogne <i>et al.</i> , 2003b)	100	20	Tamassage/Filtration 20 μm EPS solubles	1,7	12,9	Depraetere <i>et al.</i> , 2015

(*) Pourcentage calculé à partir des données fournies dans la référence, soit 13 % de sucres dans 200 mg.L^{-1} d'EPS pour 0,55 g.L^{-1} de biomasse.

Avant d'être extraits, les EPS capsulaires doivent être détachés par des traitements physiques ou chimiques. Filali Mouhim *et al.* (1993) ont mis au point une méthode d'extraction du polymère extracellulaire à des fins analytiques, pour pouvoir qualifier et quantifier les différents types d'EPS. Le protocole décrit sur la figure I.3 permet de séparer la biomasse catalytique, c'est-à-dire les cellules d'*A. platensis*, de leur mucilage de polysaccharides. La première étape consiste à séparer les cellules du milieu de culture contenant les EPS solubles (surnageant) par centrifugation. Ensuite, les EPS liés sont détachés des cellules par chauffage à l'eau bouillante dans une solution à faible force ionique contenant un agent chélatant, l'EDTA, pour déstabiliser le gel formé par les EPS capsulaires détachés. Les différentes fractions des EPS anioniques sont finalement purifiées par précipitation par un sel d'ammonium quaternaire, le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB). Après centrifugation, le culot contenant les EPS liés au CTAB est purifié par des cycles successifs de solubilisation dans des solutions de NaCl de concentrations décroissantes et de précipitation à l'éthanol. Le protocole d'extraction de Filali Mouhim *et al.* (1993) a été adapté et optimisé au laboratoire dans les travaux de Phélippe (2017). De plus, la quantification des EPS a été effectuée par une mesure des oses neutres, des oses acides et des sulfates, avec une quantification parallèle du glycogène intracellulaire pour corriger le bilan matière (Phélippe, 2017).

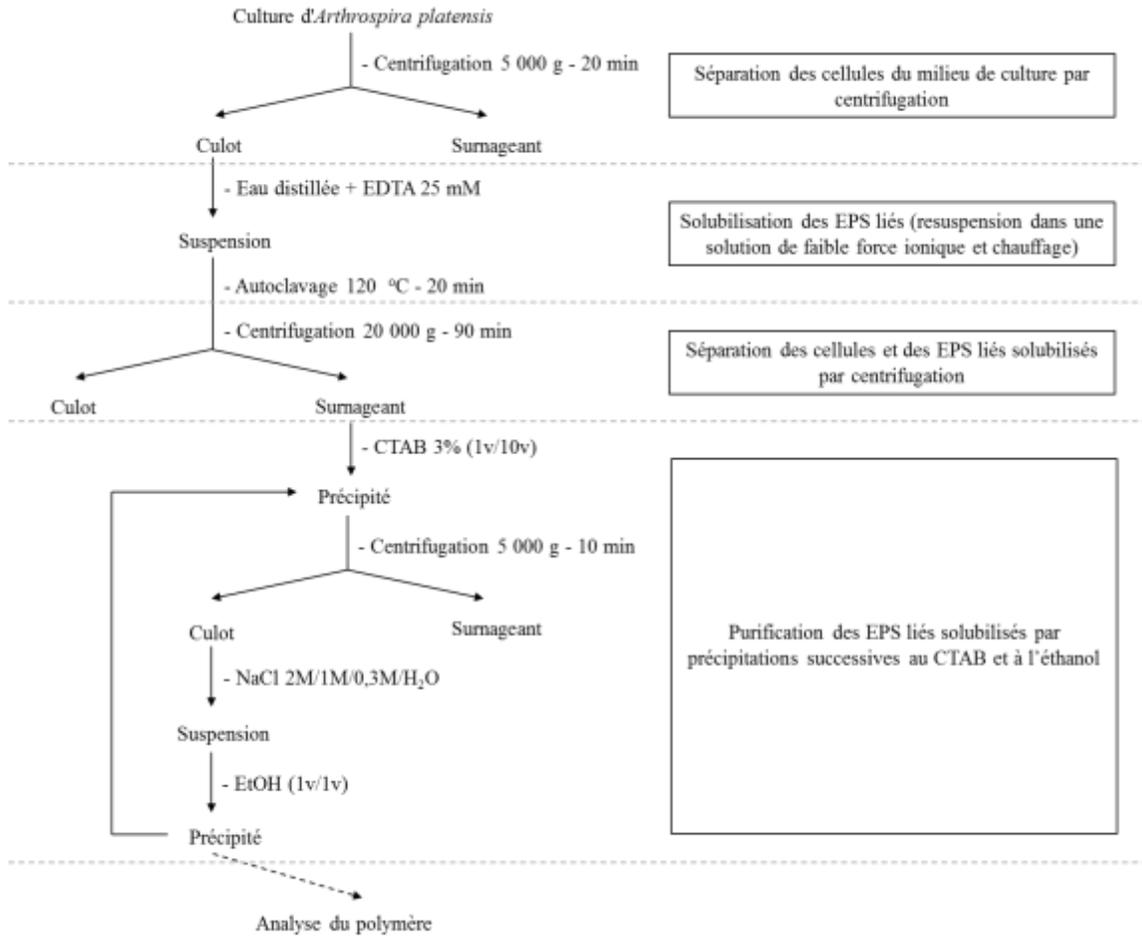


Figure I.3. Schéma d'extraction des EPS (adapté de Cornet (1992) et Filali Mouhim *et al.* (1993)).

3.2.4.2. *Porphyridium cruentum*

Certains procédés d'extraction spécifiques ont été mis en place et plusieurs brevets ont été déposés pour exploiter les EPS de *P. cruentum*. Ainsi, Barnier *et al.* (1987) ont également mis au point un procédé pour l'extraction des EPS solubles et liés. Ce procédé comprend une étape de concentration des polysaccharides (soit par écrémage soit par une technique d'ultrafiltration associée à une diafiltration), une étape de chauffage dans le but de solubiliser une partie de la fraction liée des EPS, une étape de précipitation par le chlorure de cétilypyridinium ou par addition d'alcool et une étape de séchage du précipité obtenu. Faerman *et al.* (2009) ont mis en évidence que la quantité d'EPS relargués peut être améliorée par un traitement par ultrasons en optimisant la fréquence et de l'énergie des ultrasons.

Les exopolysaccharides se solubilisant en partie dans le milieu de culture, la technique de récupération des EPS solubles seuls consiste simplement, dans la plupart des cas, à séparer les cellules du milieu de culture par centrifugation et à récupérer le surnageant contenant les EPS dissous (Arad *et al.*, 2006 ; de Jesus Raposo *et al.*, 2014 ; Eteshola *et al.*, 1996, 1998 ; Geresh *et al.*, 1990, 1992, 2002 ; Patel *et al.*, 2013 ; Tannin-Spitz *et al.*, 2005). Ces derniers sont ensuite soit dialysés afin d'éliminer les sels (Eteshola *et al.*, 1998, 1996 ; Geresh *et al.*, 1992, 1990 ; Tannin-Spitz *et al.*, 2005), soit concentrés par ultrafiltration (Arad *et al.*, 2006 ; Geresh *et al.*, 2002), soit précipités à l'alcool (en général l'éthanol) ou au chlorure de cétyle-pyridinium, un sel d'ammonium quaternaire, la précipitation étant possible grâce au caractère polyanionique des EPS (Barnier *et al.*, 1987 ; Ramus, 1972). Cependant, le processus d'extraction des EPS solubles le plus utilisé consiste à séparer les cellules par centrifugation et/ou par microfiltration puis à appliquer une précipitation à l'éthanol (Delattre *et al.*, 2016). Néanmoins, la précipitation alcoolique traditionnelle peut être souvent inappropriée en raison des grandes quantités de solvants organiques nécessaires pour isoler les EPS à grande échelle et de la durée nécessaire. De plus, cette technique n'est pas appropriée pour purifier les EPS des microalgues marines comme *P. cruentum* car les précipités d'EPS seront contaminés par la co-précipitation de sels et d'autres composés de faibles poids moléculaires (Patel *et al.*, 2013). Ces inconvénients rendent cette technique incompatible avec une application industrielle.

Actuellement, la technologie membranaire semble prometteuse pour le dessalement et la concentration de macromolécules à partir de matrices complexes. Patel *et al.* (2013) ont trouvé que la diafiltration tangentielle avec une membrane en polyéthylène sulfoné de 300 kDa est plus efficace pour purifier les EPS solubles à partir du milieu de culture de *P. cruentum* que la précipitation alcoolique et la dialyse. Zhang et Santschi (2009) ont abouti à la même conclusion après avoir comparé la précipitation à l'éthanol et l'ultrafiltration en cellule agitée ou en mode tangentiel suivie d'une diafiltration pour récupérer les EPS solubles de la diatomée *Amphora* sp.

Conclusion partielle (sections 2 et 3)

Les sections 2 et 3 de la synthèse bibliographique ont successivement présenté la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et la microalgue *Porphyridium cruentum*, puis les caractéristiques biochimiques, le potentiel de valorisation et les méthodes de récupération de leurs exopolysaccharides (EPS). En plus d'être des sources potentielles d'une large gamme de

produits biochimiques (lipides, protéines, pigments et polysaccharides), ces deux souches sont connues pour leur capacité à excréter hors de la cellule des polymères, principalement des polysaccharides (exopolysaccharides ou EPS). Ces hétéropolymères polyanioniques sulfatés sont dotés de vertus biologiques et de propriétés techno-fonctionnelles valorisables dans différents secteurs industriels (médical, pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, etc.). Ces EPS ont des poids moléculaires très élevés ($2-7 \times 10^6$ Da pour *P. cruentum*) et possèdent des structures très complexes comportant des sucres neutres, des sucres acides et des composés « non sucres » tels que des groupements sulfates et des protéines. Ils se présentent sous deux formes, les EPS capsulaires (ou liés) qui restent associés à la surface cellulaire et les EPS solubles, relargués dans le milieu de culture. La production de ces EPS peut être induite par des conditions de stress environnemental, en particulier par un stress osmotique ou lumineux, une carence en azote ou une suralimentation en CO₂.

La littérature mentionne plusieurs méthodes de récupération des EPS de microalgues ou de cyanobactéries. Les exopolysaccharides se solubilisant en partie dans le milieu de culture, la récupération des EPS solubles consiste à séparer les cellules de leur milieu de culture par centrifugation ou microfiltration puis à récupérer le surnageant contenant les EPS dissous. Ces derniers sont ensuite soit dialysés, soit précipités à l'éthanol ou à un surfactant cationique. Ces techniques conventionnelles sont souvent inappropriées pour récupérer et purifier les EPS solubles à grande échelle en raison de la consommation de grandes quantités de solvants organiques, de leur durée ou de la contamination des EPS par des sels et d'autres composés de faibles poids moléculaires. Ce dernier point est particulièrement valable pour la récupération d'EPS de microalgues marines dont le milieu de culture est riche en sels.

Il ressort tout d'abord de cette partie de la bibliographie que le potentiel de valorisation des EPS, et en particulier de leur fraction soluble, justifie que l'on s'intéresse à leur récupération. Par ailleurs, la filtration membranaire est une technologie prometteuse pour le dessalement et la concentration de macromolécules comme les EPS à partir de matrices complexes. *Il conviendra cependant de bien choisir les paramètres de conduite du procédé pour pouvoir limiter le colmatage des membranes.*

4. Généralités sur les procédés de filtration membranaire

Après une quinzaine de pages consacrées aux principes de base de la filtration membranaire (§ 4.1 à 4.6), nous présentons plus en détail au paragraphe 4.7 les mécanismes et les différents types de colmatage ainsi que les techniques de caractérisation usuelles des dépôts colmatants, en insistant sur la FTIR-ATR et l'AFM qui ont été mises en œuvre dans cette thèse.

4.1. Principe

Les procédés de filtration baromembranaire tels que l'osmose inverse, la nanofiltration, l'ultrafiltration et la microfiltration permettent de séparer des composés par perméation à travers des membranes sélectives sous l'action d'une force motrice, le gradient de pression ou pression transmembranaire (PTM). Le but de ces procédés est de séparer des espèces dissoutes ou en suspension dans un solvant. Pour cela, la solution d'alimentation est divisée au niveau de la membrane en deux fractions : le perméat qui traverse la membrane et qui contient une partie du solvant et les composés de petite taille ou de faible masse molaire et le rétentat où se concentrent les molécules ou particules de plus grande taille ou de masse molaire plus importante du fait de leur rétention par la membrane (Figure I.4). La pression transmembranaire est définie comme la différence entre les pressions qui s'exercent côté rétentat d'une part et perméat d'autre part. En première approximation, il est généralement admis que la pression côté rétentat suit un gradient de pression linéaire entre l'entrée et la sortie.

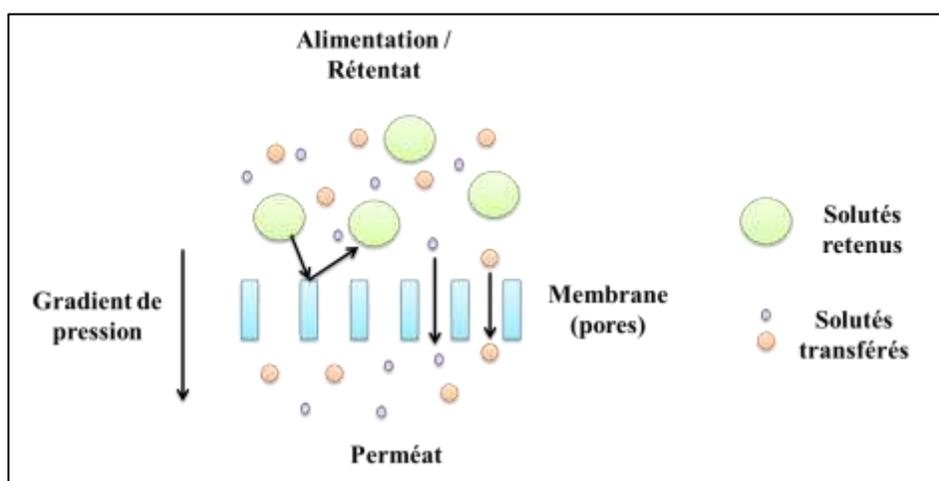


Figure I.4. Schématisation de principe de la filtration à travers une membrane permselective.

Ces procédés sont généralement classés selon la taille moyenne des pores de la membrane ainsi que selon les gammes de pression utilisées pour réaliser la séparation (Figure I.5).

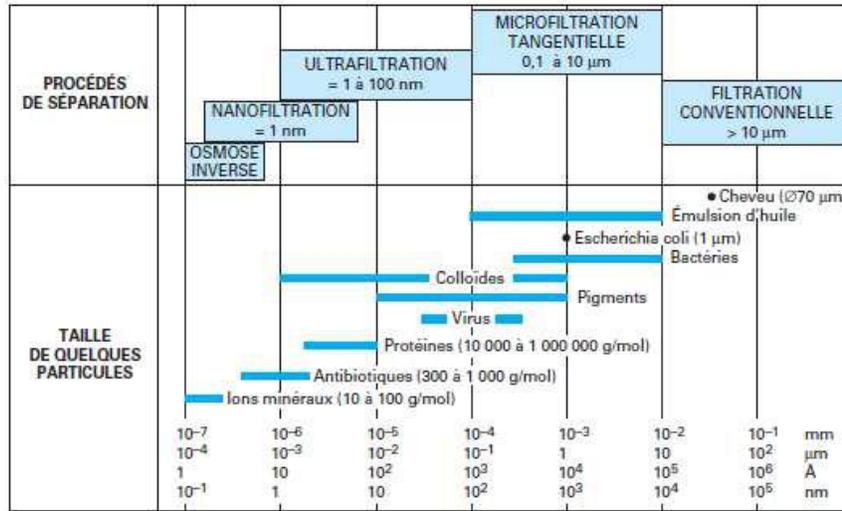


Figure I.5. Situation des procédés de séparation par membrane en fonction de la taille des particules ou des molécules retenues (Aimar *et al.*, 2010a).

L'osmose inverse utilise des membranes denses, sans microporosité apparente, qui laissent passer le solvant (l'eau le plus souvent) dans le perméat et arrêtent une partie voire la totalité des petites molécules et des ions. Le transfert s'effectue par dissolution des composés de la solution dans « le matériau membranaire » puis par diffusion à travers celle-ci. Le gradient de pression appliqué (PTM) est classiquement compris entre 30 et 80 bar.

La nanofiltration permet la rétention des composés ayant une taille en solution de l'ordre du nanomètre. La séparation des solutés chargés ne se fait pas sur le seul critère de taille mais aussi en fonction de leur charge. Les mécanismes de séparation solvant / soluté sont donc basés en nanofiltration sur des interactions de type stérique et ionique entre la membrane et le soluté d'une part, et entre les solutés d'autre part. Le gradient de pression est compris entre 10 et 40 bar.

L'ultrafiltration (UF) met en œuvre des membranes ayant des pores de diamètres compris entre environ 1 et 100 nm. Ces membranes laissent passer les petites molécules (eau, sels dissous) et retiennent les composés de masse molaire plus élevée (polymères, protéines, colloïdes, etc.). Le gradient de pression appliqué dans ce cas se situe souvent entre 1 et 5 bar. Les

applications industrielles sont multiples et concernent des opérations telles que la concentration de solutions macromoléculaires (polysaccharides, protéines...), l'élimination de macrosolutés présents dans les effluents domestiques, médicaux, industriels, etc., la séparation d'émulsions eau-huile et la clarification de moûts de fermentation puis l'extraction des produits actifs pharmaceutiques. L'UF, en dessous d'un seuil de coupure de l'ordre de 30 kg.mol^{-1} , permet également la rétention des virus.

La microfiltration tangentielle utilise des membranes dont les diamètres de pores sont compris entre 0,1 et 10 μm pour la rétention des particules et des bactéries en suspension. Elle permet également la rétention indirecte de colloïdes et peut retenir certains ions fixés sur des particules plus grosses suite à une complexation, une précipitation ou une floculation. Le gradient de pression appliqué varie de 0,1 à 1 bar généralement.

Pour plusieurs applications, les techniques à membrane se trouvent en concurrence avec des procédés plus conventionnels. En général, elles opèrent à température ambiante, d'où l'absence de dénaturation des molécules fragiles et le respect des qualités organoleptiques. De plus, elles sont fondées sur des critères physiques comme le diamètre des pores et ne font pas intervenir de réactifs chimiques polluants. Elles ne font pas non plus intervenir de changements de phase ce qui diminue la consommation d'énergie. Elles sont simples, faciles à automatiser et peuvent fonctionner en continu si les procédés de nettoyage des membranes sont bien maîtrisés.

4.2. Configuration des membranes et géométrie des modules

4.2.1. Matériaux membranaires

Les membranes asymétriques sont habituellement composées d'une couche active sélective assurant la séparation associée à un support macroporeux renforçant la résistance mécanique. Il existe selon la nature du matériau de la couche sélective, deux grandes catégories : les membranes organiques et les membranes minérales. Le tableau I.4 présente les principales caractéristiques de ces deux catégories de membranes.

Les membranes minérales sont caractérisées par une excellente résistance chimique (tolérance aux pH extrêmes et compatibilité avec les solvants organiques), thermique et mécanique (en supportant des pressions de 10 à 100 bar) et une durée de vie élevée. Cependant, les membranes organiques, constituées de matériaux polymériques sont les plus

répandues et représentent 80 à 90 % de la surface installée, notamment grâce à leur faible coût, leur facilité de mise en œuvre et leur disponibilité dans une large gamme de taille de pores et de géométries (Remigy et Desclaux, 2007).

Tableau I.4. Caractéristiques des matériaux membranaires (adapté de Remigy et Desclaux (2007)).

Membranes	Organiques	Minérales
Couche active	<p>Polymères naturels : Acétate de Cellulose (AC) Cellulose Régénérée (CR)</p> <p>Polymères synthétiques : Polyéthersulfone (PES) et Polysulfone (PS) Polyamide (PA), Polydifluorure de vinyle (PVDF) Polyacrylonitrile (PAN)</p>	<p><u>Membranes céramiques</u> <u>(majoritaires)</u> alumine (Al_2O_3) (α ou γ) zircono (ZrO_2) oxyde de titane (TiO_2)</p> <p><u>Plus rarement</u> : carbone poreux, verre et métaux</p>
Support	Polypropylène, polyester, polyamide, polyéthylène	Alumine α , carbone, silicium, inox fritté
Résistance au pH	1 – 13 (3 – 8 pour l'AC)	0 - 14
Résistance thermique	< 80 °C (30 – 40 °C pour l'AC)	> 300 °C – stérilisables
Résistance aux solvants organiques	Faible (membranes en polymères fluorés comme PTFE, PVDF plus résistants)	Très bonne résistance
Procédé membranaire	MF, UF, NF, OI	MF, UF
Géométrie	Plane, tubulaire, spiralée, fibres creuses	Plane, tubulaire, multicanaux
Coût	Faible	Plus de 10 fois plus onéreuses que les membranes organiques

4.2.2. Géométrie des membranes et des modules membranaires

La géométrie des membranes est souvent assimilée à celle des modules dans lesquelles elles sont mises en œuvre, qui peuvent être plans, tubulaires, spiralés ou à fibres creuses.

Plusieurs critères, parfois contradictoires, sont à prendre en compte pour le choix du type de module (Tableau I.5) :

- Les conditions adéquates d'écoulement et le régime d'écoulement permettant de réduire les couches limites et par là la polarisation de concentration et le colmatage.

- La compacité exprimée par la surface spécifique d'échange égale au rapport entre l'aire de la membrane (la surface filtrante) et le volume du module.
- Les coûts d'investissement et de fabrication, ainsi que la simplicité de mise en œuvre et la durée de vie des membranes.
- La facilité d'entretien pour le nettoyage, le remplacement et le démontage des membranes ou du module.

A noter que les informations dans le tableau I.5, en particulier celles concernant les coûts d'investissement sont plutôt qualitatives que quantitatives. Les valeurs notées datent de plusieurs années (Remigy et Desclaux, 2007) et ont probablement évolués.

4.2.2.1. Module plan

Le module plan ou module filtre presse est constitué d'une membrane plane ou d'un empilement de membranes sous forme de feuilles séparées par des espaceurs (grilles polymériques assurant l'homogénéité de la géométrie de la veine fluide et augmentant la turbulence). Les membranes peuvent être rectangulaires ou en forme de disque. Les modules plans à échelle du laboratoire sont couramment utilisés pour étudier les performances des membranes. Ce type de module est souvent utilisé en préalable à l'utilisation des modules spiralés commerciaux de surface plus grande car :

- Les conditions opératoires peuvent être contrôlées plus efficacement dans un module à petite échelle.
- Les résultats observés peuvent être reliés à des propriétés spécifiques de la membrane et ne sont pas masqués, ou sont moins masqués, par le manque d'uniformité de la membrane.
- La faible surface membranaire requise rend l'expérimentation plus économique surtout lorsqu'il y a lieu d'effectuer des essais destructifs.

4.2.2.2. Module spiralé

Ces modules sont constitués d'un tube perforé, sur lequel plusieurs assemblages élémentaires sont enroulés en spirale. Ces assemblages sont composés, dans l'ordre d'une membrane, d'une grille fine (espaceur perméat), d'une membrane et d'une grille plus grossière (espaceur rétentat). L'étanchéité entre les différents compartiments est assurée par collage. Ainsi,

dans un module spiralé, chaque feuille double est composée de deux membranes collées dos à dos par les bords des deux feuilles planes. Un espaceur perméat sépare les deux membranes d'une même feuille double. Chaque feuille est séparée de la suivante par un espaceur rétentat. Les membranes utilisées sont uniquement des membranes planes organiques qui sont suffisamment flexibles pour pouvoir être enroulées autour du tube central perforé. Cette configuration permet d'augmenter la surface disponible des membranes planes et la compacité du système. Toutefois, le nettoyage et la désinfection sont peu aisés et la vitesse utilisée est limitée. Les matériaux en suspension du fluide à filtrer peuvent facilement bloquer le maillage des espaceurs et bloquer partiellement le canal d'alimentation. L'insertion d'espaceurs (rétentat) dans la veine liquide est nécessaire pour améliorer les turbulences et diminuer le colmatage global. L'espaceur développe la turbulence à la surface de la membrane et réduit la polarisation de concentration et améliore par là le flux de perméat. Il réduit directement le coût de consommation d'énergie de pompage.

4.2.2.3. *Module tubulaire*

Les membranes tubulaires ont une géométrie cylindrique avec un petit diamètre (de l'ordre du cm). Les membranes dont le diamètre est compris entre 3 mm et 10 mm sont appelées membranes capillaires. Il existe aussi des modules tubulaires monocanaux équipés de membranes fabriquées avec des matériaux organiques et ayant des tubes de diamètre compris entre 10 et 25 mm. Les modules tubulaires sont les mieux adaptés aux membranes minérales en céramique. Ces membranes minérales peuvent être monocanal ou multicanaux et sont constituées d'un support poreux dans lequel circule le perméat et sur lequel on dépose la couche active de membrane située en général à la surface interne des canaux. Nécessitant un investissement élevé, cette géométrie permet de faire circuler la charge à grande vitesse (régime d'écoulement turbulent) ou de traiter des solutions visqueuses avec des couches limites minimales.

4.2.2.4. *Module fibres creuses*

Ce module se présente comme un ensemble de fibres creuses regroupées dans une enveloppe. La charge circule sous pression au contact de la peau, tandis que le perméat est recueilli à l'interface opposée. Les membranes en fibres creuses sont surtout fabriquées en matériau organique mais il en existe également en matériau inorganique. Les fibres creuses peuvent être à peau externe, à peau interne ou à double peau. Dans le cas d'une peau interne,

l'alimentation se fait à l'intérieur de la fibre creuse et le perméat sera récupéré à l'extérieur de la fibre ; dans le cas d'une peau externe, l'alimentation se fait à l'extérieur de la fibre et le perméat est collecté à l'intérieur de la fibre. La rétrofiltration (ou rétrolavage) peut donc être utilisée pour décolmater les membranes. Ces systèmes sont très compacts, peu coûteux et particulièrement adaptés aux fluides peu visqueux présentant de faibles risques de colmatage.

Tableau I.5. Performances comparées des différents modules membranaires (adapté de Remigy et Desclaux (2007)).

Géométrie	Plane	Spiralée	Tubulaire	Fibres creuses
Coût d'investissement (US\$.m⁻², 2000)	50 à 200 (élevé)	50 à 100 (relativement faible)	50 à 200 (élevé)	5 à 20
Coût énergétique (pompage)	Moyen	Faible	Important	Faible
Diamètre hydraulique (mm)	1 à 5	0,8 à 1,2	12 à 20	0,1 à 1
Compacité (m².m⁻³)	100 à 400 (faible)	300 à 1000 (élevée)	10 à 300 (faible)	1000 à 15000 (élevée)
Remplacement des membranes	Membrane par membrane	Module entier	Tube par tube	Module entier
Prétraitement	Moyen	Moyen	Faible	Moyen (filtration interne/externe) Moyen à faible (externe/interne)
Facilité de nettoyage	Moyen (Rétrolavage déconseillé)	Difficile à moyen	Facile (Rétrolavage déconseillé)	Moyen
Matériaux	Polymères et céramiques dans quelques cas	Polymères exclusivement	Céramiques essentiellement et quelques cas de polymères	Polymères surtout
Régime d'écoulement	Laminaire ou turbulent	Turbulent	Turbulent	Laminaire

Les interactions physico-chimiques entre le fluide filtré et le matériau membranaire jouent un rôle important dans le colmatage membranaire. Par ailleurs, la géométrie de la

membrane impactant les conditions hydrodynamiques de la filtration, elle constitue également un facteur important (Rabiller-Baudry *et al.*, 2014).

Pour distinguer quantitativement les deux types de régimes d'écoulement, laminaire et turbulent, le nombre de Reynolds adimensionnel, Re , qui est un paramètre rendant compte de l'hydrodynamique est employé (Equation I.1).

$$Re = \frac{\rho v d_h}{\eta} \quad (I.1)$$

Avec ρ , masse volumique du fluide (kg.m^{-3}); v , vitesse du fluide (m.s^{-1}); d_h , diamètre hydraulique (m) et η , viscosité dynamique du fluide (Pa.s).

Pour un régime laminaire, $Re < 1800$ (Cheryan, 1998 section 4E1)

Pour un régime pleinement turbulent, $Re > 4000$ (Cheryan, 1998 section 4E1)

Entre 1800 et 4000, on observe un régime de transition.

Les frottements et les pertes de charge augmentent avec la vitesse du fluide également dans une canalisation. Pour un fluide et une canalisation donnés, ils seront donc plus importants en régime turbulent qu'en régime laminaire.

4.3. Caractéristiques des membranes

Les performances d'une membrane peuvent s'évaluer à partir de sa perméabilité et de sa sélectivité. Aussi, lors d'une optimisation il est souvent souhaité que ces deux critères soient les plus élevés possibles.

4.3.1. Perméabilité (performance hydraulique)

La perméabilité ou la densité de flux volumique de solvant par unité de pression conditionne la productivité de l'opération. Elle est définie comme étant l'aptitude d'une membrane à se laisser traverser par le fluide considéré. La perméabilité dépend de la taille et de la densité des pores ainsi que de l'épaisseur de la couche sélective pour les membranes poreuses. En procédé de filtration membranaire et pour une PTM donnée, le flux de perméation doit être le plus élevé possible de manière à minimiser la surface de filtration nécessaire pour assurer la capacité de production souhaitée, et donc l'investissement (Aimar *et al.*, 2010b).

4.3.2. Sélectivité

En ultrafiltration, le seuil de coupure (SC ou *Molecular Weight Cut-Off*, MWCO) exprimé en Kilo Dalton (kDa) (avec $1 \text{ Da} = 1 \text{ g.mol}^{-1}$). Il correspond généralement à la masse molaire du soluté le plus petit retenu à 90 % par la membrane dans des conditions de pression et de température normalisées. Le seuil de coupure est donc défini par rapport à un soluté donné. En fait, les molécules ont des formes variées, fluctuantes et il se peut que des espèces de masse molaire inférieure au SC soient retenues par la membrane alors que d'autres de masse molaire supérieure la traversent. Les membranes comportent d'ailleurs des pores plus ou moins cylindriques dont les diamètres se répartissent suivant une distribution plus ou moins étendue. Ainsi, une membrane d'ultrafiltration est caractérisée, pour la séparation d'une espèce effectuée dans des conditions fixées, par le pouvoir de rétention de cette espèce. Ce pouvoir est mesuré par son taux de rétention (ou taux de rejet) *TR* qui sera défini précisément au chapitre Matériel et Méthodes). Un taux de rétention de 1 signifie que le soluté est totalement retenu par la membrane alors qu'un taux de rétention nul correspond à un soluté passant aussi librement à travers la membrane que le solvant.

En microfiltration tangentielle, la membrane est caractérisée par son pouvoir d'arrêt absolu ou son diamètre de pores nominal exprimé en micromètres qui est le diamètre de la plus grosse particule sphérique indéformable capable de traverser les pores de la membrane dans des conditions de pression et de température normalisées.

4.4. Modes de filtration membranaire

Les modes de filtration membranaire peuvent être classés selon trois critères :

- L'écoulement du fluide d'alimentation dans le module vis-à-vis de la membrane
- Le mode de filtration, à pression constante ou à flux constant
- La conduite de l'opération, continue, semi-continue ou discontinue

4.4.1. Ecoulement du fluide

En termes d'écoulement du fluide, deux modes de filtration sont à distinguer : la filtration frontale (*dead-end*) et la filtration tangentielle (*cross-flow*).

Lors d'une filtration frontale, la suspension à traiter est alimentée perpendiculairement à la membrane et le flux de solvant ne peut que traverser la membrane. Une accumulation régulière de matières à la surface de la membrane se produit au fur et à mesure de l'opération formant une couche qui diminue la perméabilité globale de l'ensemble (membrane + dépôt). Cela entraîne une diminution du débit de filtration pour une filtration à pression constante, ou une augmentation de la pression transmembranaire lors d'une filtration à débit constant (voir le § suivant). Ce type de procédé n'atteint donc jamais un état stationnaire (Figure I.6).

En filtration tangentielle, l'écoulement du fluide à filtrer se fait parallèlement à la membrane. L'objectif est de limiter l'accumulation continue de matière au voisinage immédiat (polarisation de concentration) ou à la surface de la membrane (colmatage). Ceci permet de maintenir un flux de perméat plus élevé pendant la filtration. Un équilibre peut être atteint et le flux peut se stabiliser dans un état stationnaire ou pseudo-stationnaire (Figure I.6).

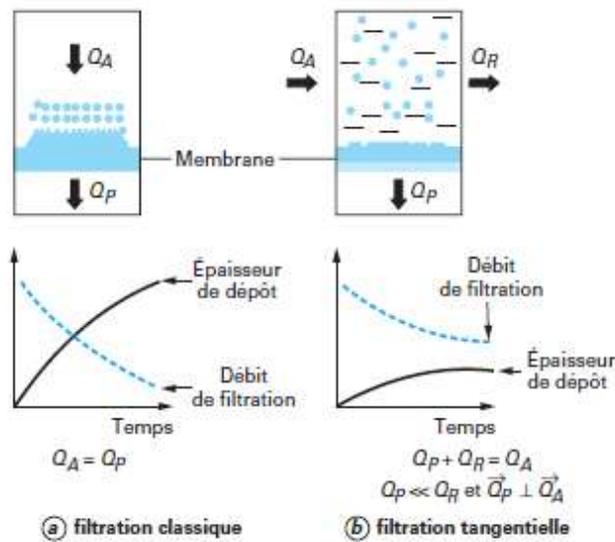


Figure I.6. Comparaison entre filtration frontale et filtration tangentielle (Aimar *et al.*, 2010a).

4.4.2. Filtration à pression constante ou à flux constant

Un système de filtration peut fonctionner soit à pression transmembranaire constante soit à flux constant. Les opérations menées à PTM constante sont les plus courantes, car plus faciles à mettre en œuvre *a priori*, une vanne de contre-pression placée en sortie du module suffisant à régler la PTM. Dans les systèmes à flux constant, la PTM est ajustée par un régulateur de

manière à maintenir un débit de perméat constant quels que soient les perturbations et en particulier l'augmentation du dépôt colmatant en cours de filtration.

4.4.3. Conduite de l'opération

Une filtration membranaire peut fonctionner en mode discontinu (batch), continu ou semi-continu (fed-batch).

4.4.3.1. Fonctionnement discontinu

Dans le cas du fonctionnement en discontinu, le fluide à traiter est introduit au préalable dans un bac d'alimentation. Le fluide est ensuite pompé le long de la membrane et séparé sous l'action de la pression transmembranaire en 2 fractions, le rétentat qui est réintroduit dans le bac d'alimentation et le perméat. Deux sous-modes de fonctionnement existent selon le devenir du perméat. Avant de les décrire, nous définissons les deux grandeurs qui permettent de caractériser l'avancement d'une opération de fractionnement, le facteur de réduction volumique et le facteur de concentration d'un soluté d'intérêt.

Le facteur de réduction volumique (FRV) instantané correspond au rapport entre le volume initial de la solution d'alimentation et le volume du rétentat produit à l'instant t (Equation I.2) :

$$FRV = \frac{V_0}{V_R(t)} = \frac{V_0}{V_0 - V_P(t)} \quad (I.2)$$

Avec V_0 : volume de la solution d'alimentation introduite (L)

$V_R(t)$: volume du rétentat cumulé à l'instant t (L)

$V_P(t)$: volume du perméat cumulé à l'instant t (L)

Le facteur de concentration instantané (FC) d'un soluté reflète l'augmentation de la concentration du rétentat contenu dans le bac d'alimentation à l'instant t et se définit comme :

$$FC = \frac{C(t)}{C_0} \quad (I.3)$$

Avec C_0 (g.L^{-1} ou kg.m^{-3}), la concentration initiale du soluté dans le rétentat et $C(t)$ (g.L^{-1} ou kg.m^{-3}), la concentration du soluté dans le rétentat à un instant t donné. On peut définir autant de facteurs de concentration que de solutés d'intérêt.

Filtration en mode recyclage total (ou isoconcentration) : le rétentat et le perméat sont tous les deux recyclés dans la cuve d'alimentation pour conserver le même volume et quasiment la même concentration dans la solution d'alimentation au cours du temps. Par suite, le FRV et le FC du soluté d'intérêt restent constamment égaux à 1. Ce mode de recyclage est intéressant pour l'étude de l'évolution du flux de perméation en fonction de la PTM appliquée, de la qualité du fluide à traiter et du matériau membranaire.

Filtration en mode recyclage partiel (concentration) : le rétentat seul est recyclé dans le bac d'alimentation alors que le perméat est extrait de la boucle. Par conséquent, le volume de la solution d'alimentation diminue au cours de la filtration provoquant l'accroissement progressif du FRV et la diminution progressive du FC. L'augmentation de la concentration d'alimentation entraîne la diminution du flux de perméation suite à l'augmentation de l'importance du colmatage membranaire induit et celle de la polarisation de concentration. Ce mode de fonctionnement est le mode de fonctionnement normal lorsqu'il s'agit d'assurer une production. Ce mode est également intéressant en phase de développement en particulier pour évaluer la valeur maximale atteignable des facteurs de réduction volumique et de concentration.

4.4.3.2. Fonctionnement continu

L'alimentation ainsi que le soutirage du perméat et d'une partie du rétentat se font en continu. La fraction du débit d'alimentation qui traverse la membrane est appelée taux de conversion de l'opération, c'est l'équivalent en mode continu du facteur de réduction volumique en mode discontinu. Lorsque le taux de conversion doit être élevé et/ou que le facteur de concentration que l'on souhaite réaliser est important, il est possible de concevoir des systèmes continus multi-étagés. Cet arrangement constitue une alternative intéressante pour atteindre un taux de conversion et un facteur de concentration élevés, en utilisant une surface de membrane réduite comparé à un système à un seul étage.

4.4.3.3. *Fonctionnement semi-continu*

Ce mode est principalement utilisé pour effectuer des opérations de diafiltration. Il consiste à introduire dans le bac d'alimentation, une quantité de fluide égale à celle du perméat qui s'écoule à travers la membrane. Le fluide réintroduit peut être de l'eau pure ou une solution de composition définie comme un tampon ou une solution contenant une molécule que l'on souhaite ajouter au rétentat pour remplacer celles qui se passent dans le perméat. La solution peut être réintroduite de façon continue ou périodiquement.

4.5. Limitations au transfert du solvant et des solutés

Lors de la filtration d'une solution contenant des particules ou des molécules retenues par la membrane, la perméabilité de la membrane diminue ce qui se traduit par une diminution du flux de perméat dans le cas d'une filtration à pression constante. Cette baisse de perméabilité est imputable à l'accumulation de matière à la surface de la membrane ou à l'intérieur de ses pores. Deux phénomènes peuvent se présenter : la polarisation de concentration et le colmatage.

4.5.1. Polarisation de concentration

La polarisation de concentration résulte de l'accumulation progressive de matière au voisinage de l'interface fluide-membrane sous forme solubilisée ou colloïdale, sous l'effet de la convection. La concentration en solutés à l'interface est donc plus élevée qu'au cœur de l'écoulement. Ce phénomène est réversible, puisque lorsque la pression est réduite, la matière accumulée revient en partie dans le cœur de l'écoulement par rétro-diffusion.

Cette accumulation de matière au voisinage de la membrane engendre un gradient de concentration des solutés qui peut être décrit par le modèle du film.

4.5.1.1. *Théorie du film*

Le gradient de concentration d'un soluté au voisinage de la membrane peut être établi par le modèle du film qui suppose que l'accumulation de matières est limitée à une mince couche d'épaisseur δ de quelques microns (qui dépend des conditions hydrodynamiques), appelée couche limite de polarisation. Le gradient de concentration en soluté dans la couche de polarisation est régi par l'équilibre qui s'établit entre les 2 composantes du flux de soluté correspondant respectivement à l'apport convectif du soluté à la surface de la membrane et à la

rétrodiffusion sous l'action du gradient de concentration (voir figure I.7a). L'intégration du bilan matière traduisant cet équilibre sur l'épaisseur de la couche de polarisation conduit à la loi du film, qui relie le flux de perméat en régime stationnaire J aux concentrations en soluté dans le cœur de la solution (C_0), à la surface de la membrane (C_m) et dans le perméat (C_p) (Equation I.4).

$$J = \frac{D}{\delta} \ln \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} = k \ln \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} \quad (\text{I.4})$$

avec D le coefficient de diffusion du soluté, δ l'épaisseur de la couche limite de diffusion et k le coefficient de transfert de matière du soluté égal à $k = D/\delta$ dans le modèle du film. Pour une espèce donnée, le coefficient k dépend des propriétés physico-chimiques de la solution (viscosité, coefficient de diffusion...) et des conditions hydrodynamiques de l'écoulement dans le circuit rétentat.

4.5.1.2. *Modèle du gel*

En ultrafiltration, la concentration en macromolécules à la membrane C_m peut atteindre la concentration de gel, C_g , lorsque la concentration en soluté C_0 est suffisamment élevée. Il se forme alors une couche de gel qui se comporte comme une seconde membrane et crée une résistance additionnelle au transfert de solvant. On parle alors de polarisation secondaire ou de polarisation de gel. Dans ces conditions, une augmentation de la pression n'a plus d'influence sur le débit du perméat (Figure I.7b). En supposant que la concentration en macromolécules dans le perméat est nulle, l'équation I.5 conduit à l'équation du modèle du gel :

$$J_{lim} = k \ln \frac{C_g}{C_0} \quad (\text{I.5})$$

L'équation I.5 peut être réécrite sous la forme suivante reliant le flux stabilisé J_{lim} à la concentration de la solution filtrée C_0 . Si on suppose que le coefficient de transfert k reste constant, la concentration de gel peut être déterminée par l'équation I.6 :

$$J_{lim} = k \ln C_g - k \ln C_0 \quad (\text{I.6})$$

On peut à partir de cette expression estimer la valeur de la concentration de gel C_g en effectuant une série de filtrations à recyclage total pour différentes concentrations C_0 dans des conditions où on peut supposer que le coefficient de transfert de matière k reste constant. En

effet, le tracé $J_{lim} = f(\ln C_0)$ est alors une droite de pente $(-k)$ et dont l'abscisse du point obtenu par extrapolation à l'origine correspond à $(k \cdot \ln C_g)$.

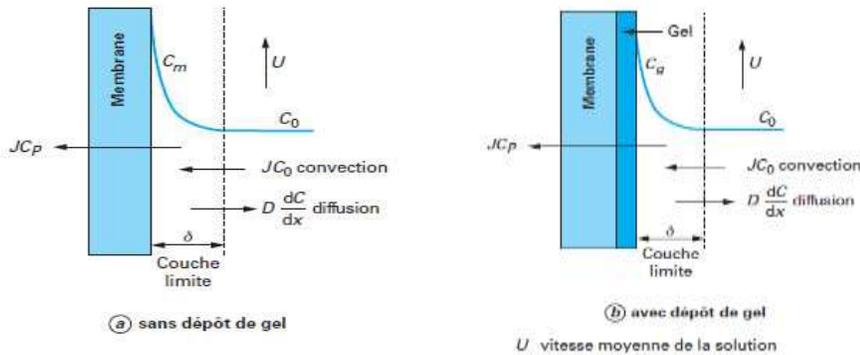


Figure I.7. Modélisation de la polarisation par la théorie du film (a) et le modèle du gel (b) (Aimar *et al.*, 2010b).

4.5.2. Colmatage

Le colmatage résulte du dépôt de matière sur le matériau membranaire ou dans les pores de la membrane qui engendre une résistance supplémentaire à l'écoulement. Les différents mécanismes de colmatage sont décrits au paragraphe 4.7.

4.6. Moyens de lutte contre la polarisation de concentration et le colmatage

Le colmatage est un facteur limitant dans toutes les applications de filtration membranaire. Son développement est difficile à éviter totalement lors des opérations de filtration tangentielle et, lorsqu'il est de type irréversible, il nécessite des séquences de nettoyage chimique pour être éliminé. Cependant, l'augmentation des fréquences de nettoyage génère des effluents et consomme beaucoup d'énergie et de produits chimiques. Les nettoyages chimiques réduisent également la durée de vie des membranes.

4.6.1. Procédés préventifs

La couche de polarisation de concentration et le colmatage de la membrane peuvent être traités en amont à l'aide des procédés préventifs. Quelques exemples sont cités ci-dessous :

- La sélection adéquate du matériau membranaire, l'agencement et le mode de conduite des procédés membranaires, et le choix de conditions opératoires permettant de travailler sous flux critique (*cf.* § 5.3.2).

- Le prétraitement de la solution d'alimentation par des procédés physiques (comme la pré-filtration et la centrifugation) et chimiques (comme l'ajustement de pH). Tout dépend de la nature, de la composition et des caractéristiques physico-chimiques du fluide d'alimentation.
- L'amélioration des conditions hydrodynamiques et du cisaillement à la surface de la membrane par :
 - ✓ L'augmentation de la vitesse tangentielle pour améliorer le coefficient de transfert de matière et la rétro-diffusion des solutés accumulés à la surface de la membrane (Aimar *et al.*, 2010a) (*cf.* § 5.3.1).
 - ✓ L'utilisation de promoteurs de turbulence (ou inserts) comme les espaceurs afin de créer des écoulements instationnaires au-dessus de la membrane.
 - ✓ La filtration dynamique qui consiste à créer un mouvement relatif entre la membrane et le carter, et qui permet de travailler à de faibles pressions transmembranaires et à des taux de cisaillements élevés, une combinaison qui permet de limiter la croissance et la compression de la couche de gel.
- Le backpulsing et le backflushing (rétrolavage), qui ont pour effet de pousser un peu du perméat (avec ou sans l'air) vers le compartiment rétentat par une contre-pression afin de retirer une partie des composés accumulés dans les pores de la membrane ou à sa surface.
- Les ultrasons peuvent causer divers phénomènes, incluant la dispersion de particules d'une suspension, la réduction de la viscosité, les changements dans les propriétés de surface de la particule et des cavitations.

4.6.2. Nettoyage de la membrane

Indépendamment du matériau de la membrane, le nettoyage de la membrane se compose des étapes suivantes : le transport de l'agent de nettoyage à travers les couches colmatantes, la solubilisation et le détachement de l'encrassement de la surface de la membrane et le transport des colmatants détachés dans la solution. L'efficacité des procédés dépend du bon choix des produits chimiques de nettoyage et des conditions de nettoyage.

Les nettoyages chimiques envisagés sont généralement à base d'acide et/ou de base mais il existe également d'autres agents de nettoyage. Quelques classes de produits entrant dans la composition des détergents ainsi que leurs modes d'action sont présentés dans le tableau I.6. Il faut cependant vérifier l'innocuité de ces agents par rapport au matériau membranaire et aux

autres éléments du procédé. Pour des matériaux peu tolérants aux réactifs chimiques comme l'acétate de cellulose, un nettoyage enzymatique peut être envisagé. Dans le cas de colmatage organique récalcitrant au nettoyage, le recours au nettoyage enzymatique peut être efficace car il fonctionne en hydrolysant des liaisons spécifiques des colmatants. Cependant, le choix de l'enzyme ou du cocktail enzymatique doit être bien adapté au matériau membranaire pour ne pas attaquer les liaisons de la matrice membranaire. En outre, le nettoyage enzymatique a la réputation d'être plus onéreux que le nettoyage chimique mais il peut s'avérer nécessaire dans certaines situations délicates.

Tableau I.6. Quelques classes de produits entrant dans la composition des détergents pour le nettoyage des membranes et leurs modes d'action (adapté de Aimar (2006) et Rabiller-Baudry (2009)).

Classe	Rôle
Alcalin	Elimination des matières organiques (i.e. sucres et protéines) Saponification des graisses
Acide	Dissolution des précipités minéraux
Enzymes	Dissolution des matières organiques
Complexants/séquestrants	Elimination des cations multivalents (solubilisation sous forme de complexes)
Tensioactifs	Elimination des matériaux hydrophobes, peu ou non hydrosolubles Augmentation de la mouillabilité de la surface filtrante et favoriser le contact entre l'agent de nettoyage et le dépôt
Désinfectants (avec un pH préférentiellement alcalin)	Destruction des microorganismes et des biofilms, nettoyage de matière organique (effets oxydants)
Dispersants	Antiredéposition

4.7. Mécanismes et caractérisation du colmatage

4.7.1. Définition

Le colmatage peut être défini comme l'ensemble des phénomènes qui interviennent dans la modification des propriétés filtrantes de la membrane (variations de perméabilité et de sélectivité), excepté la compaction et la modification chimique. Il résulte d'interactions physiques, chimiques et/ou biologiques, se produisant à l'interface membrane-solution ou dans le volume poreux et peut être de nature inorganique et/ou organique. En d'autres termes, le colmatage représente l'accumulation de substances (composants particulaires, colloïdaux et

substances dissoutes) par des phénomènes de dépôt/adsorption/blocage au niveau de la surface externe ou interne des membranes pendant la filtration (Aimar *et al.*, 2010a).

4.7.2. Mécanismes de colmatage

Lors du colmatage, les interactions spécifiques entre la membrane et les composés présents en solution ou entre les composés eux-mêmes entraînent une résistance additionnelle au transfert du solvant. Celle-ci est généralement attribuée soit au blocage de pores, soit aux phénomènes d'adsorption, soit encore au dépôt de matière à la surface de la membrane (Figure I.8). Initialement, ces processus sont contrôlés par des interactions spécifiques entre la surface de la membrane et les colmatants puis entre colmatants. Les éléments accumulés à la surface de la membrane peuvent modifier soit les propriétés physico-chimiques de la couche située à l'interface fluide/membrane par formation de dépôt, soit les propriétés de la membrane elle-même par blocage interne des pores ou par adsorption.

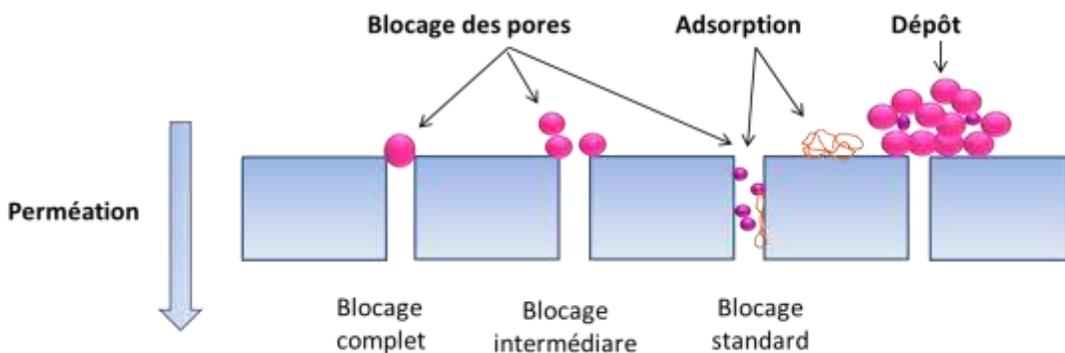


Figure I.8. Description des principaux mécanismes de colmatage.

Nous détaillons ci-dessous les mécanismes de colmatage par blocage de pores, par adsorption et par dépôt à la surface de la membrane.

Le **blocage de pores** : il s'agit d'une obstruction mécanique des pores de la membrane par des espèces particulières ou colloïdales, de façon partielle ou totale. Le blocage de pores découle de phénomènes stériques : des composés de taille inférieure ou voisine à celle des pores viennent s'inclure dans ces derniers et les bouchent, diminuant ainsi la section disponible pour l'écoulement. Ce phénomène est important en microfiltration et peut être négligé en ultrafiltration pour certains fluides et pour les tailles des pores les plus petites (1-100 nm).

L'**adsorption** : elle résulte des interactions (affinité) d'ordre physico-chimiques entre le matériau membranaire et certains solutés présents en solution. L'adsorption est essentiellement un phénomène de surface qui se produit à la surface externe de la membrane mais qui peut aussi intervenir à l'intérieur des pores. Ainsi, il y a formation d'une ou plusieurs couches moléculaires à la surface du matériau membranaire ou sur/dans le gâteau de filtration. Ainsi, l'adsorption conduit à une diminution du nombre de pores ou de la section de passage dans les pores et, par voie de conséquence, à une augmentation de la résistance hydraulique ainsi qu'à une modification de la charge de surface de la membrane. L'adsorption est facilitée par la polarisation de concentration dans la mesure où celle-ci déplace les équilibres d'adsorption vers des conditions plus propices à une accumulation importante à la surface des membranes et accélère leurs cinétiques.

La **formation de dépôt** : le flux apporté à la paroi de la membrane par convection engendre une accumulation de matières puis un dépôt à la surface de la membrane qui engendre une résistance additionnelle qui est fonction de la masse déposée par unité de surface membranaire. Le type de dépôt formé diffère en fonction des propriétés physicochimiques du fluide et peut être de nature réversible ou irréversible. Il peut s'agir par exemple d'un gel dense de macromolécules ou d'un dépôt poreux de particules ou de colloïdes lorsque la taille de ces solutés est supérieure à celle des pores.

4.7.3. Modèles de colmatage

De nombreuses recherches ont été consacrées à l'étude de ces phénomènes, et des modèles ont été développés afin de décrire les mécanismes intervenant dans le colmatage. Ainsi, en ultrafiltration et en microfiltration frontales fonctionnant à pression constante, les travaux d'Hermia (1982) ont permis d'aboutir à une équation unique (Equations I.7 et I.8) permettant de décrire le modèles de colmatage et faisant intervenir les dérivées première et seconde du temps par le volume (Aimar *et al.*, 2010b) :

$$\frac{d^2t}{dV^2} = K \left(\frac{dt}{dV} \right)^n \quad (\text{I.7})$$

Avec t , le temps de filtration, V , le volume du perméat, K , le coefficient de résistance (constante du modèle d'Hermia) et n , l'indice de colmatage, paramètre permettant de décrire le type de

colmatage dominant, et dont les valeurs valent respectivement 2, 1, 1,5 et 0 pour le blocage complet, le blocage intermédiaire, le blocage standard ou adsorption sur les parois interne des pores, et la filtration sur gâteau (dépôt). L'équation I.7 se réécrit :

$$\frac{dJ_p}{dt} = -KJ_p(J_p A_0)^{2-n} \quad (\text{I.8})$$

Avec

$$J_p = \frac{1}{A_0} \frac{dV}{dt} \quad (\text{I.9})$$

A_0 , surface utile de la membrane (m^2).

Field *et al.* (1995) ainsi que De Bruijn *et al.* (2005) ont apporté des modifications aux lois classiques de filtration frontale à pression constante déterminées par Hermia en tenant compte des mécanismes d'élimination des particules à la surface de la membrane par les forces de cisaillement créées par le flux tangentiel.

De Bruijn *et al.* (2005) ont étudié l'influence de l'ultrafiltration tangentielle du dextran à travers une membrane tubulaire, en régime turbulent alors que Field *et al.* (1995) ont étudié le colmatage en utilisant les deux systèmes de filtration : mode tangentiel avec une membrane tubulaire et mode frontal avec une membrane plane. Ils ont également introduit le concept de flux critique au-dessous duquel il n'y a pas de décroissance du flux en fonction du temps et au-dessus duquel on observe un colmatage (*cf.* § 5.3.2). Ces auteurs ont ainsi proposé un système d'équations différentielles appropriées respectivement à l'ultrafiltration (UF) et la microfiltration (MF) tangentielle. Etant donné que les forces de cisaillement du mode tangentiel n'interviennent qu'à la surface de la membrane, le modèle de constriction des pores garde son expression classique. Les modèles proposés dérivent de l'équation générale différentielle suivante :

$$-\frac{dJ_p}{dt} J_p^{n-2} = k(J_p - J^*) \quad (\text{I.10})$$

Avec J^* est considéré comme le flux critique (De Bruijn *et al.*, 2005) ou le flux limite atteint en conditions stationnaires (de Barros *et al.*, 2003).

4.7.4. Typologie du colmatage selon sa facilité à être éliminé

Deux types de colmatage sont définis : le colmatage réversible et le colmatage irréversible (Figure I.9).

Le colmatage réversible est facilement éliminé par un rinçage à l'eau de la boucle de filtration en arrêtant la filtration pour faire relaxer les couches concentrées à la surface ou par rétrolavage (*backflush* ou *backwash*) à l'eau. Ce colmatage réversible est imputable à la formation d'un dépôt réversible de matière, au phénomène de polarisation de concentration ou au blocage de pores pouvant être éliminé par rinçage.

Par ailleurs, le colmatage irréversible nécessite des nettoyages plus drastiques de la membrane par action de produits chimiques pour éliminer la partie de la matière accumulée à la surface membranaire et à l'intérieur des pores ne pouvant pas être supprimée par lavage et/ou lorsque la perméabilité hydraulique a été réduite de façon importante par rapport à la valeur de référence. C'est généralement à l'adsorption chimique (interaction forte par liaisons covalentes) qu'est attribuée la part irréversible du colmatage nécessitant l'apport d'énergie chimique pour rompre les liaisons entre les molécules adsorbées et la membrane.

Il peut exister aussi un colmatage « irrécupérable » qui s'établit sur des périodes prolongées et qui est irréversible chimiquement (Figure I.9).

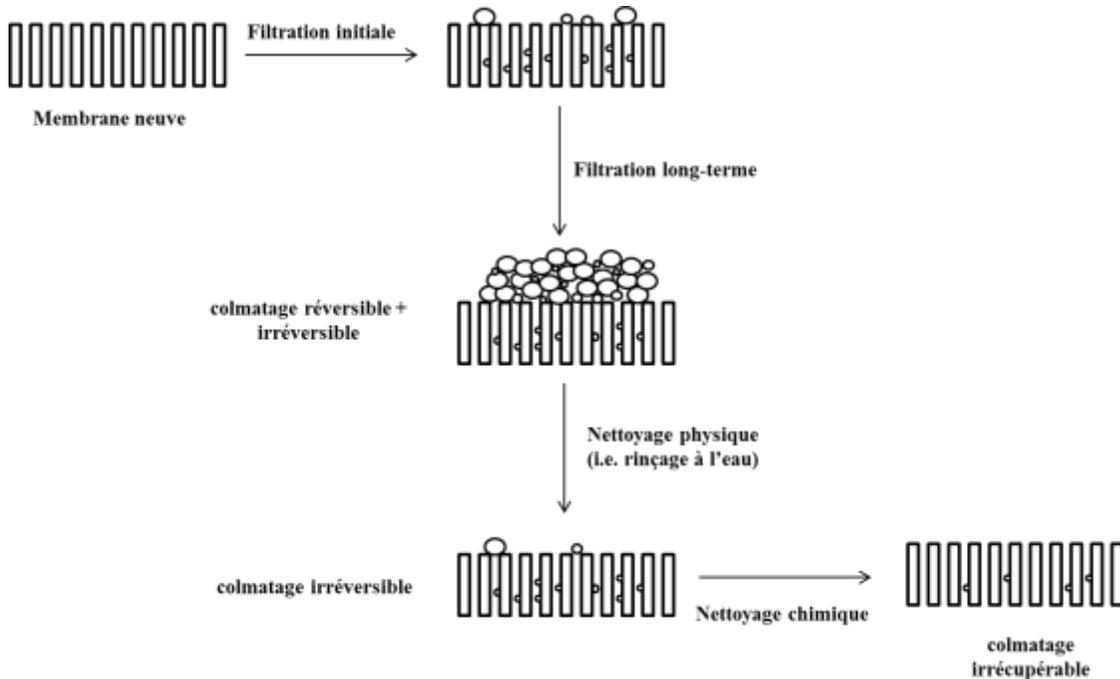


Figure I.9. Schéma représentant les différents types de colmatage et leur élimination.

4.7.5. Caractérisation du colmatage

L'étude et la compréhension du colmatage formé lors de la filtration membranaire peut s'aborder par différentes approches complémentaires :

(i) Les **approches macroscopiques** permettent d'analyser le comportement du procédé membranaire de manière globale. Ces approches consistent à étudier les évolutions du taux de rétention, du flux de perméation et de la qualité des perméats et des rétentats, en fonction des conditions opératoires, ou bien encore à mesurer des indices de colmatage (tels que les indices SDI, MFI, MFI-UF développés afin d'évaluer le pouvoir colmatant de l'eau d'alimentation). Dans certains cas, les modèles de colmatage précédemment décrits (§ 4.7.3) peuvent également être mis en œuvre pour déterminer le type de colmatage à partir de la valeur de l'indice de colmatage n des modèles.

(ii) Les **approches microscopiques** permettent d'étudier qualitativement ou quantitativement, les effets du colmatage directement sur les membranes. Ceci a lieu via la mise en œuvre de techniques d'autopsie membranaire. Ces techniques ont été mises au point afin de discerner l'origine, la structure et la nature du colmatage directement sur la membrane via des signatures locales.

L'analyse physicochimique des surfaces membranaires à toutes les étapes du procédé (neuves, colmatées, nettoyées) permet d'identifier le(s) colmatant(s), ainsi que de conclure sur l'efficacité du nettoyage. Quelques techniques d'autopsie membranaire ainsi que leurs applications et leurs principaux avantages et inconvénients sont présentés dans le tableau I.7.

Tableau I.7. Quelques exemples de méthodes d'autopsie membranaire avec leurs fonctions, avantages et inconvénients.

Classification	Méthode	Fonction	Avantage (+)/Inconvénient (-)
Microscopique	Microscopie électronique balayage (MEB) à	<p>Evaluation de la morphologie de surface des membranes (distribution, densité et structure interne des pores)</p> <p>Information sur l'épaisseur, la structure et l'organisation du gâteau ou du dépôt de filtration suite à un colmatage</p> <p>Couplée à de la microanalyse élémentaire à en spectrométrie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB-EDS) : analyses qualitatives rapides et semi-quantitatives de la composition chimique élémentaire de la membrane</p>	<p>(+) Résolution latérale élevée (1 nm)</p> <p>(-) Altération des caractéristiques des matières accumulées à la surface de la membrane à cause des traitements de séchage et de recouvrement des échantillons</p> <p>(-) Méthode destructive de la membrane</p> <p>(-) Conditions de vide poussé</p>
	Microscopie électronique balayage environnemental (MEBE) à	<i>idem</i>	<p>(+) Observation directe, in situ, des échantillons non-conducteurs, généralement sans préparation préalable (séchage, revêtement)</p> <p>(+) Exploitation possible à une pression aussi élevée que 7 kPa (Le-Clech <i>et al.</i>, 2007)</p> <p>(-) Résolution latérale pratique faible (10 - 20 nm)</p>
	Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)	<p>Affichage et quantification de la structure et de la morphologie de la section transversale de la membrane</p> <p>Obtention d'une représentation 3D de l'échantillon (et du dépôt de colmatage)</p>	<p>(+) Capacité d'enregistrement des images des couches fines au sein de l'échantillon sans avoir à le couper en tranches (méthode non destructive)</p> <p>(-) Limitation de la profondeur maximale à laquelle la détection est possible par l'atténuation de la lumière laser et la réabsorption de la fluorescence émise</p>

	Microscopie à force atomique (AFM)	<p>Caractérisation de la topographie de la surface d'une membrane</p> <p>Accès à des informations telles que la rugosité de surface. Couplée à de l'analyse d'image : renseignement sur les diamètres des pores et la distribution de leur taille</p> <p>Cartographie de certaines propriétés physiques des matériaux telles que les propriétés électriques, mécaniques, électrostatiques et magnétiques de la surface, mais également les interactions physico-chimiques entre les substances colmatantes et la surface membranaire (force d'adhésion, affinité)</p>	<p>(+) Pas de préparation spécifique préalable des échantillons (technique « in situ »)</p> <p>(-) Méthode destructive de la membrane</p>
	Observation directe à travers la membrane (DOTM)	<p>Visualisation de la surface membranaire et observation en temps réel de la formation de la première couche de dépôt et de l'arrachement de la couche de colmatage</p>	<p>(+) Technique in situ non invasive</p> <p>(-) Limitation à la première couche du dépôt et caractérisation d'ordre qualitatif</p>
Caractérisation de charge de surface	Mesure de l'angle de contact (technique de la goutte posée sur support sec et la technique de la bulle captive sur support humide)	<p>Discrimination de la mouillabilité (hydrophobicité / hydrophilicité) de la surface de la membrane</p> <p>Evaluation de la modification de la mouillabilité des membranes du fait du colmatage résultant de l'adsorption des molécules organiques</p> <p>Calcul de la tension de surface de la membrane</p>	<p>(-) Mesure délicate pour les surfaces très hydrophiles</p>
	Potentiel zêta ou potentiel d'écoulement	<p>Caractérisation des charges électrostatiques portées par les membranes de filtration</p> <p>Signalisation d'une modification de l'état de surface de la membrane (variation du potentiel zêta) et qualification de la nature de ce changement (i.e. adsorption de colmatants chargés)</p> <p>Suivi de l'évolution des propriétés électrocinétiques d'une</p>	<p>(+) Technique de caractérisation in situ</p>

		membrane au cours du processus de filtration (Kecili, 2006)	
Spectroscopie	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR)	<p>Identification des liaisons chimiques polaires ou polarisables → quantification des fonctions chimiques présentes dans le matériau</p> <p>Exemples d'application :</p> <p>Identification de la présence de colmatants protéiques à la surface de la membrane et dans la membrane ; dosage des protéines à la surface des membranes PES (Wemsy Diagne <i>et al.</i>, 2013)</p> <p>Elucidation de la composition des MOE lyophilisés de <i>M. aeruginosa</i> ainsi que celle des membranes en PES et en RC neuves et colmatées par ces MOE (Zhou <i>et al.</i>, 2014)</p>	(+) Réalisation d'un spectre infrarouge à la surface d'un matériau, en particulier non transparent (i.e. une membrane de filtration) ne pouvant pas être analysé en transmission
Méthodes indirectes de caractérisation (Isolation du matériel colmatant de la membrane étudiée)	Pyrolyse - GC/MS	<p>Identification des sous-produits issus de la dégradation thermique des structures organiques moléculaires</p> <p>Adaptation du couplage (Pyrolyse GC/MS) à l'étude des structures polymériques et l'analyse des matrices colmatantes</p>	(-) Plus ou moins grande facilité à la dégradation par pyrolyse aboutissant à une surestimation des premiers biopolymères dans la matrice globale (Kecili, 2006)
	Imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	Etude de la formation, l'arrachement et la compressibilité du dépôt à partir de l'analyse des images	<p>(+) Technique non invasive et non destructive</p> <p>(+) Bonne résolution 10 µm</p> <p>(-) Application limitée du fait de la complexité de l'équipement et de la difficulté d'extraction des informations liées uniquement à la formation du dépôt ainsi que du temps relativement long nécessaire pour produire une image</p>

5. Facteurs affectant la filtrabilité de solutions de polysaccharides et la propension au colmatage

Dans les procédés de filtration membranaire, le transfert de matière (solvant et solutés) est gouverné par des phénomènes d'ordre convectif et diffusif qui dépendent des propriétés des membranes utilisées et des fluides traités ainsi que des paramètres opératoires (Aimar *et al.*, 2010a ; Bacchin *et al.*, 2006 ; Koo *et al.*, 2012).

5.1. Caractéristiques des membranes

5.1.1. Matériau membranaire et hydrophobicité

La nature chimique de la peau active induit des propriétés physico-chimiques propres à chaque type de membrane. Ces propriétés interviennent surtout dans les interactions (électrostatiques et hydrophobes) entre la membrane et les solutés contenus dans le fluide d'alimentation. Elles sont donc partiellement à l'origine de l'établissement du colmatage irréversible.

La sensibilité des membranes au colmatage augmente avec leur hydrophobicité et leur charge ; ces membranes sont sujettes à un fort colmatage par adsorption de molécules organiques, en particulier des protéines et des polysaccharides. Toutefois, des membranes organiques en polyéthersulfone PES, naturellement hydrophobes, sont communément employées dans les études traitant du colmatage membranaire par polysaccharides (Alazmi *et al.*, 2010 ; Jermann *et al.*, 2007 ; Katsoufidou *et al.*, 2007, 2010 ; Li *et al.*, 2011 ; Patel *et al.*, 2013 ; Xie *et al.*, 2014). Ceci est dû à leur excellente résistance chimique, leur tolérance à une large gamme de pH, ainsi qu'à leurs bonnes résistances thermique et mécanique.

La comparaison entre deux membranes fabriquées à partir du même matériau (PAN) et à seuil de coupure analogue mais dont l'une est neutre et l'autre est chargée positivement a permis à Rossi *et al.* (2004) de souligner l'efficacité de la membrane neutre en termes de flux de perméation pour la récolte de la cyanobactérie *A. platensis* par filtration membranaire ; la membrane chargée ayant plus d'affinité (interactions électrostatiques) avec les EPS anioniques de la cyanobactérie. D'autre part, l'importance du degré d'hydrophobicité des membranes a été soulignée par la comparaison de deux membranes neutres en PAN et en PES, respectivement

hydrophile et hydrophobe et à seuil de coupure égal (40 kDa). La membrane en PAN hydrophile était plus perméable que celle en PES mais hydrophobe.

Des modifications physiques ou chimiques peuvent être appliquées aux membranes pour modifier leurs propriétés de surface (Ayyavoo *et al.*, 2016). Par exemple, l'incorporation de polymères hydrophiles comme la polyvinylpyrrolidone PVP dans les membranes hydrophobes permet de minimiser la propension au colmatage par adsorption (Ayyavoo *et al.*, 2016). Susanto *et al.* (2008) ont trouvé que le colmatage par adsorption d'une solution d'alginate (10 g.L⁻¹) était plus sévère pour la membrane en PES non modifiée (10 kDa) que pour la membrane modifiée (hydrophilisée) quel que soit le pH de la solution. Le caractère hydrophile de la surface de la membrane modifiée a favorisé l'interaction avec les molécules d'eau minimisant ainsi l'adsorption des solutés (alginate).

5.1.2. Taille des pores, distribution de la taille des pores et seuil de coupure

L'augmentation de la taille moyenne des pores membranaires ou de la largeur de leur distribution peut accroître la propension au colmatage intra-pores. Elle peut également conduire à la formation d'un dépôt ayant des caractéristiques (résistance hydraulique spécifique, porosité et compressibilité) différentes de celles du dépôt formé sur une membrane de faible seuil de coupure ou ayant des pores de taille monodispersée comme cela a été observé dans le cas de l'UF et de la MF frontales d'une solution d'alginate de sodium (Ye *et al.*, 2005). Ceci impacterait la rétention des solutés. Une membrane de seuil de coupure plus élevé et donc ayant des pores plus grands est plus sujette au colmatage par adsorption qu'une membrane de seuil de coupure plus faible puisqu'en plus de l'adsorption à la surface externe de la membrane, les solutés peuvent accéder aux pores et s'y adsorber. Ceci a été observé dans le cas du colmatage par adsorption des membranes en PES (seuil de coupure SC de 10 à 100 kDa) avec une solution d'alginate de sodium à 10 g.L⁻¹ (Susanto *et al.*, 2008 ; Susanto et Widiassa, 2009) et des membranes en PS (SC de 20 et 100 kDa) avec une solution d'amylose à 10 g.L⁻¹ (Susanto et Widiassa, 2009). De plus, l'accès des solutés aux pores de grande taille et de distribution uniforme tend à rétrécir ces derniers plutôt qu'à les bloquer. Le colmatage au début de l'ultrafiltration pourrait alors être caractérisé par une diminution graduelle du flux de perméation plutôt que par une diminution rapide induite par un blocage de pores observable sur des membranes à faible seuil de coupure ou à distribution non uniforme de la taille des pores

(Susanto et Widiassa, 2009). Par ailleurs, Qu *et al.* (2014) ont réalisé des essais d'adsorption statique et d'UF frontale de solutions de matières organiques extracellulaires (MOE) de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* en utilisant des membranes en PES ayant différents seuils de coupure (10, 30 et 100 kDa). Ils ont trouvé que la réversibilité du colmatage s'était progressivement détériorée lorsque le seuil de coupure diminuait, bien que le colmatage total ait été considérablement réduit. Les membranes de faibles seuils de coupure ont été plus sujettes à l'adhésion irréversible intra-pores des MOE alors que la membrane de 100 kDa a été plutôt sujette à l'adhésion irréversible à la surface par la formation d'un dépôt plus compact et moins poreux qui a amélioré la rétention des MOE par piégeage des molécules de faibles poids moléculaires (Qu *et al.*, 2014).

5.2. Caractéristiques physico-chimiques de la solution filtrée

5.2.1. pH

Dans le cas d'une solution d'alimentation contenant des solutés ayant des groupes fonctionnels potentiellement chargés, le changement de pH peut avoir des conséquences sur la charge de ces groupes, telle que la protonation des groupes carboxyles à pH acide, et donc sur les interactions des solutés avec la surface membranaire. Il peut également impacter la structure des colmatants en réduisant par exemple la taille des molécules d'alginate, suite à la diminution des répulsions électrostatiques intramoléculaires entre les groupements carboxyles protonés à pH acide. Ces dernières ayant alors une plus petite taille peuvent accéder plus facilement aux pores et promouvoir l'adsorption. Ceci a été observé lors d'un colmatage par adsorption d'une solution d'alginate de sodium à 10 g.L^{-1} sur des membranes en PES (entre 10 et 100 kDa) et à pH compris entre 5,5 et 8 (Susanto *et al.*, 2008). Zazouli *et al.* (2010) ont observé un comportement similaire lors de la NF tangentielle d'une solution d'alginate de sodium à 3 mg.L^{-1} sur une membrane spiralée en polyamide à des pH compris entre 6 et 9 ; la couche colmatante formée était plus éparse lorsque le pH augmentait, ce que les auteurs ont attribué à une augmentation des répulsions électrostatiques entre les groupements carboxyles déprotonés voisins. Zhou *et al.* (2014) ont trouvé que l'augmentation et la diminution du pH d'une solution de MOE de *M. aeruginosa* augmentaient toutes deux le colmatage d'une membrane plane en PES (30 kDa) par rapport au pH neutre, mais pour des raisons différentes. A pH acide (5), les solutés et la membrane ayant des charges opposées, l'attraction électrostatique favorisait l'adsorption

irréversible. A pH alcalin (9,5), les solutés et la membrane ayant été chargés négativement, la répulsion électrostatique a diminué le colmatage irréversible mais a entraîné une diminution plus importante du flux par rapport au pH neutre (7,2) en raison de la formation d'agrégats de grandes tailles moléculaires. Toutefois, ces effets n'ont pas été observés par Lo *et al.* (1996) lors de l'ultrafiltration d'une solution de xanthane (10 % (w/v)) sur une membrane fibre creuse en PES (500 kDa) à des pH compris entre 4 et 10. La valeur du pH, bien que pouvant affecter les charges électrostatique des molécules de xanthane (polysaccharides anioniques) et la viscosité de la solution, n'a pas montré d'effet significatif sur le flux de perméat et donc sur le colmatage (Lo *et al.*, 1996).

5.2.2. Sels et force ionique

Dans la littérature, l'effet de sels et de la force ionique a été étudié principalement lors du traitement des eaux, en particulier dans les bioréacteurs à membranes où les matières organiques naturelles et les substances polymériques extracellulaires constituent les colmatants principaux. Souvent, les polysaccharides, macromolécules hydrophiles, sont utilisés comme substances modèles représentatives de ces matières organiques, étant leur principal constituant et approchant le plus leur caractère colmatant. Afin de mieux comprendre les mécanismes de colmatage impliqués lors de la filtration de ces polysaccharides, de nombreux travaux ont été effectués sur des solutions synthétiques à base d'alginate de sodium utilisé comme composé modèle (Jermann *et al.*, 2007 ; Katsoufidou *et al.*, 2007 ; van den Brink *et al.*, 2009 ; Ye *et al.*, 2005 ; Zazouli *et al.*, 2010). L'alginate est un polysaccharide naturel, linéaire et anionique, dérivé de l'acide alginique, qui se trouve dans les algues marines, principalement les algues brunes. C'est un copolymère de deux monomères différents : le α -L-glucuronate (G) et le β -D-mannuronate (M) liés entre eux par des liaisons glycosidiques (1 \rightarrow 4). Dans la chaîne, il existe des zones homopolymériques constituées uniquement de monomères G ou M (blocs M et blocs G) et séparées par des séquences alternées de G et de M (blocs MG).

Lorsque des cations divalents tels que Ca^{2+} sont présents, ils se lient préférentiellement aux groupes carboxyles de l'alginate et forment des ponts entre les molécules d'alginate adjacentes. Par suite, les molécules d'alginate s'agrègent et forment des complexes de structure unique de type hydrogel, réseau rigide tridimensionnel fortement structuré. Cette structure est

décrite par le modèle de boîte à œufs ou *egg-box model* (Figure I.10) (Alazmi *et al.*, 2010 ; Grant *et al.*, 1973 ; Jermann *et al.*, 2007 ; Katsoufidou *et al.*, 2007).

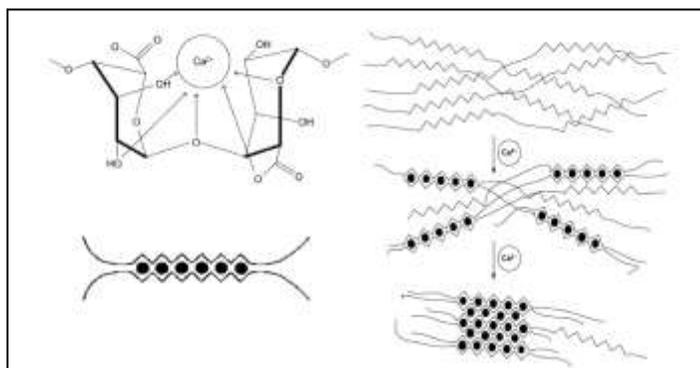


Figure I.10. Le modèle “egg-box” pour le pontage de molécules d’alginate de sodium par des cations divalents (d’après Katsoufidou *et al.*, 2007).

La concentration des ions Ca^{2+} influence le taux, la nature et la réversibilité du colmatage. Cette influence est cependant controversée dans la littérature. Katsoufidou *et al.* (2007) ont effectué une UF frontale d’une solution d’alginate de sodium (10 ppm avec 20 mM NaCl) en l’absence ou en présence d’ions Ca^{2+} (0,5 – 2 mM) en utilisant une membrane en fibre creuse de 150 kDa en PES. Les auteurs ont mis en avant que l’augmentation de la concentration des ions Ca^{2+} permettait de diminuer le colmatage, d’augmenter sa réversibilité et d’améliorer le taux de rétention de l’alginate. Ils ont expliqué cela par le fait que l’agrégation des macromolécules d’alginate en présence d’ions Ca^{2+} réduisait l’adsorption des colmatants et par la faible adhésion de la couche de gel, le colmatage résultant alors d’une interaction colmatant/colmatant plutôt qu’une interaction colmatant/membrane. Cependant, lors de la microfiltration tangentielle d’une solution d’alginate de sodium (10 ppm, force ionique 10 mM) en présence d’ions Ca^{2+} (1 ou 2 mM) avec une membrane en polycarbonate (0,1 μm), van den Brink *et al.* (2009) ont observé une augmentation du colmatage et une perte de sa réversibilité. Pour ces auteurs, en plus de la formation d’un gel à la surface de la membrane et d’agrégats en solution, les ions calcium promouvraient le pontage entre les groupes carboxyles d’alginate et les groupes fonctionnels chargés négativement de la membrane, favorisant ainsi l’adsorption au début de la filtration. Une perte de réversibilité a été également observée lors de l’ultrafiltration d’une solution d’alginate de sodium (5 mg.L^{-1}) préparée avec de l’eau de mer artificielle (33 g.L^{-1} de sels) contenant 7,5 mM de calcium, en utilisant une membrane fibre creuse de 0,04 μm

en PVDF (Resosudarmo *et al.*, 2013). Selon les auteurs, ceci pourrait être dû à la concentration très élevée en sels par rapport à celles utilisées dans les travaux de Katsoufidou *et al.* (2007).

D'autres études ont montré que l'influence de la concentration de Ca^{2+} n'est pas monotone (Mo *et al.*, 2011 ; Xin *et al.*, 2015). Il existe une concentration de calcium critique au-dessous de laquelle l'augmentation de la concentration de calcium accroît le colmatage et au-dessus de laquelle, elle atténue au contraire le colmatage. Une diminution de viscosité de la solution polysaccharidique à partir de la concentration critique en Ca^{2+} est probablement associée à la rupture de la structure du gel et à l'agrégation ultérieure des particules de gel. Cette combinaison d'une diminution de la viscosité et de l'augmentation de la taille des agrégats peut améliorer la filtrabilité. Mo *et al.* (2011) ont trouvé une concentration critique en Ca^{2+} de 3 mM lors de la nanofiltration tangentielle d'une solution d'alginate de sodium ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$) avec une membrane NF270 (Dow) et Xin *et al.* (2015) ont trouvé quant à eux une concentration critique de 6 mM lors de la filtration d'une solution d'alginate de sodium ($0,4 - 2 \text{ g.L}^{-1}$) avec une membrane plane de $0,1 \mu\text{m}$ en PVDF.

À force ionique élevée et suite à la compression de la double couche électrique, les charges des molécules organiques et de la membrane diminuent conduisant à la diminution de la répulsion électrostatique entre les colmatants et entre les colmatants et la membrane. Ceci a pour conséquence de favoriser l'accumulation de colmatants à la surface membranaire. Zazouli *et al.* (2010) ont observé que le flux de perméation déclinait de manière plus importante lorsque la force ionique augmentait (de 2,5 à 10 mM NaCl) lors de la NF d'une solution d'alginate à 3 mgC.L^{-1} . En effet, le dépôt de colmatants et la polarisation de concentration augmentent à la surface membranaire tandis que la rétrodiffusion diminue. De plus, suite à la diminution de la répulsion, les molécules organiques colmatantes s'enroulent plus sur elles-mêmes et forment une couche de colmatage plus compacte (Zazouli *et al.*, 2010).

Les effets de deux autres facteurs sur la structuration et la viscosité des polysaccharides en solution ont également été étudiés, à savoir le rapport (R) entre la concentration de calcium et la concentration d'alginate et la force ionique (Listiarini *et al.*, 2011). La figure I.11 illustre la structure des alginates dans les différents cas de figures. Il est à noter que la viscosité de la solution d'alginate de sodium diminue avec l'augmentation du rapport R jusqu'à 0,25 puis augmente jusqu'à $R = 0,5$ pour rediminuer au-delà de $R = 0,55$ (Fang *et al.*, 2007). A un rapport

R élevé et à une force ionique élevée, l'échange ionique entre les ions monovalents et les ions calcium conduit à la perte des réticulations formées par les ions calcium (l'agrégation des molécules d'alginate) ce qui se traduit par le gonflement et la désintégration du réseau de gel (boîte à œuf) ainsi qu'à la diminution de la viscosité de la solution, améliorant ainsi le flux de perméat (Listiarini *et al.*, 2011). Ceci est en accord avec les résultats de van den Brink *et al.* (2009) qui ont montré l'effet positif de l'augmentation de la force ionique d'une solution fortement colmatante (concentration élevée en calcium de 2 mM dans leur cas) sur la diminution du colmatage et l'amélioration de sa réversibilité.

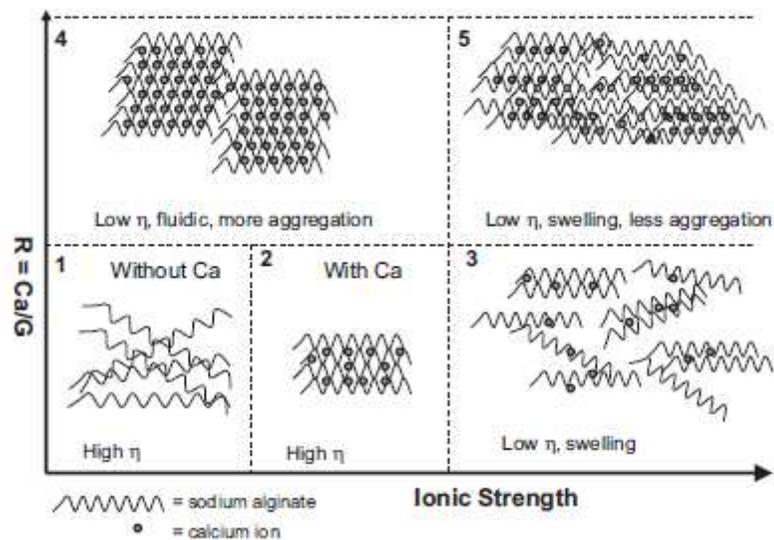


Figure I.11. Influence qualitative de la force ionique et du rapport $R = \text{Ca}^{2+}/\text{alginate}$ sur les interactions Ca – alginate (Listiarini *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus sur ces solutions modèles à base d'alginate peuvent être une source d'inspiration pour l'analyse de la mise en place du colmatage lors de la filtration de solutions d'autres polysaccharides et d'EPS de microalgues en particulier. Ils doivent cependant être exploités avec précaution à cause des propriétés spécifiques des alginates qui conduisent à la formation d'hydrogels (modèle de boîte à œufs) fortement structurés. En effet, la sélectivité de ce phénomène tient principalement à la géométrie particulière de la liaison diaxiale entre les unités G des molécules d'alginate, qui forment une cavité permettant une capture efficace du cation divalent Ca^{2+} (Grant *et al.*, 1973).

D'autre part, les sels peuvent influencer la filtrabilité des solutions d'EPS de microalgues. En effet, Eteshola *et al.* (1998) ont trouvé que la viscosité d'une solution d'EPS de *Porphyridium* (0,1 % (w/v)) mesurée à un taux de cisaillement de $7,9 \text{ s}^{-1}$ était 3 fois plus élevée en l'absence de NaCl qu'en présence de NaCl à la concentration de 0,1 M. Les sels auraient un effet d'écrantage sur les interactions charge-charge à la fois le long des chaînes de polysaccharides et entre les chaînes (Eteshola *et al.*, 1998). Cependant, certaines études ont montré que la présence de sels favorise le colmatage des solutions d'EPS. Au cours de la diafiltration d'une solution concentrée en EPS de *Porphyridium cruentum* (milieu de culture dépourvu de cellules et concentré par MF) avec une membrane en céramique (0,14 μm), Balti *et al.* (2018) n'ont pas détecté de changement de viscosité de la solution. Toutefois, ils ont observé une augmentation du flux de perméat de 40 à 59 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ et ont suggéré que l'élimination de 99 % de sels (et possiblement d'autres petits composés « non sucres ») lors de la diafiltration aurait pu atténuer le phénomène de concentration de polarisation à la surface de la membrane et induire une augmentation des flux de perméat. Des travaux antérieurs effectués au sein du laboratoire GEPEA sur la microfiltration de solutions reconstituées d'EPS de *P. cruentum* avec une membrane en PVDF (0,2 μm) ont conduit à des résultats similaires : le flux de perméat s'améliorait lors de la diafiltration des solutions (élimination des sels), et les flux de perméat et le facteur de concentration en polysaccharides lors d'une concentration étaient plus faibles lorsque la concentration de la solution était plus riche en sels (*cf.* § 6).

5.2.3. Type de colmatant

Les EPS anioniques des microalgues forment des solutions visqueuses qui peuvent présenter un fort pouvoir collant et une forte propension à former des gels visqueux susceptibles d'encrasser gravement les membranes (Villacorte *et al.*, 2009). Leur pouvoir colmatant a été observé même lors de la filtration de suspensions de microalgues. (Morineau-Thomas *et al.*, 2002) ont ainsi observé que les flux de perméation étaient plus faibles lors de la filtration d'une suspension de *P. purpureum* que lors de la filtration d'une suspension de *Chlorella* sp., ce qu'ils ont attribué à la présence d'EPS dans le milieu de culture de *P. purpureum* conduisant à la formation d'un dépôt moins poreux à la surface de la membrane.

La structure et la conformation des molécules pourraient également influencer le mécanisme de colmatage. En effet, lors de l'ultrafiltration de pentasaccharides sulfatés par des

membranes céramiques de différents seuils de coupure, Delcroix *et al.* (2015) ont trouvé que le polysaccharide linéaire semblait être à l'origine d'un colmatage de surface plutôt réversible alors que le polysaccharide ramifié semblait être plus sujet à l'adsorption et au colmatage interne.

L'hydrophobicité des solutés organiques a également un impact sur la nature du colmatage. Elle peut promouvoir les interactions colmatants-membrane et aggraver l'adhésion irréversible des molécules organiques à la surface de la membrane. Les molécules organiques hydrophiles qui peuvent former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau auront moins de tendance à l'adhésion que les molécules hydrophobes, mais elles auront tendance à former des couches colmatantes poreuses (« cake layer ») ayant une résistance plus élevée à la perméation. Elles pourront alors contribuer à la formation d'un dépôt ayant une résistance élevée à l'eau. Ces résultats ont été rapportés par Qu *et al.* (2012) et Zhou *et al.* (2014) lors de la filtration des solutions de matières organiques extracellulaires de *M. aeruginosa* avec des membranes d'UF en PES.

La présence de débris cellulaires et d'autres molécules organiques dissoutes, en particulier, les protéines, peuvent augmenter le colmatage membranaire. Saha *et al.* (2007) ont rapporté que lors d'une filtration frontale de jus de canne à sucre avec des membranes d'UF en PS et en PES, les flux de perméation obtenus avec le jus brut étaient plus faibles qu'avec le jus clarifié, à cause de la présence de macromolécules organiques conduisant à un colmatage plus sévère. Les protéines peuvent quant à elles former des réseaux structurés avec des polysaccharides chargés, l'interaction protéine-polysaccharide étant principalement gouvernée par le potentiel zêta de la protéine (Neemann *et al.*, 2013). Susanto *et al.* (2008) ont montré lors d'essais d'adsorption statique de solutions modèles binaires d'alginate (10 g.L^{-1}) et de protéines ($0,1 - 1 \text{ g.L}^{-1}$) que la présence de protéines contribuait au colmatage irréversible de la membrane par adsorption, peut-être à cause de l'interconnection entre les deux biopolymères par des liaisons ioniques et/ou des ponts d'hydrogène, formant ainsi un réseau structuré. Cependant, les auteurs n'ont pas constaté d'effet de synergie durant la filtration, ce qu'ils ont attribué au fait que les grosses molécules d'alginate étaient totalement retenues par la membrane et qu'elles limitaient le passage des protéines dans les pores de la membrane. Qu *et al.*, (2012, 2014) ont observé un comportement similaire lors de la filtration d'une solution de MOE de *M. aeruginosa*. D'autre part, le rapport entre les concentrations de protéine et de polysaccharides est un facteur important influençant le colmatage, l'effet sur le colmatage semblant dépendre du seuil de

coupure de la membrane, tout au moins en microfiltration. Ainsi, Yao *et al.* (2010) ont trouvé que l'augmentation du rapport des concentrations protéines/polysaccharides causait un blocage plus important des pores lors d'une MF frontale sur des membranes en PVDF et en PC de 0,22 μm de mélanges modèles BSA-alginate (rapport protéines/polysaccharides de 1 à 20) ; de leur côté, Sweity *et al.* (2011) ont remarqué que plus ce rapport était faible, plus la fluidité des substances polymériques extracellulaires favorisait leur accès aux pores de la membrane augmentant ainsi le colmatage (membrane de 0,04 μm en PVDF, traitement des boues activées en MBR).

5.3. Paramètres opératoires

La pression transmembranaire, la vitesse tangentielle qui conditionne l'écoulement (nombre de Reynolds) et la contrainte de cisaillement sont généralement les principaux paramètres qui régissent à la fois les besoins énergétiques d'une filtration membranaire et le colmatage.

5.3.1. Vitesse tangentielle

Une vitesse tangentielle élevée augmente les contraintes de cisaillement et la turbulence à la surface de la membrane et érode les couches limites hydrodynamique et de matière. Cela tend à limiter l'accumulation et le dépôt de matière à la surface de la membrane, et donc le colmatage en surface de la membrane et dans les pores (Cheryan, 1998 section 6D3). Cependant, lorsque la vitesse augmente, la rétro-diffusion des gros solutés induite par le cisaillement peut provoquer la stratification préférentielle des petites particules à la surface membranaire, obstruant ainsi les pores et aggravant le colmatage.

Une autre conséquence de l'augmentation de la vitesse tangentielle peut être la diminution du taux de rétention des solutés. Balti *et al.* (2018) ont testé l'effet de la vitesse tangentielle (entre 2,5 et 4,2 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) sur la concentration des solutions d'EPS solubles (milieux de culture dépourvus de cellules) de *P. cruentum* avec une membrane tubulaire en céramique (MF 0,14 μm). L'augmentation de la vitesse tangentielle de 2,5 à 4,2 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a bien amélioré les flux de perméation mais a diminué le FRV maximal ainsi que le taux de rétention et la concentration finale en EPS. Les auteurs ont expliqué cela par le fait que quand la vitesse tangentielle augmente, il y a plus de sucres de petits poids moléculaires qui peuvent traverser librement les

pores de la membrane colmatée. Ceci a été vérifié par la légère diminution de la masse molaire des EPS dans les rétentats fins pour les vitesses les plus élevées.

5.3.2. Pression transmembranaire et flux de perméation – notion de flux critique

Les premières définitions du concept de flux critique ont été apparues en 1995. Ce concept a été défini comme « le flux au-dessous duquel aucun colmatage ne se produit » (Bacchin *et al.*, 1995), comme « le flux au-dessous duquel il n'y a pas de diminution du flux de perméation avec le temps et au-dessus duquel on observe un colmatage » (Field *et al.*, 1995) ou comme « le flux au-dessous duquel il n'y a pas de colmatage par des particules colloïdales » (Howell, 1995). Plus simplement, le flux critique peut être défini comme le flux de perméation au-dessus duquel le colmatage devient visible. La notion du flux critique est donc bien différenciée de celle du flux limite représentant le flux de perméat stabilisé maximal qui peut être atteint pour une vitesse tangentielle donnée lorsqu'on augmente la pression transmembranaire (Michaels, 1968 ; Porter, 1972).

Deux formes de flux critique ont été proposées par Field *et al.* (1995) et affinées par Bacchin *et al.* (2006) : la forme forte et la forme faible (Figure I.12). La *forme forte du flux critique* (*strong form*, J_{cs}) distingue les conditions d'absence de colmatage de celles de sa présence en supposant que les effets de pression osmotique et la résistance d'adsorption sont négligeables. En pratique et en traçant le flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire, J_{cs} est le point à partir duquel le flux commence à dévier de la droite (J-PTM) de l'eau pure. La *forme faible* (*weak form*, J_{cw}) est observée dans les systèmes où une adsorption se produit immédiatement au début de l'opération, indépendamment de la pression et du transfert du solvant à la membrane. La partie linéaire de la courbe (J-PTM) est alors caractérisée par une pente légèrement plus faible que celle de l'eau pure. J_{cw} est le point auquel cette ligne devient non linéaire. Bacchin *et al.* (2006) ont ensuite introduit le concept du *flux critique pour l'irréversibilité*, J_{ci} qui discrimine le colmatage par rapport à son irréversibilité : en dessous de J_{ci} , une couche de polarisation de concentration existe, ainsi qu'une couche supplémentaire d'espèces colmatantes adsorbées dans certains cas. Pour les suspensions colloïdales, J_{ci} est lié à une transition physique du fluide au voisinage de la surface de la membrane entre une phase dispersée (polarisation de concentration) et une phase condensée (colmatage irréversible multicouche). Ainsi, le travail dans des conditions de PTM critiques (ou légèrement sous-

critiques) permet de prévenir un colmatage important et par suite de diminuer la fréquence des nettoyages nécessaires pour éliminer le colmatage irréversible et régénérer la membrane.

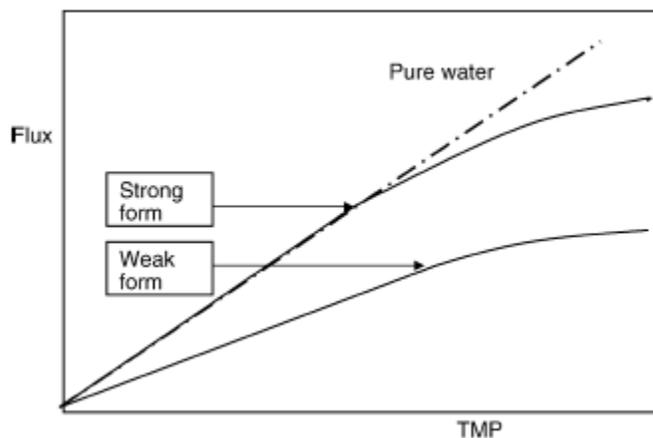


Figure I.12. Formes du flux critique (Field *et al.*, 1995).

Cependant, travailler à une PTM très faible par rapport à la PTM critique induit des flux de perméation faibles, ce qui réduit la capacité de filtration. D'un autre côté, travailler à une PTM supérieure à la PTM critique (et proche de la PTM limite) augmentera le colmatage et consommera plus d'énergie sans améliorer notablement le flux de perméation. Pour cette raison, les notions de flux seuil et de flux durable ont été introduites. Le concept du flux seuil (*Threshold flux*) se concentre sur l'intensité du colmatage, sans distinction entre les colmatages réversibles et irréversibles mais en distinguant la région de fonctionnement à faible colmatage de celle à colmatage élevé. Ceci est particulièrement utile pour les applications de « mélanges complexes » où l'industrie fonctionne typiquement à un taux de colmatage acceptable entre les nettoyages et avec un flux suffisamment élevé sur une longue période de fonctionnement (Field et Pearce, 2011).

Le concept de flux durable (*sustainable flux*) est quant à lui basé sur un critère économique. Le flux durable est défini comme le flux en dessous duquel le degré de colmatage est acceptable, et le colmatage est facilement éliminé par une procédure de nettoyage de fréquence acceptable, de sorte qu'il existe un équilibre approprié entre les coûts d'exploitation (opex) et ceux d'investissement (capex).

Rossi *et al.* (2008) ont comparé les flux critiques obtenus suite à une ultrafiltration sur une membrane inorganique (50 kDa) de trois suspensions différentes d'*Arthrospira platensis* :

une biomasse fraîche, un surnageant riche en EPS et une suspension stressée par congélation/décongélation puis détruite. Ils ont trouvé que la présence d'EPS dans le surnageant abaissait le flux critique par rapport à celui obtenu lors de l'UF des suspensions. Les auteurs ont attribué ce résultat au fort pouvoir colmatant des macromolécules d'EPS représenté par leur capacité d'adsorption à la membrane et à leur potentiel de former une couche de gel irréversible par agrégation sous pression.

5.3.3. Température

La température peut agir directement sur le flux de perméation à travers la viscosité du solvant, mais elle peut également affecter le colmatage membranaire en fonction de la solution d'alimentation et des caractéristiques du soluté. La littérature rapporte quatre influences potentielles de la température sur le flux de perméation. D'après Jönsson et Trägårdh (1990) et Cheryan (1998 section 6D3) (i) une augmentation de la température diminue la viscosité de la solution d'alimentation ce qui devrait entraîner un flux de perméation plus élevé. D'autre part (ii), l'augmentation du flux de perméation peut augmenter l'accumulation de solutés à la surface de la membrane et donc la pression osmotique, ce qui limite en partie l'augmentation du flux de perméat. De plus, les variations de température peuvent (iii) diminuer la solubilité de certains composés inorganiques tels que le phosphate de calcium. En outre, (iv) elles peuvent affecter les caractéristiques physico-chimiques des macromolécules et leur adsorption à la surface de la membrane et peuvent donc avoir un effet sur l'efficacité de rétention du soluté (Campbell *et al.*, 1993).

6. Filtration tangentielle pour la récupération des EPS produits par les microalgues

La filtration membranaire a été rarement étudiée pour l'extraction et la purification des EPS à partir des surnageants de culture de microalgues et de cyanobactéries.

Li *et al.* (2011) ont isolé les EPS à partir des milieux de culture de 6 microorganismes photosynthétiques (cyanobactéries, microalgues vertes, microalgues rouges et diatomées) dans le but de tester leurs propriétés bioactives antitumorales. Les milieux de culture clarifiés par microfiltration tangentielle (membrane de 0,3 μm en polypropylène) ont été ensuite filtrés par ultrafiltration tangentielle à l'échelle pilote avec une membrane en PES de 5 kDa. Bien que la

concentration initiale en EPS n'ait pas été spécifiée, les résultats ont démontré la faisabilité de concentration des EPS avec des facteurs de réduction volumique de l'ordre de 20 – 40. Li *et al.* (2011) ont montré que l'augmentation de la température (de 20 à 30 - 40 °C) et le travail à un pH alcalin (8) permettent d'améliorer le flux de perméation. Après UF menée en conditions sous-critiques (PTM de 0,6 bar), ces auteurs ont pu régénérer la membrane après avoir effectué au moins deux fois le cycle de nettoyage basique (NaOH).

Patel *et al.* (2013) ont démontré qu'un système de diafiltration tangentielle sur une membrane en PES de 300 kDa constituait un procédé efficace pour la séparation sélective et le dessalement des solutions d'EPS de *P. cruentum* à partir de milieux de culture dépourvus de cellules. Une concentration initiale d'EPS de 0,6 g.L⁻¹ a été utilisée car au-delà de cette valeur, la formation d'un gel est favorisée dû à l'entremêlement des EPS (Patel *et al.*, 2013). Pour un nombre de diavolumes de 12, 98 % des sels et 34 % des polysaccharides ont été éliminés dans le perméat. 85 % du flux à l'eau ont été récupérés après nettoyage basique (NaOH).

Plus récemment, Balti *et al.* (2018) ont effectué une concentration et une purification (diafiltration) d'EPS de *P. cruentum* à partir des milieux de culture dépourvus de cellules (concentration initiale en EPS de 0,26 g.L⁻¹), à l'échelle pilote sur une membrane tubulaire en céramique (0,14 µm), à une température de 20 °C et sous une PTM de 4 bar. Différentes conditions de vitesses tangentielles entre 2,5 et 4,2 m.s⁻¹ ont été testées durant la concentration. Selon la vitesse tangentielle utilisée, les polysaccharides ont été concentrés entre 6,3 et 10,4 fois (rétention supérieure à 80 % et FRV compris entre 7 et 10), avec une pré-purification par rapport aux protéines puisque ces dernières n'ont été concentrées qu'entre 5 et 6 fois. En appliquant le modèle du gel, une concentration de gel de l'ordre de 5,4 g.L⁻¹ a été estimée. La concentration des EPS à 3,3 m.s⁻¹ a été suivie d'une diafiltration, pendant laquelle 99 % de sels ont été éliminés dans le perméat ainsi qu'une faible concentration de protéines. Une séquence de nettoyage base (NaOH) – acide (HNO₃) a permis de récupérer plus de 90 % du flux à l'eau.

De même, au cours de son stage réalisé en 2014 au sein du laboratoire GEPEA, Emilie Isidore a effectué des essais de concentration et de diafiltration des solutions d'EPS de *P. cruentum* (PTM de 0,4 bar). Des solutions reconstituées à partir d'EPS précipités à l'éthanol ainsi que des surnageants récoltés par centrifugation ont été utilisés. Dans un premier temps, deux membranes fibres creuses de microfiltration de 0,65 et 0,2 µm en PVDF ont été testées

pour la concentration des surnageants. La membrane de 0,65 μm a montré une plus grande efficacité en termes du flux de perméat et de concentration des EPS. La concentration de départ en protéines étant plus faible pour le surnageant filtré avec la membrane de 0,2 μm (taille de pores plus faible) et la perte d'EPS plus élevée dans le perméat ont laissé l'auteur supposer qu'une absence de protéines induit un dépôt plus poreux, d'où une perméabilité plus élevée aux EPS. De plus, il a été montré que les sels participaient au colmatage de la membrane. D'une part, leur élimination durant la diafiltration a induit une augmentation d'environ 30 % du flux de perméat. D'autre part, à partir des solutions reconstituées d'EPS (0,4 g.L^{-1}) ajustées ou non avec des sels, les concentrations maximales atteignables en EPS étaient de 8 g.L^{-1} (FRV de 29 et FC de 20) à forte concentration en sels, et de 14 g.L^{-1} (FRV de 33 et FC de 33, soit une rétention totale) à faible concentration en sels.

Un autre travail sur la récupération des EPS de *P. cruentum* à partir des milieux de culture par ultrafiltration membranaire a été effectué par Jareeya au cours de son stage au sein du laboratoire GEPEA en 2011. Tout d'abord, des essais de filtration frontale d'une solution d'EPS (0,2 g.L^{-1}) ont été réalisés avec trois membranes en PES de différents seuils de coupure (20, 50 et 100 kDa). L'allure et de l'évolution du flux de perméation en fonction du temps de filtration ainsi que les valeurs des flux étaient quasiment les mêmes pour les trois membranes. D'après l'auteur, ceci a été probablement attribué à la formation d'un gel de l'ordre d'un millimètre d'épaisseur visible à l'œil nu.

Marcati *et al.* (2014) ont développé un procédé de filtration membranaire à deux étapes pour l'extraction et le fractionnement de la B-phycoérythrine et des polysaccharides à partir d'une biomasse de *P. cruentum* à haute teneur en polysaccharides (0,63 g.L^{-1}). Dans un premier temps, ils ont concentré et diafiltré la solution obtenue après la lyse des cellules, sur une membrane en PES de 300 kDa pour récupérer dans le perméat les protéines et éliminer les polysaccharides de grande taille. La deuxième filtration tangentielle sur une membrane en PES de 10 kDa a permis de séparer le pigment (rétentat) et les polysaccharides (perméat). Marcati *et al.* (2014) ont attribué la rétention partielle des protéines de faibles poids moléculaires par la membrane de 300 kDa aux interactions entre les polysaccharides et les protéines.

Conclusion partielle (sections 4 à 6)

Dans la 4^{ème} section de l'étude bibliographique, les concepts fondamentaux de la filtration membranaire ont été décrits. Après une quinzaine de pages consacrées aux principes de base de la filtration membranaire, nous avons présenté plus en détail les mécanismes et les différents types de colmatage ainsi que les techniques de caractérisation usuelles des dépôts colmatants, en insistant sur la FTIR-ATR et l'AFM qui ont été mises en œuvre dans cette thèse.

La 5^{ème} section a permis de souligner l'importance de certains facteurs qui influencent la filtrabilité des solutions et promeuvent le colmatage. Ces facteurs sont les propriétés des membranes utilisées et des fluides traités ainsi que les paramètres opératoires. L'impact de ces facteurs sur le flux de perméat, la propension du colmatage, l'amélioration ou la détérioration de la réversibilité du colmatage ont été décrits pour les études antérieures traitant de la filtration des solutions de polysaccharides provenant de microalgues ou d'autres origines. Les effets principaux sont les suivants :

- La sensibilité des membranes organiques au colmatage augmente avec leur hydrophobicité et leur charge ; ces membranes sont sujettes à un fort colmatage par adsorption de molécules organiques, en particulier des protéines et des polysaccharides.
- Certaines études ont montré qu'une taille élevée des pores membranaires et qu'une distribution large de la taille des pores peuvent induire une propension au colmatage intrapores tandis que d'autres ont trouvé que la réversibilité du colmatage s'est progressivement détériorée en diminuant le seuil de coupure, bien que le colmatage total ait été considérablement réduit.
- Le pH de la solution d'alimentation peut avoir des conséquences sur les interactions entre la surface membranaire et les colmatants, surtout sur ceux ayant des groupes fonctionnels chargés. Il peut également impacter la structure des colmatants. C'est généralement au pH acide que le colmatage irréversible (par adsorption) est favorisé.
- La concentration des ions Ca^{2+} influence le taux, la nature et la réversibilité du colmatage par les polysaccharides (tels que l'alginate). Les tendances générales sont difficiles à dégager à cause de la complexité des solutions et de la grande variabilité des conditions opératoires dans lesquelles ont été menées les études. Des études ont montré que l'influence de la concentration de Ca^{2+} n'est pas monotone. Il existe une concentration de calcium critique au-

dessous de laquelle l'augmentation de la concentration de calcium accroît le colmatage et au-dessus de laquelle elle le diminue. Il est à noter que nombreux travaux ont été menés sur des solutions modèles à base d'alginate, et que leurs résultats ne sont pas extrapolables en l'état à d'autres polysaccharides vu la structure spécifique des alginates, même s'ils peuvent donner des indications qualitativement intéressantes quant à l'influence du milieu sur la filtrabilité des solutions.

- Une force ionique élevée a en général pour conséquence de favoriser l'accumulation de colmatants à la surface membranaire, à cause de l'écrantage des charges qui diminue la répulsion entre espèces de même charge. Cependant, il faut prendre en compte que le rapport « concentration de calcium sur concentration de sucres » et la concentration en ions monovalents imposant la force ionique agissent ensemble sur la structuration et la viscosité des solutions de polysaccharides qui influencent la sévérité et le mécanisme de colmatage. Dans le cas de la concentration et la diafiltration des EPS de *Porphyridium cruentum*, il a été observé que les sels aggravent le colmatage.
- L'hydrophobicité du soluté a également un impact sur la nature du colmatage. Elle peut promouvoir l'interaction colmatant-membrane et aggraver l'adhésion irréversible des molécules organiques à la surface de la membrane. Cependant les molécules organiques hydrophiles peuvent contribuer à la formation d'un dépôt ayant une résistance hydraulique élevée à la perméation de l'eau.
- Une vitesse tangentielle élevée permet d'améliorer le flux de perméation à une pression transmembranaire donnée et de réduire la résistance de colmatage, mais elle peut également réduire le taux de rétention du soluté testé si le seuil de coupure de la membrane est suffisamment élevé.
- Le travail en dessous de ou à la limite des conditions de PTM critiques permet de prévenir un colmatage important, et par suite de diminuer la fréquence des nettoyages nécessaires pour éliminer le colmatage irréversible et régénérer la membrane.
- La température peut agir directement sur le flux de perméation à travers la viscosité du solvant, mais elle peut également affecter le colmatage membranaire en fonction de la solution d'alimentation et des caractéristiques du soluté.

A terme, ce chapitre a donc aidé au choix des paramètres à analyser pour étudier la filtrabilité des solutions d'EPS de *P. cruentum* qui fera l'objet du chapitre IV. Les paramètres

retenus sont la vitesse tangentielle, la pression transmembranaire, la concentration initiale en sucres et la température. Nous n'avons pas pu étudier dans le cadre de ce travail l'effet du pH et de la force ionique par manque de temps.

Par ailleurs, les études antérieures sur la récupération et la purification des EPS produits par les microalgues, en particulier *P. cruentum*, ainsi que leurs résultats principaux ont été présentés dans la 6^{ème} section. La formation d'un gel par les macromolécules d'EPS de *P. cruentum* lors de la filtration de solutions d'EPS a été également citée.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

1. Introduction

Ce chapitre décrit le matériel utilisé et les essais expérimentaux réalisés au cours de la thèse. Dans un premier temps, sont décrites les méthodes de culture de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et les analyses de suivi de culture. Ensuite, la préparation des solutions d'EPS de la microalgue *Porphyridium cruentum* et les procédés de filtration membranaire de ces solutions sont présentés, ainsi que les moyens mis en œuvre pour analyser le colmatage.

2. Culture d'*Arthrospira platensis*

2.1. Souche et milieu de culture

La souche de cyanobactérie *Arthrospira platensis* retenue est référencée PCC 8005 à l'institut Pasteur (*Pasteur Collection of Cyanobacteria*) et est obtenue auprès de la collection *Alphabiotech* (Figure II.1).

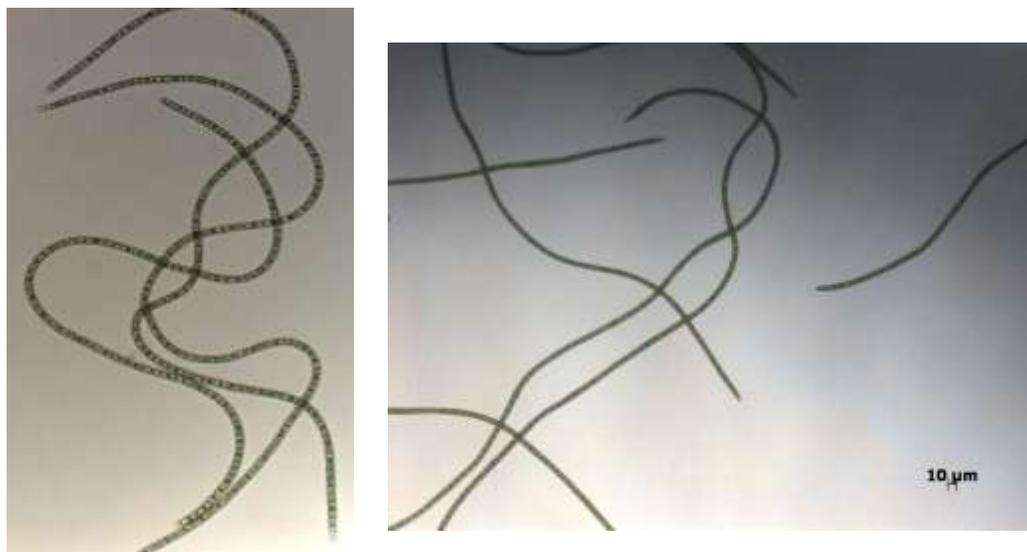


Figure II.1. Photographies au microscope optique de la cyanobactérie *A. platensis* (crédits : GEPEA).

Le milieu nutritif utilisé pour cette étude est adapté du milieu proposé par Zarrouk (1966) et dit « milieu Zarrouk modifié ». La composition de ce milieu est donnée dans le tableau II.1.

L'absence de contaminants est vérifiée périodiquement par des observations microscopiques (microscope *ZEISS* équipé d'une caméra *AxioCam MRc*) à faible et à fort grossissements. Les manipulations de repiquage se font à la flamme d'un bec bunsen avec du matériel et de la verrerie préalablement stérilisés dans une étuve sèche à 150 °C pendant 2 h ou

autoclavés (121°C, 25 minutes). La préparation des milieux doit être réalisée en conditions aseptiques pour garantir une culture monospécifique de la cyanobactérie et éviter toute contamination durant les étapes de croissance. Pour préparer 1 L de milieu de culture, 1 mL de la solution 1, 5 mL de la solution 2, 1 mL de la solution A5 et 1 mL de la solution B6 sont ajoutés à la solution de macronutriments.

Tableau II.1. Composition du milieu de culture « Zarrouk modifié » d'*A. platensis*.

Composition de la solution de macronutriments (kg.m⁻³)	
NaCl	1
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2
NaNO ₃	2,5
K ₂ SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,5
NaHCO ₃	16,8
Composition de la solution 1 (kg.m⁻³)	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	30
Composition de la solution 2 (kg.m⁻³)	
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	16
FeSO ₄ , 7H ₂ O	2
Composition de la solution A5 (kg.m⁻³)	
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,22
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,08
MoO ₃	0,015
Composition de la solution B6 (kg.m⁻³)	
NH ₄ VO ₃	0,023
NiSO ₄ , 7H ₂ O	0,048
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	0,044

2.2. Les différentes étapes de la culture

L'application des essais de séparations membranaires nécessite des volumes importants de surnageants de milieux de culture. Ceci requiert des cultures à grande échelle et donc une montée en échelle de la culture d'*A. platensis* (Figure II.2).

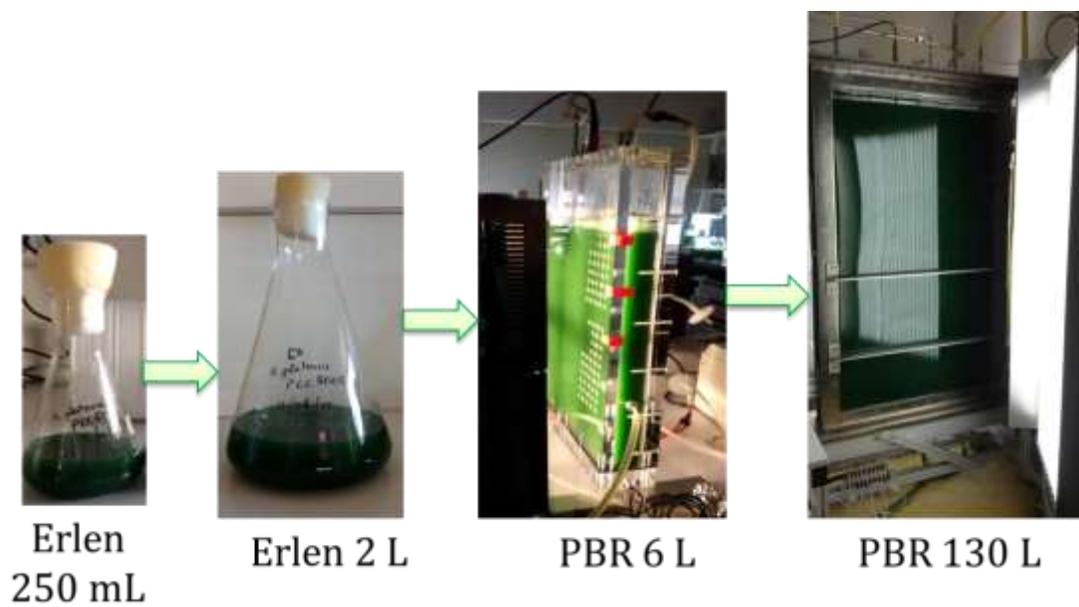


Figure II.2. Montée en échelle de la culture d'*Arthrospira platensis* PCC 8005.

2.2.1. Culture en erlenmeyers de 250 mL puis de 2 L

Afin de conserver la souche, cette dernière est cultivée en mode batch dans des erlenmeyers stériles de 250 mL. Les cultures sont maintenues en permanence sous une lumière d'intensité modérée de $50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à température ambiante entre 20 et 25 °C et en perpétuelle agitation de 100 rpm sur une plaque à agitation (*Heidolph Unimax 2010*) afin de prévenir la décantation des cellules sans les soumettre à un fort cisaillement. Afin d'éviter toute mutation de la souche et pour garder des cellules jeunes avec un fort potentiel de croissance, un repiquage doit être effectué régulièrement tous les dix jours dans deux nouveaux erlenmeyers. Pour ce faire, 10 mL d'une vieille culture (pré-culture) sont prélevés et transférés stérilement, sous une hotte à flux laminaire et à côté du bec Bunsen, dans 100 mL de milieu de culture neuf. Généralement, pour une culture en erlenmeyer, le volume de remplissage recommandé est de 25 à 40 % du volume nominal du récipient, ceci pour garder une bonne aération de la culture.

Ensuite, une culture en erlenmeyer de 2 L est effectuée en introduisant 80 mL d'une pré-culture d'un erlenmeyer de 250 mL dans 800 mL de milieu nutritif frais. Ceci permet d'avoir un inoculum prêt à être utilisé pour l'ensemencement du PBR de 6 L.

2.2.2. Culture en photobioréacteur airlift de 6 L

Un PBR plan vertical dit gazosiphon ou *airlift* de capacité de 6 L (Figure II.3) a été utilisé pour préparer l'inoculum pour le PBR de 130 L. Ce PBR est construit avec du PMMA (Polyméthacrylate de méthyle) transparent et non toxique pour la cyanobactérie d'étude. Il estensemencé avec une culture provenant de l'ermenmeyer de 2 L puis complété avec 4 L du milieu de culture stérile. L'alimentation se fait via une pompe péristaltique (MASTERFLEX[®] CONSOLE DRIVE). Le flux de lumière incident q_0 (ou PFD pour Photons Flux Density) est assuré par un système d'éclairage constitué d'un panneau de 300 LEDs (OPTOTRONIC@OTi DALI DIM PWM LED Dimmer 5 A max, OSRAM) parallèle à la face optique. Un contrôle de la tension appliquée au panneau permet de faire varier l'intensité lumineuse. La densité de flux de photons est mesurée à l'aide d'un capteur quantique (LI-250A, LI – COR Lincoln, NE). Lors de l'ensemencement de la culture, le flux lumineux est réglé entre 40 et 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour ne pas stresser la cyanobactérie. Ensuite, le flux incident est progressivement augmenté afin de garder une zone sombre la plus petite possible. Une injection d'air (0,2 bar) stérile (filtre Midisart[®] 2000 IN, 0,2 μm) en position centrale au niveau bas du PBR permet de mettre le fluide en mouvement, provoquant ainsi une circulation de la culture. L'agitation en continu et le mélange sont très importants pour favoriser l'échange des gaz O_2 et de CO_2 entre le milieu liquide et le gaz d'aération, favoriser l'homogénéisation et prévenir la sédimentation des cellules.

Le pH est régulé par injection du CO_2 gazeux dans la culture, ce qui prévient également la toute limitation en carbone de la culture. Ainsi, dès que le pH dépasse la valeur consigne de 9,5, une électrovanne permet l'injection automatique de CO_2 qui se dissout ensuite, provoquant ainsi une acidification du milieu. Il est à noter que cette procédure ne permet que la diminution du pH, la consommation du carbone dissous lors de la photosynthèse provoquant une alcalinisation du milieu.

Une platine supérieure en PMMA supporte différents piquages pour recevoir les capteurs et les différentes injections :

- une électrode à pH (Type InPro 480 li/SG/425, METTLER TOLEDO),
- un filtre (Midisart[®] 2000 IN, 0,2 μm) pour l'évacuation de l'air,
- une canne vers une pompe péristaltique (MASTERFLEX[®] CONSOLE DRIVE) d'injection du milieu neuf,

- une canule plongeant dans la culture pour le prélèvement par seringue.

La culture est maintenue à température ambiante entre 20 et 25 °C.

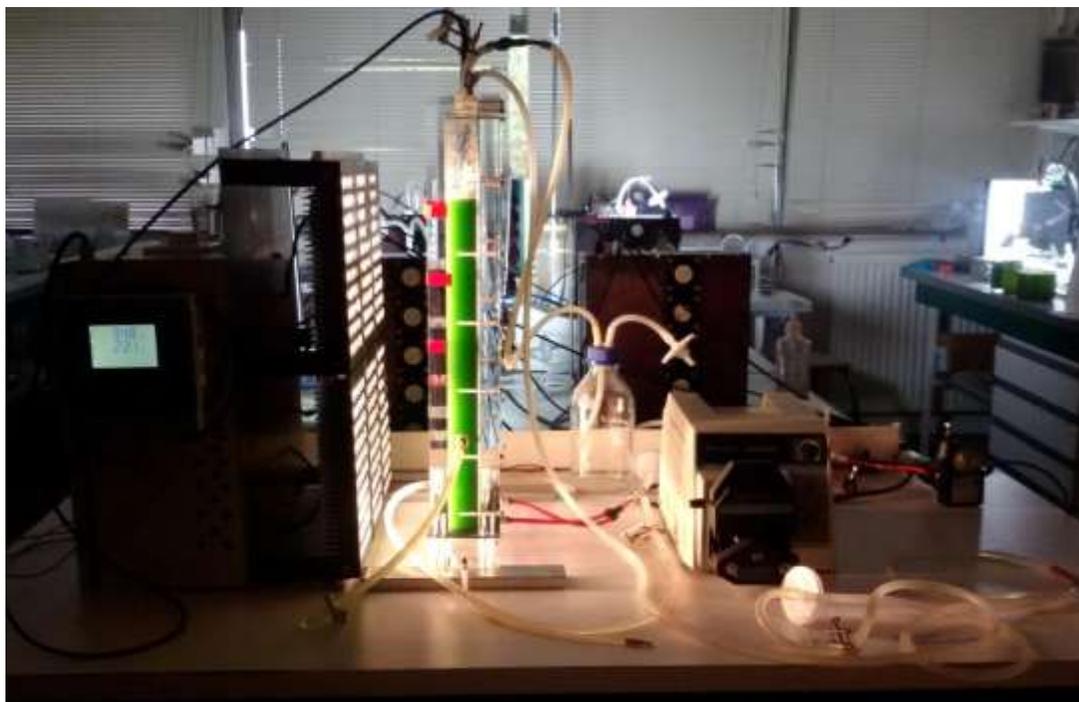


Figure II.3. Culture de la cyanobactérie *A. platensis* dans un photobioréacteur Airlift de 6 L avec le panneau de LEDs.

Après calibration de la sonde de pH et mise en place des différents éléments, le réacteur est stérilisé chimiquement à l'eau de javel 10 % (v/v) dans l'eau pendant au moins 1 heure. Le matériau du PBR étant en PMMA, il n'est pas autoclavable. Une solution de sulfite de sodium (1,8 % (w/v) de Na_2SO_3 dans l'eau déionisée) autoclavée (121 °C, 25 minutes) est ajoutée au PBR en conditions stériles et le milieu est laissé au repos pendant 1 heure tout en agitant avec l'air.

La culture est effectuée en mode semi-continu. D'abord, le milieu Zarrouk modifié est utilisé pendant 15 jours. Ensuite, un volume de culture d'environ 3 L est récolté et remplacé par un milieu Zarrouk modifié 2 N (même composition que celle du milieu Zarrouk modifié, mais avec une concentration en NaNO_3 multipliée par deux) pour lancer une culture pendant 20 jours.

2.2.3. Culture en photobioréacteur airlift de 130 L

Pour les essais de filtration membranaire et donc pour avoir des productions en EPS et en biomasse plus grandes, un PBR à l'échelle pilote nommé HectoR pour "Hectoliter photobio reactor" est utilisé. C'est un PBR plan de type *airlift*, en acier inoxydable (type 316 L), hormis les faces verticales qui sont faites en matériau transparent (PMMA). Il présente une épaisseur de 11 cm, un volume de 130 L et une surface spécifique éclairée (a_{light}) égale à 18,2 m⁻¹. L'éclairage est assuré par deux panneaux constitués de 20 néons chacun (QUICKTRONIC® PROFESSIONAL QTP8 2×58, OSRAM) et situés devant les deux faces du PBR. L'intensité lumineuse appliquée est réglée simplement en jouant sur le nombre de néons allumés et la distance entre chaque panneau et le PBR. Le pH et la température sont mesurés par une sonde pH/température (Sensor Mettler Toledo SG 3253) et sont contrôlés par un logiciel d'acquisition sous LabVIEW. La régulation du pH se fait par injection de CO₂ à la base du PBR et la température est contrôlée par l'intermédiaire d'un fluide (de l'eau osmosée) circulant dans un échangeur plan immergé à l'intérieur du PBR. Cet échangeur est relié à un thermostat (cryoth 5 RK 20 KP, Lauda, Allemagne) permettant le maintien de la température désirée (pouvant aller de 5 à 55 °C).

Le milieu de culture est préparé et agité dans une cuve (GOAVEC, breveté SGDG / patented 81- 17696) de capacité nominale 300 L et ajouté dans le PBR par stérilisation via une cartouche de filtration stérilisante (Sartorius Stedim Sartofluor Mini Cartridge) de taille de pores de 0,2 µm. Le PBR ainsi que la cuve d'alimentation sont stérilisés à la vapeur pendant 2 h à température de 80 - 85 °C. L'inoculation d'HectoR est effectuée avec un inoculum de 5 L provenant du PBR 6 L, auxquels sont ajoutés 125 L du milieu de culture Zarrouk modifié (1 N). Un mode de culture « en batchs répétés » est adopté avec un taux de renouvellement de 80 % tous les 14 jours. En d'autres termes, tous les 14 jours, 80 % du volume de la culture sont récoltés et du milieu frais est ajouté pour réajuster le niveau du PBR. La culture est réalisée à un pH de 9,5, une température de 35 °C et sous une intensité lumineuse de 332 µmol photons.m⁻².s⁻¹. Cette densité de flux lumineux est assurée par l'illumination de 20 néons de chacun des deux panneaux. La distance entre chaque panneau et le PBR est fixée à 28,5 cm.

2.3. Analyses

2.3.1. Concentration en biomasse

La concentration en biomasse sèche d'*A. platensis* est déterminée en mesurant la concentration de matières en suspension. Un volume V_s de la suspension de cyanobactérie est filtré à travers un filtre en fibre de verre (Whatman GF/F microporeux de diamètre de pores de $0,7 \mu\text{m}$) préalablement séché à l'étuve ($105 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 heures), refroidi dans un dessiccateur pendant 10 minutes au minimum puis pesé à $0,1 \text{ mg}$ près dans un pilulier sur une balance de précision (METTLER TOLEDO, AB204). Soit m_1 sa masse. Le pilulier et le filtre sont ensuite lavés deux fois avec deux volumes d'eau déminéralisée pour éliminer les sels pouvant être restés sur le filtre. Le filtre est séché à l'étuve à $105 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 heures, refroidi puis pesé de nouveau (soit m_2 la masse pesée). La concentration en biomasse sèche, C_x , est alors calculée ainsi :

$$C_x = \frac{m_2 - m_1}{V_s} \quad (\text{II.1})$$

avec m_2 et m_1 en (g) ; V_s en (L) et C_x en (g.L^{-1} ou kg.m^{-3}).

Chaque analyse est réalisée en triplicat et le résultat représente la moyenne des trois mesures.

2.3.2. Dosage des pigments (chlorophylle a et caroténoïdes)

Le contenu cellulaire en chlorophylle a est déterminé par une méthode spectrophotométrique après une extraction au méthanol. Un volume de culture (V_{culture} de $0,25 \text{ mL}$) est placé dans un Eppendorf et complété avec 1 mL d'une solution de CaCl_2 à $6,5 \text{ kg.m}^{-3}$. L'ensemble est centrifugé pendant 10 minutes à 12100 g (centrifugeuse *miniSpin*) à température ambiante. Le chlorure de calcium aide les cellules flottantes de la cyanobactérie *A. platensis* à s'agréger et à décanter dans le culot. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est mis en suspension dans un volume $V_{\text{méthanol}}$ de $1,5 \text{ mL}$ de méthanol ($99,9 \%$) puis il est placé dans un bain à ultrasons (VWR ULTRASONIC CLEANER) et incubé pendant 45 minutes à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ à l'obscurité. Par la suite, les débris cellulaires sont séparés par centrifugation pendant 10 minutes à 12100 g . L'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans le méthanol est

mesurée aux longueurs d'onde 480, 665 et 750 nm (spectrophotomètre UV-visible V-630, Jasco). Des triplicats sont préparés. La concentration de la chlorophylle *a* est déterminée suivant l'équation (II.2) proposée par Ritchie (2006) pour les cyanobactéries.

$$C_{Chla} = \frac{V_{méthanol}}{V_{culture}} \times 12,9447 \times (DO_{665}) \quad (\text{II.2})$$

La concentration en caroténoïdes, quant à elle, est estimée à l'aide de l'équation II.3 proposée par Macías-Sánchez *et al.* (2005) :

$$C_{caroténoïdes} = \frac{V_{méthanol}}{V_{culture}} \times 4 \times (DO_{480}) \quad (\text{II.3})$$

avec $V_{culture}$ et $V_{méthanol}$ les volumes de culture (mL) et de méthanol (mL) respectivement, C_{Chla} et $C_{caroténoïdes}$, les concentrations en chlorophylle *a* et caroténoïdes ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou g.m^{-3}), respectivement.

Une fois la concentration massique de la culture déterminée, la teneur en pigments peut être exprimée en grammes de pigments par grammes de biomasse sèche.

3. Ultrafiltration des solutions d'EPS de *Porphyridium cruentum*

3.1. Préparation des solutions d'EPS

3.1.1. Eau déionisée

L'eau utilisée pour la préparation des différentes solutions ainsi que pour la filtration membranaire (mesure de perméabilité hydraulique, rinçage et nettoyage de la membrane) est une eau de type 2 produite par le système Elix[®] Advantage (Millipore). L'eau du robinet est tout d'abord prétraitée par le système pour éliminer efficacement les particules, les colloïdes et le chlore libre et également pour abaisser sa dureté. Ensuite, elle est purifiée par osmose inverse et électrodéionisation (sur une résine échangeuse d'ions de haute qualité) jusqu'à atteindre une résistivité de 15 M Ω .cm à 25 °C. Enfin, l'eau est stérilisée par un rayonnement U.V. bactéricide puis filtrée à travers un filtre de 0,22 μm .

3.1.2. Souche et milieu de culture

La souche de la microalgue rouge *Porphyridium cruentum* (UTEX 161) retenue a été produite et récoltée sur la plate-forme R&D Algosolis - UMS CNRS 3722 (Saint-Nazaire, France, <http://algosolis.com/>), pilotée par l'Université de Nantes. La plateforme est dédiée au développement de nouvelles technologies pour la culture et le bioraffinage de microalgues et offre l'infrastructure nécessaire pour effectuer des investigations dans des conditions représentatives d'applications industrielles. *P. cruentum* a été cultivée dans un milieu dit « milieu Basal de Bold modifié » et noté « milieu BBM modifié », dans un raceway d'un volume de 1000 L et d'une surface de 10 m² fonctionnant en mode discontinu (batch). La composition du milieu de culture est donnée dans le tableau IV.1 du chapitre IV. Les cultures ont été maintenues sous le flux lumineux solaire, à un pH de 7,5 et à une température variant entre 17 et 28 °C pour la culture A et entre 20 et 25 °C pour la culture B.

3.1.3. Solutions d'EPS filtrées

Les solutions d'alimentation du procédé de filtration sont préparées à partir de deux cultures A et B de *P. cruentum* récoltées lorsqu'elles avaient respectivement 22 et 18 jours. La biomasse et le milieu de culture contenant les EPS hydrosolubles exsudés ont été séparés par centrifugation à 3000 g dans un décanteur dynamique à plaques d'Evodos (Evodos 10). La séparation produit ainsi les surnageants A et B à partir respectivement des cultures A et B. Une partie du surnageant B est concentrée à l'aide d'une membrane céramique tubulaire (Membralox P1940) ayant un diamètre de pores moyen de 50 nm. Le rétentat résultant est nommé surnageant Bc.

Tous les surnageants (A, B et Bc) sont conservés au congélateur à -20 °C. Ils sont mis à décongeler à 4 °C pendant 24 à 48 heures avant les manipulations de filtration, pour minimiser le risque de contamination bactérienne. Les différentes solutions d'EPS filtrées sont préparées à partir de ces 3 surnageants A, B et Bc selon les protocoles décrits ci-dessous et récapitulés sur la figure II.4. Les teneurs des solutions en EPS (kg GlcEq.m⁻³) sont également mentionnées sur cette figure.

Une fois décongelé, le surnageant A est prétraité par centrifugation (Thermo Scientific Sorvall RC6 Plus) deux fois à 6000 g pendant 15 minutes et à 4 °C, pour éliminer les débris cellulaires résiduels. La solution d'EPS résultante est notée « S_A ».

La solution d'EPS notée « S_B » est le surnageant B brut lui-même. De son côté, le surnageant Bc est centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes et à 4 °C afin d'éliminer les précipités apparus après la décongélation. Le surnageant récupéré est ensuite dilué avec du milieu BBM modifié (BBMm) frais selon les concentrations requises pour les essais de filtration. Les solutions obtenues sont nommées « S_{Bcd1} » et « S_{Bcd2} ». La solution « S_{Bcd1}* » est préparée de la même façon que la solution « S_{Bcd1} » mais sans faire de centrifugation avant la dilution.

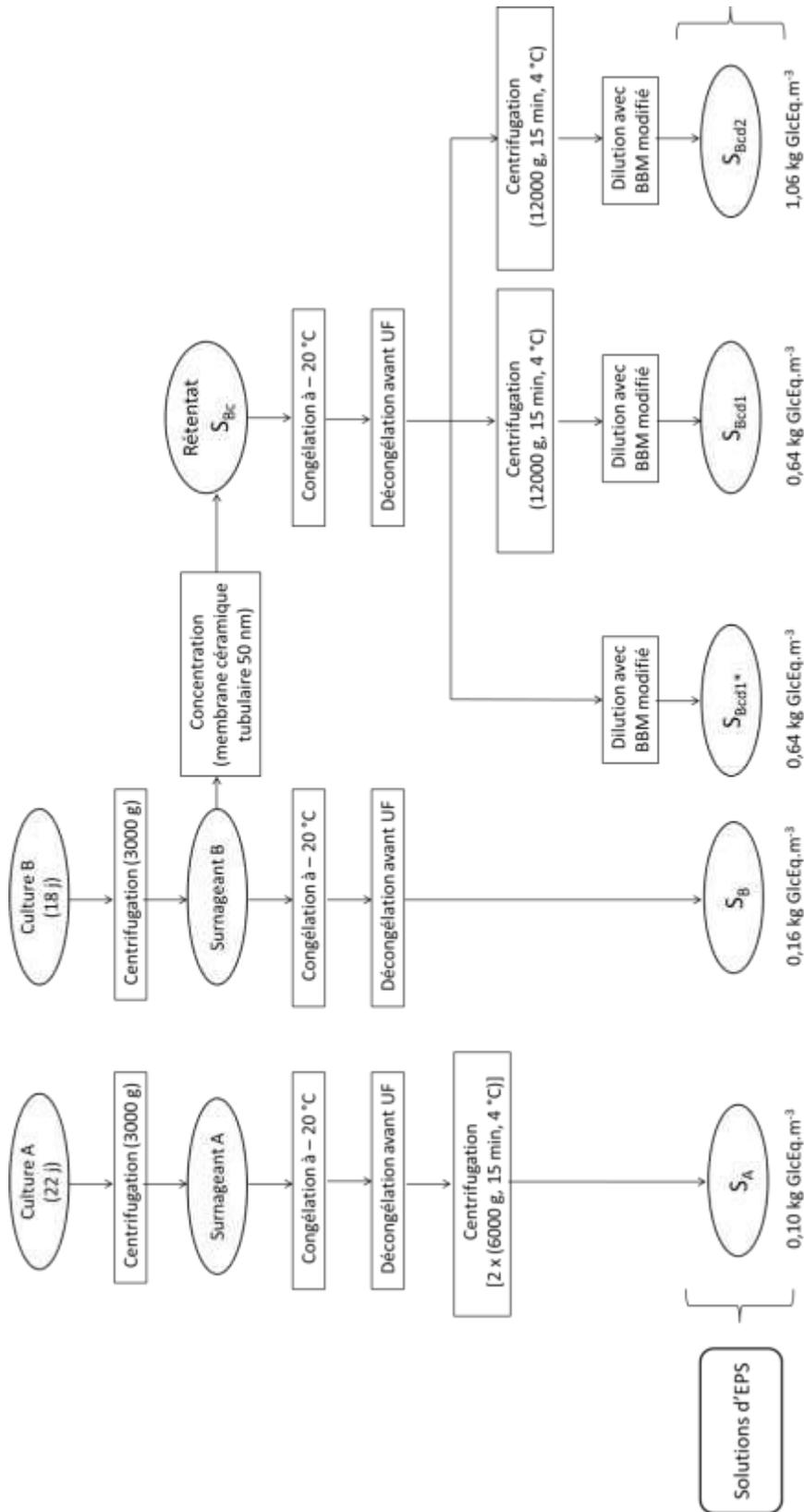


Figure II.4. Préparation des solutions d'EPS utilisées lors des essais d'ultrafiltration.

3.2. Analyses et caractérisation des solutions d'EPS

Différentes analyses sont effectuées sur les solutions d'EPS dans le but d'en déterminer leur composition. Ceci pourrait permettre de comprendre l'influence de la composition du surnageant sur la filtration et sur la propension au colmatage.

3.2.1. Analyse des sels

La caractérisation des sels contenus dans la solution d'EPS est faite par deux méthodes, la mesure globale de la conductivité de la solution et la détermination de sa composition en certains ions par chromatographie ionique.

La conductivité ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Mettler ToledoTM FG3 FiveGoTM) équipé d'une sonde LE703.

Pour faire les analyses des ions en suspension présents dans les solutions d'EPS, les échantillons sont d'abord dilués avec de l'eau déionisée afin que les quantités de matière soient dans la gamme de concentrations mesurables. Ensuite, ils sont filtrés sur acétate de cellulose à $0,2\ \mu\text{m}$ (Filtres-seringue, Minisat[®] NML) avant d'être injectés. Le dosage des cations (sodium, calcium, magnésium et potassium) est réalisé à l'aide d'un chromatographe Dionex – ICS 1100 (Thermo Scientific) équipé d'une colonne de garde CG16 ($5 \times 50\ \text{mm}$) et d'une colonne de séparation CS16 ($5 \times 250\ \text{mm}$). L'élution se fait avec une solution d'acide sulfurique, H_2SO_4 , à $17 \times 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à un débit de $1,2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les anions phosphate, sulfate, chlorure et nitrate sont dosés à l'aide d'un chromatographe Dionex – ICS 900 (Thermo Scientific) équipé d'une colonne de garde (pré-colonne) AG9 – HC ($4 \times 50\ \text{mm}$), d'une colonne de séparation AS9 – HC ($4 \times 250\ \text{mm}$) et d'un supprimeur chimique. L'éluant utilisé est un mélange de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à $7,7 \times 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à $1,3 \times 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Le débit d'élution est de $1,0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Afin de régénérer les ions des phases stationnaires, un supprimeur chimique AMMS 300, 4 mm (alimentation H_2SO_4 à $25 \times 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) est utilisé pour la colonne anionique, alors que la colonne cationique est équipée d'un supprimeur électrochimique CSRS[®] 300, 4 mm (autorégénération par électrolyse). L'injection est réalisée en série sur les deux chromatographes (cationique puis anionique). Le signal de détection est la conductivité de la solution éluée. L'acquisition et le traitement des

données sont réalisées par le logiciel Chromeleon[®]7. La concentration des ions est déterminée par la mesure de l'aire sous chaque pic.

3.2.2. Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Mettler Toledo[™] FG2 FiveGo[™]) équipé d'une sonde LE438 préalablement étalonnée à l'aide de solutions tampons (pH 4,01, 7,01 ou 10,01 ; HANNA instruments).

3.2.3. Dosages des sucres totaux

La composition en sucres totaux est déterminée par la méthode colorimétrique au phénol et à l'acide sulfurique développée par DuBois *et al.* (1956). Le principe de cette méthode repose sur l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, à chaud, en présence d'acide sulfurique concentré et sur la déshydratation des unités osidiques qui conduit à la formation de composés furfuriques (furfural ou de l'hydroxyméthylfurfural). Ces derniers interagissent avec le phénol par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune absorbant à 483 nm. Pour ce faire, 500 µl d'échantillons sont placés dans des vials en verre de 8 mL. Ensuite, sous la hotte, 500 µl de phénol (50 kg.m⁻³) sont ajoutés puis 2,5 ml d'acide sulfurique concentré (96 %) sont introduits sur chaque échantillon. Les mélanges sont incubés pendant 10 minutes exactement à température ambiante puis homogénéisés vigoureusement au vortex pendant 10 secondes. Ensuite, les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante puis pendant 30 minutes dans un bain-marie à 35 °C. Enfin, ils sont refroidis dans de l'eau courante pendant 10 minutes. La lecture de l'absorbance à 483 nm permet, par l'intermédiaire d'une droite d'étalonnage préalablement établie, de remonter à la concentration en sucres. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de glucose à 0,1 kg.m⁻³ et les résultats sont exprimés en kilogrammes d'équivalent D-glucose par mètre cube (kg GlcEq.m⁻³). Le dosage se fait en triplicat.

Avant de doser les sucres dans les perméats, les échantillons sont diafiltrés à 2 bar sur une membrane en PES (Biomax, EMD Millipore Corporation) de 10 kDa placée dans une cellule à agitation (Amicon EMD Millipore[™]). Ainsi, les sels qui pourraient interférer dans le dosage des sucres, notamment les nitrates, sont éliminés des échantillons. Les solutions filtrées ont une concentration en sucres relativement élevée et ne nécessitent donc pas de diafiltration préalable.

Ces échantillons sont dilués avec de l'eau déionisée afin de rentrer dans la gamme de fiabilité du spectrophotomètre.

3.2.4. Dosage des protéines

Le dosage de protéines à l'acide bicinchoninique (BCA) repose sur le fait qu'en milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques Cu^{2+} en ions cuivreux Cu^+ . Le BCA est un réactif colorigène hautement spécifique des ions Cu^+ , qui forme avec eux un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Le réactif dit « C » est préparé de façon extemporanée en ajoutant 50 mL de solution de BCA et 1 mL de solution de CuSO_4 à 4 % (w/v). 2 mL de réactif C sont ensuite ajoutés à 100 μL de l'échantillon à doser dans un vial en verre de 8 mL. Le mélange est vortexé pendant 5 secondes et placé pendant 30 minutes dans un bain-marie à 37 °C. Il est ensuite refroidi à l'eau courante pendant 10 à 15 minutes. L'absorbance est ensuite mesurée à 562 nm. L'étalonnage est réalisé en faisant une gamme étalon à partir d'une solution standard de protéines (sérum albumine bovine, BSA, à 0,15 M ; 0,001 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ en NaCl ; Sigma-Aldrich, BCA1-1KT). Les résultats sont exprimés en ($\text{kg BSAEq}\cdot\text{m}^{-3}$). Le dosage est fait en triplicat.

3.2.5. Mesure des matières sèches

Une coupelle en aluminium est préalablement séchée à l'étuve et pesée. Un volume connu (15 mL) de solution d'EPS est placé dans la coupelle qui est mise à sécher à l'étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante (environ 24 heures). Ensuite, l'ensemble est sorti puis placé dans un dessiccateur pendant 10 minutes minimum pour permettre l'abaissement de la température, et est enfin pesé à l'aide d'une balance de précision (à 0,1 mg près). La différence de masse entre les deux pesées permet de déterminer la teneur en matières sèches. Chaque analyse est réalisée en triplicat.

3.2.6. Mesure de la turbidité

Cette mesure se fait grâce à la lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 750 nm (spectrophotomètre UV-visible V-630, Jasco). Le blanc est réalisé avec de l'eau déionisée.

3.2.7. Caractéristiques des solutions d'EPS

Les différentes solutions d'EPS ont pu être caractérisées à partir des analyses réalisées suivant les protocoles ci-dessus. Les caractéristiques sont récapitulées dans le tableau IV.2 du chapitre IV.

3.3. Membrane et pilote d'ultrafiltration

3.3.1. Membranes utilisées

Une membrane organique en Polyéthersulfone (PES) de seuil de coupure égal à 50 kDa (modèle MQ fabriquée par la société Synder, Vacaville, CA, USA) est utilisée pour ce travail. La membrane est livrée sous forme d'un rouleau à partir duquel des échantillons (coupons) rectangulaires de dimensions (8,5 cm × 17,9 cm) sont découpés pour les essais de filtration. Les caractéristiques de la membrane MQ sont présentées dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Caractéristiques de la membrane MQ (Synder).

Modèle	Matériau	Seuil de coupure (kDa)	Température max. (°C)		pH	
			En filtration	En nettoyage	En filtration	En nettoyage
MQ	PES	50	55	50	3 – 9 (T maximale) 2 – 10 (T ambiante)	2 – 11 (T maximale) 1,8 – 11 (T ambiante)

Les EPS des souches de *Porphyridium* ayant des poids moléculaires compris entre de 2000 et 7000 kDa, une membrane d'un seuil de coupure de 50 kDa a été choisie pour assurer une rétention normalement totale des EPS.

Pour éviter le dessèchement de la membrane et l'emprisonnement des bulles d'air dans les pores d'une membrane utilisée pour une série d'essais de filtration, les échantillons sont maintenus dans le pilote rempli d'eau déionisée. L'eau est renouvelée régulièrement (chaque

jour) afin d'éviter la contamination bactérienne. L'absence de dérive de la perméabilité de la membrane est vérifiée après chaque stockage.

3.3.2. Description de l'installation d'ultrafiltration

L'étude expérimentale est réalisée dans une unité de filtration tangentielle Rayflow 100 (Rhodia-Orelis, Miribel, France, Figure II.5) équipée d'une membrane plane de surface utile de $0,0125 \text{ m}^2$ ($167 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$). La membrane est disposée à plat sur une plaque rainurée. Le perméat s'écoule à la pression atmosphérique. L'épaisseur de la veine liquide côté rétentat est fonction de l'épaisseur du joint d'étanchéité placé entre la membrane et le module. Lors des filtrations effectuées en veine liquide « libre » (sans espaceur), l'épaisseur de la veine fluide est de $0,5 \text{ mm}$. Cependant, lorsqu'un espaceur en polypropylène jouant le rôle d'un promoteur de turbulence est placé côté rétentat (espaceur Synder 46 mil d'épaisseur $1,168 \text{ mm}$ dans notre cas), la veine liquide a une épaisseur de $1,5 \text{ mm}$.

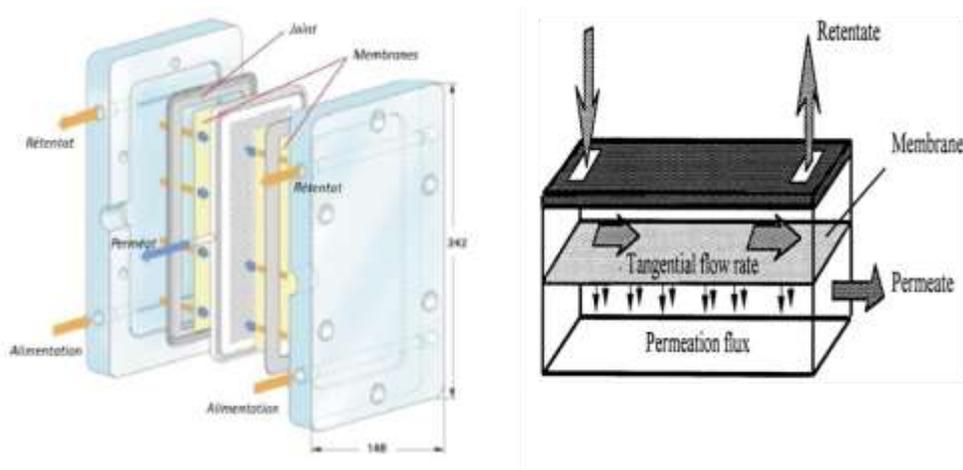


Figure II.5. Représentations schématiques du module plan (Rayflow 100) et de l'écoulement dans le module (le schéma complet de l'installation est décrit sur la Figure IV.1 du chapitre IV.).

Les mesures instantanées du débit de perméation sont réalisées à l'aide d'une balance de précision (RADWAG, WLC 6/A2), connectée à un ordinateur équipé du logiciel d'acquisition de données Labview. L'alimentation se fait par pompage de la solution d'EPS via une pompe volumétrique (Quattroflow-1200 S, pompe à diaphragme à 4 pistons). Il est à noter qu'une pompe différente (Quattroflow-150 S) a été utilisée lors de l'essai 1* sans espaceur (cf. tableau IV.3 du chapitre IV). La pression imposée durant la filtration est ajustée à l'aide d'une vanne de

contre-pression placée sur le circuit du rétentat à la sortie du module. Chaque expérience est effectuée avec un volume de 2 L de solution d'EPS qui est continuellement agitée et réfrigérée à l'aide d'un cryothermostat (Fisher Bioblock Scientific, bain réfrigérant / chauffant) pour les filtrations à 20 °C. Dans le cas des essais effectués à plus haute température (40 °C), un système d'agitation magnétique équipé d'une plaque chauffante (VELP Scientifica, AREX CerAlTopTM) combinée à un thermorégulateur numérique VTF (VELP Scientifica) est utilisé. Les températures du perméat et du rétentat sont mesurées par des thermocouples. Deux manomètres analogiques [0 – 4 bar] (Swagelok) et deux capteurs-transmetteurs de pression [0 – 6 bar] (Schneider Electric XMLP) sont placés à l'entrée et à la sortie du module membranaire afin d'estimer la pression transmembranaire. Une vanne de soutirage, situé au point bas du pilote, permet la vidange de l'installation. Une application créée au laboratoire GEPEA sous le logiciel Labview permet de suivre en temps réel le débit de perméat, les températures ainsi que les pressions.

Dans ce travail, la pression transmembranaire (PTM, en bar) est calculée suivant l'équation :

$$PTM = \frac{P_e + P_s}{2} - P_p \quad (\text{II.4})$$

avec P_e et P_s les pressions à l'entrée et à la sortie du module (bar), et P_p , la pression du perméat (bar). La pression du perméat est considérée comme étant égale à la pression atmosphérique. La perte de charge (ΔP) au niveau du module est déterminée à partir de la différence de pressions côté rétentat entre l'alimentation et la sortie :

$$\Delta P = P_e - P_s \quad (\text{II.5})$$

La vitesse tangentielle du fluide ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) est le rapport entre le débit volumique de l'écoulement et la section de passage.

$$v = \frac{Q}{S} \quad (\text{II.6})$$

avec Q , le débit d'alimentation ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) et S , la section d'écoulement (m^2). La section de passage est le produit de l'épaisseur de la veine liquide (épaisseur du joint) et de la largeur de la membrane (7,5 cm). Elle est égale à 0,375 cm^2 et 1,125 cm^2 en l'absence et en présence d'espaceur, respectivement. Dans les deux cas, la vitesse tangentielle est calculée « en fût vide ».

Le débit d'alimentation est estimé en recueillant le rétentat et le perméat dans une éprouvette graduée. Il faut noter que pour une fréquence électrique donnée, les débits de refoulement des pompes volumétriques Quattroflow varient avec la pression de refoulement. Nous avons donc étalonné les deux pompes en fonction de la fréquence et de la pression transmembranaire PTM (Figures II.6 et II.7). Pour la pompe Quattroflow-1200 S utilisée pour la plupart des essais, nous avons inversé la relation pour exprimer la fréquence électrique qui doit être imposée en fonction de la PTM (en abscisse) et de la vitesse tangentielle (paramètre) souhaitées (Figure II.8).

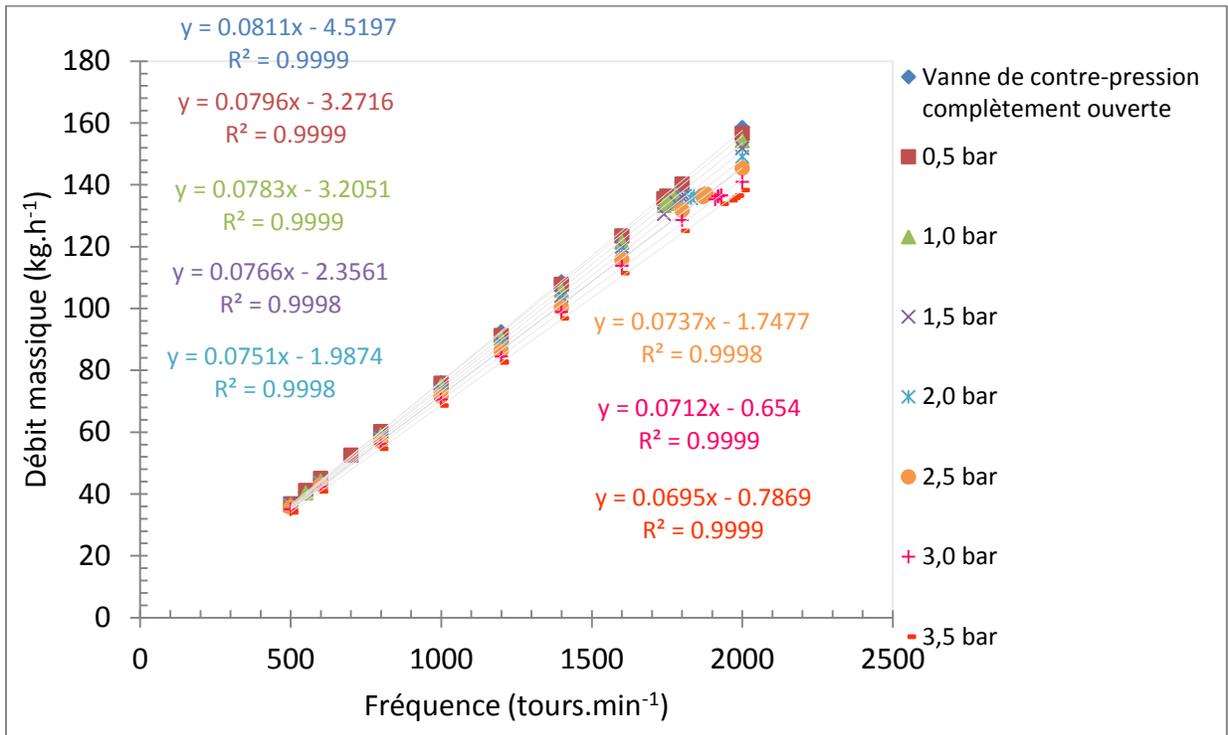


Figure II.6. Variation du débit d'écoulement en fonction de la fréquence de la pompe Quattroflow-150 S pour différentes pressions transmembranaires appliquées.

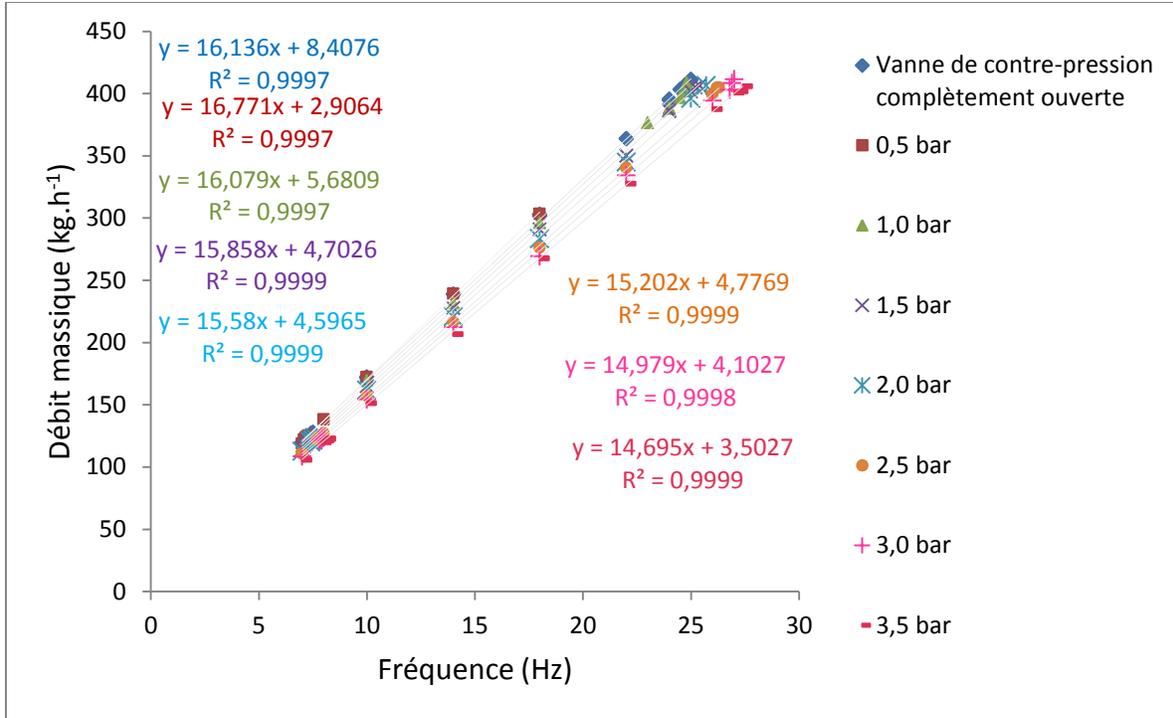


Figure II.7. Variation du débit d'écoulement en fonction de la fréquence de la pompe Quattroflow-1200 S pour différentes pressions transmembranaires appliquées.

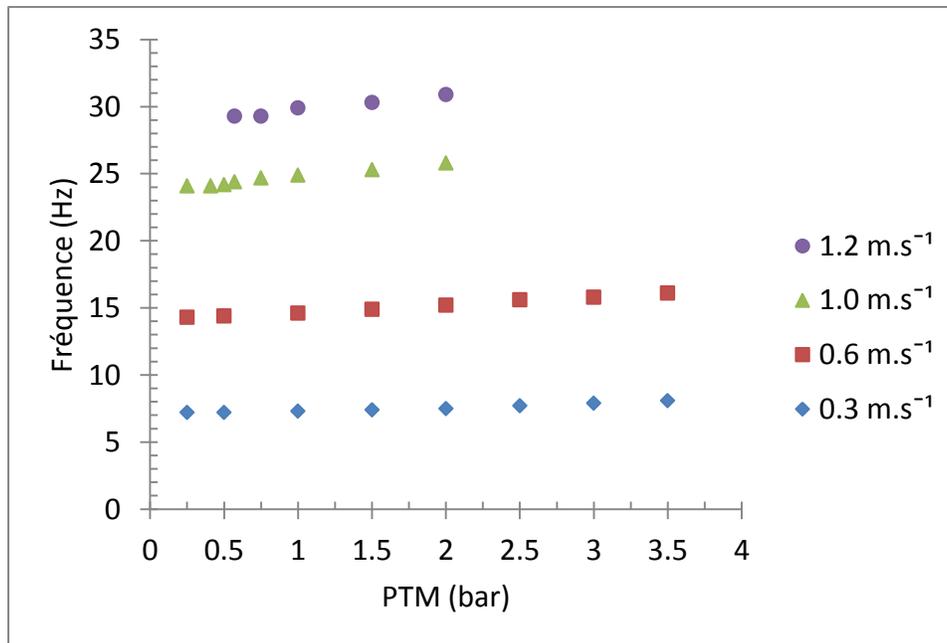


Figure II.8. Choix de la fréquence de la pompe Quattroflow-1200 S en fonction de la pression transmembranaire appliquée pour les différentes valeurs de la vitesse tangentielle utilisées au cours des essais d'UF des EPS.

3.4. Conditions opératoires de conditionnement et de nettoyage de la membrane, et des essais de filtration

3.4.1. Conditionnement de la membrane

Les coupons de membrane sont conditionnés avant leur première utilisation afin d'éliminer les conservateurs et produits chimiques (glycérine et métabisulfite de sodium) et d'obtenir une perméabilité à l'eau de référence. Ces agents sont ajoutés par le fabricant des membranes pour permettre de conserver les propriétés des membranes, maintenir une bonne mouillabilité et préserver les membranes des risques de biodégradabilité lors du transport et/ou du stockage. Ainsi, lors du conditionnement, la membrane est d'abord trempée pendant une nuit (15 h) dans de l'eau déionisée. Ensuite de l'eau déionisée est filtrée à travers la membrane à une pression transmembranaire PTM de 0,5 bar et à une vitesse tangentielle de 1 m.s^{-1} jusqu'à ce que 200 mL de perméat soient récupérés. Par la suite, la membrane subit une séquence de nettoyage acide-base (procédure similaire à celle adoptée pour le nettoyage). Enfin, la membrane est compactée à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ et sous une PTM de 2 bar jusqu'à ce que le flux de perméat soit stabilisé. La valeur de 2 bar est choisie puisque les pressions maximales qui seront testées lors des essais de filtration n'excéderont jamais cette valeur.

La perméabilité à l'eau est ensuite mesurée et utilisée comme référence pour la membrane vierge. Lors de la filtration d'un solvant pur comme l'eau déionisée, le flux de perméat (J_{w0} , $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) est proportionnel à la PTM appliquée (bar) (Equation II.7), le coefficient de proportionnalité représentant la perméabilité hydraulique Lp_{w0} ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$) de la membrane.

$$J_{w0} = Lp_{w0} \times PTM \quad (\text{II.7})$$

Le flux de perméat est suivi au cours du temps lors de la filtration d'eau déionisée où le rétentat et le perméat sont tous deux réintroduits dans le bac d'alimentation. La PTM est d'abord augmentée progressivement jusqu'à 2 bar puis elle est diminuée de 0,5 bar en 0,5 bar en laissant le flux de perméat se stabiliser à chaque PTM avant de passer à la pression immédiatement inférieure. La perméabilité représente la pente de la droite (J_{w0} en fonction de la PTM) passant par l'origine. Il est à noter que la perméabilité hydraulique est également déterminée avant chaque essai de filtration, après rinçage à l'eau déionisée et après le nettoyage chimique. Ces

mesures de perméabilité se font toujours dans les mêmes conditions opératoires de vitesse tangentielle et de température que pour la filtration des solutions d'EPS.

La perméabilité hydraulique de la membrane est fonction de la température. Pour tenir compte du changement de la viscosité dynamique de l'eau avec la température, les flux de perméat mesurés à la température de l'expérience sont corrigés à une température de référence, d'après l'équation suivante :

$$J_{w,Tréf} = J_{w,T} \times \frac{\eta_T}{\eta_{Tréf}} \quad (\text{II.8})$$

avec

$J_{w,T}$, flux de perméat à la température T de l'expérience ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)

$J_{w,Tréf}$, flux de perméat corrigé à la température de référence ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)

η_T , viscosité de l'eau à la température T de l'expérience (Pa.s)

$\eta_{Tréf}$, viscosité de l'eau à la température de référence (Pa.s).

Dans le cas des essais effectués à une température voisine de 20 °C ($T_{réf}$), les facteurs de correction (TCF), donnés par le fournisseur des membranes Synder ont été utilisés pour corriger les flux à l'eau.

Pour les essais effectués à une température voisine de 40 °C ($T_{réf}$), la viscosité à la température T de l'expérience a été calculée suivant l'équation II.9 obtenue à partir du tracé de la viscosité dynamique de l'eau en fonction de la température (entre 0 et 90 °C), les valeurs de viscosités et de températures ayant été adoptées du Catalogue-formulaire Serseg N°79.

$$\eta_T = 8,251 \times 10^{-15} \times T^6 - 2,763 \times 10^{-12} \times T^5 + 3,874 \times 10^{-10} \times T^4 - 3,057 \times 10^{-8} \times T^3 + 1,587 \times 10^{-6} \times T^2 - 6,148 \times 10^{-5} \times T + 1,790 \times 10^{-3} \quad (\text{II.9})$$

avec T, la température de l'expérience.

3.4.2. Conditions opératoires des filtrations des solutions d'EPS

3.4.2.1. Conditions générales de filtration

Toutes les expériences d'ultrafiltration (UF) sont réalisées en mode batch avec une recirculation totale à la fois du rétentat et du perméat vers le réservoir d'alimentation afin de

maintenir une concentration constante en EPS (facteur de réduction volumique $FRV = 1$). Tous les essais sont effectués avec une veine liquide d'épaisseur 1,5 mm, équipée d'un espaceur, à l'exception d'un seul essai où une veine liquide de 0,5 mm est utilisée. Un échantillon de perméat, prélevé directement à la sortie du tuyau de perméat, ainsi qu'un échantillon prélevé dans le bac d'alimentation, sont recueillis à chaque palier de pression lorsque le flux de perméat est stabilisé. Ces échantillons collectés sont conservés au congélateur, à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jusqu'aux analyses ultérieures. Les échantillons prélevés dans le bac d'alimentation permettent de s'assurer que la concentration en sucres reste relativement constante au cours de la filtration. Les conditions opératoires des différents essais sont récapitulées dans le tableau IV.3 du chapitre IV.

3.4.2.2. Détermination des flux limite et critique

L'étude de la filtrabilité des solutions d'EPS menée au chapitre IV a été effectuée en établissant les courbes J-PTM (flux de perméation-pression transmembranaire) jusqu'à l'obtention du flux limite, en faisant varier trois paramètres opératoires : la vitesse tangentielle du fluide (de $0,3$ à $1,2\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), la concentration en EPS de la solution filtrée (de $0,10$ à $1,06\text{ kg GlcEq}\cdot\text{m}^{-3}$) et la température (20 et $40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Par ailleurs, les résistances réversible et irréversible de colmatage ont été calculées pour tous les essais de filtration et le flux critique pour l'irréversibilité a été estimé pour une concentration en EPS de $0,16\text{ kg GlcEq}\cdot\text{m}^{-3}$ et une vitesse de $1\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ en présence d'espaceur.

Etablissement des courbes de J-PTM

Pour établir les courbes J-PTM, on augmente progressivement la PTM à partir de la valeur minimale réglable sur le pilote. Pour chaque valeur de PTM, l'évolution du flux de perméat est suivie dans le temps jusqu'à l'établissement du régime permanent) avant de réaugmenter la PTM jusqu'à ce que le flux limite soit atteint. Chaque filtration est arrêtée dès que J_{lim} est atteint pour ne pas laisser la membrane fonctionner longtemps dans des conditions fortement colmatantes.

La figure II.9 illustre l'allure de la courbe J-PTM lors de la filtration d'une solution donnée telle qu'une solution d'EPS dans notre cas. Chaque point sur la courbe J-PTM représente la valeur du flux stabilisé à une PTM donnée. Une augmentation de la PTM induit dans un

premier temps une augmentation linéaire du flux de perméation stabilisé (J). Ensuite, une inflexion de la courbe se produit avant que, au-delà d'une certaine pression, le flux ne varie plus.

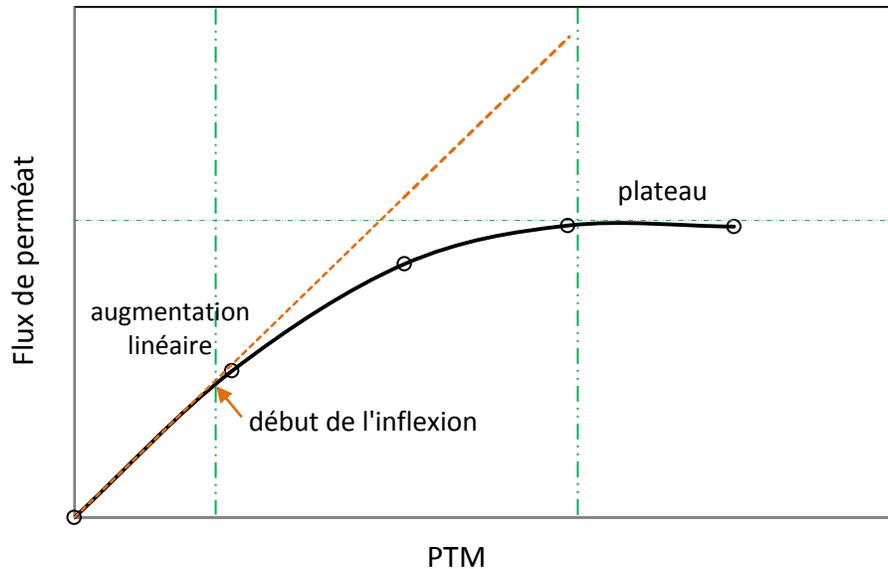


Figure II.9. Evolution du flux de perméation en fonction de la PTM appliquée, pour une solution réelle.

Flux critique pour l'irréversibilité

Le flux critique pour l'irréversibilité J_{ci} est estimé pour une concentration initiale en EPS et une vitesse donnée d'après la méthode de l'onde rectangulaire ou « square wave » notamment utilisée par Espinasse *et al.* (2008, 2002).

La méthode consiste à alterner des échelons de pression croissants (U pour *Upper step*) et décroissants (L pour *Lower step*) et à suivre continuellement la variation des flux de perméation stabilisés. Elle permet de déterminer la pression à partir de laquelle un colmatage de type irréversible apparaît. Comme expliqué en bibliographie (chapitre I, § 5.3.2), la réversibilité du colmatage est à entendre ici au sens de « la fraction du colmatage qui disparaît lorsqu'on rediminue la pression transmembranaire ». Le flux critique est atteint lorsque le retour à une pression inférieure ne permet pas de revenir au précédent flux de perméat. Les méthodes de calcul des résistances irréversibles et de l'estimation du flux critique J_{ci} seront développées au chapitre IV.

La méthode de l'onde rectangulaire est appliquée pour la solution S_B ($0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), le perméat et le rétentat étant recirculés dans le bac d'alimentation ($FRV = 1$) avec une vitesse tangentielle de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$ et à $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.2.3. Calcul des résistances hydrauliques

L'eau déionisée est filtrée avant chaque essai de filtration afin d'estimer la perméabilité hydraulique Lp_{w0} et la résistance hydraulique R_m de la membrane propre :

$$J_{w0} = \frac{PTM}{\eta \times R_m} = Lp_{w0} \times PTM \quad (\text{II.10})$$

avec J_{w0} , le flux de perméat à l'eau déionisée (m.s^{-1}), η la viscosité dynamique du perméat (eau pure) à la température de l'UF (Pa.s) et R_m la résistance hydraulique de la membrane (m^{-1}) ; PTM la pression transmembranaire (Pa) et Lp_{w0} la perméabilité hydraulique de la membrane ($\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$).

Au cours de la filtration d'une solution d'EPS, des résistances supplémentaires peuvent apparaître suivant le type de colmatage (réversible et irréversible). Le modèle de résistances en série permet de quantifier ce colmatage et de rendre compte de la diminution du flux de perméat à travers la membrane. Les différentes résistances sont reliées au flux de perméation stabilisé J et à la PTM par la relation suivante :

$$J = \frac{PTM}{\eta \times R_t} = \frac{PTM}{\eta \times (R_m + R_f)} = \frac{PTM}{\eta \times (R_m + R_{rév} + R_{irrév})} \quad (\text{II.11})$$

avec :

η la viscosité dynamique du perméat (assimilé à de l'eau pure) à la température de l'UF (Pa.s)

R_t la résistance totale à l'écoulement (m^{-1})

R_f la résistance due au colmatage global (m^{-1})

$R_{rév}$ la résistance due au colmatage réversible (éliminé par simple rinçage à l'eau) (m^{-1})

$R_{irrév}$ la résistance due au colmatage irréversible (nécessitant une étape de nettoyage chimique pour être éliminée) (m^{-1})

La résistance totale à l'écoulement ($R_t = R_m + R_f$) est déterminée à partir du flux de perméation stabilisé (J) obtenu en fin de filtration à partir de l'équation (II.11). La résistance due au colmatage (R_f) est la somme de la résistance due au colmatage réversible ($R_{rév}$) et celle due au colmatage irréversible ($R_{irrév}$) :

$$R_f = R_{rév} + R_{irrév} \quad (\text{II.12})$$

Afin d'évaluer les valeurs de $R_{rév}$ et de $R_{irrév}$, on procède à la suite de la filtration à un simple rinçage de la membrane à l'eau pure. La part réversible du colmatage est alors éliminée et il ne reste que la composante irréversible du colmatage qui est déterminée par une mesure du flux de perméation à l'eau pure ($J_{w,rincée}$) selon l'équation suivante, R_m étant connue :

$$J_{w,rincée} = \frac{PTM}{\eta \times (R_m + R_{irrév})} \quad (\text{II.13})$$

La résistance $R_{rév}$ est enfin déterminée comme la différence entre R_f et $R_{irrév}$:

$$R_{rév} = R_f - R_{irrév} \quad (\text{II.14})$$

Les différentes étapes permettant de déterminer les résistances hydrauliques sont récapitulées sur la figure II.10.

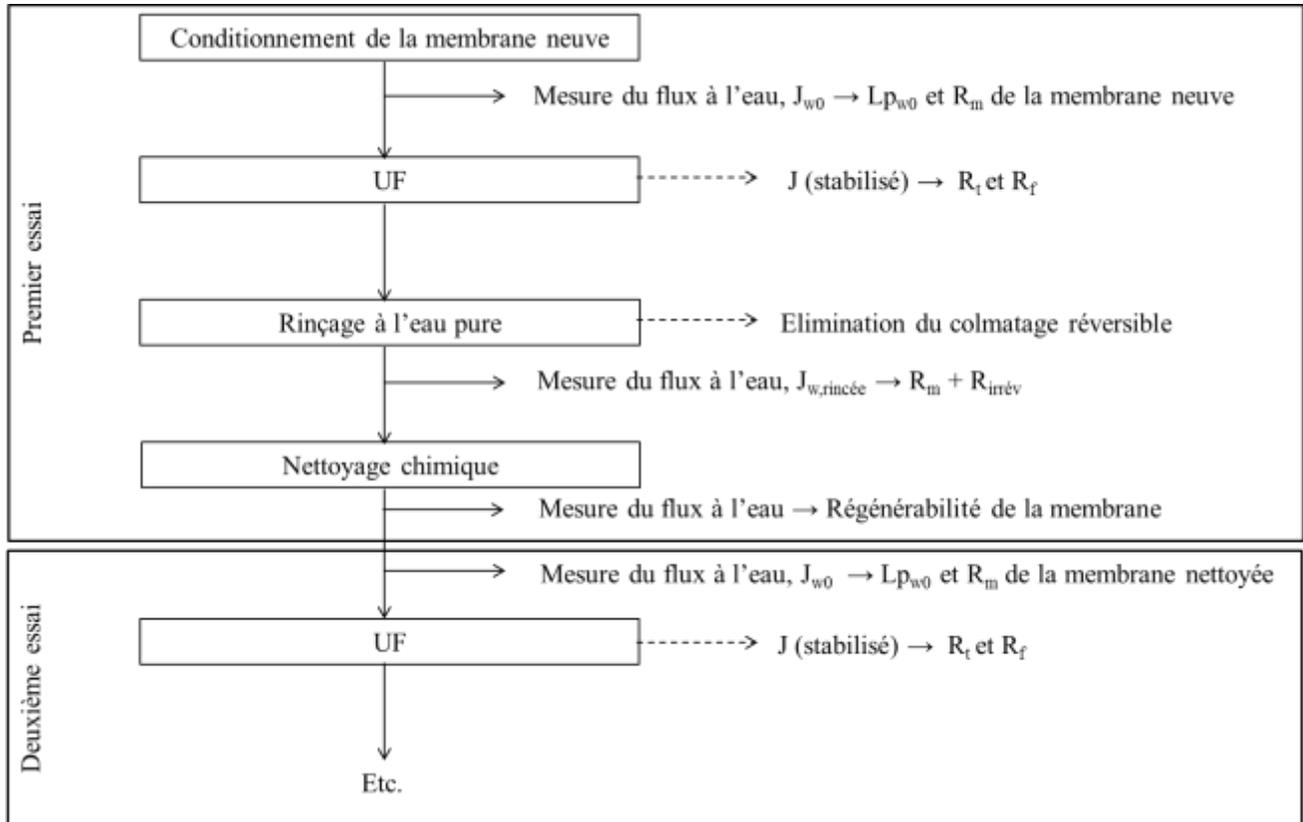


Figure II.10. Principe de détermination des différentes résistances hydrauliques de colmatage.

3.4.2.4. Calcul du taux de rétention

Le taux de rétention d'un soluté indique la proportion qu'a la membrane à retenir de ce soluté. Expérimentalement, on ne peut accéder qu'à la concentration de l'espèce à retenir dans la solution d'alimentation du module mais pas à sa concentration au voisinage de la surface membranaire, et on ne peut donc déterminer que le taux de rétention observé du soluté. Pour cela, un échantillon de perméat, prélevé directement à la sortie du tuyau de perméat, ainsi qu'un échantillon prélevé dans le bac d'alimentation (FRV = 1), sont recueillis à chaque palier de pression lorsque le flux de perméat est stabilisé. Le taux de rétention observé de sucres est alors calculé selon l'équation :

$$TR_{obs} = \frac{C_A - C_p}{C_A} = 1 - \frac{C_p}{C_A} \quad (\text{II.15})$$

avec C_A (kg GlcEq.m⁻³), la concentration en sucres dans le bac d'alimentation (FRV = 1) et C_p (kg GlcEq.m⁻³), la concentration en sucres dans le perméat.

3.4.3. Nettoyage de la membrane

3.4.3.1. Nettoyage physique

Après chaque expérience de filtration, la membrane est systématiquement rincée avec de l'eau déionisée (6 L) à 27 - 29 °C en circuit ouvert (perméat et rétentat évacués) et avec la vanne de contre-pression complètement ouverte. Ce rinçage sert à éliminer tout le colmatage réversible de la surface de la membrane. Il se fait à la même vitesse que celle utilisée durant la filtration.

3.4.3.2. Nettoyage en place NEP (nettoyage chimique)

Les solutions de NEP sont fournies par la société Ecolab (France). La membrane est nettoyée avec 2 L (1 × volume d'alimentation) de la solution de nettoyage appropriée dans le bac d'alimentation. Le NEP est réalisé en mode de recyclage total (recirculation du rétentat et du perméat ; FRV = 1) à 49 °C, sous une PTM de 0,5 bar et une vitesse tangentielle de 1 m.s⁻¹. Différents détergents (P3-Ultrasil 53 avec P3-Ultrasil 62A, P3-Ultrasil 75 et P3-Ultrasil 110) ont été testés dans différentes conditions opératoires (voir les protocoles suivis et les résultats au chapitre IV).

Immédiatement après chaque NEP, le pilote est soigneusement rincé avec de l'eau déionisée. L'efficacité du nettoyage est évaluée à travers la récupération de la perméabilité à l'eau par comparaison à celle initialement obtenue avant filtration des solutions d'EPS. La propreté hydraulique est considérée comme atteinte lorsqu'au moins 90 % de la perméabilité initiale à l'eau est récupérée.

4. Autopsie des membranes colmatées par FTIR-ATR et AFM

Les analyses par autopsie membranaire ont été effectuées, pour la FTIR-ATR à l'ISCR UMR 6226 à Rennes dans l'équipe du professeur Murielle Rabiller-Baudry, et pour l'AFM par Benoît Teychené du laboratoire IC2MP, UMR 7285 à Poitiers.

4.1. Préparation de la membrane autopsiée

Les analyses par autopsie membranaire ont été effectuées dans le but de caractériser le colmatage irréversible formé lors de la filtration des solutions d'EPS dans des conditions colmatantes, c'est-à-dire au-delà du flux critique. Ainsi, la membrane MQ₂ conditionnée qui a

subi l'ensemble des essais de filtrations 1 à 11 (voir tableau IV.3 du chapitre IV) a été nettoyée après les essais de 1 à 10, et simplement rincée à l'eau déionisée après l'essai 11 (solution d'EPS (S_B) à $0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ et à PTM de 0,45 bar) pour éliminer la part réversible du colmatage. Ensuite, la membrane a été démontée et découpée dans le sens de la longueur en 2 parties égales ; la partie (a) du côté de l'entrée du fluide d'alimentation et de la sortie du rétentat et la partie (b) du côté de la sortie du perméat (Figure II.11). Puis, les deux parties ont été séchées au dessiccateur avant leur envoi pour analyses, la partie (a) par FTIR-ATR et la partie (b) par AFM. Un organigramme récapitulant ces étapes est présenté sur la figure II.12.

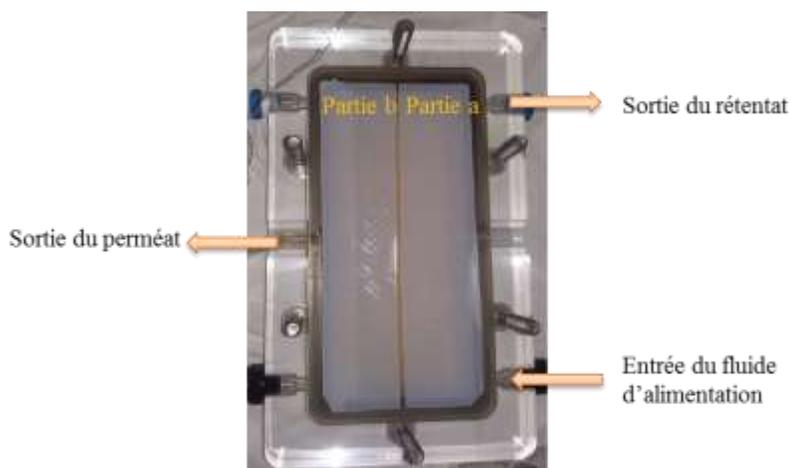


Figure II.11. Parties (a) et (b) de la membrane MQ_2 colmatée puis rincée à l'eau déionisée utilisées pour les analyses FTIR-ATR et AFM respectivement.

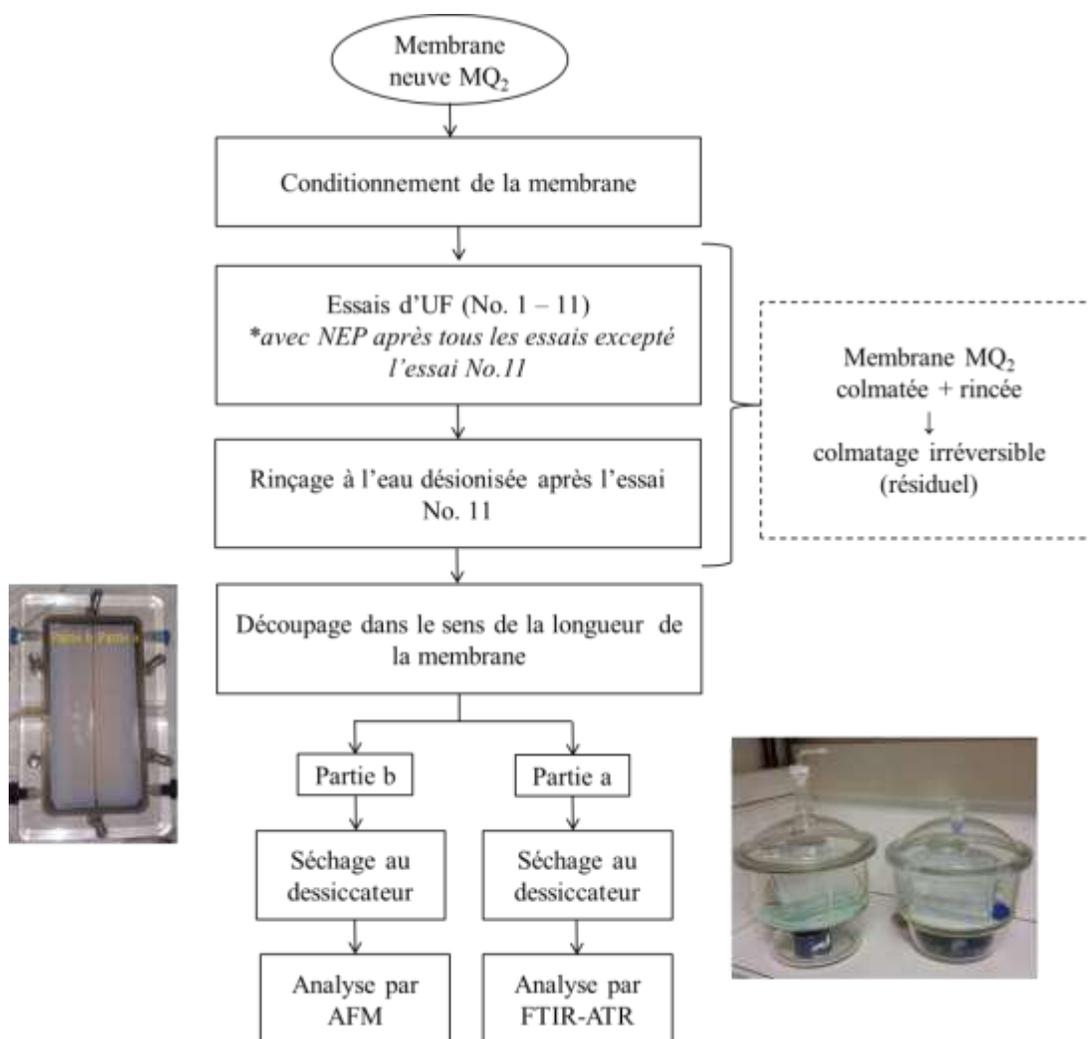


Figure II.12. Les différentes étapes subies par la membrane MQ₂ avant analyse par autopsie.

4.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR)

4.2.1. Principe de fonctionnement de la méthode et matériel utilisé

La technique FTIR-ATR est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques de liaisons chimiques polaires ou polarisables, d'identifier et de quantifier les groupes fonctionnels présents dans le matériau. C'est le cas des liaisons C-O des EPS par exemple.

Pour analyser une membrane, celle-ci est écrasée du côté de sa couche active, sur un cristal en séléniure de zinc, ZnSe. La pression exercée sur l'échantillon par le biais de la presse

permet d'augmenter le contact entre celui-ci et le cristal et d'augmenter ainsi l'intensité du signal. Le spectre ATR-FTIR est le résultat de l'interaction entre la surface de la membrane et le faisceau infrarouge qui a préalablement traversé le cristal, taillé avec un angle d'incidence connu avant d'être réfléchi par la surface de l'échantillon. Néanmoins comme une partie du faisceau IR incident pénètre dans la membrane et interagit avec les différentes couches rencontrées (couche colmatante, peau active puis couche intermédiaire de la membrane), des ondes évanescentes produites par ces interactions modifient le signal réfléchi par la surface. Par conséquent, le spectre obtenu est la superposition des spectres des 3 couches traversées (voir la figure II.13).

La profondeur de pénétration du faisceau IR dans le matériau ainsi que le nombre de réflexion dépendent en particulier de la taille du cristal et de sa composition (indice de réfraction), ainsi que de l'angle d'incidence.

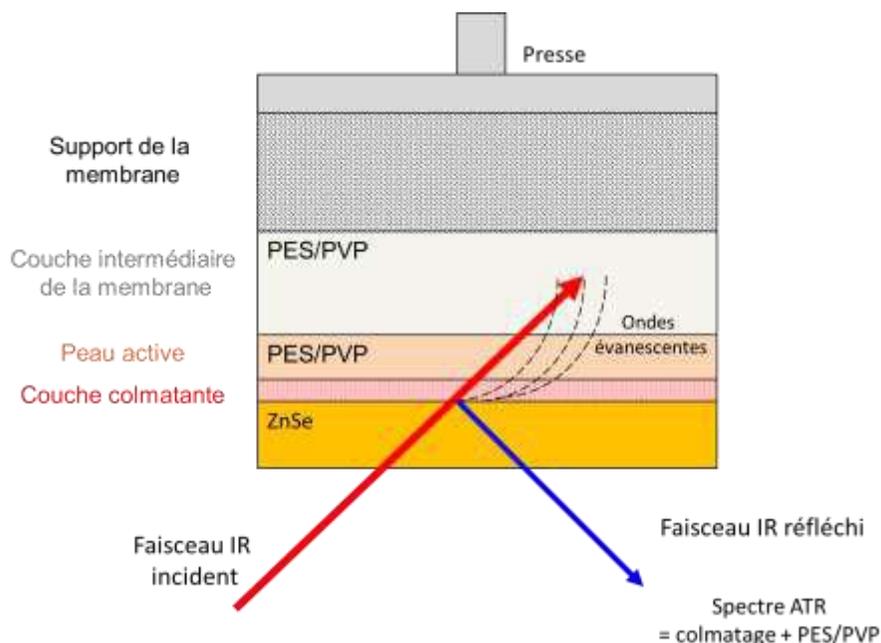


Figure II.13. Trajet du faisceau IR et principe de la FTIR-ATR.

Les spectres FTIR-ATR sont enregistrés avec un spectromètre Jasco FT/IR 4100 disposant de l'accessoire ATR MIRacle™ (PIKE) à réflexion unique (Figure II.14). Ce dernier est équipé d'un cristal en ZnSe de 1,8 mm de diamètre, taillé à 45°. Les conditions d'acquisition sont les suivantes : 128 scans effectués dans la gamme de nombre d'onde 3700 – 600 cm^{-1} , avec une résolution de 2 cm^{-1} .



Figure II.14. Photos de l'accessoire MIRacle™ (PIKE) sur le spectromètre Jasco 4100 FT/IR.

4.2.2. Les différents spectres effectués FTIR

En ce qui concerne l'identification des colmatants sur la membrane MQ₂ colmatée lors de la filtration de la solution d'EPS, la démarche est basée sur la comparaison des spectres FTIR-ATR obtenus sur la membrane avec des spectres établis sur :

des composés "purs" pris comme étalons, disponibles sous la forme de poudres plus ou moins finement broyées, afin d'identifier les bandes des colmatants potentiels apparaissant sur les spectres effectués sur la membrane colmatée. Ces étalons solides des sels entrant dans la composition du milieu BBMm (K₂HPO₄, KH₂PO₄, FeSO₄, MgSO₄, NaNO₃, NaHCO₃ et Na₂EDTA), du métabisulfite de sodium (agent conservateur de la membrane) ainsi qu'un lot d'EPS lyophilisés de *P. cruentum* obtenus à partir de la solution S_{Bc} décongelée, centrifugée (12000 g, 15 min, 4 °C) pour éliminer les précipités d'EPS, puis dialysée sous agitation contre de l'eau déionisée pendant 45,5 h à 4 °C afin d'éliminer les sels. Le dialysat avait une conductivité de 176 μS.cm⁻¹ et contenait 1,29 kg GlcEq.m⁻³ de polysaccharides et 0,054 kg BSAEq.m⁻³ de protéines. Ce dialysat a ensuite été lyophilisé pendant 20 h à -20 °C puis pendant 28 h à -42 °C à des pressions respectives de 1 mbar et 0,1 mbar (Alpha 1-2-LD plus, Fisher Scientific).

- *des coupons de membranes qui ont été immergés dans des solutions aqueuses préparées à partir des composés « purs »*. Pour détecter la présence d'EPS sur la membrane MQ₂ colmatée et pour estimer les quantités déposées, des coupons de membrane MQ ont été immergés dans des

solutions plus ou moins concentrées préparées à partir du lot d'EPS lyophilisés (voir chapitre V, § 2.2.3.1).

- *des coupons de membrane vierge pour servir de référence* à l'analyse des spectres effectués sur la membrane MQ₂ colmatée.

4.3. Microscopie à force atomique (AFM)

Les analyses AFM ont été effectuées avec un appareil Agilent 5500 (Scientec, France). Des morceaux de membranes séchées ont été collés sur une plaque de verre pour analyse. Les images ont été effectuées en mode acoustique avec une pointe ACT (AppNano, USA). La pointe est en silicium avec une forme pyramidale. Elle possède une force constante de l'ordre de 37 N.m⁻¹ et une fréquence de résonance de 300 kHz (dans l'air). La taille de fenêtre pour les images est de 10 µm avec une résolution de 512 pixels par ligne.

Les images de phase sont obtenues par la mesure du déphasage des vibrations de la pointe durant l'analyse de la surface. Elles permettent un contraste plus important qu'en mode acoustique et sont liées aux interactions pouvant avoir lieu entre la pointe et la surface analysée.

De plus, la rugosité de la surface de la membrane (R_a) neuve et colmatée a été calculée avec le logiciel Picoview comme étant l'écart-type des valeurs de pixel à partir du plan moyen \bar{Z} :

$$R_a = \sqrt{\frac{\sum_{\substack{x=1,N \\ y=1,M}} (Z_{x,y} - \bar{Z}_{x,y})^2}{(N-1)(M-1)}} \quad (\text{II.16})$$

Conclusion

Ce chapitre a présenté tout d'abord les méthodes de culture de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et la montée en échelle de cette culture afin de disposer de gros volumes pour la filtration membranaire. Les premiers résultats de culture et les essais de séparation des cellules et du milieu de culture contenant les EPS solubles seront présentés dans le chapitre III. Dans ce dernier, nous expliquerons la stratégie expérimentale suivie et la raison pour laquelle le travail a été réorienté vers la filtration des solutions d'EPS solubles de la microalgue *Porphyridium cruentum*. Ainsi dans la suite de ce chapitre II, nous avons décrit la méthode de préparation des solutions d'EPS de *P. cruentum* et les protocoles de filtration membranaire de ces solutions, ainsi que les méthodes de caractérisation du colmatage mis en place lors des filtrations (calcul des résistances hydrauliques et autopsie membranaire). Les résultats de l'étude paramétrique de la filtrabilité des solutions d'EPS et des résistances hydrauliques seront présentés dans le chapitre IV de ce manuscrit. Ceux de l'autopsie membranaire le seront dans le chapitre V.

**Chapitre III. Stratégie expérimentale et
premiers essais sur la cyanobactérie *Arthrospira
platensis***

1. Positionnement du sujet et démarche expérimentale

Ce chapitre présente la stratégie expérimentale suivie au cours de la thèse. Il décrit les premiers essais réalisés sur la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, les problèmes rencontrés et les raisons pour lesquelles l'objectif initial de la thèse a été réorienté vers la filtrabilité des solutions d'EPS d'un autre microorganisme photosynthétique, la microalgue rouge *Porphyridium cruentum*.

Le cadre de la thèse est la récupération des polysaccharides solubles issus de surnageants de culture de microalgues ou de cyanobactéries par filtration sur une membrane organique. Sur le plan scientifique, le travail est orienté vers la caractérisation du colmatage et la compréhension de la façon dont il se met en place.

La démarche expérimentale mise en œuvre consiste tout d'abord à caractériser la filtrabilité des surnageants. Celle-ci est évaluée en termes de flux de perméation et de perméabilité, de taux de rétention des EPS (polysaccharides) et de nettoyabilité de la membrane. Les flux et les perméabilités sont caractérisés en établissant des courbes flux-pression transmembranaire en mode de recyclage total dans différentes conditions de vitesse tangentielle, de concentration en EPS et de température. Par ailleurs, le colmatage de la membrane est caractérisé en calculant les différentes résistances hydrauliques associées au colmatage (colmatage total et fractions réversible et irréversible), puis en estimant le flux critique dans un jeu de conditions opératoires particulières (une concentration donnée en EPS et des conditions hydrodynamiques limitant le colmatage). Enfin, la mise en place du colmatage est étudiée par le biais de l'autopsie d'une membrane colmatée par analyses FTIR-ATR et AFM.

Le sujet initial portait sur la récupération des EPS solubles d'*Arthrospira platensis*. Cette cyanobactérie est en effet un des microorganismes photosynthétiques les plus exploités dans le monde et son bioraffinage est actuellement un enjeu important à l'échelle mondiale. Elle est par ailleurs connue pour produire des EPS en quantité importante. Une culture de la souche *A. platensis* a été effectuée à l'échelle pilote sous une intensité lumineuse relativement élevée afin de favoriser la production d'EPS et d'obtenir par la suite un milieu de culture riche en EPS solubles en quantité suffisante pour étudier sa filtration sur membrane. La récupération de ces EPS nécessite une séparation préalable des cellules et du milieu de culture, souvent appelée « récolte de la biomasse ». Dans ce contexte, différentes méthodes de séparation, telles que la

centrifugation et la filtration sur tamis ou toile, ont été testées dans le but de trouver une méthode rapide et efficace permettant l'obtention d'un milieu « presque totalement » dépourvu de cellules. Il est à noter que dans l'optique d'une production industrielle, il est nécessaire que la méthode de séparation soit peu coûteuse et peu énergétique, la récolte de la biomasse étant connue comme étant une des étapes les plus onéreuses dans le bioraffinage des microalgues.

Cependant, les différents essais que nous avons réalisés ont montré que la concentration en EPS solubles dans le surnageant récupéré après séparation des cellules était très faible, de l'ordre de $0,04 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$, la majorité des EPS d'*A. platensis* restant attachée aux cellules. La récupération à des fins de production industrielle des EPS d'*A. platensis* aurait alors nécessité un détachement et une solubilisation préalables des EPS liés, par exemple en suivant ou en adaptant le protocole de dégommeage à chaud proposé par Filali Mouhim *et al.* (1993). La mise en place d'un tel protocole sortant du cadre de cette thèse, le travail a donc été réorienté vers la récupération des EPS d'un autre microorganisme. Le choix s'est porté sur la microalgue rouge *P. cruentum*, qui libère des quantités d'EPS solubles plus importantes qu'*A. platensis*.

Dans la suite de ce chapitre, seront présentés les essais effectués sur *A. platensis* avant l'abandon de cette souche. Nous décrirons le suivi de la culture (évolution au cours du temps de la concentration en biomasse et la teneur en pigments) ainsi que les tests de séparation du milieu de culture et des cellules.

Dans le chapitre IV, nous décrirons l'étude paramétrique menée dans la suite de la thèse sur la filtrabilité des solutions d'EPS solubles de *P. cruentum*. L'étude a été effectuée à l'échelle du laboratoire sur une membrane organique plane en PES d'un seuil de coupure de 50 kDa en présence d'un espaceur côté alimentation, et ce dans différentes conditions opératoires. Il est à noter que la culture de *P. cruentum* a été réalisée sur la plateforme Algosolis (Saint-Nazaire, France) qui a assuré la fourniture de matière première (surnageants de culture) pour les essais de filtration membranaire. La caractérisation du colmatage irréversible par autopsie membranaire sera développée dans le chapitre V.

2. Premiers essais de récupération d'EPS solubles d'*Arthrospira platensis*

2.1. Suivi de la culture dans le PBR HectoR

Comme cela a été énoncé dans la chapitre I de la synthèse bibliographique (§ 3.2.2.1), l'intensité de la lumière incidente est un point de pression sur le métabolisme des EPS, et l'augmentation de cette intensité, en augmentant la vitesse d'absorption des photons par les cellules, favorise la production d'EPS. Pour cette raison, une culture de la souche *A. platensis* a été effectuée sous un flux lumineux incident relativement élevé de $332 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (flux maximal disponible sur ce pilote). La culture a été effectuée à l'échelle pilote dans le PBR HectoR d'un volume de 130 L, pour obtenir des volumes de solutions d'EPS solubles en quantité suffisante pour pouvoir effectuer les essais de séparation membranaire.

Un mode de culture dit « en batchs répétés » a été adopté avec un taux de renouvellement de 80 % tous les 14 jours. En d'autres termes, tous les 14 jours, 80 % du volume du PBR sont récoltés et du milieu frais est ajouté pour réajuster le niveau du PBR. Le suivi des cultures a été effectué au moyen de prélèvements pour la mesure en routine (toutes les 24 à 48 h) des matières en suspension (biomasse) et des pigments (chlorophylle a et caroténoïdes).

La figure III.1 représente l'évolution de la concentration en biomasse totale d'*A. platensis* lors des batchs répétés successifs, mesurée avant chaque renouvellement de la culture. On voit que les concentrations en biomasse évoluent linéairement avec le temps et atteignent une valeur d'environ 3 kg.m^{-3} au bout de 14 jours environ. La lumière est le facteur limitant la croissance cellulaire (Pruvost et Cornet, 2012). En effet, dans le cas d'une cyanobactérie comme *A. platensis* ayant la même chaîne de transporteur d'électrons impliquée dans la photosynthèse et la respiration (contrairement aux microalgues), la respiration est inhibée par la lumière et la vitesse volumétrique maximale de croissance est atteinte (tout en restant constante) (González de la Vara et Gómez-Lojero, 1986).

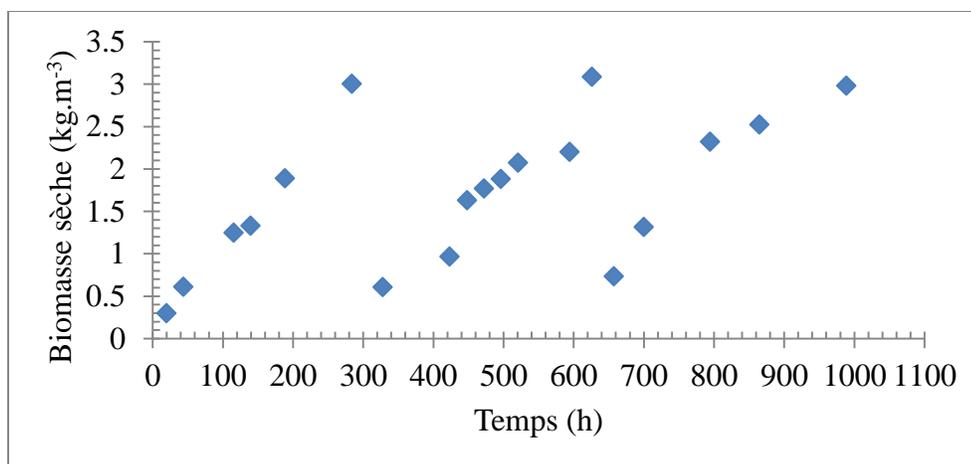


Figure III.1. Evolution de la concentration en biomasse (matières en suspension) en fonction du temps lors de la culture en mode « batchs répétés » de la cyanobactérie *A. platensis* ($332 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $\text{pH} = 9,5$, $T = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

La figure III.2 représente l'évolution de la teneur de la biomasse totale en pigments, chlorophylle a et caroténoïdes. On voit que la teneur en chlorophylle a (Chla) a augmenté assez nettement de 0,9 à 2,5 % durant le premier batch alors qu'elle n'a varié que très légèrement durant les deuxième et troisième batchs. De même, la teneur en caroténoïdes a augmenté de 0,3 à 0,7 % durant le premier batch, alors qu'elle est restée presque constante durant les deux derniers batchs. L'augmentation de la teneur en pigments se produit au début du premier batch, au moment où la culture est la plus diluée et où les cellules reçoivent la plus grande quantité de lumière. Cette augmentation initiale de la teneur pourrait donc être un phénomène d'adaptation de la culture à leurs nouvelles conditions d'éclairage.

La figure III.2 indique également l'évolution du rapport des densités optiques à 480 nm et à 665 nm (représentatives des teneurs en caroténoïdes et en chlorophylle a, respectivement) qui est un indicateur classique de stress environnemental des cultures de microalgues (stress nutritif et carence en azote en particulier, ou une forte illumination). Cet indicateur reste stable aux alentours de 0,9 (pour les 3 batchs), après une diminution initiale qui peut être attribuée là encore à l'acclimatation des cellules à leur nouvel environnement (culture diluée et donc quantité de lumière reçue par les cellules plus importante, renouvellement de leur milieu de culture). La stabilité de l'indicateur $\text{DO}_{480} / \text{DO}_{665}$ semble indiquer que les cultures n'ont pas été vraiment stressées. Cela semble raisonnable car le flux lumineux est modéré ($332 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et

les nutriments sont en concentrations élevées dans le milieu de culture et donc probablement non limitantes.

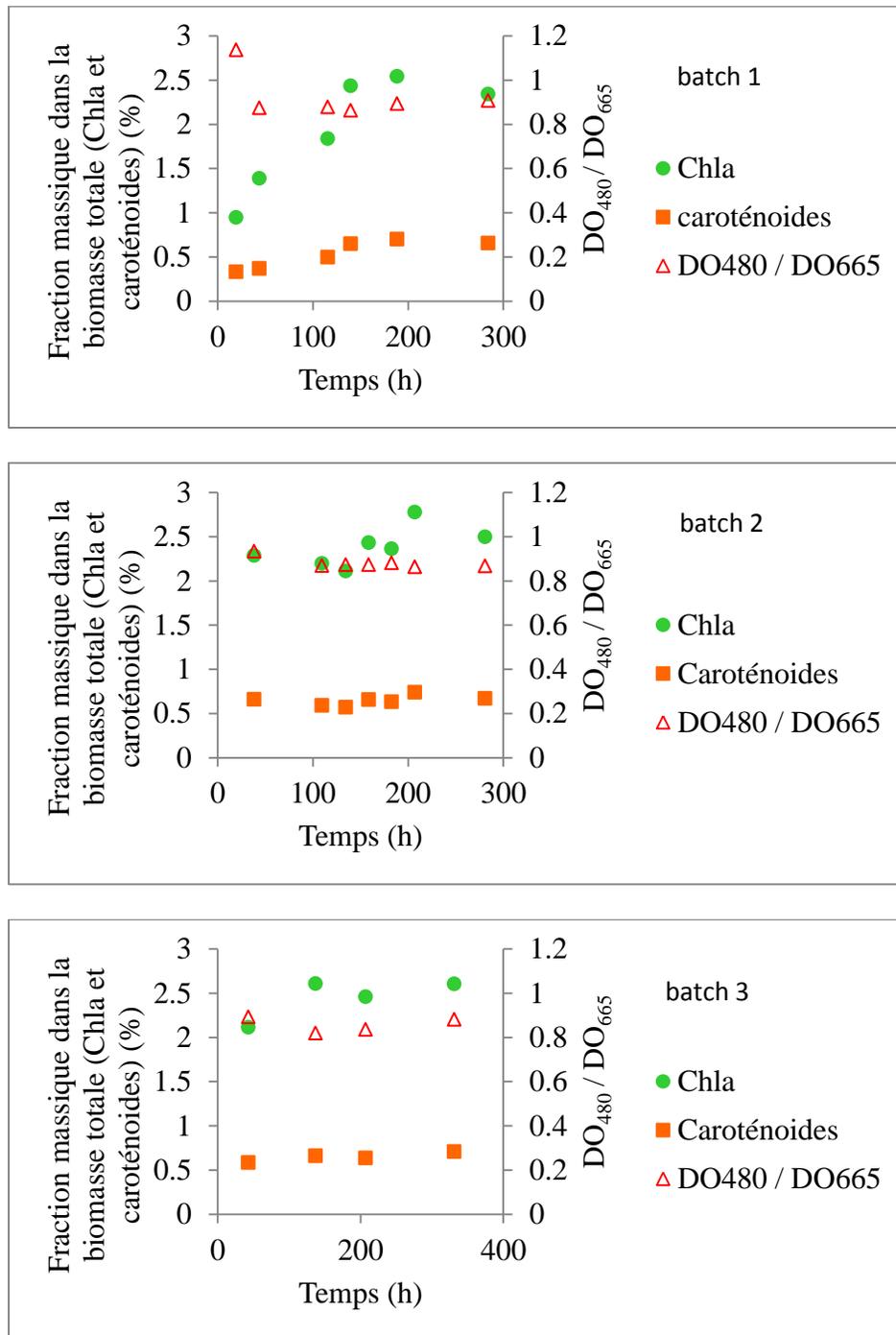


Figure III.2. Evolution de la fraction massique de pigments (chlorophylle a et caroténoïdes) et du rapport des densités optiques à 480 et 665 nm (ratio pigmentaire caroténoïdes / chlorophylle a) en fonction du temps lors de la culture en batchs répétés de la cyanobactérie *A. platensis* ($332 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH = 9,5, T = 35 °C).

2.2. Séparation des cellules du milieu de culture

Différents essais de séparation des cellules de leur milieu de culture ont été effectués sur les récoltes dans le but de récupérer des surnageants pratiquement exempts de cellules et contenant les EPS solubles. En effet, notre objectif était d'étudier la filtrabilité des surnageants en l'absence de cellules (ou de débris cellulaires) afin de mettre en évidence le rôle des composés dissous, et des EPS en particulier, dans la mise en place du colmatage.

D'abord, nous avons testé la *centrifugation*, l'une des techniques « conventionnelles » les plus utilisables pour la séparation des microalgues de leurs milieux de culture. Des essais de centrifugation (Sorvall RC6 Plus) à 10000 g ou à 12700 g pendant 30 minutes à 20 °C ont été effectués. Cependant, cette méthode s'est avérée très peu efficace, les surnageants étaient fortement colorés en vert (couleur de la chlorophylle a et donc présence de cellules). En effet, les cellules d'*A. platensis* ayant des vacuoles gazeuses (*cf.* Chapitre I, § 2.3.1), elles ont tendance à flotter ce qui rend la centrifugation peu adaptée à leur récolte. Il est à noter qu'on ne pouvait pas ajouter du chlorure de calcium (CaCl_2) pour flocculer les filaments d'*A. platensis* comme dans le cas du protocole de dosage de pigments (*cf.* Chapitre I, § 2.3.2), pour ne pas risquer de changer les propriétés des solutions d'EPS à filtrer. D'autre part, le fait d'alterner des décantations des cultures avec les centrifugations pourrait être efficace pour la séparation. Cependant, le temps de décantation élevé pourrait rendre le procédé pénalisant en termes opératoires pour de grands volumes de culture.

Des essais de *tamisage* ont été également testés. Dans le cas d'exploitations artisanales, la récolte se fait d'ailleurs souvent par filtration sur sable (Abdulqader *et al.*, 2000), ou sur toile ou sur tamis (D. Fox, 1986). Un tamisage sous vide a été effectué à l'aide d'un Büchner équipé d'un tamis en inox ayant des mailles de taille supérieure à 50 μm . Le tamisat récupéré était de couleur verte, ce qui indiquait la présence de cellules, et cette couleur persistait même après répétition du processus de tamisage. Une observation au microscope optique du tamisat a révélé la présence de nombreux filaments d'*A. platensis* d'environ 5 à 7 μm de diamètre et de 34 à 200 μm de longueur. La concentration des matières en suspension n'a pas été mesurée. Un autre test de tamisage sous pression atmosphérique à l'aide d'un tamis de 50 μm s'est avéré également inefficace, la concentration de matières en suspension dans le filtrat étant là de 0,14 g.L^{-1} .

Des essais de *tamissage suivi d'une centrifugation* ont également été effectués. Le tamisage était fait sous pression atmosphérique à l'aide d'un tamis en inox de 50 μm , et la centrifugation à l'aide de la centrifugeuse de type essoreuse (*Rousselet Robotel, type RA20 Vx*) équipée d'un panier de filtration muni de sacs de filtration à 1 ou 5 μm de taille de pores (Figure III.3, Tableau III.1). Différentes conditions opératoires, de vitesse de rotation et de pression d'alimentation de la centrifugeuse, ont été testées. Ces conditions ainsi que les résultats en termes de densité optique à 750 nm (turbidité), de concentration des matières en suspension et de celle des EPS dans les surnageants résultants, sont présentés dans le tableau III.1.



Figure III.3. Tamisage de la culture de la cyanobactérie *A. platensis* sur un tamis de maille 50 μm , suivi d'une centrifugation/filtration du tamisat.

Tableau III.1. Conditions opératoires de la centrifugation suivant le tamisage (50 μm) et caractéristiques des surnageants récupérés, en termes de densité optique à 750 nm, concentration des matières en suspension et concentration des EPS.

Taille de pores du sac de filtration (μm)	5	5	5	5	5	5	1
Pression d'alimentation de la centrifugeuse-essoreuse (bar)	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5
Vitesse de rotation (g)	1372	1372	701	701	253	253	1372
Densité optique du surnageant récupéré à 750 nm	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13	0,14	0,13
Concentration des matières en suspension dans le surnageant récupéré ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0,098	0,060	0,083	0,040	0,080	0,040	0,12
Concentration des EPS dans le surnageant récupéré ($\text{kg GlcEq}\cdot\text{m}^{-3}$)	0,036	0,041	0,036	0,043	0,032	0,035	0,036

D'après les résultats de la concentration de matières en suspension, il semble qu'il faille travailler à faible vitesse (253 ou 701 g plutôt qu'à une vitesse de 1372 g) et sous faible pression d'alimentation (0,2 bar plutôt que 0,5 bar) pour maximiser l'efficacité de la séparation. De plus, l'utilisation du sac de filtration de 5 μm semblait plus favorable que celui de 1 μm , en termes de concentration de matières en suspension. La densité optique mesurée à 750 nm dans les surnageants semble restée quasiment la même pour les différentes conditions opératoires testées.

Enfin, une *filtration sur Büchner à l'aide d'une toile en nylon de 5 μm* (Figure III.4) à 0,1 bar a été également réalisée. Le filtrat jaunâtre avait une densité optique de 0,14 à une longueur d'onde de 750 nm et contenait une concentration en matières sèches de 0,061 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$.



Figure III.4. Filtration sur Büchner avec une toile en nylon de 5 μm .

Les deux dernières méthodes de séparation citées, tamisage suivi d'une centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse essoreuse munie d'un sac de filtration, et filtration sur toile de 5 μm étaient les plus efficaces, en permettant l'obtention d'un surnageant de culture jaunâtre ne contenant que très peu de filaments d'*A. platensis* (observation de quelques filaments au microscope optique et faible concentration de matières sèches en suspension). Cependant, la filtration sur toile étant plus rapide et moins énergétique que deux étapes successives de tamisage et centrifugation, elle est considérée plus favorable pour la séparation des cellules de leur surnageant.

Toutefois, les résultats de dosage des EPS solubles mentionnés dans le tableau III.1 ont permis d'estimer des concentrations de l'ordre de 0,032 – 0,046 $\text{kg GlcEq}\cdot\text{m}^{-3}$. Ces valeurs faibles ont révélé qu'une petite proportion seulement des EPS d'*A. platensis* était relarguée dans

le milieu. Probablement, la majorité des EPS reste attachée aux cellules. Vu la faible concentration des EPS d'*A. platensis* solubilisés dans les surnageants, leur récupération à des fins de production industrielle nécessiterait un détachement et une solubilisation préalables des EPS liés. Comme indiqué précédemment, cette voie n'a pas été explorée dans le cadre de cette thèse, consacrée à la récupération d'EPS solubilisés dans les milieux de culture de microorganismes photosynthétiques.

La récupération des EPS d'*A. platensis* après forçage métabolique reste cependant d'actualité au sein du laboratoire. Dans des conditions de culture batch sous stress lumineux, des proportions d'EPS par rapport à la matière sèche totale de l'ordre de 24 % ont été obtenues pour des concentrations en biomasse dans le milieu de culture d'environ $1,0 \text{ kg.m}^{-3}$, 16 % des EPS étant libérés dans le milieu de culture et 84 % restant liés aux cellules. Cela correspond à une concentration effective d'EPS dans le milieu d'environ $0,04 \text{ kg.m}^{-3}$ seulement, mais à une concentration potentielle d'environ $0,24 \text{ kg.m}^{-3}$ dans l'hypothèse où la totalité des EPS liés pourraient être solubilisés (Référence : Touchard R., Méthode de dosage des EPS liés sur une culture d'*Arthrospira platensis* : Etude de l'étape de séparation des EPS de la cellule. Rapport Interne du projet Algoraff (ADEME), octobre 2015).

Conclusion

Ce chapitre a tout d'abord rappelé le positionnement du sujet de thèse et présenté la démarche expérimentale suivie au cours de la thèse. Le sujet initial portait sur la récupération des EPS solubles d'*Arthrospira platensis*. Une culture en mode de « batchs répétés » de cette cyanobactérie a été effectuée à l'échelle pilote sous de intensités lumineuses élevées afin de favoriser la production d'EPS et d'obtenir par la suite un milieu de culture riche en EPS solubles en quantité suffisante pour étudier leur filtration sur membrane.

Différentes méthodes de séparation cellules-milieu de culture, telles que la centrifugation et la filtration sur tamis ou sur toile, ont été testées sur les cultures récoltées pour permettre de récupérer un surnageant de milieu de culture « presque totalement » dépourvu de cellules. Au vu des résultats obtenus, la filtration sur une toile de $5 \mu\text{m}$ semble une méthode de séparation

potentiellement intéressante en termes d'efficacité de la séparation, de coût et de consommation d'énergie.

Cependant, il s'est avéré que la concentration en EPS solubles dans le surnageant récupéré après séparation des cellules était très faible, de l'ordre de $0,04 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$, la majorité des EPS d'*A. platensis* reste probablement attachée à la cellule. La récupération à des fins de production industrielle des EPS d'*A. platensis* aurait alors nécessité un détachement et une solubilisation préalables des EPS liés. La mise en place d'un tel protocole sortant du cadre de cette thèse, le travail a donc été réorienté vers la récupération des EPS de la microalgue rouge *Porphyridium cruentum*, qui libère une quantité d'EPS solubles plus importante qu'*A. platensis*. Une étude paramétrique de la filtrabilité de solutions d'EPS solubles de *P. cruentum* sur une membrane organique sera présentée au chapitre IV.

Chapitre IV. Résultats et Discussion :
Filtrabilité des solutions d'exopolysaccharides
solubles de *Porphyridium cruentum*

I. Introduction et résumé du chapitre IV « sur article »

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la filtrabilité des solutions d'exopolysaccharides solubles de *Porphyridium cruentum* sur une membrane organique en PES, en présence d'un espaceur côté alimentation. Les solutions d'EPS ont été reconstituées à partir de surnageants de milieux de culture produits à l'échelle pilote. L'étude de filtrabilité a consisté en premier lieu à effectuer une étude paramétrique qui repose sur l'établissement des courbes J-PTM (flux de perméation-pression transmembranaire) jusqu'à l'obtention du flux limite, en faisant varier successivement trois paramètres opératoires : la vitesse tangentielle du fluide pour évaluer l'influence de l'hydrodynamique sur les flux de perméation, la concentration en EPS de la solution filtrée et la température de filtration. Les filtrations ont été effectuées à l'échelle du laboratoire, en mode de recyclage total du rétentat et du perméat de façon à disposer de flux de perméation stabilisés pour pouvoir analyser l'influence des paramètres opératoires en s'affranchissant des dynamiques de colmatage.

Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article accepté dans la revue scientifique *Environmental Technology*. Nous signalons ici en italique les éléments présents dans le texte de l'article qui ont déjà été présentés dans les chapitre I et II de ce mémoire et que le lecteur peut éventuellement ne pas lire sans que cela nuise à la compréhension du reste de l'article.

La partie « Introduction » décrit tout d'abord le contexte général de la filtration membranaire des solutions d'EPS solubles (surnageants de culture) de microalgues, et en particulier de *P. cruentum*. Pour ce faire, une étude de l'art récapitule des informations sur la caractérisation chimique des EPS de *P. cruentum* et leur potentiel biotechnologique, et explique l'intérêt de la filtration membranaire par rapport à d'autres techniques plus conventionnelles de récupération des EPS. Cette partie cite également des travaux antérieurs sur la récupération et la purification d'EPS de microalgues par filtration membranaire. D'autres travaux sur la filtration de suspensions de microalgues et cyanobactéries sont aussi cités car ils attirent l'attention sur le pouvoir colmatant des EPS, le colmatage étant un point critique des procédés membranaires. Pour cela, le concept du flux critique sous ses différentes formes ainsi que leurs relations avec le colmatage membranaire sont décrits. *Tous ces points sont présentés plus amplement dans le chapitre I (Synthèse Bibliographique)*. A la fin de l'« Introduction », l'objectif de l'article et la

méthodologie utilisée sont mentionnés. *La partie « Experimental » reprend et décrit les éléments du chapitre II (Matériel et Méthodes) concernant le matériel utilisé et les méthodes appliquées pour l'ultrafiltration des solutions d'EPS de P. cruentum mais de façon plus synthétique.* Il est à noter que la numérotation des figures, des tableaux et des équations suit celle utilisée dans le manuscrit. De même, les références bibliographiques sont citées suivant le style utilisé dans le manuscrit et non suivant celui requis par le journal.

Résumé du contenu de l'article

En résumé, ce chapitre a permis d'évaluer la filtrabilité des solutions d'EPS de *Porphyridium cruentum* sur une membrane plane organique en PES de 50 kDa, en mode de recyclage total et sous différentes conditions opératoires.

Dans un premier temps, un protocole de nettoyage consistant en une séquence enzymatique – acide – basique a été mis au point pour nettoyer des membranes ayant travaillé jusqu'au flux limite et donc dans des conditions fortement colmatantes. Ces essais de filtration effectués dans des conditions hydrodynamiques proches de celles rencontrées en module spiralé ont montré le fort pouvoir colmatant des solutions d'EPS même à faible concentration en polysaccharides ($0,10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), avec par exemple un flux limite de $21,6 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ à une vitesse de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$ en veine fluide libre (sans espaceur).

Ensuite, l'influence de la vitesse sur les flux de perméation a été étudiée en présence d'un espaceur côté alimentation. L'étude a montré l'effet bénéfique d'une augmentation de la vitesse sur toute la gamme étudiée ($0,3$ à $1,2 \text{ m.s}^{-1}$), avec un accroissement du flux limite de $20,7$ à $60,0 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et la diminution de la résistance de colmatage calculée au flux limite (figures IV.2, IV.3).

L'effet de la concentration en polysaccharides a ensuite été étudiée sur des solutions reconstituées à partir de 2 surnageants de milieux de culture et couvrant une gamme allant de $0,10$ à $1,06 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ (facteur de 10,6). Les résultats ont bien illustré la diminution du flux limite et son obtention à une PTM plus faible lorsque la concentration en EPS augmente (Figure IV.5). Cependant, la concentration de gel prédite par le modèle de gel avec les valeurs de flux

limite obtenues est surprenante ($47 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), cette valeur serait probablement beaucoup plus faible lors de l'ultrafiltration en mode concentration d'une solution réelle (Figure IV.6).

D'un point de vue pratique, les flux de perméation obtenus sur ces solutions reconstituées de différentes concentrations ont montré que cette opération de concentration d'une solution réelle pourrait probablement être réalisée sur un module de filtration plan ou tubulaire, à des vitesses suffisamment élevées pour limiter l'importance de la polarisation et la formation du dépôt colmatant, mais pas sur un module spiralé.

Le travail à une température élevée (à condition qu'elle soit tolérée par la membrane et qu'elle préserve les propriétés des EPS) améliorerait les performances de l'UF en termes de flux de perméation. En effet, ces derniers ont augmenté proportionnellement à la diminution de la viscosité de l'eau lorsque la température a été augmentée de 20 à 40 °C, alors que les résistances de colmatage restaient inchangées (Figure IV.7).

Dans tous ces essais, la rétention des sucres a été quasiment totale, quelles que soient les conditions opératoires testées.

Par ailleurs, il a été observé que la nature du colmatage changeait avec la pression transmembranaire appliquée. Ainsi, à une concentration en EPS de $0,10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ et à une vitesse de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$, le colmatage au flux limite de perméation était majoritairement réversible alors qu'en travaillant sous une PTM nominale, c'est-à-dire dans des conditions nettement moins colmatantes, le colmatage global était plus faible, et majoritairement irréversible (Figure IV.8). Il est possible d'émettre une hypothèse à ce sujet : à une pression de filtration modérée (telle que la PTM nominale), le colmatage qui se met en place est majoritairement irréversible, mais quand on augmente la PTM en se rapprochant de la PTM limite, le colmatage augmente et cette augmentation est principalement due à celle de la composante réversible du colmatage. Ce colmatage réversible pourrait correspondre à la formation d'une couche de « gel » plus ou moins structuré et riche en polysaccharides, comme cela a été rapporté par différents auteurs pour la filtration de solutions de polysaccharides (voir chapitre I, § 6, Jareeya 2011) ou de suspensions de cellules excréant des EPS (Morineau-Thomas *et al.*, 2002 ; Rossi *et al.*, 2008 ; Villacorte *et al.*, 2009).

Le flux critique pour l'irréversibilité a ensuite été évalué lors de l'ultrafiltration d'une solution d'EPS de concentration $0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ à une vitesse de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$ par la méthode de l'onde de pression rectangulaire, notamment utilisée par (Espinasse *et al.*, 2008) (Figure IV.9). Le flux critique pour l'irréversibilité n'a pas pu être déterminé réellement dans la gamme de PTM testées car il n'a pas été possible de filtrer la solution à une PTM inférieure à 0,24 bar avec la vitesse tangentielle retenue ($1,0 \text{ m.s}^{-1}$) à cause des pertes de charge élevées dans le module membranaire à cette vitesse. Toutefois, on a pu déterminer que le flux critique était en-dessous de $36 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, et estimer qu'il était d'environ $32 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ (ce qui correspond à une pression critique de 0,3 bar environ, voir Figure IV.10).

On a également cherché à savoir si le flux critique était de forme « forte » ou « faible », c'est-à-dire s'il y avait ou non une adsorption rapide de matière à la surface de la membrane ou dans les pores en début de filtration. Ainsi, pour les quatre essais sur l'étude de l'influence de la vitesse tangentielle (essais No. 1 - 4) réalisés avec la solution d'EPS S_A (à $0,10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), la diminution de la perméabilité J/PTM entre les mesures du flux à l'eau avant la filtration et du flux de perméation à faible PTM a été déterminée. La diminution est modérée mais claire, avec une valeur moyenne de $20,5 \pm 4,0 \%$ qui indique probablement l'existence d'une résistance supplémentaire à l'écoulement par rapport à la filtration du solvant (eau) pur. Les calculs ont également été faits pour les essais correspondant à l'influence de la concentration en EPS (essais No. 3, 6, 8 et 9) ; la variation moyenne de perméabilité entre les filtrations des solutions d'EPS et celle du solvant pur était du même ordre de grandeur mais avec un écart-type beaucoup plus élevé, sans doute dû au fait que les solutions filtrées n'étaient pas les mêmes. Il est cependant difficile de trancher entre flux critique « fort » ou « faible », cette diminution du flux de perméation pouvant être due à une adsorption modérée de matière en début de filtration, mais aussi à l'apparition d'une couche de polarisation. En effet, la viscosité des solutions filtrées est supérieure à celle de l'eau à cause de la présence des EPS et cela pourrait entraver la rétrodiffusion des molécules d'EPS s'accumulant à la surface de la membrane. Il est difficile de trancher entre les 2 hypothèses, le flux de perméation à faible PTM lors de la filtration des solutions d'EPS n'étant déterminé qu'à une seule pression.

II. Filterability of exopolysaccharides solutions from the red microalga *Porphyridium cruentum* by tangential filtration on a polymeric membrane

ZAOUK Lisa ^(1, 2), MASSÉ Anthony ⁽¹⁾, BOURSEAU Patrick ^(1, 3), TAHA Samir ⁽²⁾, RABILLER-BAUDRY Murielle ⁽⁴⁾, JUBEAU Sébastien ⁽⁵⁾, Benoit TEYCHENÉ ⁽⁶⁾, PRUVOST Jérémy ⁽¹⁾, JAOUEN Pascal ⁽¹⁾

⁽¹⁾ GEPEA, Université de Nantes, CNRS, UMR 6144, Bd de l'Université, CRTT - BP 406, 44602 Saint-Nazaire Cedex, France

⁽²⁾ AZM Center for Biotechnology Research and Its Applications, Laboratory of Applied Biotechnology, Lebanese University, EDST, Tripoli, Lebanon

⁽³⁾ IRDL, Université de Bretagne Sud, CNRS, UMR 6027, Rue de Saint-Maudé, BP 92116, 56321 Lorient Cedex, France

⁽⁴⁾ Univ Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) - UMR 6226, F-35000 Rennes, France

⁽⁵⁾ AlgoSource Technologies, 37 Bd de l'Université, 44600 Saint-Nazaire, France

⁽⁶⁾ Université de Poitiers, CNRS, UMR 7285 (IC2MP), 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

* Corresponding author. Email: patrick.bourseau@univ-ubs.fr

Filterability of exopolysaccharides solutions from the red microalga *Porphyridium cruentum* by tangential filtration on a polymeric membrane

Abstract

The red microalga *Porphyridium cruentum* is exploited industrially for its exopolysaccharides (EPS) and pigments production. EPS produced by *P. cruentum* are partially released and dissolved into the surrounding environment, they can be recovered from the culture medium after removing the cells. This paper presents a parametric study of the ultrafiltration of EPS solutions on organic membrane. The EPS solutions were produced in conditions representative of an industrial production. They were filtered at lab-scale on a flat, PES 50 kDa MWCO membrane in a complete recirculation mode of permeate and retentate. Permeate flux-transmembrane pressure (TMP) curves were established up to the limiting flux for the filtration of solutions with various values of concentration in EPS (0.10 to 1.06 kg GlcEq.m⁻³), fluid tangential velocity (0.3 to 1.2 m.s⁻¹) and temperature (20 and 40 °C). The reversible and irreversible parts of fouling were evaluated for each experiment and the critical flux was determined for an intermediate EPS concentration (0.16 kg GlcEq.m⁻³). The results showed that EPS solutions had a strong fouling capacity. When filtering the lowest concentrated solution (0.10 kg GlcEq.m⁻³) with moderate fouling conditions, the overall fouling resistance was approximately half that of the membrane and the share of irreversible/reversible fouling was 88 and 12 %. However, the part of reversible fouling becomes predominant when approaching the limiting flux. Permeate fluxes which were obtained allow to estimate that a VRR of approximately 10 could be obtained when concentrating EPS solutions using PES membranes in flat or tubular modules but not in spiral-wound.

Keywords: *Porphyridium cruentum*; exopolysaccharides (EPS); ultrafiltration PES 50 kDa MWCO membrane; fouling.

1. Introduction

A wide range of microalgae and cyanobacteria is able to produce large amounts of extracellular polymeric substances, which are mainly composed of polysaccharides, proteins and/or other biopolymers in different proportions. This is the case for most of the red marine unicellular microalgae which are encapsulated within a sulfated polysaccharide gel that provides cells with protection against desiccation, predators and environmental extremes due to its stability to temperature, pH and salinity (Arad and Levy-Ontman, 2010). During the growth, the outer part of this gel undergoes dissolution into the culture medium (soluble fraction), 50 to 70 % of the polysaccharide remains attached to the cell (bound fraction) (Pignolet *et al.*, 2013). The red microalgae belonging to the *Porphyridium* genus especially *P. cruentum* are currently cultivated on a large scale for the production of exopolysaccharides and pigments (Marcati *et al.*, 2014) and may have a future for lipid-based industrial applications due to their original and/or highly specific lipid profiles (Pignolet *et al.*, 2013). The amount of exopolysaccharides (EPS) produced and the distribution between bound and dissolved fractions change according to the culture conditions, physiological state of microalgae, cultivation mode, light quality and intensity, salinity, etc. (Delattre *et al.*, 2016; Pignolet *et al.*, 2013). The production of EPS is particularly enhanced during the stationary phase of growth (Ramus, 1972), soluble polysaccharide concentrations ranging from 0.10 to 0.70 kg.m⁻³ have been reported in the literature (Adda *et al.*, 1986; Arad *et al.*, 1988; Csögör *et al.*, 2001; Jubeau, 2012). Higher values up to 4.6 kg.m⁻³ have also been reported (You and Barnett, 2004) but the status of the EPS is not clear and could include not only the soluble part of EPS but also some or all of the cell-bound part.

The apparent molecular mass of *Porphyridium* sp. EPS has been estimated by SEC-HPLC to $2-7 \times 10^6$ Da (Arad and Levy-Ontman, 2010) but the results might be influenced by the tendency of molecules to aggregate in solutions (Geresh *et al.*, 2002). These EPS have specific structures with in particular an acidic character due to the presence of glucuronate, sulfate and carboxylic groups (Eteshola *et al.*, 1998) which give them biological activities which are of high interest and value to the cosmetic, nutraceutical and therapeutic industries. Natural polysaccharides are currently gaining interest for recent applications such as novel food, pharmaceutical and cosmetic industries. As the growing demand cannot be fully satisfied by

conventional available sources such as red and brown macroalgae, EPS from *Porphyridium* species that have similar techno-functional properties, they could penetrate the large market of phycocolloids provided that the technologies for both their autotrophic solar production at high cell densities, and their downstream processing attain the breakeven point (Arad and Levy-Ontman, 2010; Delattre *et al.*, 2016). The industrial exploitation of *P. cruentum* EPS is in particular limited because of their low concentration in rich salt culture media (Patel *et al.*, 2013). However, for large-scale culture, EPS recovery should be part of a strategy of a complete bio-refinery of the microalga culture in order to mitigate the production cost.

The conventional extraction processes of microalgae EPS from their culture medium consists in a cells removing step by centrifugation or microfiltration followed by an alcoholic precipitation (see the review on microalgae EPS by Delattre *et al.*, 2016). However, the authors pointed out that *the development of membrane processes is a good alternative for the desalting and concentration of EPS solutions before their drying even if they constitute a very limited step because of their high viscosity and accordingly very high cost*. They indicated also that alcoholic precipitation is not really appropriate to purify EPS from marine microalgae as they will often be contaminated by salts which co-precipitate with them.

Ultrafiltration (UF) has been poorly investigated for the extraction and the purification of EPS from culture supernatants of microalgae. Li *et al.* (2011) isolated EPS from the spent culture media of 6 photosynthetic microorganisms (cyanobacteria, green or red microalgae and a diatom), with the aim to test their bioactive (antitumor) properties. The cell-free media clarified by a dead-end microfiltration were filtered by tangential UF at a pilot-scale on an organic membrane in polyethersulfone (PES) with a 5 kDa molecular weight cut-off (MWCO). A high EPS isolation efficiency was achieved with volume reduction ratio (VRR) of 20 or 40. Although the initial EPS concentration was not specified, the work demonstrated the feasibility of concentrating of microalgal EPS from clarified cell-free culture media. More recently, Patel *et al.* (2013) found that a tangential flow filtration system used in diafiltration mode was a potential technology to collect and desalt selectively the EPS of *P. cruentum* from cell-free culture media. On the other hand, Marcati *et al.* (2014) separated B-phycoerythrin and soluble polysaccharides from *P. cruentum* biomass with a high polysaccharidic content ($0.63 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) by a two-step membrane process using PES flat membranes. In addition, some authors have highlighted the

role of EPS in fouling during the harvesting of the microalga *P. purpureum* (Morineau-Thomas *et al.* (2002) or the cyanobacterium *A. platensis* (Rossi *et al.*, 2008). Indeed, even at low concentrations, microalgae EPS form highly viscous solutions that can exhibit high stickiness and propensity to form slimy gels which could severely foul the membranes.

Membrane fouling is often a critical point of the economic profitability of membrane processes because severe fouling penalizes both CAPEX and OPEX. Therefore, a good understanding of fouling is needed to adapt the filtration conditions in order to minimize fouling and filtrations costs. The critical flux concept was developed in that sense simultaneously by Field *et al.* (1995) and Bacchin *et al.* (1995). These authors published 10 years later a joint paper in which they clarified the concept and distinguished 3 forms of critical flux (Bacchin *et al.*, 2006). The *strong form* J_{cs} discriminates no fouling conditions from fouling conditions of any type, supposing that osmotic pressure effects and adsorption resistance are negligible. In practice, J_{cs} is defined as the point at which the flux starts to deviate from the pure water flux-transmembrane pressure (TMP) line. The *weak form* J_{cw} is observed in systems where an initial adsorption takes place independently of pressure and solvent transfer through the membrane and occurs immediately at the start of the operation, leading to a linear portion of the flux-TMP curve with a lower slope than the pure water flux line. Finally, the *critical flux for irreversibility* J_{ci} discriminates fouling with respect to its irreversibility. Below it, only a concentration polarization layer exists, with an additional monolayer of adsorbed species in some cases. For colloidal systems, J_{ci} is linked to a physical phase transition from a dispersed phase (concentration polarization) to a condensed phase (multi-layer deposit).

This paper aims to estimate the filterability of EPS solutions issued from *P. cruentum* cultures with modules equipped with organic (PES) membranes known to have lower investment costs and pumping rates than mineral membranes (Cheryan, 1998, chap. 5). Firstly, we evaluated the influence of the main operating parameters (tangential velocity, transmembrane pressure, EPS concentration and temperature) on both permeate flux and membrane fouling at a lab-scale using a flat polymeric, PES 50 kDa MWCO membrane. The extent and the type of fouling were then characterized in terms of fouling resistances and critical flux for irreversibility. Finally, the feasibility of the isolation of *P. cruentum* EPS by ultrafiltration on organic membranes at an industrial level will be discussed.

2. Experimental

2.1. Water and preparation of EPS solutions

Water used for solutions preparation, membrane filtration and set-up flushing and cleaning is a type 2 (resistivity of 15 M Ω .cm at 25 °C), pure water delivered by an Elix[®] Advantage System (Millipore). It's referred to as *deionized water* in the subsequent text.

The microalga *P. cruentum* (UTEX 161) was produced and harvested on the Algosolis microalgae R&D facility (Saint-Nazaire, France, <http://algosolis.com/>). This facility is dedicated to the development of breakthrough technologies for microalgae culture and biorefinery and offers the infrastructure for investigations in conditions representative of industrial applications. *P. cruentum* was grown in a modified Bold's basal medium within a raceway (1000 L, 10 m²) operated in a batch mode. The fresh medium contained 15 kg.m⁻³ of NaCl and 3.4 kg.m⁻³ of other nutrients (see Table IV.1). The culture was maintained outdoor under solar flux at a pH of 7.5 and a temperature varying between 17 and 28 °C for culture A, and between 20 and 25 °C for culture B. The cultures were harvested when they were 22 and 18 days old respectively, the cells being in the stationary phase of growth. The biomass and the culture medium containing EPS were separated by centrifugation at 3000 g in a dynamic settler based on the Evodos spiral plate technology (Evodos 10). The separation produced supernatants A and B, respectively for cultures A and B. A part of supernatant B was concentrated using a UF tubular ceramic membrane with a 50 nm mean pore diameter (Membralox P1940), the concentrate being referred as supernatant Bc. All the supernatants (A, B and Bc) were stored at -20 °C.

Supernatants were thawed at 4 °C for 24 to 48 hours just before the preparation of the EPS solutions to be filtered. Characteristics of the four EPS solutions used in the work are summarized in Table IV.2. The EPS solution S_A was obtained after a second centrifugation of supernatant A (Thermo Scientific Sorvall RC6 Plus, 2 times at 6000 g, 15 min, 4 °C) in order to remove residual cell debris and had an EPS concentration of 0.10 kg GlcEq.m⁻³. The EPS solution S_B was the raw supernatant B itself (0.16 kg GlcEq.m⁻³). By the end, supernatant Bc underwent a second centrifugation (same conditions as for S_A) in order to remove precipitates that appeared after thawing, before being diluted with fresh modified BBM medium to obtain the solutions S_{Bcd1} (0.64 kg GlcEq.m⁻³) and S_{Bcd2} (1.06 kg GlcEq.m⁻³).

N.B. : la phrase précédente contenait une faute qui figure malheureusement dans la publication se rapportant à ce chapitre. En réalité, la solution S_A a été obtenue après centrifugation du surnageant A deux fois à 6000 g pendant 15 minutes et à 4 °C alors que le surnageant Bc a été centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes et à 4 °C (cf. chapitre II, § 3.1.3 et figure II.4).

Turbidity (O.D. at 750 nm), dry matters DM, pH and conductivity of all solutions are closed. The main difference is the protein to EPS ratio which is approximately 2 to 3 times higher for S_A and S_B than for the concentrated solutions S_{Bcd1} and S_{Bcd2}.

Table IV.1. Composition of the modified BBM culture medium.

Composition of modified BBM medium (kg.m⁻³)			
NaNO ₃	1.5		
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.225	<i>Composition of additive 1</i>	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.025	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.2
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	0.05	Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	0.044
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.014	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	0.15	H ₃ BO ₃	2.9
KH ₂ PO ₄	0.123	MnCl ₂ , 4H ₂ O	1.8
NaCl	15		
NaHCO ₃	1.26	<i>Composition of additive 2</i>	
+ 1 L.m ⁻³ of additive 1 and 1 L.m ⁻³ of additive 2		MoO ₃	0.2

Table IV.2. Characteristics of the EPS solutions filtered.

Solution	S _A	S _B	S _{Bcd1} & S _{Bcd1*} ⁽¹⁾	S _{Bcd2}
EPS concentration (kg GlcEq.m ⁻³)	0.10	0.16	0.64	1.06
Protein concentration (kg BSAEq.m ⁻³)	0.0097	0.014	0.021	0.041
Protein to EPS ratio (% (w/w))	9.7	8.8	3.3	3.9
Optical density at 750 nm	0.003	0.004	0.004	0.002
Dry matter (kg.m ⁻³)	16.8	14.8	16.8	16.0
pH	8.4	8.2	8.6	8.8
Conductivity (mS.cm ⁻¹)	23.7	20.3	22.2	20.9
Na ⁺ (10 ⁻³ kg.m ⁻³)	6695	5560	6120	5832
Ca ²⁺ (id.)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mg ²⁺ (id.)	39.4	47.4	26.3	44.9
K ⁺ (id.)	85.8	87.2	83.7	93.0
<i>Total cations</i> (id.)	6820	5695	6230	5970
Cl ⁻ (id.)	8607	6695	7604	7036
NO ₃ ⁻ (id.)	552	882	1004	948
SO ₄ ²⁻ (id.)	50.5	30.3	911	135
PO ₄ ³⁻ (id.)	148	121	144	142
<i>Total anions</i> (id.)	9357	7728	9663	8261

⁽¹⁾ S_{Bcd1*} was prepared in the same way as S_{Bcd1} but without centrifugation before dilution with the modified BBM medium.

2.2. Assays

Total sugar content was evaluated by a colorimetric method (spectrophotometer Jasco V630) after adding phenol and sulfuric acid as described by DuBois *et al.* (1956). The absorbance was read at 483 nm and the results were expressed in $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ of D-glucose equivalent ($\text{kg GlcEq}\cdot\text{m}^{-3}$). Permeate samples were diafiltered using a 10 kDa MWCO PES membrane (Biomax) at 2 bar in order to remove salts (mainly nitrates) that can adulterate the measuring results.

Protein content was quantified by the bicinchoninic acid (BCA) method using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, BCA1-1KT) as a standard. The absorbance was measured at 562 nm. Cell-free medium were dried at 105 °C and weighted until constant mass in order to obtain the dry weight. Total sugar and protein concentrations as well as the dry weight were all measured in triplicates.

Solutions turbidity was evaluated through the measurement of the optical density at 750 nm. Their conductivity and pH were measured using a portable conductivity meter (Mettler Toledo™ FG3 FiveGo™ equipped with a probe LE703 and a pH portable meter (Mettler Toledo™ FG2 FiveGo™), respectively.

Concentrations of salts in EPS solutions were measured by ionic chromatography. Prior to injection, EPS solutions underwent specific dilutions with deionized water then the diluted samples were filtered through 0.2 μm cellulose acetate (Minisart® NML syringe filter) in order to remove particulates. The anionic chromatograph Dionex - ICS 900 (Thermo Scientific) was equipped with a guard column AG9-HC (4 \times 50 mm) and a separation column AS9-HC (4 \times 250 mm). The eluent was a mixture of solution of $7.7 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ and $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, with a flow rate of $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The cationic chromatograph Dionex - ICS1100 (Thermo Scientific), had a guard column CG16 (5 \times 50 mm) and a separation column CS16 (5 \times 250 mm). The elution was performed with $17 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ at a flow rate of $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. In order to regulate the stationary phase, a chemical suppressor AMMS® 300, 4 mm ($25 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$) was used for the anion column, whereas the cationic column was equipped with an electrochemical suppressor CSRS® 300, 4 mm (self-regeneration by electrolysis). Data acquisition and processing were accomplished with the Chromeleon®7

software. The detection signal was the conductivity of the eluted solution and the concentration of an ion was determined knowing the proportionality between the ion concentration and the areas under its chromatographic peak.

2.3. Ultrafiltration runs

2.3.1. Membrane and ultrafiltration set-up

A PES membrane with a 50 kDa MWCO (Synder membranes, Vacaville, CA, USA, model MQ) was used in the study. The membrane was delivered as a roll from which 3 rectangular samples were cut for filtration processes. The initial water permeabilities and membrane resistances of samples are given in Table IV.3. To prevent drying of the membrane and entrapment of air bubbles in the membrane pores, samples were kept in the pilot filled with deionized water during the experiments campaign and water was renewed regularly in order to avoid bacterial contamination.

The experimental study was performed in a cross-flow lab-scale membrane unit (see Figure IV.1). The plate and frame module Rayflow 100 (Rhodia-Orelis, Miribel, France) was equipped with a flat membrane (167 mm × 75 mm, effective surface area 0.0125 m²). The liquid channel was 0.5 mm thick with a free liquid vein (no spacer) for the run 1* and 1.5 mm thick liquid vein with a polypropylene 46 mil feed spacer (1.168 mm thickness) placed inside as a turbulence promoter for all other test runs.

The instantaneous permeation flow rate was computed from the permeate masses measured using a digital balance (RADWAG, WLC 6/A2) connected to a personal computer fitted with a data acquisition software. EPS solution was pumped into the membrane by a displacement pump (Quattroflow-1200 S, 4-piston diaphragm pump) and the feed solution pressure was adjusted with a throttling valve. Each experiment was carried out with a 2 L EPS solution volume which was continuously stirred and thermostatically controlled using a cryothermostat (Fisher Bioblock Scientific, Refrigerant / Heating Circulating Bath). Experiments were done at 20 or 40 °C. In the latter case, as well as during cleaning assays at 49 °C (see section 2.3.2 membrane cleaning), a hotplate stirrer (VELP Scientifica, AREX CerAITop™) connected to a VTF digital thermoregulator (VELP Scientifica) was used. Temperatures of both permeate and retentate were monitored by thermocouples. Two pressure gauges were placed at

the input and the exit of the membrane module in order to estimate the transmembrane pressure TMP as:

$$TMP = \frac{P_f + P_r}{2} - P_p \quad (IV.1)$$

where P_f , P_r and P_p (bar) are respectively the feed, retentate and permeate pressure, the latter being assumed constant.

N.B. : dans le chapitre II de ce manuscrit, P_f et P_r sont remplacés P_e et P_s , les pressions à l'entrée et à la sortie du module de filtration.

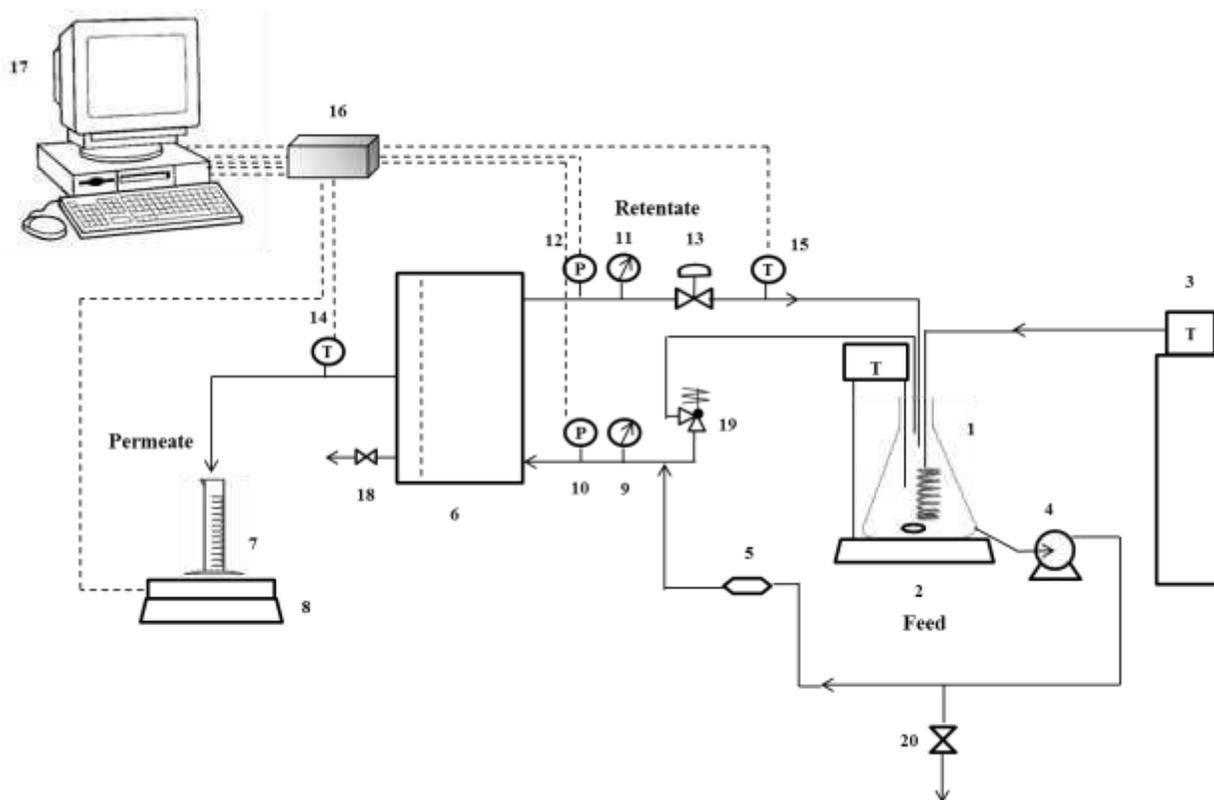


Figure IV.1. Schematic diagram of the cross-flow filtration set-up.

1: feeding tank, 2: hotplate stirrer, 3: cryo-thermostat, 4: feed pump, 5: pulse dampener, 6: membrane module, 7: measuring cylinder (permeate recovery), 8: precision balance, 9: pressure gauge at the module inlet, 10: feed input pressure transmitter, 11: pressure gauge at the module outlet, 12: retentate output pressure transmitter, 13: throttling valve (back pressure), 14: permeate temperature sensor (thermocouple), 15: retentate temperature sensor (thermocouple), 16: data acquisition system, 17: PC-data logging system, 18: air purge valve, 19: safety valve, 20: drain valve.

2.3.2. Membrane conditioning and cleaning

Membrane conditioning. Membrane samples were conditioned before the first use in order to remove preservatives (glycerine and sodium metabisulfite) and to obtain a reference water flux. The membrane was therefore soaked overnight (15 h) in deionized water, then water was filtered under 0.5 bar at a 1 m.s^{-1} cross-flow velocity until 0.2 L of permeate was recovered. Thereafter, the membrane underwent an acid-alkaline cleaning (same procedure as in the membrane chemical cleaning). The membrane was then compacted at 20 °C and a TMP of 2 bar until a stable water flux was reached. The water permeability of the pristine membrane was then measured.

Membrane cleaning. After each experiment, the membrane was systematically rinsed with deionized water (6 L) at 27 – 29 °C in a non-recirculation mode (permeate and retentate flushed to drain) before chemical cleaning to remove any remaining build-up. The pure water flux was then measured in order to evaluate the irreversible part of the fouling.

Formulated Clean-In-Place (CIP) solutions were provided by Ecolab (France). The membrane was always cleaned with 2 L of the appropriate cleaning solution in a complete recirculation mode (49 °C, 0.5 bar, cross-flow velocity 1 m.s^{-1}). Three CIP solutions were tested within different sequences (*cf.* part 3). Acidic and alkaline cleaning was performed for 20 mins respectively with P3-Ultrasil 75 solution (0.104 % (v/w) in water, 49 °C, pH 2) and P3-Ultrasil 110 solution (0.223 % (v/w) in water, 49 °C, pH 11). The enzymatic solution was a mixture of the buffer P3-Ultrasil 53 (0.8 % (w/v) in water, 49 °C, pH ~ 9.15) and the combination of enzymes and surfactants P3-Ultrasil 62A. P3-Ultrasil 53 was first circulated for 10 mins before P3-Ultrasil 62A was added at 0.5 % (v/v) and the mixture circulated for 40 mins. Right after each CIP, the pilot plant was thoroughly rinsed with water and the cleaning efficiency was evaluated by comparing the water flux recovery to that of the pristine membrane. The hydraulic cleanliness was considered to be achieved when at least 90 % of the initial water flux was recovered.

2.3.3. Ultrafiltration of EPS solutions

Table IV.3 summarizes the different experimental runs performed in this study and their operating conditions. All ultrafiltration (UF) runs were carried out in a batch mode with a complete recirculation of both retentate and permeate to the feed tank in order to maintain a

constant concentration in EPS (VRR of 1). All runs were performed with a 1.5 mm thick fluid vein equipped with a spacer excepted run 1* where a free, 0.5 mm thick fluid vein was used. For the fouling experiments, samples of permeate (taken directly from the outlet of the permeate pipe) and retentate (from the feed tank) were collected at each steady-state pressure step and stored at -20 °C until further analyzes. Samples taken from the feed tank were also used to check if the EPS concentration remained constant during the complete recirculation mode.

Filtration tests were carried out at 20 °C for all runs except for run 13 performed at 40 °C. Water fluxes were systematically normalized to 20 or 40 °C to smooth the impact of temperature and viscosity fluctuations on permeation fluxes.

2.3.4. Determination of limiting and critical permeation fluxes

Establishment of the J-TMP curves. The results of the filtration tests are presented by plotting the steady-state permeate flux J against the transmembrane pressure TMP. Each point on the curves represents the steady state flux value at a given TMP (see Figures IV.2, IV.5 and IV.7). The TMP was increased stepwise from the minimum adjustable pressure on the pilot (which increases with the tangential velocity) until the region where the flux independent of the TMP was reached. For each value of TMP, the evolution of the permeate flux J over time was followed and the value of the steady-state flux was measured after the flux had leveled off.

Limiting flux J_{lim} for a given tangential velocity v . The limiting flux J_{lim} is the maximum stationary permeation flux which can be reached when increasing TMP (Michaels, 1968; Porter, 1972). J_{lim} correspond to a flux for which fouling saturates the filtration capacity of the membrane (Bacchin *et al.*, 2006). The TMP at which J_{lim} is obtained is called the limiting TMP and noted TMP_{lim} . Each filtration was stopped as soon as J_{lim} was reached in order not to exceed the limiting pressure and not to let the membrane operate for a long time in strongly fouling conditions.

Nominal transmembrane pressure TMP_n . TMP_n was defined as the TMP for which the permeation flux is equal to 75 % of the limiting flux J_{lim} , a value taken as an estimate of the critical flux J_{ci} .

Determination of the critical flux for irreversibility J_{ci} . The critical flux for irreversibility was valued following the method of square wave of applied pressure proposed by (Espinasse *et*

al., 2002, 2008) for evaluating the reversibility of colloidal fouling layers. The method was used with the solution S_B (0.16 kg GlcEq.m⁻³) in a complete recirculation mode (VRR = 1) with a fixed cross-flow fluid velocity of 1.0 m.s⁻¹ at 20 °C. The principle of the method is explained in section 3.3.2.

2.3.5. Resistance in series analysis

Deionized water was filtered at the beginning of each experiment to enable the clean membrane resistance R_m to be calculated according to Darcy's law:

$$J_{w0} = \frac{TMP}{\eta \times R_m} = Lp_{w0} \times TMP \quad (IV.2)$$

where J_{w0} is the permeate flux (m.s⁻¹ or L.h⁻¹.m⁻²), η the permeate (assimilated to pure water) dynamic viscosity (Pa.s), R_m the membrane hydraulic resistance (m⁻¹), TMP the transmembrane pressure (bar) and Lp_{w0} the water permeability (m. s⁻¹.bar⁻¹ or L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹).

The additional fouling resistances that appeared during the filtration of EPS were evaluated according to the "Resistance-in-Series" model according to the following equation:

$$J = \frac{TMP}{\eta \times R_t} = \frac{TMP}{\eta \times (R_m + R_f)} = \frac{TMP}{\eta \times (R_m + R_{rev} + R_{irrev})} \quad (IV.3)$$

where R_t is the total hydraulic resistance, R_f the overall fouling resistance, R_{rev} the reversible part of R_f that is eliminated by a simple water rinsing and R_{irrev} the irreversible fouling requiring chemical cleaning to be removed. η , R_m and TMP are the same as in equation (IV.2). The values of the resistances were measured experimentally as followed: R_m by a water flux measurement on a clean membrane prior to each run (eq. IV.2); $R_t = (R_m + R_f)$ with the stabilized permeate flux measurements at the end of the run (eq. IV.3); $(R_m + R_{irrev})$ with water flux measurements after water rinsing (physical cleaning) and R_{rev} as the difference between R_f and R_{irrev} .

3. Results and discussion

The aim of this study is to evaluate the filterability of *P. cruentum* EPS solutions by modules equipped with organic, PES membranes. The cleaning protocol of the membrane is first assessed (3.1), then the influence of tangential velocity v , transmembrane pressure TMP, EPS concentration C_0 and temperature T on permeate fluxes are evaluated in a complete recirculation mode (section 3.2). Finally, the sensitivity of membrane fouling to the operating parameters (section 3.3) and the feasibility of EPS isolation by organic, PES membrane at an industrial level (3.4) are discussed.

EPS from *Porphyridium* sp. having high molecular weight, a membrane with 50 kDa MWCO was selected to ensure a complete retention of EPS and avoid pore clogging. Although they are susceptible to consequential fouling by adsorption of proteins and other organic molecules due to their hydrophobic character, PES membranes have several advantages (low investment costs, good thermal stability and chemical resistance, *see* Cheryan, 1998) that make them regularly used in the industry in spiral wound modules for the ultrafiltration of biological fluids such as skim milk and whey (Rabiller-Baudry *et al.*, 2014; Rezaei *et al.*, 2014).

3.1. Cleaning protocol assessment

As several flux-TMP curves had to be established up to the limiting flux with the same membrane, this one would work in highly fouling conditions. Therefore, an effective cleaning protocol had to be determined in order to clean correctly the membrane and recover its permeability over several cycles. Superficial velocity in spiral wound modules with feed spacer is in the range of 0.2 - 0.3 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Ghosh *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2013). According to the recommendations of the flat module manufacturer, the first filtration run and the membrane cleaning tests were performed with a thin 0.5 mm thick fluid vein with no spacer, and at a fluid velocity of 1.0 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for which the flux-TMP relation was intended to be close the one with a 1.5 mm thick vein with a spacer. The efficiency of the cleaning protocol was assessed with the EPS solution S_A at 20 °C (run 1* in Table IV.3).

The limiting flux ($21.6 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) was quickly reached even at 0.5 bar, the lowest TMP possible at a velocity of 1 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (the J-TMP curve was very similar to that for $v = 0.3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ in Figure IV.2). An alkaline-acid CIP was first tested allowing only 83 % of the initial water flux to

be recovered which was insufficient. Either the repetition of the alkaline cleaning step or the cleaning by sodium hypochlorite (150 ppm with P3- Ultrasil 110, pH = 11) failed to regenerate the membrane. Enzymatic cleaning was thus tested on a second membrane MQ₂ after the filtration of the same EPS solution S_A, but in usual hydrodynamic conditions in industrial spiral wound module, i.e. with a cross-flow velocity of 0.3 m.s⁻¹ and a fluid vein of 1.5 mm width containing a 46 mil spacer (run 1). The limiting flux J_{lim}, 20.7 L.h⁻¹.m⁻², was reached rapidly for a low TMP of 0.5 bar (see the flux-TMP curve for v = 0.3 m.s⁻¹ in Figure IV.2), and was very close to that of run 1*, meaning that filtration performances are indeed very close in the operating conditions “v = 1 m.s⁻¹ in a thin, free fluid vein” and “v = 0.3 m.s⁻¹ with a spacer in the fluid vein”.

Otherwise, the membrane was correctly regenerated by a three-steps cleaning procedure using successively the enzymatic mixture, acid cleaning and alkaline cleaning. The cleaning efficiency was ensured almost entirely by the first step of enzymatic cleaning meaning that EPS are involved in the irreversible fouling of the membrane. The acid and alkaline cleaning steps were nevertheless kept to inactivate the enzyme and to recondition the membrane, respectively. After this CIP procedure, the membrane was regenerated and the water permeability of the membrane was increased by about 25 % in comparison with that measured on the brand new membrane without any filtration. Li *et al.* (2011) reported that an alkaline cleaning can properly regenerate a PES membrane when microalgal EPS from different strains were filtered below the critical flux. The enzyme cleaning step is necessary in the present work most probably because the membrane works under strongly fouling conditions. However, it cannot be excluded that the EPS solutions filtered here have a higher fouling capacity than those in the work of Li *et al.*, possible causes being higher molecular weights of EPS and/or the presence of small organic compounds that could block the pores. In particular, the EPS solutions in the work of Li *et al.* (2011) were filtered at 0.3 μm and ours, no, so that they contain probably less colloidal matters.

Table IV.3. Experiments carried out and their operating conditions

Studied parameter	No exp.	Membrane sample	$Lp_w^{20^\circ\text{C}}$ (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹) and R_m (10 ¹² m ⁻¹) ⁽¹⁾	EPS solution	C_0 (kg GlcEq.m ⁻³)	v (m.s ⁻¹)	T (°C)	e ⁽²⁾ (mm)
Cleaning protocol assessment	1*	MQ ₁	66.5 - 5.4	S _A	0.10	1	20	0.5
	1	MQ ₂	74.4 - 4.8	<i>id.</i>	<i>id.</i>	0.3	<i>id.</i>	1.5
Influence of cross-flow velocity v	1	MQ ₂	74.4 - 4.8	S _A	0.10	0.3	20	1.5
	2	<i>id.</i>	85.9 - 4.2	<i>id.</i>	<i>id.</i>	0.6	<i>id.</i>	<i>id.</i>
	3	<i>id.</i>	103.9 - 3.5	<i>id.</i>	<i>id.</i>	1.0	<i>id.</i>	<i>id.</i>
	4	<i>id.</i>	101.2 - 3.6	<i>id.</i>	<i>id.</i>	1.2	<i>id.</i>	<i>id.</i>
UF at nominal TMP for $v = 1 \text{ m.s}^{-1}$	5	MQ ₂	112.5 - 3.2	S _A	0.10	1.0	20	1.5
Influence of sugar concentration C_0	3	MQ ₂	101.9 - 3.5	S _A	0.10	1.0	20	1.5
	6	<i>id.</i>	107.5 - 3.4	S _B	0.16	<i>id.</i>	<i>id.</i>	<i>id.</i>
	7	<i>id.</i>	109.7 - 3.3	S _{Bcd1*}	0.64	<i>id.</i>	<i>id.</i>	<i>id.</i>
	8	<i>id.</i>	110.7 - 3.3	S _{Bcd1}	<i>id.</i>	<i>id.</i>	<i>id.</i>	<i>id.</i>
	9	<i>id.</i>	110.2 - 3.3	S _{Bcd2}	1.06	<i>id.</i>	<i>id.</i>	<i>id.</i>
Evaluation of the critical flux J_{ci}	10, 11	MQ ₂	110.9 - 3.2	S _B	0.16	1.0	20	1.5
Influence of temperature T	12	MQ ₃	71.0 - 5.0	S _{Bcd1}	0.64	1.0	20	1.5
	13	<i>id.</i>	121.1 (40 °C) - 4.5	<i>id.</i>	<i>id.</i>	<i>id.</i>	40	<i>id.</i>

⁽¹⁾ Initial water permeability Lp_w at 20 °C and initial membrane resistance R_m

⁽²⁾ Fluid vein of thickness e without ($e = 0.5 \text{ mm}$) or with a feed spacer 46 mil ($e = 1.5 \text{ mm}$).

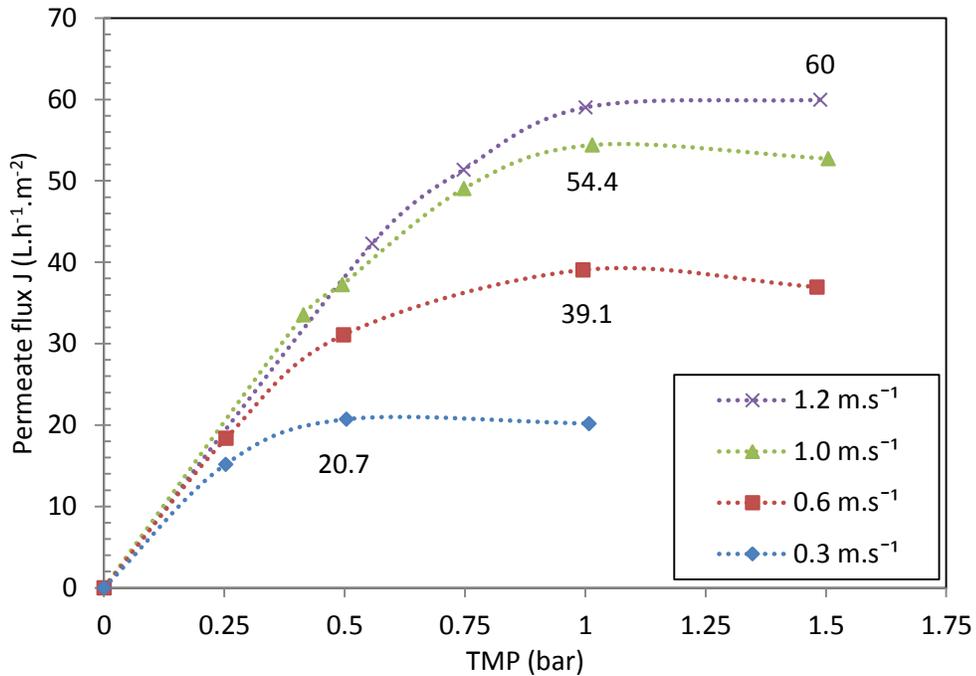


Figure IV.2 . Steady state permeation flux J against TMP at various cross-flow velocities.

Experimental conditions: exp. No. 1-4, membrane sample MQ₂, e = 1.5 mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_A (C₀ = 0.10 kg GlcEq.m⁻³), T = 20 °C, v = 0.3, 0.6, 1.0 and 1.2 m.s⁻¹. Limiting permeate fluxes for the various velocities are indicated on the diagram.

3.2. Influence of operating parameters on EPS filtration

3.2.1. Cross-flow velocities v and transmembrane pressure TMP

Transmembrane pressure TMP and tangential velocity v that condition flow pattern (Reynolds number) and wall shear stress are usually the main parameters governing both the energetic requirements of a membrane filtration and the fouling of the membrane. Therefore, flux-TMP curves at different velocities v are a useful tool to evaluate the feasibility of a membrane operation. The curves were established for the filtration of the EPS solution S_A (0.10 kg GlcEq.m⁻³) in the following conditions: a fluid vein 1.5 mm width with a feed spacer, temperature 20 °C, tangential velocity v: 0.3, 0.6, 1.0 and 1.2 m.s⁻¹ (runs 1-4).

For a given TMP, an increase in the fluid velocity v always led to an increase of the steady state permeation flux whatever the pressure. For a given velocity, an increase in the TMP firstly led to an increase in flux, but then a plateau was reached at the so-called limiting flux, J_{lim}.

An excessive increase in TMP seems to induce a decrease in permeation flux. As explained by Jönsson and Trägård (1990), the decrease in permeation flux at high pressures can be due either to the compression of the formed cake or gel layer or to the compaction of the polymeric membrane itself. Such a phenomenon has already been observed with biological suspensions containing polysaccharides such as suspensions of microalgae or bacteria (see for instance Rossi *et al.*, 2008). As mentioned earlier, for $v = 0.3 \text{ m.s}^{-1}$, a typical value in spiral wound modules, the limiting flux $J_{lim} = 20.7 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ was reached rapidly at a low TMP of 0.5 bar (see Figure IV.2). Thereby, it seems that the EPS solution fouled strongly the membrane under these conditions.

As the nominal TMP was already low ($\sim 0.25 \text{ bar}$) for this experiment at $0.10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$, it turned out that it would be even lower for more concentrated EPS solutions, so that the reachable concentration factor in a UF operated in a concentration mode would probably be very limited. Thus, to isolate and concentrate the *P. cruentum* EPS with an organic PES membrane, it will be probably necessary to work in more favorable hydrodynamic conditions by increasing the tangential velocity v . Therefore, the TMP-flux curves have been established for 3 other values of v ranging from 0.6 to 1.2 m.s^{-1} (Figure IV.2). As expected, the limiting permeate flux J_{lim} increased with the fluid velocity from $20.7 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ at 0.3 m.s^{-1} to $60 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ at 1.2 m.s^{-1} . So, higher shear stresses resulting from higher velocities reduce the thickness of the concentration boundary layer and prevent the accumulation of materials on the membrane surface (Rezaei *et al.*, 2014). Otherwise, the evolution of J_{lim} against v fit very well the “gel layer model” proposed by Blatt *et al.* (1970) to explain the TMP independence of flux in ultrafiltration when the TMP is increased beyond a certain value. The gel layer model results from the film theory in the case where (i) the solute concentration on the membrane surface is high enough that it undergoes a gelation (or more generally, any liquid-solid phase transition) and (ii) the solute concentration in the permeate is negligible. The limiting flux is then linked to the solute concentration in the bulk by the relation:

$$J_{lim} = k \ln \frac{C_g}{C_0} \quad (\text{IV.4})$$

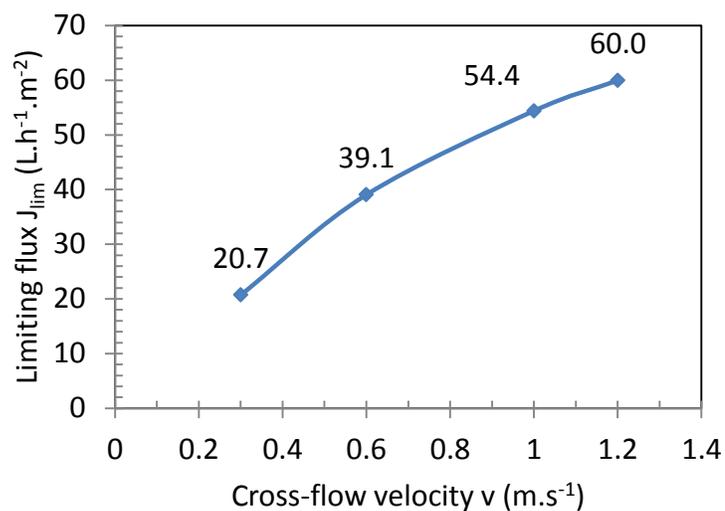
where C_g is the gel concentration of the solute and k the mass transfer coefficient in the polarization layer which can be expressed with respect to the tangential velocity v using a mass transfer correlation. When a set of experiments are carried out with the same solution and at the

same temperature, the gel model leads to the following relation between the limiting flux J_{lim} and the tangential velocity v (see Appendix 1):

$$J_{lim} = C \times v^a \quad (IV.5)$$

where C and a are 2 constants. Figure IV.3 shows that experimental results fit quite well the proportional relationship between J_{lim} and v^a (coefficient of determination $R^2 = 0.99$) with $a = 0.77$. This value is fully coherent with those for turbulent flow, which are known to be comprised between 0.75 and 0.90 (Gekas and Hallström, 1987), meaning that nothing obviously limits the positive influence of the fluid velocity on the limiting flux.

a)



b)

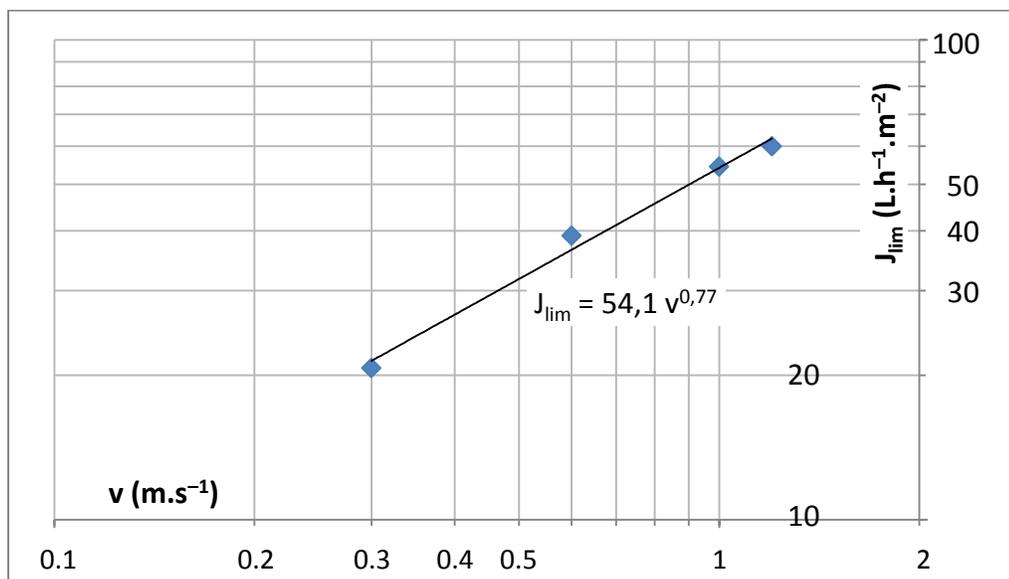


Figure IV.3. Limiting permeate flux J_{lim} against the cross-flow velocity v on linear (a) and logarithmic scales (b).

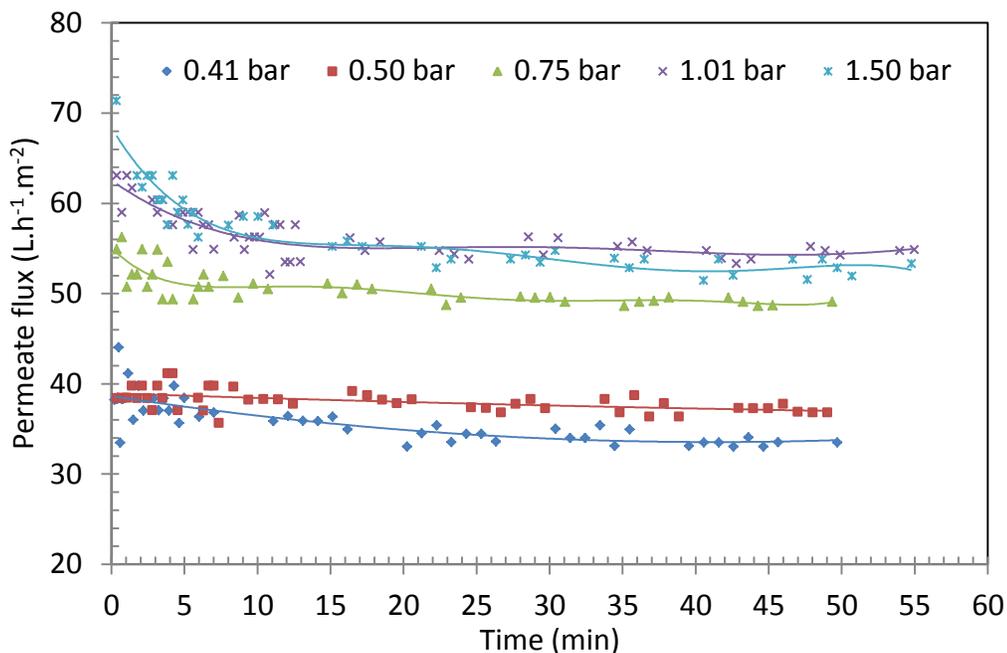
Experimental conditions: exp. No. 1-4, membrane sample MQ₂, $e = 1.5$ mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_A ($C_0 = 0.10$ kg GlcEq.m⁻³), $T = 20$ °C.

Flux-TMP curves were also used to choose the tangential velocity v for the runs concerning the influence of the concentration in EPS C_0 on permeation flux and membrane fouling by taking into account the extend of the pressure drop across the module. As v increased, fouling decreased and permeate fluxes increased, but so did the pressure drop across the module.

Such high value increases the minimum TMP usable and makes the membrane work more heterogeneously. It would also increase pumping costs on an industrial plant. Thus, pressure drop was 0.04, 0.14, 0.27 and 0.36 bar for 0.3, 0.6, 1.0 and 1.2 m.s⁻¹ respectively at the minimal accessible TMP and for a membrane length of 16.8 cm. For this reason, a cross-flow velocity of 1.0 m.s⁻¹ seemed to be a reasonable compromise and was thus selected for all subsequent experiments.

By the end, a filtration was carried out in the same conditions of those of run 3 but at a single TMP_n of 0.57 bar representing the nominal TMP for a 1.0 m.s⁻¹ tangential velocity (run No. 5). The stabilized permeation flux obtained under this TMP_n was 41.2 L.h⁻¹.m⁻², which is very close to that in run 3 (40.8 L.h⁻¹.m⁻²) for the same TMP. The agreement between the two values can be interpreted as a clue of the stability of the membrane hydraulic resistance R_m after regeneration (this will be confirmed by the examination of the fouling resistances in section 3.3.1). Figure IV.4 shows the evolution of the permeate flux J over time for the filtration. During the filtration at the nominal TMP (Figure IV.4b), the flux exhibits a sharp drop during the first 20 min flux followed by a slower decline before reaching a steady-state value after about 170 minutes. Flux stabilization was much faster for experiments where TMP was increased step by step until the limiting flux is obtained, with a typical duration of about 25 to 50 min (see Figure IV.4a).

a)



b)

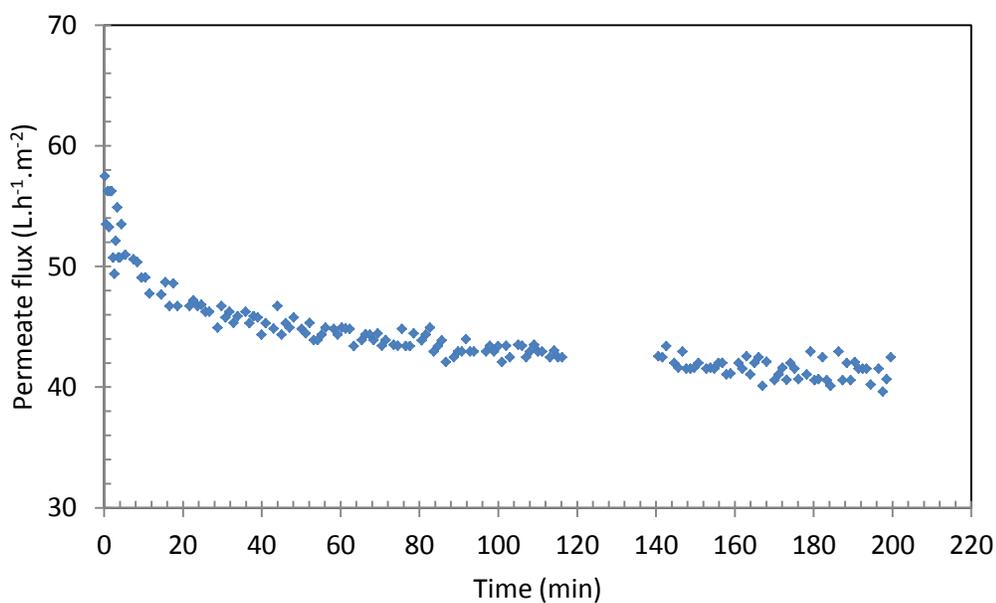


Figure IV.4. Evolution of permeate flux versus time during cell-free medium filtration, with a step-by-step increase TMP (a) or at the nominal TMP_n of 0.57 bar (b).

Experimental conditions: exp. No. 3 (b) and 5 (a), membrane sample MQ₂, e = 1.5 mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_A (C₀ = 0.10 kg GlcEq.m⁻³), T = 20 °C, v = 1.0 m.s⁻¹.

3.2.2. EPS concentration C_0

The effect of EPS concentration on fouling experiments was studied through the filtration of the 4 solutions S_A , S_B , S_{Bcd1} and S_{Bcd2} with respective EPS concentrations of 0.10, 0.16, 0.64 and 1.06 kg GlcEq.m⁻³ (runs 3, 6, 7, 8 and 9; membrane sample MQ₂, cross-flow velocity 1.0 m.s⁻¹, temperature 20 °C, VRR 1). The filtration of solution S_{Bcd1} was performed twice, without (S_{Bcd1}^*) and with a clarification by centrifugation (runs 7 and 8, respectively) to remove precipitates that appeared in small quantities after thawing. As no difference was observed between the two flux-TMP curves, it was considered thereafter that the presence of these precipitate did not lead to any bias.

EPS retention. The EPS concentration in permeates was very low and below the threshold of quantification for all solution concentrations C_0 , and even undetectable. Hence, the retention in EPS by the membrane can be considered total as expected because of the MWCO of the membrane.

Permeation fluxes. The filtration curves for the various concentrations are shown on Figure IV.5. As the EPS concentration C_0 in the feed solution increased, the limiting permeate flux J_{lim} decreased and was reached for a lower TMP value (see Figure IV.5 and Table IV.4), because of the amount of additional material likely to foul the membrane. However, the decay in J_{lim} when C_0 increased did not seem to agree with the gel layer model. According to equation (IV.4), the J_{lim} plot against $\ln(C_0)$ should intersect the abscissa axis at $\ln(C_g)$. Now the plot here gives a C_g value of 47 kg GlcEq.m⁻³ which seems to be high (see Figure IV.6). Indeed, Balti *et al.* (2018) estimated a C_g value of around 5.5 kg GlcEq.m⁻³ when they concentrated a supernatant of *P. cruentum* with an inorganic microfiltration membrane (mean pore diameter 0.14 µm) up to a VRR of 10. Cheryan (1998, section 4 G) indicates that the experimental values of C_g can be much lower than those predicted by the gel layer model if the solution viscosity and solutes diffusion coefficient vary greatly with the increase in C_0 , which is the case for highly viscous polysaccharide solutions (Eteshola *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2013).

Therefore, the permeation fluxes that would be obtained during a concentration mode filtration up to a VRR of about 10 could be lower than those obtained here. Nevertheless, they indicate that *P. cruentum* EPS can probably be isolated from supernatants obtained outdoors in open circulating pond with quite high concentration factors. As already mentioned, Li *et al.*

(2011) reported that EPS of various photosynthetic microorganisms could be isolated from culture supernatants using a plate UF unit up to high volume reduction factors (20 and sometimes 40) with a mean permeate flux around $35 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Although they didn't specify the EPS concentration (C_0) in the supernatants processed, the EPS yields they mentioned allow to estimate that it ranged between 0.02 and 0.2 kg.m^{-3} .

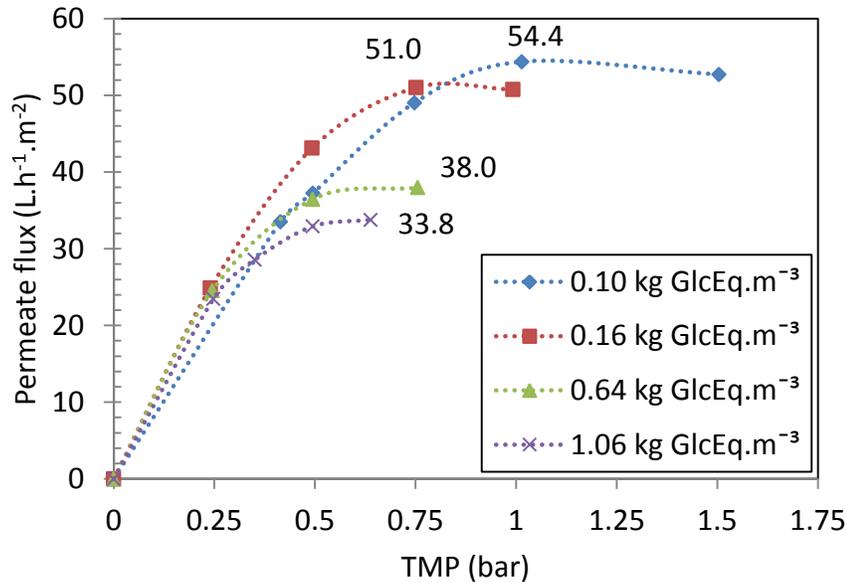


Figure IV.5. Effect of EPS concentration C_0 on the steady-state permeation flux at various TMP.

Experimental conditions: exp. No. 3, 6, 8, 9, membrane sample MQ₂, $e = 1.5 \text{ mm}$ with feed spacer, $VRR = 1$, EPS solution S_A ($0.10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), S_B ($0.16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), S_{Bcd1} ($0.64 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$) and S_{Bcd2} ($1.06 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, $v = 1.0 \text{ m.s}^{-1}$. Limiting permeate fluxes values for the various EPS concentrations are indicated on the diagram.

Table IV.4. Limiting permeate fluxes and TMP obtained during EPS fouling experiments at 20 °C, with the membrane sample MQ₂.

Experimental conditions: exp. No. 3, 6, 8 & 9, e = 1.5 mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_A, S_B, S_{Bcd1} et S_{Bcd2}, T = 20 °C, v = 1.0 m.s⁻¹.

EPS solution	EPS concentration (kg GlcEq.m ⁻³)	Limiting permeate flux J _{lim} (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Limiting TMP, TMP _{lim} (bar)
S _A	0.10	54.4	1.00
S _B	0.16	51.0	0.75
S _{Bcd1}	0.64	38.0	0.50
S _{Bcd2}	1.06	33.8	0.65

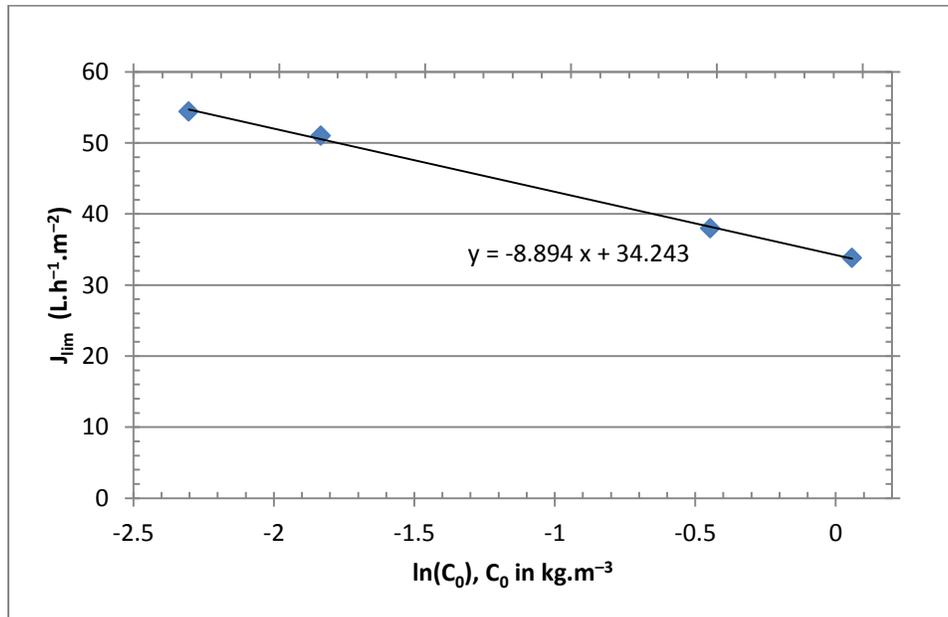


Figure IV.6. Curve J_{lim} versus ln(C₀), with J_{lim} the limiting permeate fluxes and C₀ the EPS concentration.

Experimental conditions: exp. No. 3, 6, 8, 9, membrane sample MQ₂, e = 1.5 mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_A (0.10 kg GlcEq.m⁻³), S_B (0.16 kg GlcEq.m⁻³), S_{Bcd1} (0.64 kg GlcEq.m⁻³) and S_{Bcd2} (1.06 kg GlcEq.m⁻³), T = 20 °C, v = 1.0 m.s⁻¹.

3.2.3. Temperature T

Temperature has a direct effect on permeate flux through the solvent viscosity but it can also affect fouling depending on feed solution and solute characteristics. So, the same EPS solution (S_{Bcd1} , $0.64 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$) was filtered in the same conditions but at two different temperatures in order to evaluate the temperature effect on the filterability. The limiting permeate flux J_{lim} was found to increase by 52 % from 33.9 to $51.5 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ when the temperature rose from 20 to 40 °C (runs 12 & 13).

The literature reports four different potential influences of temperature on permeate flux. According to Jönsson and Trägårdh (1990) and Cheryan (1998, section 6.D.3), (i) an increase in temperature reduces the viscosity of the solution and thus increases the permeate flux according to Darcy's law. On the other hand, (ii) the rise in permeate flux can increase the accumulation of solutes at the membrane wall and thus the solution osmotic pressure, partly limiting the flow rise. Additionally, temperature variations can also (iii) decrease the solubility of some inorganic compounds such as calcium phosphate (calcium and phosphate ions being present in the *P. cruentum* culture medium). Furthermore, (iv) it may affect the physicochemical characteristics of macromolecules and their adsorption to the membrane surface and can therefore have an effect on the solute retention efficiency (Campbell *et al.*, 1993). In our case, cause (ii) can be ruled out as the major solutes are high molecular weight EPS, as well as cause (iv) because of the total retention of EPS by the 50 kDa MWCO membrane. In order to evaluate the direct influence of T on flux through the decrease in fluid viscosity (cause i), the permeate fluxes measured at 40 °C were corrected at 20 °C assuming the permeate had the same viscosity as pure water. The corrected flux-TMP curve was then compared to that measured directly at 20 °C. It can be seen in Figure IV.7 that the flux-TMP measured à 20 °C and the one established at 40 °C but corrected to 20 °C are virtually superimposable, meaning that the influence of T on permeation fluxes can be totally explained by the viscosity decrease.

To conclude, the results indicate that a filtration at 40 °C would be appropriate when using a MWCO low enough for the membrane retaining totally the EPS. A similar conclusion was reported by Li *et al.* (2011) who isolated EPS from the cell-free medium of *H. pluvialis* clarified by microfiltration using an ultrafiltration PES membrane with a 5 kDa MWCO. The authors found that the permeate flux increased from 33.9 to $57.7 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ (70 % increase) when

the temperature rose from 20 °C to 50 °C, and they concluded that a temperature between 30 and 40 °C was appropriate to isolate EPS by ultrafiltration.

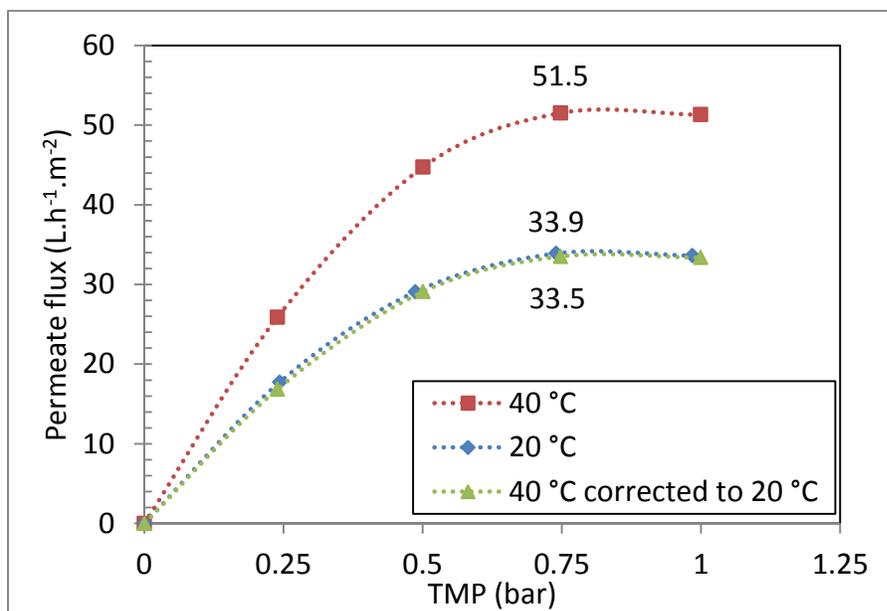


Figure IV.7. Effect of temperature on steady-state permeation flux J at various TMP.

Experimental conditions: exp. No. 12, 13, membrane sample MQ₃, $e = 1.5$ mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_{Bcd1} (0.64 kg GlcEq.m⁻³, $T = 20$ and 40 °C, $v = 1.0$ m.s⁻¹). Limiting permeate fluxes values for the various temperatures are indicated on the diagram.

3.3. Fouling characterization

The nature and extent of fouling during the filtration of EPS solutions were characterized firstly on the basis of the hydraulic resistances of reversible and irreversible fouling, then using the square wave procedure for determining the critical flux for irreversibility.

3.3.1. Hydraulic resistances of membrane and fouling layer

Figure IV.8 displays the resistances values of the membrane (R_m) and the reversible (R_{rev}) and irreversible (R_{irrev}) parts of fouling for all the test runs carried out on the membrane samples MQ₂ and MQ₃. Runs are numbered chronologically in the order they were performed. R_m was measured prior to each experiment and R_{rev} and R_{irrev} at the end of the procedure. Note that all the runs excepted No. 5 consisted in establishing the flux-TMP curve by a step-by-step increase in TMP. Consequently, the fouling resistances R_{rev} and R_{irrev} are not associated with specific

hydrodynamics conditions but are rather the cumulative result of successive filtrations carried out at several increasing pressures until the limiting flux was reached, meaning that the membrane worked in severe fouling conditions. Therefore, fouling resistances and R_{rev} in particular should be analyzed and compared with caution.

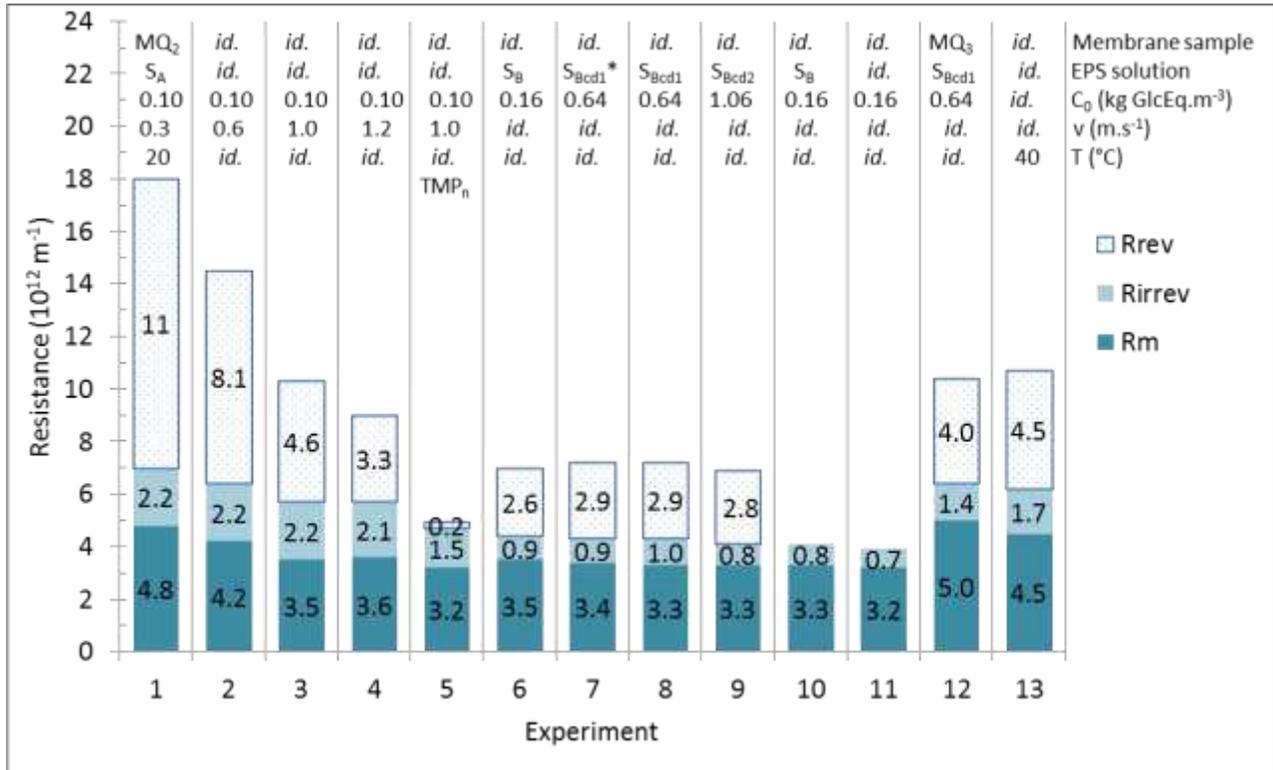


Figure IV.8. Evolution of hydraulic resistances (R_m , R_{rev} and R_{irrev}).

Exp. 1, 2, 3, 4 (influence of cross-flow velocity v on EPS filterability), exp. 5 (UF at nominal TMP for $v = 1.0 \text{ m.s}^{-1}$), exp. 3, 6, 7, 8 & 9 (influence of EPS concentration C_0 , exp. 10 & 11 (evaluation of the critical flux), exp. 12 & 13 (influence of temperature). Operating conditions are mentioned above the results of each experiment.

The membrane resistance. R_m decreased by 27 % from 4.8×10^{12} to $3.5 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ on the first 3 experiments (runs 1-3), after which R_m remained stable at $\pm 5\%$ for subsequent tests. This behavior was also observed with the membrane sample MQ₃ (data not shown). As R_m is independent of fouling and fluid flow conditions (Rezaei *et al.*, 2014), the decrease in R_m values after the chemical cleaning steps of the first runs can be attributed to a modification of membrane morphology or surface quality such as pores size, hydrophobicity or surface charge or the progressive formation of a residual fouling layer up to a stable state.

The influence of the cross-flow velocity on fouling was carried out on solution S_A at a concentration in EPS of 0.10 kg GlcEq.m⁻³ (runs 1-4). It can be seen in Figure IV.8 that the value of R_{irrev} is roughly the same (about 2.2 × 10¹² m⁻¹) regardless of the cross-flow velocity v, the cleaned membrane resistance and the last TMP used (1 bar for 0.3 m.s⁻¹ but 1.5 bar for 0.6, 1.0 and 1.2 m.s⁻¹). Irreversible fouling is due to the deposition of solutes onto the external surface and/or within the pores of the membrane (adsorption, pore blockage, irreversible deposit or gel) which can be removed only by chemical cleaning. Under the operating conditions investigated in runs 1-4, it seems that the irreversible fouling was quite independent of the cross-flow velocity contrary to the reversible fouling. Indeed, R_{rev} decreased when the cross-flow velocity increased, expressing the positive influence of this parameter on reversible fouling due to the increase in the lift force by greater wall shear stress that limited the solutes deposition on the membrane.

In any case, the resistance of the reversible fouling (R_{rev}) in runs 1-4 was greater than that of the irreversible fouling (R_{irrev}), but as explained in the first paragraph of this part, the fact should be interpreted with caution. In that respect, comparing runs 3 and 5 indicates that the irreversible resistance was higher than the reversible one in run 5 (moderate fouling conditions) contrary to what was observed for the run 3 (same tangential velocities but more severe fouling conditions). For the filtration under nominal TMP at 1.0 m.s⁻¹ (run 5), R_{irrev} is significantly lowered but amounts nevertheless to 88 % of the overall fouling resistance. So, in moderate fouling conditions and with low EPS concentrations, the irreversible fouling is the main cause of flux decrease whereas the part of reversible fouling becomes predominant when approaching the limiting flux.

Regarding experiments on the influence of EPS concentration, reversible and irreversible fouling resistances were found to keep almost the same value for all the filtrations of solutions prepared from the supernatant B (runs 6-9, R_{rev} and R_{irrev} ≈ 2.8 and 0.9 × 10¹² m⁻¹ respectively) while EPS concentrations C₀ increased by a factor of 6.6 (0.16 to 1.06 kg GlcEq.m⁻³). One possible reason is that the maximum TMP imposed on the plateau decreased when the concentration of EPS was increased (see Figure IV.5) so that the opposite influences of the two parameters on the fouling compensate each other. On the other hand, the irreversible fouling resistances for the filtrations of solutions S_B, S_{Bcd1} and S_{Bcd2} (R_{irrev} ~ 0.9 × 10¹² m⁻¹) were lower than those for the filtration of solution S_A. This hold even for the run 5 (R_{irrev} = 1.5 × 10¹² m⁻¹,

run 5) carried out *a priori* in less fouling conditions (same velocity but nominal TMP and lower EPS concentration). One possible explanation is that the organic matter of solution A has a fouling capacity greater than that of solution B. Indeed, the OM excreted by microalgae depends on the cultivation conditions (solar flux and temperature in particular) and the culture age (Ramus, 1972). The fact that culture A was older than culture B (resp. 22 and 18 days) is compatible with the hypothesis.

Finally, both the irreversible and reversible resistances at the plateau are almost identical at 20 and 40 °C, confirming that T has little or no impact on fouling establishment as hypothesized in section 3.2.3.

3.3.2. Estimation of the critical flux for irreversibility J_{ci}

Before estimating the critical flux for irreversibility, we sought whether the critical flux was of weak or strong form, i.e. if there is a rapid adsorption of material at the beginning of the filtration or not. The decrease in permeability (J/TMP) between the clean water flux measurement just before the filtration and the filtration of the EPS solution at low TMP was determined for the 4 tests carried out with the solution S_A . The decrease was clear but moderate with an average value of 20.5 ± 4.0 % which indicates the existence of an additional flow resistance during the filtration of EPS solutions at low TMP. The cause may *a priori* be either a moderate adsorption or the formation of a polarization layer. Indeed, the increase in EPS solutions viscosity with the EPS content even at low concentration could reduce the back transfer of EPS accumulated near the membrane surface. Therefore, the issue of the existence of a moderate adsorption cannot be solved without a rheological study of filtered EPS solutions and a study of the flow of these solutions near the membrane surface (Eteshola *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2013).

The critical flux for irreversibility J_{ci} was defined by Bacchin *et al.* (2006) as the flux above where an irreversible fouling of the membrane appears. Note that the concept of reversibility considered by these authors is not the one used here. In our paper, the reversible resistance is that of the part of the solid deposit on the membrane which will be eliminated by sweeping it with water *after stopping the filtration of the solution*, the irreversible resistance being that of the residual part whose elimination requires a chemical cleaning of the membrane.

For Bacchin *et al.* (2006), the reversible resistance to permeation is the one which will gradually disappear when the pressure is decreased *during the filtration of the solution*. The reversible resistance is offered by molecules or particles accumulated more or less compactly in the vicinity of the fouled membrane but without significant interaction with the deposit already formed on the membrane surface, whereas the irreversible resistance is that of the deposit already formed. To mark the difference between the two notions of reversibility, an asterisk will be attached to that of Bacchin *et al.* (2006).

J_{ci} was determined by filtering the solution S_B ($0.16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$) according to the procedure proposed by Espinasse *et al.* (2008). The method consists in imposing successive square waves of pressure composed each one of an upper (U) and a lower (L) pressure step while continually monitoring the permeate flux J . For example, the first 2 square waves in Figure IV.9a are $(U_1, L_1) = (b, c)$ and $(U_2, L_2) = (d, e)$. Two successive square waves (U_{n-1}, L_{n-1}) and (U_n, L_n) are such that $TMP_{U_n} > TMP_{U_{n-1}}$ and $TMP_{L_n} = TMP_{U_{n-1}}$, i.e. the pressure after the lower step L_n is brought back to the upper pressure imposed at the previous wave (with an exception for the first square wave). The occurrence of a critical flux is then determined as follows. Firstly, the presence of a flux decline at an upper step U_n indicates that the increase in TMP has increased the membrane fouling and that a kind of critical flux has been reached (for instance J_d on Figure IV.9a). Then, the type of additional fouling appeared after step U_n is diagnosed by comparing the stabilized permeate fluxes at the same pressure before and after the square wave (i.e., J_{L_n} and $J_{U_{n-1}}$ for $n > 1$ and J_a and J_c for the 1st wave). The additional fouling appeared at step U_n is considered as totally reversible if fluxes J_{L_n} and $J_{U_{n-1}}$ are not significantly different, and partly irreversible otherwise.

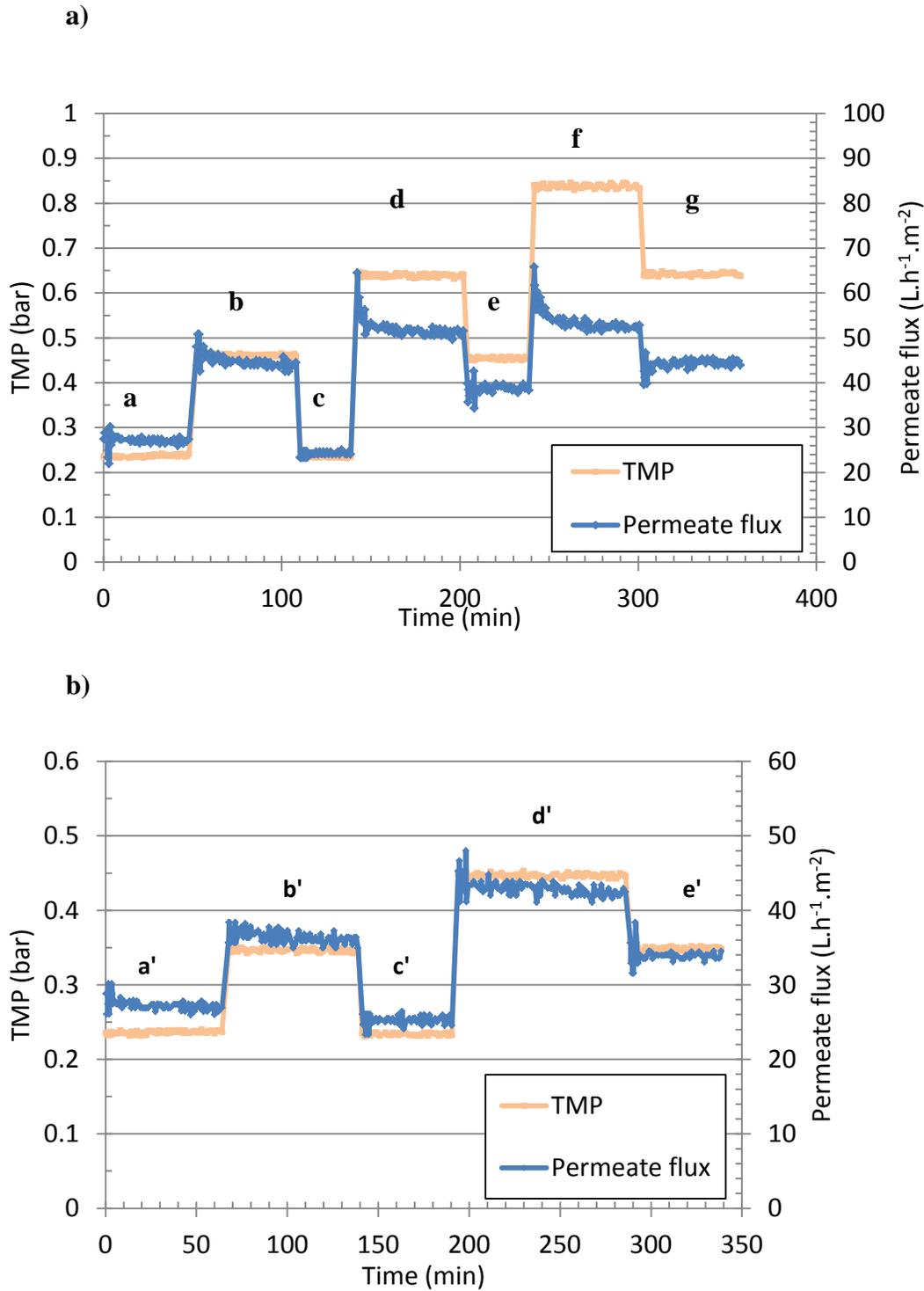


Figure IV.9. Evaluation of the critical flux for irreversibility J_{ci} by the method of square wave of applied pressure, with step amplitude of 0.20 bar (a, exp. No. 10) or 0.10 bar (b, exp. No. 11).

Experimental conditions: membrane sample MQ₂, $e = 1.5$ mm with feed spacer, VRR = 1, EPS solution S_B (0.16 kg GlcEq.m⁻³), $T = 20$ °C, $v = 1.0$ m.s⁻¹.

Here, TMP was firstly increased from 0.24 to 0.85 bar by 0.20 bar increments (Figure IV.9a). It can be seen that a critical flux was reached from the first upper step since a flux decline with time was observed at this pressure (step b, 0.45 bar). In addition, the stabilized flux after the first lower step c (0.24 bar) was not totally recovered but decreased by 9.6 % between steps a (26.9 L.h⁻¹.m⁻²) and c (24.3 L.h⁻¹.m⁻²). This means that the fouling was already (in part) irreversible and that the critical flux for irreversibility J_{ci} was already exceeded at 0.45 bar. A second test run was thus carried out under the same conditions but with a smaller TMP increment of 0.10 bar (Figure IV.9b). Here again, after the first wave a'-b'-c', a small decrease between the stabilized fluxes $J_{c'}$ and $J_{a'}$ was observed, meaning that an irreversible fouling existed already at 0.35 bar, e.g. that the critical flux is below 36 L.h⁻¹.m⁻². The value of J_{ci} was thus estimated by Espinasse *et al.* (2008) by computing the total irreversible resistance at the upper steps as the sum of the additional resistances that appeared gradually at the n first upper steps:

$$R_{irrev}^*(U_n) = \sum_{i \leq n} r_{irrev}^*(U_i) \quad (IV.6)$$

$$r_{irrev}^*(U_i) = R_f(L_i) - R_f(U_{i-1}) \quad (IV.7)$$

where $r_{irrev}^*(U_n)$ is the additional irreversible resistance appearing at level U_n and $R_f(S)$ the overall fouling resistance at step S. Plotting R_{irrev}^* against TMP allows then the estimation of the TMP_{ci} pressure at which an irreversible fouling begins to manifest, i.e. at nil R_{irrev}^* . Here, a linear regression gives an estimation of TMP_{ci} around 0.3 bar (see Figure IV.10) which would correspond to a critical flux $J_{ci} = 32 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ and a ratio J_{ci}/J_{lim} close to 0.6. However, the value of J_{ci} is overestimated because the flux at the first upper step U_1 is not sub-critical therefore a part of the irreversible resistance was not taken into account in eq IV.6. Indeed, the high tangential velocity required for the EPS solution filtration results in a high pressure drop through the module, so that the minimal mean TMP is above the one corresponding to the critical flux. Similar values of J_c have been already reported for the filtration on a PES 50 kDa membrane of cells and macromolecules, i.e. 23 L.m⁻².h⁻¹ for yeast and 32-55 L.m⁻².h⁻¹ for BSA depending on Reynolds number (Wu *et al.*, 1999 cited by Bacchin *et al.*, 2006).

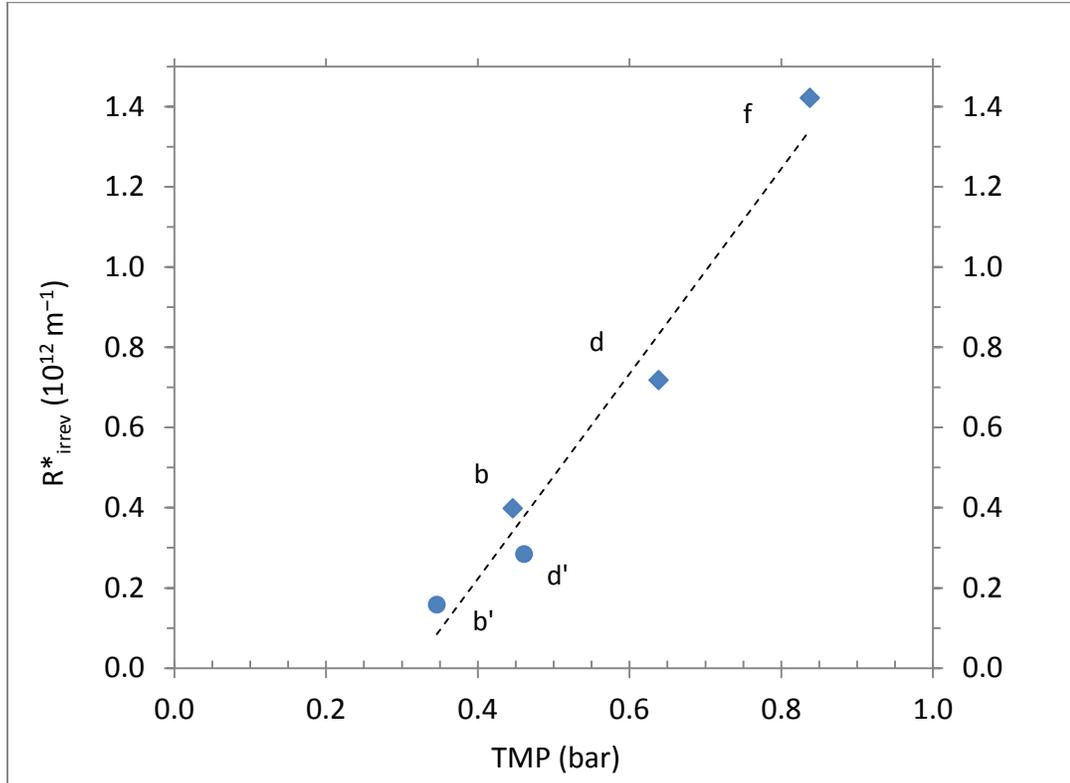


Figure IV.10. Evolution of the irreversible fouling resistance R^*_{irrev} against the transmembrane pressure with the technique of the square wave of applied pressure.

Exp. No. 10 (square marks) and 11 (round marks). Same conditions as for Figure IV.9.

Finally, we would emphasize that the measurement of the critical flux could be hampered by a noticeable heterogeneity in the membrane permeability over its surface. Rabiller-Baudry *et al.* (2014) report three possible causes of such heterogeneity, namely (i) variations in permeability of the primary membrane, (ii) the axial gradient of TMP along the membrane, and (iii) the fluid distribution at the membrane inlet and the resulting local variations in fluid velocity and turbulence. Cause (i) is not considered here because it is not related to the hydrodynamics of the flow in the module, and cause (iii) not either as we have no insight on the fluid distribution at the module entry. Regarding cause (ii), the minimal TMP in this work was high as already mentioned because of the importance of the pressure drop in the module. For instance, in the condition of exp. 10 and 11 (see legend of Figure IV.9), the minimal TMP was 0.24 bar and the pressure drop ΔP between the inlet and the outlet of the module 0.29 bar. The actual pressure drop along the membrane is lower because of the point losses at the module entrance and exit,

but considering that the order of magnitude of the mean membrane permeability J/PTM at low TMP is around $100 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$, even a third of ΔP would lead to a significant decrease in the permeate flux between the entrance and the exit of the module ($\sim 10 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) if the effect of the TMP gradient on flux was dominant. Furthermore, Cho and Fane (2002) established from SEM examination that the fouling by EPS in membrane bioreactors (flat sheet MF membrane $0.22 \mu\text{m}$ in hydrophilised PVDF) was progressively increasing from entry to the output of the module, which tends to further increase the ratio of the local flux of permeate between the inlet and the outlet due to the pressure drop. The authors indicated that '*the reason for this significant axial distribution of foulant is not clear but may be due to stronger eddies close to the inlet or the surface flow of foulant downstream due to shear*'.

3.4. Feasibility of the extraction of EPS from *P. cruentum* supernatants by organic UF at an industrial scale

Here the choice of filtration modules that could be used on an industrial scale to concentrate EPS solutions on organic membranes will be discussed.

P. cruentum culture media containing EPS are strongly fouling solutions. Table IV.5 compares the performance of the filtration of EPS solutions and of skim milk (Rabiller-Baudry *et al.*, 2014) carried out in similar conditions (same plate module, same operating mode $VRR = 1$, similar UF membrane and close temperatures), the main difference being a much higher velocity in our work. It can be seen that limiting and critical fluxes J_{lim} and J_c , respectively, were almost identical in both cases, this means that the fouling capacities of solutions are close to each other although the concentration in organic matter was much higher for skim milk filtration (ratio of about 1000) and the duration longer. As explained in part 3.3.2, the high fouling power of EPS solutions can be attributed to the high molar mass of EPS and their ability to form highly viscous gels and compact deposits on the membrane surface. The fact that J_{lim} and J_c were obtained for higher pressures for skim milk should be related to the nature of critical flux. As indicated by the high drop between the permeabilities for pure water and the filtered solution at low pressures (resp. L_{pw0} and L_{p0}), the membrane underwent a strong adsorption of organic matter during the filtration of skim milk. This corresponds clearly to the weak form of critical flux (J_{cw}) according

to Bacchin *et al.* (2006), whereas the adsorption was clearly less pronounced during the filtration of EPS solutions.

Spiral wound (SW) modules were considered first because of their high compactness, low energy consumption and low system capital costs (Cheryan, 1998). However, the results obtained in parts 3.2.1 and 3.3.2 show that when filtering the native EPS solution S_A ($C_0 = 0.10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$) in a fluid vein with a feed spacer at a tangential velocity of 0.3 m.s^{-1} typically encountered in spiral wound modules, the limiting flux was quickly reached even for a low TMP. Therefore, it can be expected that a high volume reduction ratio VRR could not be obtained in a SW module. Additional work is nevertheless needed to evaluate the possibility to pre-concentrate EPS solutions at a low VRR using a SW module before increasing the VRR on another module. Reaching high VRR in sustainable conditions would probably require working in more favorable hydrodynamic conditions by increasing the tangential velocity v . This can be obtained either within a *plate and frame (PF)* module as has been previously done by Li *et al.* (2011) or with a *tubular module*. An estimation of the wall shear stresses τ_w in typical hydrodynamic conditions shows that they are significantly higher in both modules than in the spiral-wound one (resp. approximately 86 Pa and 58 Pa for a tubular module and a plate and frame module against 8 Pa in a spiral wound module, see Appendix 2).

Table IV.5. Comparison of filtration performance of EPS solution and skim milk at close temperatures.

	Membrane and module	Run conditions ⁽¹⁾	Critical point TMP _c / J _c	Limiting point TMP _{lim} / J _{lim}	Permeabilities L _{p0} / L _{pw0} ⁽²⁾ / drop (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)
EPS solution (this work)	PES 50 kDa (Synder, mod. MQ)	EPS: 0.64 kg GlcEq.m ⁻³ Proteins: 0.02 kg.m ⁻³ Salts : 15 kg.m ⁻³			
	Plate module Rayflow 100, fluid vein e = 1.5 mm with a 46 mil spacer (1.168 mm)	T = 40 °C v = 1.0 m.s ⁻¹ VRR = 1 Duration: 50 – 80 min	0.30 bar 32 L.h ⁻¹ .m ⁻²	0.75 bar 51.5 L.h ⁻¹ .m ⁻²	121 / 108 / 12%
Skim milk (Rabiller- Baudry <i>et al.</i> 2014)	PES 5-10 kDa (Koch, model HFK-131)	Organic matter: 32 kg prot.m ⁻³ , 48 kg lact.m ⁻³			
	Plate module Rayflow 100, fluid vein with a 2 mm spacer	T = 46 °C v = 0.3 m.s ⁻¹ VRR = 1 Duration: 180 min	1.5 bar 28 L.h ⁻¹ .m ⁻²	3.5 bar 50 L.h ⁻¹ .m ⁻²	45 / 18 / 60 %

⁽¹⁾ prot: proteins, lact: lactose, VRR: Volume Reduction Ratio, v: superficial velocity, T: Temperature

⁽²⁾ L_{p0}: permeability at the lowest TMP; L_{pw0}: initial water permeability before filtration.

4. Conclusion

The paper aims to evaluate the filterability of EPS solutions issued from *P. cruentum* cultures by modules equipped with organic membranes.

The establishment of the flux-TMP curves at various fluid velocities shows that the EPS solutions have a strong fouling power even at low EPS concentration. A critical flux for irreversibility J_{ci} was found experimentally to be below 36 L.m⁻².h⁻¹ and was estimated at about

32 L.m⁻².h⁻¹ at a low EPS concentration which would correspond to a ratio J_{ci}/J_{lim} close to 0.6. The hydraulic resistance to the permeate flux is mainly irreversible at moderate pressure but the reversible fraction becomes predominant when approaching the limiting flux.

However, the permeate fluxes obtained at various fluid velocities allow estimating that a VRR of about 10 could be obtained by concentrating EPS solutions on organic membranes either in flat or tubular modules but not in a spiral-wound module. Working at the maximum temperature tolerated by the membrane (approximately 50 °C for PES membranes) should be considered, verifying that the polysaccharides will not be denatured for the intended use.

Acknowledgements

This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) under the Algoraff project, and by the Azm and Saade association (Tripoli, Lebanon).

We also thank the Algosolis platform (UMS CNRS 3722) for the supply of culture supernatants of *Porphyridium cruentum*, and Mr. Meignan (Ecolab, France) for graciously providing us with Ultrasil cleaning products and advice on their use.

Appendix 1 – Relation between the limiting flux J_{lim} and the tangential velocity v for a set of filtrations carried out on the same solution and at the same temperature

The film theory leads to the following relation as soon as the concentration polarization is not negligible (see for instance (Jönsson and Trägårdh, 1990):

$$J = k \ln \frac{C_w - C_p}{C_0 - C_p} \quad (\text{A.1.1})$$

where J is the permeate flux, k the solute mass transfer coefficient of the solute in the concentration boundary layer and C_0 , C_w and C_p are the concentration in solute in the bulk, at the membrane wall and in the permeate respectively. At the limiting flux and in the presence of a solute gel at the membrane wall, Equation A.1.1 is reduced to:

$$J_{lim} = k \ln \frac{C_g}{C_0} \quad (\text{A.1.2})$$

with C_g , the gel concentration of the solute, which can be often considered as independent of the flow pattern as a first approximation (more precisely, the gel layer model supposes the existence of a fairly well-defined gel layer for a concentration in solutes independent of the operating parameters and the flow pattern, so long as the solutes retention remain constant (Cheryan, 1998, section 4G). Otherwise, the mass transfer coefficient k can be estimated by correlations having the following form:

$$Sh = A Re^a Sc^b \quad (\text{A.1.3})$$

where Sh , Re and Sc are the Sherwood, Reynolds and Schmidt numbers, and A , a and b constants that on the state development of the fluid velocity and the solute concentration along the channel. For turbulent flow, a is known to be comprised between 0.75 and 0.9 (Gekas and Hallström, 1987). If all the experiments are carried out with the same solution and at the same temperature, all variables in equation (A.1.3) are constants except the tangential velocity v , and the mass transfer coefficient k and (A.1.2) and (A.1.3) reduce respectively to

$$k = B \times v^a \quad (\text{A.1.4})$$

and:

$$J_{lim} = C \times v^a \quad (\text{A.1.5})$$

where B and C are two constants.

Appendix 2 – Comparison of wall shear stress for typical hydrodynamic conditions in spiral wound (SW), plate and frame (PF) and tubular (TUB) modules

The analysis relies on a simplified representation of the fluid flow in the module that assumes in particular (i) a homogeneous distribution of the feed over the width of the membrane, (ii) an exclusively axial fluid flow and (iii) a predominant effect of the frictional losses along the membrane in front of those at the inlet and the outlet of the module. These assumptions are obviously questionable, in particular for spiral and plate and frame modules.

Wall shear stress τ_w along the membrane were estimated through the following equation valid in turbulent flow for a free fluid vein:

$$\tau_w = \frac{1}{2} \rho v^2 f \quad (\text{A2.1})$$

with $f = \frac{0.079}{Re^{0.25}}$ (Blasius law for a conduct with a hydraulically smooth surface) (A2.2)

$$Re = \frac{d_h v \rho}{\eta} \quad (\text{A2.3})$$

where f is the friction factor, Re the Reynolds number, v the (mean) fluid velocity, d_h the hydraulic diameter of the flow channel ($d_h = D$ for a cylindrical tube of diameter D and $d_h \approx 2e$ for a flat, large, rectangular channel height e), ρ and η the density and dynamic viscosity of the fluid which were assimilated here to those of pure water at 20 °C (i.e. $\rho = 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ and $\rho/\eta = 10^6 \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$). For SW and PF modules, computations were performed on the basis of the hydraulic analogy between exp. 1* and 1 (same curve flux-TMP) as explained in Table IV.A.2.1.

Tubular module. As all friction is exerted on the membrane (the whole volume inside the tube is occupied by the fluid), τ_w can be computed directly through equation (A.2.1).

Spiral-wound module. Shear stress have been estimated based on the hydraulic similitude between runs 1 and 1* whose flux-TMP curves are superimposable. The similitude allows hypothesizing that the mean wall shear stresses are quite the same in the two experiments. Therefore, the mean shear stress $\tau_{w,SW}$ for run 1 ($v = 0.3 \text{ m.s}^{-1}$, $e = 1.5 \text{ mm}$ with a 46 mil spacer)

was estimated in the hydraulic conditions of run 1* ($v = 1.0 \text{ m.s}^{-1}$ for $e = 0.5 \text{ mm}$ with no spacer).

The shear stress $\tau_{w,PF}$ on a flat membrane in a FP module was computed assuming that the hydraulic analogy between runs 1 and 1* is kept at higher velocities, i.e assuming that $\tau_{w,PF}$ ($v = 1.0 \text{ m.s}^{-1}$, $e = 1.5 \text{ mm}$ with a 46 mil spacer) is close to the shear stress in a free vein fluid, 0.5 mm height at a fluid velocity $v = 1.0 \times (1.0/0.3) = 3.33 \text{ m.s}^{-1}$.

The calculations lead to the following values of wall shear stresses: $\tau_{w,TUB} = 86 \text{ Pa}$, $\tau_{w,SW} = 8 \text{ Pa}$ and $\tau_{w,PF} = 58 \text{ Pa}$.

NB: the flow is laminar for the equivalent hydrodynamic conditions for the SW module ($Re = 1000$), but not too far from the turbulent flow so that the friction factor f computed from the Blasius law and from the law valid in laminar flow, $f = 16/Re$ are close (resp. 0.014 and 0.016).

Table IV.A.2.1. Hydrodynamic conditions considered in spiral-wound, plate and frame and tubular modules; column a) real conditions in the module, column b) equivalent conditions considered in this work for the estimation of wall shear stress. Fluid properties assimilated to those of pure water at 20 °C in all cases.

Module	Real hydrodynamic conditions	Equivalent hydrodynamic conditions in free fluid vein	τ_w (Pa) from (eq. A.2.2)
Tubular (TUB)	$v = 6.0 \text{ m.s}^{-1}$ Cylindrical tube, $D = 12.7 \text{ mm}$ (diameter of PCI membranes, Filtration Group Corp., USA)	<i>Idem</i> ($d_h = 12.7 \cdot 10^{-3} \text{ m}$)	86
Spiral-wound (SW)	$v = 0.3 \text{ m.s}^{-1}$ Spiral wound rectangular channel, $e = 1.5 \text{ mm}$ with a 46 mil spacer	$v = 1.0 \text{ m.s}^{-1}$ Flat rectangular free vein fluid, $e =$ 0.5 mm, without spacer ($d_h = 10^{-3} \text{ m}$)	8
Plate and frame (PF)	$v = 1.0 \text{ m.s}^{-1}$ Flat rectangular channel, $e = 1.5$ mm, with a 46 mil spacer	$v (= 1.0/0.3) = 3.33 \text{ m.s}^{-1}$ Flat free vein fluid, $e = 0.5 \text{ mm}$, without spacer ($d_h = 10^{-3} \text{ m}$)	58

Chapitre V. Résultats et Discussion :
Caractérisation du colmatage irréversible par
autopsie membranaire (FTIR-ATR et AFM)

1. Introduction

Un des objectifs de la thèse était d'obtenir des informations sur la nature du colmatage de la membrane lors de la filtration des solutions d'EPS, et en particulier sur la façon dont ce colmatage se met en place. Pour cette raison, nous avons cherché à caractériser le colmatage irréversible, c'est-à-dire la fraction résiduelle restant sur la membrane après un rinçage à l'eau effectué après la filtration. Cette caractérisation a été effectuée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR) et par microscopie à force atomique (AFM). Les analyses par FTIR-ATR ont été réalisées dans l'équipe du Professeur Murielle Rabiller-Baudry à l'ISCR UMR 6226 de l'Université de Rennes 1, dans le cadre du stage de DUT 2A de Lucas Chalouni. Les analyses par AFM, quant à elles, ont été réalisées par Benoît Teychené à l'IC2MP UMR 7285 de l'Université de Poitiers. Toutes les analyses ont été effectuées sur la membrane MQ₂ qui, après une série de 10 essais d'ultrafiltration de solutions d'EPS dans différentes conditions opératoires suivis chacun d'un nettoyage en place, a été colmatée en dernier par une solution d'EPS à 0,16 kg GlcEq.m⁻³ sous une pression transmembranaire de 0,45 bar (expérience n° 11 d'estimation du flux critique, voir chapitre IV, § 3.3.2). Il faut rappeler que cette pression correspondait à un flux supérieur au flux critique. Des coupons de membrane MQ vierges conditionnés ont été également analysés, pour servir de référence pour l'analyse de la membrane colmatée.

La technique de FTIR-ATR a pour objectif d'identifier les composés présents dans le dépôt colmatant « irréversible ». La question que l'on se posait était la suivante : *peut-on mettre en évidence la présence dans ce dépôt de composés de la solution filtrée, en particulier de polysaccharides, mais aussi de protéines ou de composés minéraux ?* La microscopie à force atomique (AFM), quant à elle, vise à caractériser la topographie de la surface de la membrane neuve puis colmatée pour détecter la présence d'un dépôt irréversible formé suite au colmatage et accéder à des informations telles que la rugosité de ce dépôt.

2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR)

2.1. Analyse FTIR-ATR de la membrane vierge

La membrane vierge analysée est une membrane neuve MQ qui n'a subi aucune filtration et qui est conditionnée afin d'éliminer les conservateurs (glycérine et métabisulfite de sodium). Ainsi, elle a été rincée soigneusement à l'eau et séchée au dessiccateur avant analyse par FTIR-ATR.

La figure V.1 montre le spectre FTIR-ATR de la membrane vierge MQ. Une seule bande, localisée à 1657 cm^{-1} , correspond à la PVP (polyvinylpyrrolidone), polymère organique ajouté par le fabricant lors de la fabrication de la membrane pour augmenter son caractère hydrophile. Toutes les autres bandes correspondent à la PES (polyéthersulfone), polymère majoritaire du matériau de la membrane.

La bande localisée à 1235 cm^{-1} (liaison C-O-C de la PES) est utilisée comme étalon interne pour évaluer les quantités des colmatants détectés car elle ne présente pas de recouvrement avec les bandes des colmatants potentiels tels que les polysaccharides et les protéines. En effet, lorsque l'épaisseur du dépôt formé à la surface de la membrane augmente, la part du signal due au dépôt augmente, tandis que celle due au matériau membranaire diminue parce que le faisceau IR pénètre moins profondément dans la membrane. De manière à tenir compte de ce double effet, l'estimation de la quantité d'une substance détectée dans le dépôt est basée sur *l'intensité relative* de la bande d'absorbance caractéristique de la substance, définie comme le rapport de la hauteur de cette bande et de celle de l'étalon interne (PES à 1235 cm^{-1}).

Par exemple, l'intensité relative de la bande de la PVP à 1657 cm^{-1} , H_{1657}/H_{1235} , est de l'ordre de 0,164. Des spectres FTIR-ATR ont été également établis par L. Chalouni pour d'autres membranes vierges à base de PES/PVP ayant des seuils de coupure égaux ou légèrement inférieurs à celui de la membrane MQ, et provenant de deux autres fournisseurs (Microdyn de 50 kDa et HFK-131, Koch, de 5 - 10 kDa). Même si les membranes sont différentes, les spectres se ressemblaient mais les intensités relatives des bandes étaient différentes, surtout pour la bande à 1657 cm^{-1} caractéristique de la PVP, avec des variations de l'intensité relative H_{1657}/H_{1235} variant

d'un facteur 2 sur les 3 membranes testées. Ces variations indiquent que la quantité de PVP dans une membrane donnée dépend du fournisseur de cette membrane.

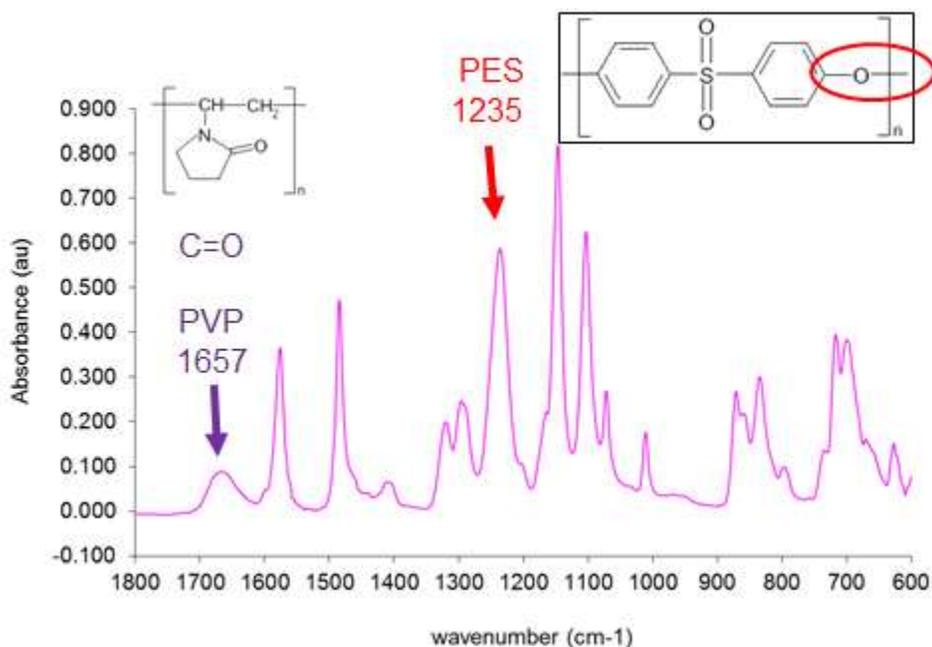


Figure V.1. Spectre FTIR-ATR de la membrane vierge MQ.

2.2. Analyse FTIR-ATR de la membrane colmatée

2.2.1. Plan de la membrane colmatée autopsiée

La membrane autopsiée est la membrane colmatée et rincée MQ₂. Elle a été coupée dans sa longueur en 2 parties égales, la partie droite (a) étant analysée par FTIR-ATR et la partie gauche (b) par AFM. La demi-membrane (a) a été analysée sur toute sa surface par FTIR-ATR en définissant une grille de 88 points régulièrement espacés à la surface de la membrane et en établissant des spectres FTIR en chacun de ces points (voir figure V.2a). Chacun des 88 points sur la figure V.2a représente la trace laissée par la presse lors d'une analyse. Ainsi, au total, 88 spectres ont été obtenus sur le plan de la membrane autopsiée représenté sur la figure V.2b. L'entrée du fluide d'alimentation lors des essais de l'ultrafiltration ainsi que la sortie du rétentat sont indiquées sur les figures V.2a et V.2b. Le point 0 correspond à l'entrée du module et le point 84 est celui de la sortie. *Il faut noter que les 3 bandes situées sur les pourtours extérieurs de la membrane se trouvent lors des filtrations sous le joint d'étanchéité de la membrane et donc en dehors de la surface active de filtration.*

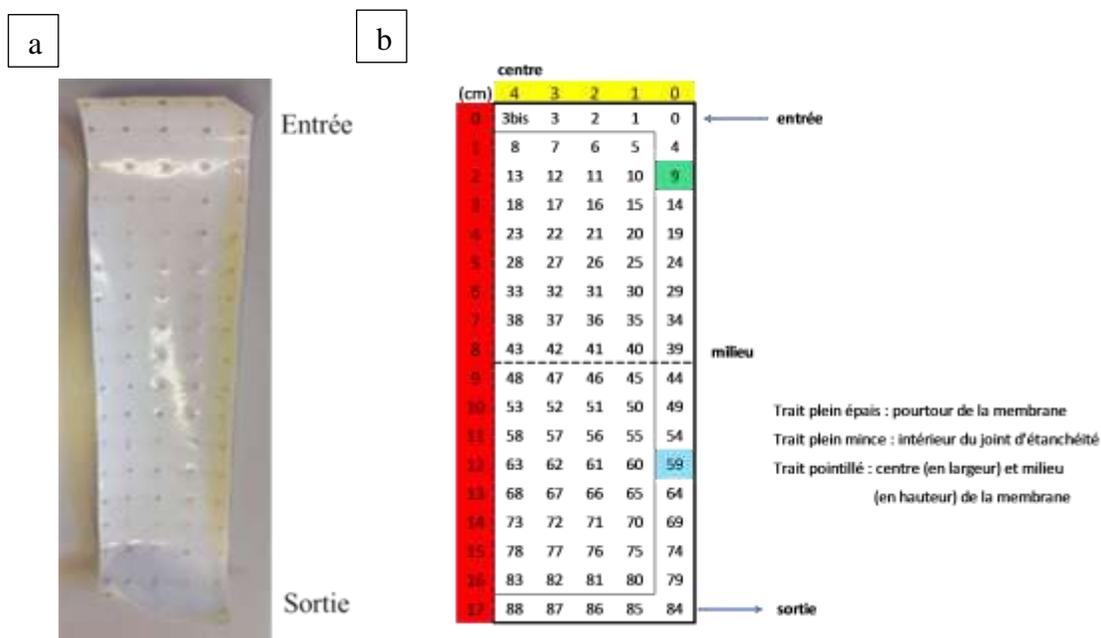


Figure V.2. Photographie de la demi-membrane MQ₂ (colmatée et rincée) autopsiée par FTIR-ATR, avec la disposition des 88 points analysés (a), et numérotation des points et des spectres effectués en ces points (b).

Les spectres aux points 9 et 59 sont pris plus loin comme exemple des spectres de type 1 et 2 respectivement.

NB : la numérotation particulière des cinq points de la première ligne n'a pas de signification particulière mais résulte de contingences matérielles liées à l'ordre dans lequel les analyses ont été effectuées. Cet ordre a été conservé pour éviter toute confusion lors de l'analyse.

2.2.2. Identification des composés colmatants

Dans un premier temps, la présence de composés identifiables dans le dépôt colmatant a été recherchée en comparant les spectres FTIR-ATR des membranes neuve et colmatée. Deux composés ont été détectés et des hypothèses sur leur nature ont pu être posées (§ 2.2.2.1 et 2.2.2.2). Ce premier examen n'a pas permis de détecter de bande caractéristique des EPS. Aussi, une recherche plus approfondie de la présence d'EPS dans le dépôt colmatant a été entreprise sur la base des spectres d'EPS lyophilisés et ceux effectués sur des coupons de membrane vierge trempés dans des solutions d'EPS lyophilisés à 2 et 5,4 kg.m⁻³ (§ 2.2.2.3). La présence d'EPS dans le dépôt colmatant a pu ainsi être établie. Enfin, une cartographie des 3 composés identifiés a été établie (§ 2.2.2.4).

2.2.2.1. Recherche des colmatants

La démarche d'identification des colmatants sur la membrane ayant filtré des EPS est basée sur la comparaison des spectres de la membrane colmatée avec ceux de la membrane vierge et ceux des produits étalons à l'état solide ou en solution aqueuse. Dans un premier temps, on détecte les nouvelles bandes apparaissant sur le spectre de la membrane colmatée, puis on les compare avec les principales bandes d'absorbance des produits étalons (voir chapitre II, § 4.3.2) pour tenter d'identifier les produits correspondants.

Si deux bandes n'apparaissent pas systématiquement ensemble sur tous les spectres, on peut supposer qu'elles correspondent à deux colmatants différents. Ici, une bande apparaît systématiquement sur tous les spectres de la membrane colmatée à 969 cm^{-1} , alors qu'une seconde bande à 1644 cm^{-1} n'apparaît que sur certains spectres. Les 88 spectres établis peuvent ainsi être classés en 2 familles : la première (spectres de type 1) ne fait apparaître qu'une seule bande additionnelle localisée à 969 cm^{-1} , et la seconde (spectres de type 2) correspond à l'apparition, en plus de la bande à 969 cm^{-1} , d'une bande à 1644 cm^{-1} . Cette seconde bande est par ailleurs probablement associée à d'autres bandes apparaissant dans la région $2700 - 3600\text{ cm}^{-1}$. Ainsi, ces résultats mettent en évidence la présence d'au moins deux colmatants dans le dépôt formé lors de la filtration, le premier correspondant à la bande à 969 cm^{-1} et qui apparaît sur tous les spectres de la membrane MQ₂ (colmatant 1), et le second correspondant à une bande localisée à 1644 cm^{-1} et n'apparaissant que sur certains spectres (colmatant 2). *Il faut noter que sur ces premiers essais, on ne détecte aucune bande pouvant correspondre à des polysaccharides ou à des protéines.*

La figure V.3 donne un exemple de spectre de type 1 correspondant à l'analyse effectuée au point 9 de la membrane MQ₂ (voir figure V.2b) et comparé au spectre de la membrane vierge. On voit que sur cette figure seul le colmatant 1 est présent (bande à 969 cm^{-1}), les bandes dans la région $2700 - 3600\text{ cm}^{-1}$ et 1644 cm^{-1} étant absentes. La figure V.4 illustre un exemple de spectre de type 2 correspondant à l'analyse effectuée au point 59 de la membrane MQ₂. L'apparition de bandes dans la région $2700 - 3600\text{ cm}^{-1}$, 1644 cm^{-1} et 969 cm^{-1} indique la présence simultanée des 2 colmatants de type 1 et 2. Enfin, la figure V.5 qui porte les spectres des deux points 9 et 59 de la membrane colmatée permet de comparer les spectres de type 1 et de type 2.

2.2.2.2. *Nature des colmatants 1 et 2*

Si aucune certitude ne peut être établie à ce stade sur la nature des deux composés détectés dans le dépôt colmatant, il y a une *forte suspicion pour que le colmatant 1 soit un ion orthophosphate*, probablement l'ion hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}), qui est l'ion majoritaire au pH des solutions d'EPS filtrées (environ 8,2). La bande à 969 cm^{-1} est en effet compatible avec une liaison phosphore-oxygène au sein d'un groupement phosphate. Par ailleurs, *le colmatant 2 pourrait être l'ion EDTA (éthylènediaminetétraacétate)*, également présent dans le milieu de culture et dont la double liaison $\text{C}=\text{O}$ de ses acides carboxyliques donne une bande à 1610 cm^{-1} . Même si cette valeur semble *a priori* un peu éloignée de 1644 cm^{-1} , on ne peut pas exclure que le pic soit associé à la présence d'EDTA (selon l'état d'ionisation, les bandes peuvent en effet se déplacer d'au moins 10 cm^{-1}). Ce point devra être étudié plus en profondeur pour pouvoir trancher. Il est à noter que la présence des principaux sels présents dans le milieu a été testée (chapitre II, § 4.3.2). Des spectres FTIR-ATR des sels solides ont été établis, Pour ceux dont la bande la plus intense était proche de celle des colmatants inconnus, un spectre FTIR-ATR de membrane vierge et déconditionnée par rinçage à l'eau déionisée sur laquelle le sel avait été adsorbé (trempage pendant 24 h dans des solutions concentrées) a également été enregistré. La présence d'aucune autre espèce n'a été détectée. Il en est de même pour le métabisulfite de sodium.

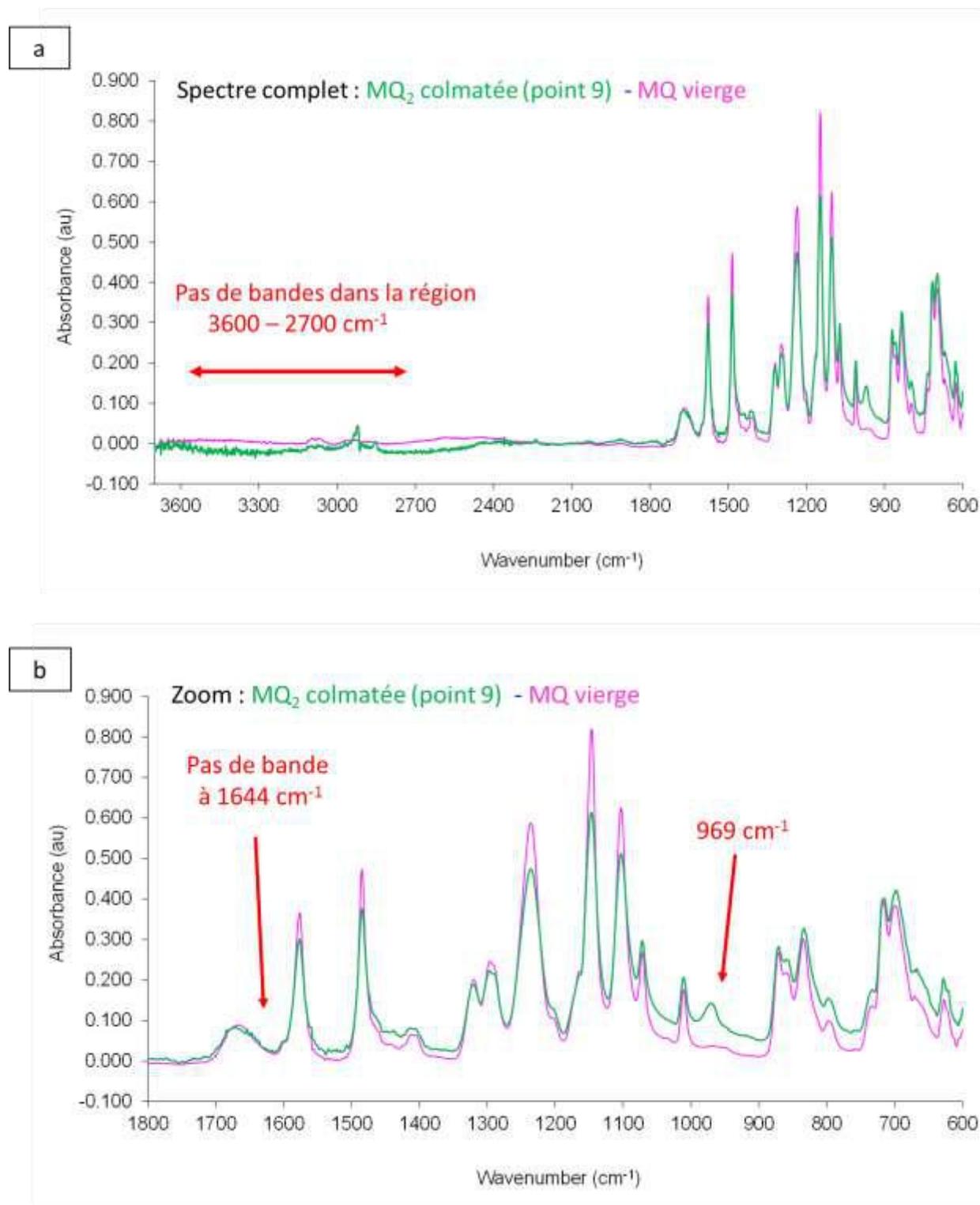


Figure V.3. Spectres FTIR-ATR de la membrane vierge MQ (en rose) du point 9 de la membrane colmatée MQ₂. Spectre entier 3600 - 600 cm⁻¹ (a), agrandissement dans la région 1800 – 600 cm⁻¹ (b). Le point 9 est le point où l'intensité de la bande à 969 cm⁻¹ est maximale.

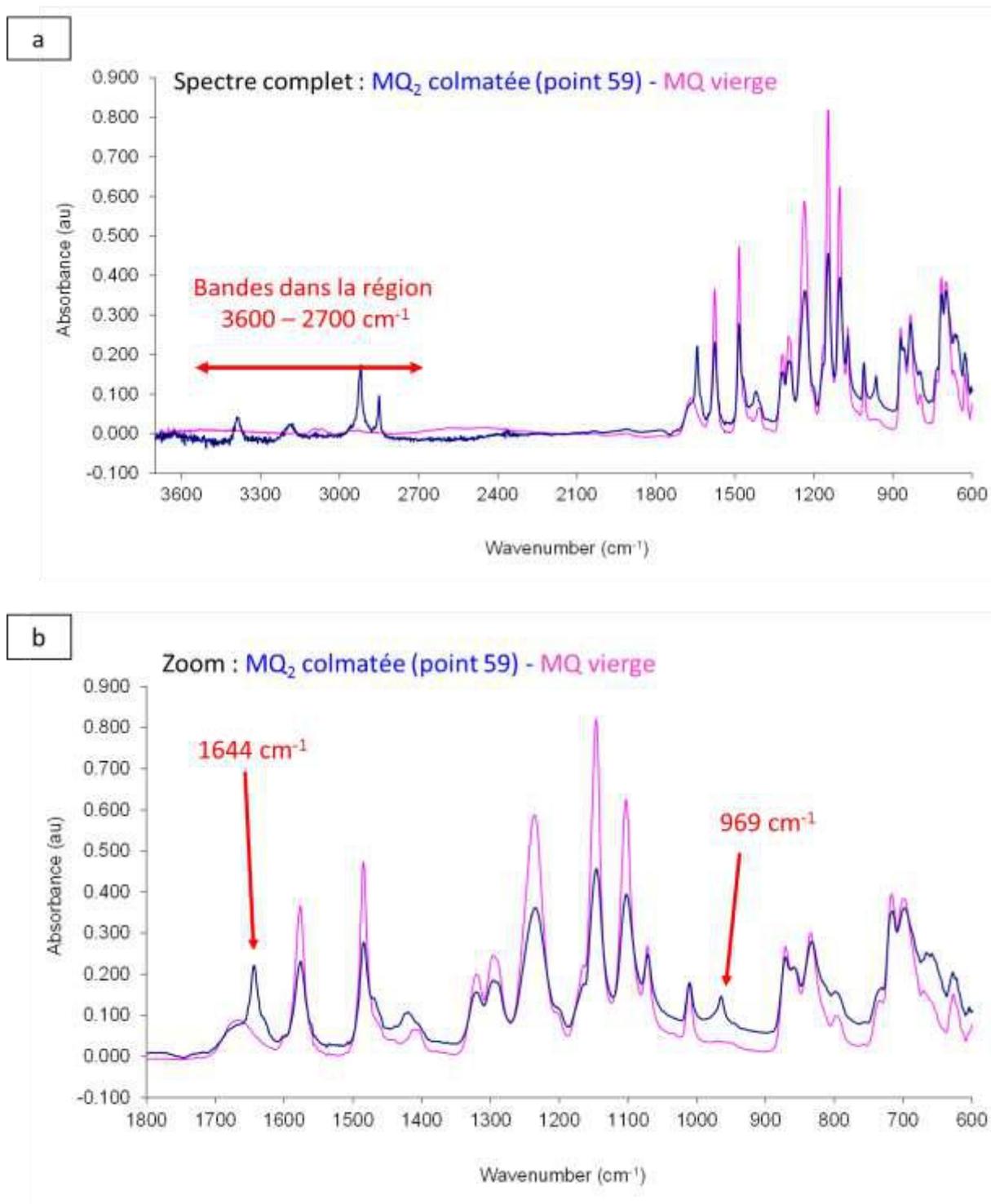


Figure V.4. Spectres FTIR-ATR de la membrane vierge MQ (en rose) et au point 59 de la membrane colmatée MQ₂. Spectre entier 3600 - 600 cm⁻¹ (a) et agrandissement dans la région 1800 - 600 cm⁻¹ (b). *Le point 59 est le point où l'intensité de la bande à 1644 cm⁻¹ est maximale.*

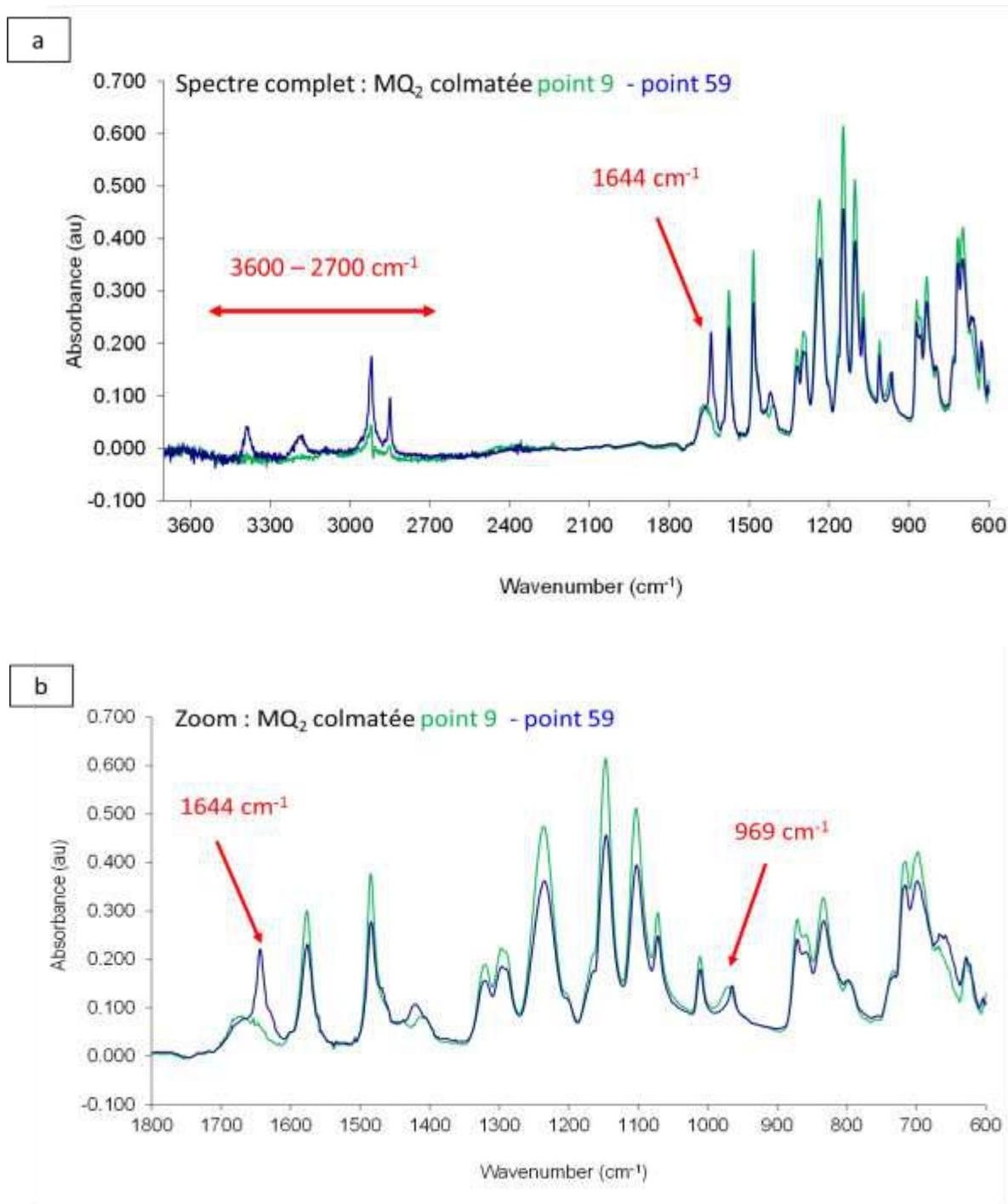


Figure V.5. Spectres FTIR-ATR aux points 9 (en vert) et 59 (en bleu) de la membrane colmatée MQ₂. Spectre entier 3600 - 600 cm⁻¹ (a) et agrandissement dans la région 1800 – 600 cm⁻¹ (b).

2.2.3. Recherche approfondie des EPS

2.2.3.1. Méthodologie de recherche des EPS

Aucune présence de polysaccharides dans la couche colmatante n'a donc été détectée lors de l'analyse des spectres de la membrane colmatée lors de la filtration des solutions d'EPS. Ce fait étant *a priori* étonnant, une recherche plus approfondie a été menée en s'appuyant sur l'analyse de coupons de membrane trempés dans des solutions d'EPS pendant une durée suffisante pour que l'adsorption de ces derniers puisse se faire. Les spectres des membranes trempées dans les solutions d'EPS ont alors été comparés à ceux de la membrane vierge et de la membrane MQ₂ colmatée par UF puis rincée.

Solutions de trempage et traitement des membranes trempées avant analyse

Deux solutions d'EPS (S0 et S00) ont été préparées par dissolution d'un échantillon d'EPS lyophilisés (voir chapitre II, § 4.2.2) dans de l'eau déionisée. Une solution « S0 » à 5,4 kg.m⁻³ d'EPS lyophilisés a été utilisée pour le trempage d'un coupon de membrane MQ de 1,44 cm² de surface pendant 24 heures. Ce coupon a été ensuite directement séché au dessiccateur sans rinçage. D'autre part, une solution « S00 » moins concentrée, à 2 kg.m⁻³ d'EPS lyophilisés, a été utilisée pour le trempage de deux coupons de membrane MQ de 0,96 cm² pendant 6 jours à température ambiante. Après ces 6 jours, l'un des deux coupons a été trempé dans l'eau sous agitation pendant 15 minutes pour simuler un rinçage et donc pour déterminer si le colmatage sur la membrane était irréversible ou pas. Les deux coupons ont ensuite été séchés au dessiccateur avant analyse.

2.2.3.2. Mise en évidence de la présence des EPS

Mise en évidence sur les coupons trempés dans des solutions d'EPS lyophilisés

Les spectres FTIR-ATR effectués sur des EPS lyophilisés (en poudre) ont montré la présence d'une large bande entre 1000 et 1100 cm⁻¹ qui peut être attribuée aux vibrations des liaisons C–O des polysaccharides. Un examen attentif du spectre de la membrane MQ trempée dans la solution S0 (5,4 kg.m⁻³ d'EPS lyophilisés) a alors montré la présence d'un épaulement sur cette même bande (Figure V.6), ce qui traduit bien la présence des EPS adsorbés dans ou à la surface de la membrane, l'intensité du signal sur cette bande étant en effet 3 fois plus élevée que

sur celui de la membrane vierge. En revanche, aucune différence notable n'apparaît dans cette zone 1000 - 1100 cm^{-1} entre les spectres des membranes « MQ vierge » et « MQ après adsorption d'EPS » par trempage dans la solution S00, moins concentrée en EPS (2 kg.m^{-3} d'EPS lyophilisés), que ce soit avec ou sans rinçage à l'eau.

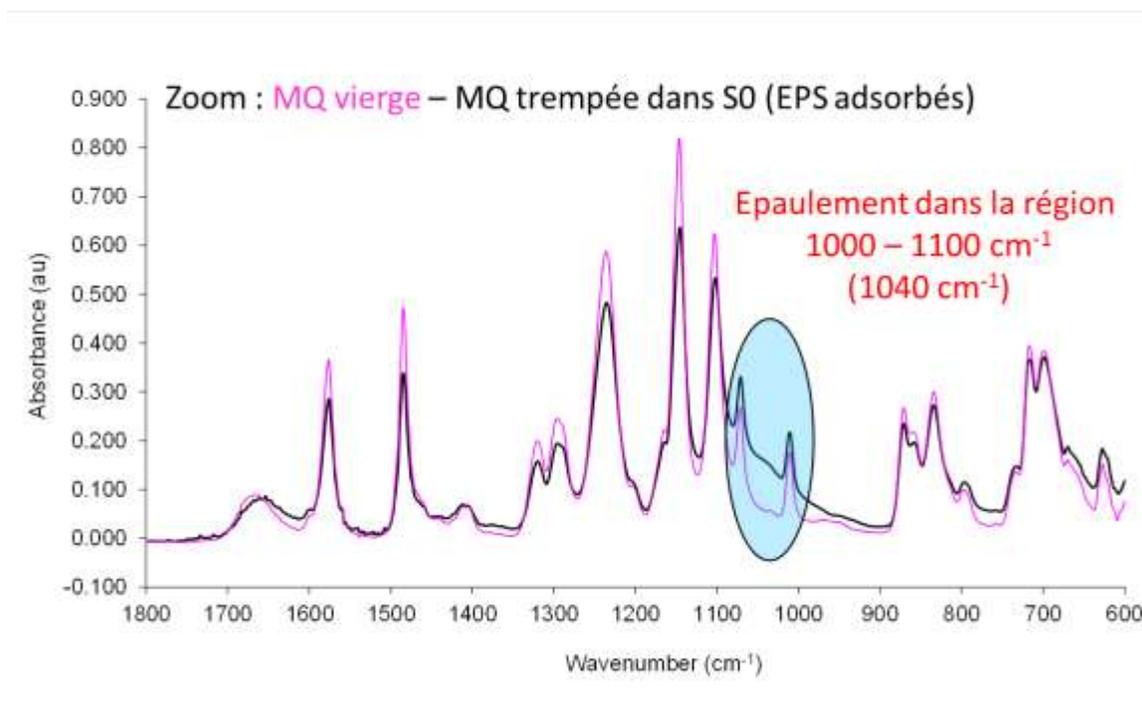


Figure V.6. Spectres FTIR-ATR d'un coupon MQ vierge et du coupon MQ trempé dans la solution S0 ($5,4 \text{ kg.m}^{-3}$ d'EPS lyophilisés).

On remarque par ailleurs que les bandes correspondant au colmatant 1 (à 969 cm^{-1}) et au colmatant 2 (à 1644 cm^{-1} et dans la région $2700 - 3600 \text{ cm}^{-1}$) sont absentes. Cela ne signifie pas forcément que les colmatants 1 et 2 sont totalement absents des échantillons d'EPS lyophilisés. En effet, ils peuvent être présents mais en quantité trop faible pour s'adsorber sur la membrane en quantités suffisantes pour pouvoir être détectés ensuite par l'analyse FTIR-ATR (il ne faut pas oublier que le dépôt s'effectue sous pression lors de la filtration des solutions d'EPS, mais sans pression lors de ces essais d'adsorption par trempage dans les solutions S0 et S00).

Mise en évidence des EPS sur la membrane MQ₂ colmatée lors de la filtration

La figure V.7 présente les spectres de la membrane MQ₂ colmatée lors de la filtration sur membrane aux deux points 9 et 59 (spectres de type 1 et 2 respectivement), et les compare à ceux d'un coupon MQ vierge et d'un coupon ayant trempé dans la solution S0 à $5,4 \text{ kg.m}^{-3}$ d'EPS

lyophilisés. L'apparition de l'épaulement dans la région $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ sur les spectres de la membrane colmatée MQ₂ met clairement en évidence la présence d'EPS sur cette membrane, et par suite leur contribution au colmatage irréversible de la membrane lors de la filtration des solutions d'EPS. Cependant, les intensités des épaulements sur les 2 spectres de la membrane MQ₂ sont plus faibles que celle de l'épaulement sur le spectre de la membrane MQ trempée dans la solution S0 (la plus concentrée, $5,4 \text{ kg.m}^{-3}$). A défaut d'une quantification précise des EPS sur la membrane colmatée, on peut déduire de ce résultat en s'appuyant sur les spectres obtenus sur les coupons trempés dans les solutions S0 et S00 que *la quantité d'EPS adsorbée sur la membrane lors de la filtration d'une solution d'EPS à $0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ sous une pression transmembranaire PTM de 0,45 bar et en conditions colmatantes (nettement au-dessus du flux critique) est comprise entre les quantités adsorbées par trempage simple (sans PTM) dans des solutions à 2 kg.m^{-3} d'EPS lyophilisés (S00, adsorption indétectable) et à $5,4 \text{ kg.m}^{-3}$ d'EPS lyophilisés (S0).*

Par ailleurs, il est à noter que les spectres FTIR-ATR n'ont pas permis de détecter la présence de protéines bien qu'il y en avait dans la solution filtrée par la membrane MQ₂ et dans la solution S0.

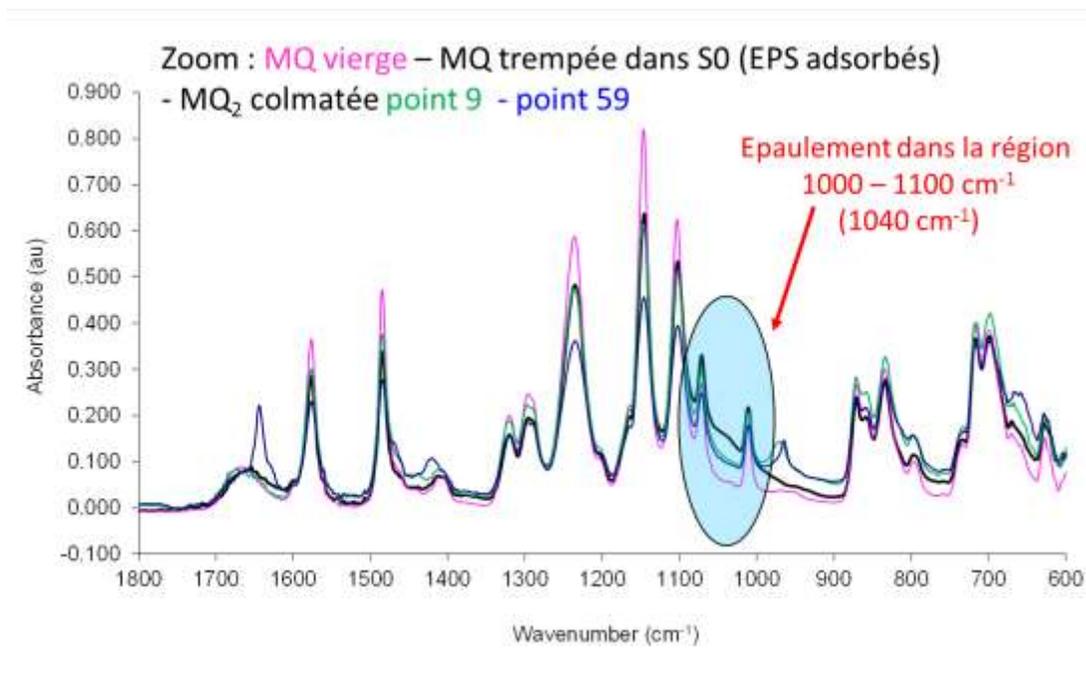


Figure V.7. Spectres FTIR-ATR de la membrane vierge (en rose), de la membrane trempée dans la solution S0 à $5,4 \text{ kg.m}^{-3}$ d'EPS lyophilisés (en noir), ainsi qu'aux points 9 (en vert) et 59 (en bleu) de la membrane MQ₂ colmatée.

2.2.4. Cartographie des colmatants

Les cartographies des trois colmatants détectés dans le dépôt ont été établies afin de visualiser la façon dont ils se déposent sur la membrane (Figure V.9). Ces cartographies sont établies sur la base des intensités relatives des bandes caractéristiques des colmatants situées respectivement à 969 cm^{-1} (colmatant 1), à 1644 cm^{-1} (colmatant 2) et à 1040 cm^{-1} (EPS). Le principe étant identique pour les trois colmatants, nous l'expliquons ci-dessous pour le colmatant 1 seulement.

2.2.4.1. Cartographies du colmatant 1 et du colmatant 2

La cartographie est basée sur l'intensité relative $I_{r,969}$ de la bande à 969 cm^{-1} , définie comme le ratio entre la hauteur de la bande à 969 cm^{-1} et de celle de la bande référence à 1235 cm^{-1} (correspondante à la PES prise comme étalon interne), soit :

$$I_{r,969} = \frac{H_{969}}{H_{1235}} \quad (\text{V.1})$$

L'intensité relative à 969 cm^{-1} est d'abord estimée pour les 88 spectres de la membrane MQ₂ colmatée. Ces valeurs sont ensuite comparées à l'intensité relative de cette même bande sur le spectre de la membrane vierge, notée $I_{r,969}^*$, pour obtenir le taux d'augmentation de la bande de la membrane colmatée par rapport à celle de la membrane vierge. La cartographie du colmatant 1 est alors obtenue en appliquant un code couleur basé sur la valeur du rapport $I_{r,969}/I_{r,969}^*$ (voir la Figure V8.a). En procédant de même, on obtient les cartographies du colmatant 2 et des EPS à partir des rapports $I_{r,1644}/I_{r,1644}^*$ et $I_{r,1040}/I_{r,1040}^*$, respectivement (Figures V.9b et c).

Pour limiter le nombre de spectres à établir sur la membrane vierge, les intensités relatives aux trois nombres d'onde 969 , 1040 et 1644 cm^{-1} ont été considérées comme constantes sur toute la surface de la membrane, la valeur retenue étant la moyenne sur les trois points 1, 2 et 3 situés à proximité immédiate du fluide dans le module. Les valeurs moyennes et les écarts-types relatifs (RSD) des rapports $I_{r,ni}/I_{r,ni}^*$ sont indiqués sur la figure V.8. Les écarts-types relatifs calculés à partir des triplicats faits en chaque point sont faibles (1 % pour les colmatants 1 et 2, 4

% pour les EPS), ce qui semble indiquer que les intensités relatives sont stables au moins localement, à défaut de l'être sur l'ensemble de la membrane.

Il apparaît que le dépôt du colmatant 1 (suspecté d'être l'ion hydrogénophosphate) sur la membrane n'est pas du tout homogène. Si on excepte la bande extérieure située sous le joint d'étanchéité (sur le pourtour de la demi-membrane), le colmatant 1 semble se déposer préférentiellement vers le milieu de la membrane plutôt que près de la sortie ou de l'entrée, cette tendance étant nettement visible sur la carte. Sa concentration semble également plus importante le long du bord externe qu'au milieu de la membrane, c'est presque toujours le cas entre les lignes 5 à 15. D'autre part, on remarque que l'accumulation est nettement plus prononcée sous le joint d'étanchéité (pourtour extérieur de la membrane) que sur la surface active en filtration. Cela pourrait être dû à une circulation latérale du fluide dans l'épaisseur de la membrane (couche active et couche intermédiaire) qui favoriserait l'accumulation du colmatant dans la « zone morte » située sous le joint d'étanchéité.

Les mêmes tendances s'observent sur la cartographie du colmatant 2 (suspecté d'être l'ion EDTA), à savoir une accumulation préférentielle vers le milieu de la membrane et près du bord externe de la zone active de filtration ainsi qu'une accumulation préférentielle dans la partie de la membrane située sous le joint d'étanchéité, l'effet étant ici moins marqué pour le bord supérieur.

L'hétérogénéité des cartographies montrent que la vitesse du fluide n'était pas la même dans toutes les zones du module plan. En effet, on peut considérer que plus les zones où le colmatage est le plus faible sont celles où la vitesse d'écoulement est la plus élevée (Rabiller-Baudry *et al.*, 2014).

2.2.4.2. Cartographie des EPS (localisés à 1040 cm^{-1})

La cartographie semble plus homogène, avec un écart-type relatif de 13 % contre 51 et 39 % pour les colmatants 1 et 2 sur l'ensemble de la demi-membrane. Le dépôt est légèrement plus important et plus homogène dans la partie supérieure de la membrane (moyenne $\mu = 1,85$, RSD = 6 %) que dans la partie inférieure ($\mu = 1,65$, RSD = 16 %). Dans cette dernière, le dépôt est assez homogène au centre de la membrane, tandis qu'il diminue dans la partie inférieure.

On constate également toujours la présence d'EPS sous le joint d'étanchéité, mais sans concentration particulière cette fois-ci par rapport à la zone de filtration active. Peut-être est-ce à rapprocher de la très grande taille des molécules d'EPS (plusieurs centaines de milliers de Da) et à leur mobilité très inférieure à celle des colmatants 1 et 2 dont on suspecte qu'ils sont des molécules de petite taille ($MM = 96$ et 292 g.mol^{-1} pour les ions hydrogénophosphates et EDTA respectivement).

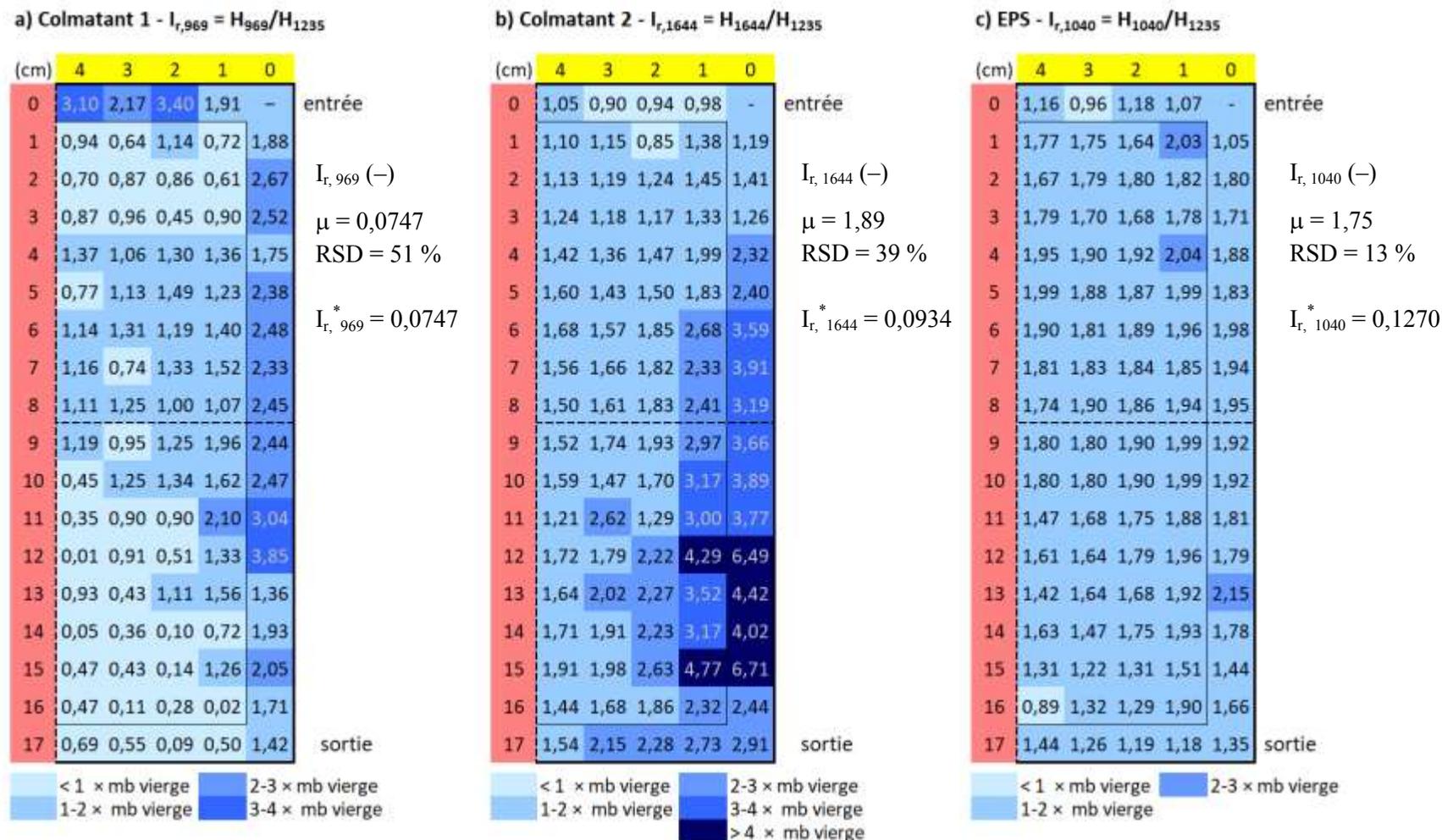


Figure V.8. Cartographies des trois colmatants identifiés.

Les valeurs portées sont les taux d'augmentation par rapport à la membrane vierge de l'intensité relative I_r des bandes caractéristiques du colmatant. μ et RSD sont la valeur moyenne et l'écart-type relatif des intensités relatives I_r des 63 spectres de la zone active de filtration de la membrane, et I_r^* l'intensité relative de la membrane vierge près de l'entrée.

3. Microscopie à force atomique (AFM)

Les analyses AFM ont été effectuées sur une membrane MQ vierge conditionnée selon le protocole décrit dans le chapitre II (§ 3.4.1), puis sur la partie (b) de la membrane MQ₂ colmatée et rincée (voir chapitre II, § 4.2). Les deux membranes ont été séchées au dessiccateur avant analyse. Les analyses sur la membrane colmatée ont été effectuées près de l'entrée, au milieu et près de la sortie de la membrane, aux zones symétriques des points 3 bis, 48 et 88 de la partie (a) analysée par FTIR-ATR (voir figure V.2b). Les clichés des analyses « à l'entrée » de la membrane, moins exploitables, ne sont pas présentés ici.

3.1. Topographie de la membrane vierge conditionnée

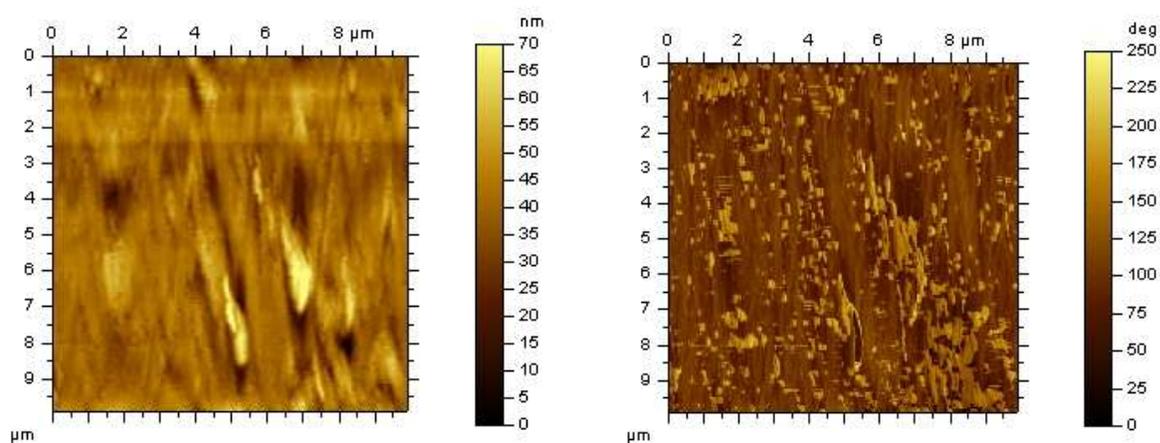


Figure V.9. Topographie (à gauche) et image de phase (à droite) de la membrane vierge conditionnée.

Le cliché de gauche de la figure V.9 montre la topographie de la membrane vierge conditionnée. L'échelle maximale est de 70 nm indiquant une surface membranaire assez lisse. La rugosité (R_a) obtenue sur l'échantillon est de 3,57 nm. On peut discerner des zones noires pouvant être considérées comme l'entrée de pores de la membrane. Le cliché de droite montre l'image de phase de la membrane. Le degré de déphasage maximum observé est d'environ 250°. Comme on peut le voir, la surface est parsemée de zones à fort déphasage indiquant des zones ayant des interactions différentes avec la pointe de l'AFM.

3.2. Topographie de la membrane MQ₂ colmatée et rincée « au milieu »

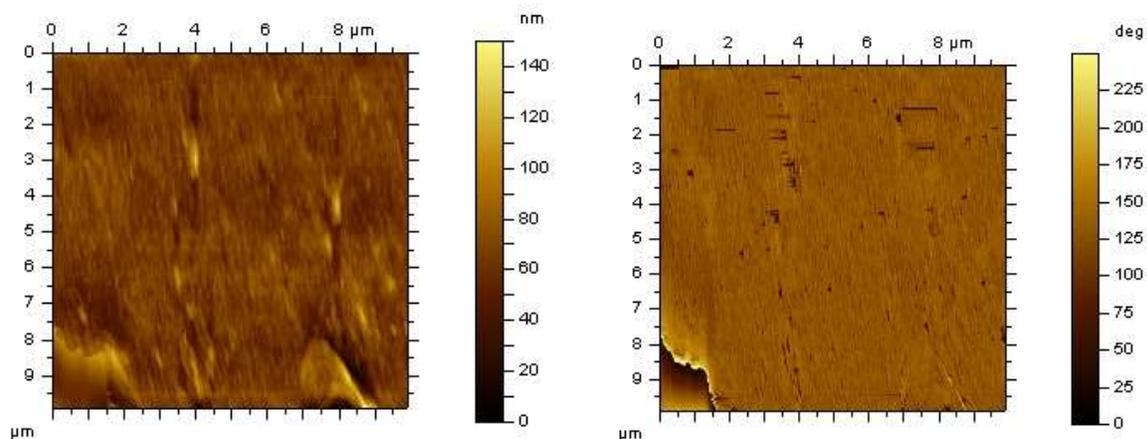


Figure V.10. Topographie (à gauche) et image de phase (à droite) de la membrane colmatée puis rincée « au milieu ».

Le cliché de la topographie de la membrane colmatée (figure V.10 à gauche) montre une surface moins lisse que celle de la membrane vierge, avec une échelle maximale atteignant 140 nm. La rugosité correspondante à cette image est de 4,96 nm. On peut distinguer également quelques zones montrant des matières, organiques ou minérales, déposées sur la membrane (par exemple à la position $x = 8 \mu\text{m}$; $y = 9 \mu\text{m}$). L'image de phase (figure de droite) présente un profil différent de celui observé sur la membrane vierge. Le déphasage est important (environ 200°) sur pratiquement toute la surface membranaire analysée ($10 \times 10 \mu\text{m}$). On peut observer également des petites zones sombres circulaires présentant un faible déphasage. Il est assez difficile de conclure sur la nature de ces zones (peut-être des pores, mais sans certitude).

3.3. Topographie de la membrane MQ₂ colmatée et rincée « en sortie »

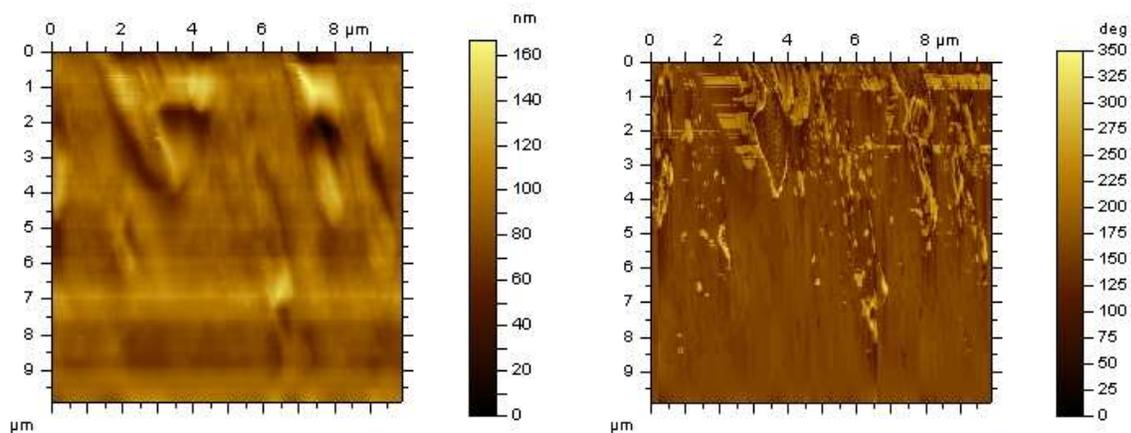


Figure V.11. Topographie (à gauche) et image de phase (à droite) de la membrane colmatée puis rincée « en sortie ».

L'image de la topographie de la membrane colmatée près de la sortie reportée sur la gauche de la figure V.11, montre une image de la membrane présentant une moins bonne définition que celle des clichés précédents. Ceci peut être dû à des interactions plus fortes entre la pointe et la surface membranaire à ce niveau de la membrane. L'échelle maximale est similaire à celle observée sur la membrane colmatée « milieu » et est beaucoup plus importante que sur la membrane vierge. La rugosité est de 8,09 nm indiquant la probable présence d'un dépôt, qui pourrait être de la matière organique. De la même manière, l'image de phase montre des zones à fort déphasage indiquant de fortes interactions, peut-être de nature hydrophile, entre la pointe et les matières déposées.

3.4. Conclusion sur la topographie des membranes vierge et colmatée puis rincée

Les analyses montrent que la topologie de la membrane vierge conditionnée est différente de celle de la membrane colmatée puis rincée. La rugosité semble augmenter entre la membrane neuve et la membrane colmatée, mais également le long de la surface membranaire. Les images de phase montrent une modification des interactions entre la pointe et la surface analysée. Ces interactions peuvent être reliées à la dureté d'un échantillon ou au caractère hydrophile/hydrophobe du matériau. Cependant, de plus amples analyses devraient être

effectuées afin de pouvoir conclure. Par exemple, l'analyse d'une membrane avant et après lavage pourrait apporter des éléments intéressants.

Conclusion

Ce chapitre a présenté les résultats de la caractérisation du colmatage irréversible lors d'une ultrafiltration d'une solution d'EPS de *P. cruentum* ($0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$) sous une pression de 0,45 bar, sur une membrane organique (PES, 50 kDa) par FTIR-ATR et AFM.

La technique de FTIR-ATR a permis de mettre en évidence la présence de trois colmatants (corps purs ou mélanges de composés de même nature), le colmatant 1 dont la bande d'absorbance est localisée à 969 cm^{-1} , le colmatant 2 dont la bande est localisée à 1644 cm^{-1} et probablement en lien avec des bandes localisées dans la région $2700 - 3600 \text{ cm}^{-1}$, ainsi que le colmatant 3 identifié comme étant les EPS, la présence de ces derniers se signalant par l'apparition d'un épaulement dans la région $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$. L'identification des deux autres composés (colmatants 1 et 2) est en cours mais il y a une forte suspicion qu'il s'agisse d'ions phosphates et d'EDTA, respectivement.

Une cartographie des trois composés a été établie en termes de l'intensité relative de la bande d'absorbance caractéristique de la substance, définie comme le rapport de la hauteur de cette bande et de celle de l'étalon interne (PES, à 1235 cm^{-1}). Elle montre des dépôts hétérogènes des colmatants 1 et 2, avec une tendance à l'accumulation préférentielle au milieu de la membrane (selon l'axe « horizontal ») et sur son bord externe (selon l'axe « vertical ») et une hétérogénéité moins marquée du dépôt d'EPS.

Différentes perspectives peuvent être envisagées pour mieux caractériser le colmatage. La première consiste à quantifier précisément la quantité d'EPS dans le dépôt irréversible en s'appuyant sur un étalonnage effectué à partir de spectres établis sur des coupons de membrane sur lesquels des masses connues d'EPS auront été déposées (traitement en cours). Une deuxième perspective est la simulation de l'écoulement par la mécanique des fluides numérique (CFD pour *Computational Fluid Dynamics*) pour étudier les corrélations éventuelles entre la distribution des colmatants à la surface de la membrane et l'hétérogénéité de l'écoulement. D'autre part, une caractérisation du colmatage irréversible formé dans des conditions de filtration moins

colmatantes (à des PTM plus faibles) ou avec des concentrations en EPS plus élevées nous permettrait de voir si on pourrait détecter les mêmes constituants (colmatants) ou pas et s'il y aurait une évolution dans l'hétérogénéité du dépôt de ces colmatants ? De plus, il serait intéressant de confirmer les hypothèses émises sur la nature des colmatants 1 et 2 par d'autres méthodes (telles que la spectrométrie à plasma à couplage inductif, ICP), et de rechercher également la présence d'autres colmatants.

D'après les résultats d'analyse par AFM, la rugosité semble augmenter entre la membrane neuve et la membrane colmatée, mais également le long de la surface membranaire. Les images de phase montrent une modification des interactions entre la pointe et la surface analysée. Ces interactions peuvent être reliées à la dureté d'un échantillon ou au caractère hydrophile/hydrophobe du matériau. Cependant, de plus amples analyses devraient être effectuées afin de pouvoir conclure.

Conclusions Générales et Perspectives

Le travail a porté sur l'ultrafiltration de solutions d'EPS solubles de microalgues ou de cyanobactéries.

Dans un premier temps, on a cherché à récupérer les EPS solubles d'*Arthrospira platensis* (chapitre III). Cette cyanobactérie est en effet un des microorganismes photosynthétiques les plus exploités dans le monde, et elle est connue pour produire des EPS en quantité importante. Une montée en échelle de la culture d'*A. platensis* a été effectuée à l'échelle pilote pour avoir de grands volumes de milieux riches en EPS solubles prêts pour la filtration membranaire. Différentes méthodes de séparation des cellules de leur milieu de culture ont également été testées avec l'objectif de récupérer un surnageant de milieu de culture exempt ou presque de cellules. Bien que de grande taille (plusieurs dizaines à quelques centaines de microns), les filaments d'*A. platensis* ne sont pas aisément séparables de leur milieu par centrifugation en raison de leur densité proche de 1 due à la présence de vacuoles d'air. Une filtration sur une toile de 5 μm semble une méthode de séparation potentiellement intéressante en termes d'efficacité de la séparation, de coût et de consommation d'énergie.

Il s'est avéré cependant que la concentration en EPS solubles était très faible, de l'ordre de 0,04 kg GlcEq.m⁻³, la majorité des EPS d'*A. platensis* restant attachée à la cellule. La récupération des EPS d'*A. platensis* nécessiterait un détachement et une solubilisation préalables des EPS liés pour augmenter notablement la concentration en EPS solubilisés. La mise en place d'un tel protocole sortant du cadre de cette thèse, le travail a donc été réorienté vers la récupération des EPS de la microalgue rouge *Porphyridium cruentum*, qui libère une quantité d'EPS solubles plus importante qu'*A. platensis*. *P. cruentum* est déjà exploitée industriellement, principalement pour ses pigments et ses EPS dotés d'activités biologiques et de propriétés techno-fonctionnelles intéressantes.

L'étude présentée au chapitre IV a concerné la filtrabilité des solutions d'EPS solubles de *P. cruentum* sur une membrane organique plane, à l'échelle laboratoire (0,0125 m²) et en présence d'un espaceur côté alimentation. La membrane choisie était en PES (Synder) et possédait un seuil de coupure de 50 kDa pour assurer une rétention (quasi-)totale des EPS et prévenir un colmatage en profondeur (par blocage de pores). Les solutions filtrées ont été « reconstituées » à partir de surnageants de milieux de culture obtenus sur la plateforme AlgoSolis dans des conditions représentatives d'une production industrielle, et ayant subi une

clarification par centrifugation et, éventuellement, un pré-traitement complémentaire (centrifugation et/ou concentration par UF minérale).

L'étude a consisté en premier lieu à effectuer une étude paramétrique en établissant les courbes J-PTM (flux de perméation-pression transmembranaire) jusqu'à l'obtention du flux limite, et en faisant varier successivement trois paramètres opératoires : la vitesse tangentielle du fluide pour évaluer l'influence de l'hydrodynamique sur les flux de perméation, la concentration en EPS de la solution filtrée et la température. Les filtrations ont été effectuées à recyclage total du rétentat et du perméat de façon à disposer de flux de perméation stabilisés pour pouvoir analyser l'influence des paramètres opératoires en s'affranchissant des dynamiques de colmatage.

Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole de nettoyage permettant de nettoyer des membranes ayant travaillé jusqu'au flux limite (établissement de la courbe J-PTM) et donc dans des conditions assez ou fortement colmatantes. Cette étude a été effectuée avec une solution d'EPS, S_A (de $0,10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$), dans des conditions représentatives des filtrations en module spiralé, soit $v = 0,3 \text{ m.s}^{-1}$ en présence d'un espaceur, ou dans des conditions similaires du point de vue hydrodynamique (c'est-à-dire conduisant à une courbe J - PTM très proche), en l'occurrence $v = 1,0 \text{ m.s}^{-1}$ en veine fluide étroite de $0,5 \text{ mm}$ d'épaisseur et sans espaceur. Le nettoyage classique acide-base ayant été insuffisant pour récupérer les flux à l'eau, un nettoyage enzymatique a été placé en tête de la séquence de nettoyage en place. Par ailleurs, les essais ont montré que les solutions d'EPS avaient un fort pouvoir colmatant même à faible concentration, avec un flux limite faible (de l'ordre de $21 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) obtenu à une faible PTM ($0,5 \text{ bar}$).

L'étude de l'influence de la vitesse sur les flux de perméation a été réalisée avec 4 valeurs de vitesses allant de $0,3$ à $1,2 \text{ m.s}^{-1}$; la limite supérieure pouvant être envisagée dans des modules plans de type « filtre presse ». L'effet bénéfique d'une augmentation de la vitesse v s'est manifesté sur toute la gamme étudiée, sans qu'aucune limitation n'apparaisse, avec cependant comme conséquence des pertes de charge élevées. Une vitesse de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$, considérée comme réalisant un compromis raisonnable entre flux de perméation et pertes de charge dans le module, a été retenue pour les essais ultérieurs. Pour une pression transmembranaire « nominale » correspondant à l'obtention d'un flux égal à 75% du flux limite, le flux de perméation et le gradient de pertes de charge sur le module (pertes singulières à

l'entrée et à la sortie incluses) valent respectivement $41 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et $0,27 \text{ bar}$ (soit un gradient de $1,6 \text{ bar.m}^{-1}$). Ensuite, l'effet de la concentration en polysaccharides a été étudié en filtrant 4 solutions de concentrations (C_0) allant de $0,10$ à $1,06 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$, ce qui correspondrait pour une filtration menée en mode concentration, à un facteur de concentration de $10,6$ en admettant une rétention totale des sucres, ce qui a été confirmé quelle que soit la valeur C_0 . Pour une vitesse et une PTM données, les flux limites ont diminué de 37% seulement (de 54 à $34 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) quand C_0 augmentait de $0,10$ à $1,06 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$. Il semble toutefois que les flux de perméation obtenus soient élevés par rapport à ceux qu'on peut espérer lors d'une concentration effective des EPS à un FRV de $10,6$ à partir d'un surnageant réel contenant $0,10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ d'EPS. Le modèle de gel prédit en effet de ces essais effectués à FRV sur des solutions reconstituées de teneurs en EPS croissantes, une concentration de gel C_g de 47 g.L^{-1} qui semble très élevée.

Néanmoins, les résultats indiquent que les EPS de *P. cruentum* pourraient probablement être isolés à partir de surnageants obtenus en lumière solaire dans un bassin en circulation couvert, avec des facteurs de concentration pas trop faibles. Cette opération de concentration devrait cependant être réalisée à des vitesses suffisamment élevées pour limiter l'importance de la polarisation et la formation du dépôt colmatant, de l'ordre de 1 m.s^{-1} , ce qui serait envisageable dans un module plan de type « filtre presse », mais pas dans un module spiralé. Une alternative serait d'utiliser un module tubulaire. Cela demanderait bien sûr à être confirmé par des expériences de concentration de surnageants réels.

Enfin, les flux de perméation ont augmenté proportionnellement à la diminution de la viscosité de l'eau lorsque la température de filtration augmentait de 20 à $40 \text{ }^\circ\text{C}$, sans que les résistances de colmatage ne soient modifiées. Le travail à une température élevée (à condition qu'elle soit tolérée par la membrane et qu'elle préserve les propriétés des EPS) améliorera donc les performances de l'UF en termes de flux de perméation.

Cette étude de filtrabilité a également inclus un calcul des résistances hydrauliques de colmatage réversible et irréversible, ainsi qu'une estimation expérimentale du flux critique. Le calcul des résistances a montré que la nature du colmatage changeait avec la pression transmembranaire appliquée. Ainsi, à une concentration en EPS de $0,10 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ et à une vitesse de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$, le colmatage au flux limite de perméation était majoritairement réversible

alors qu'en travaillant sous une PTM nominale dans des conditions nettement moins colmatantes, le colmatage global était plus faible, et majoritairement irréversible. Par ailleurs, la nature du colmatage évolue avec la pression transmembranaire ; il est majoritairement de nature irréversible à faible PTM, puis majoritairement réversible au flux limite.

Le flux critique pour l'irréversibilité a été évalué lors de l'ultrafiltration d'une solution d'EPS de concentration $0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$ à une vitesse de $1,0 \text{ m.s}^{-1}$ par la méthode de l'onde de pression rectangulaire. S'il n'a pas pu être déterminé dans la gamme de PTM testées à cause des pertes de charge élevées, il a pu être estimé à environ $32 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ pour une pression critique de 0,3 bar environ.

Enfin, au chapitre V, la mise en place du colmatage (irréversible) a été analysée en comparant les résultats d'analyses AFM et FTIR-ATR effectuées respectivement sur un coupon neuf, simplement conditionné, et sur un coupon colmaté puis rincé. La membrane a été colmatée lors de l'ultrafiltration d'une solution d'EPS de *P. cruentum* ($0,16 \text{ kg GlcEq.m}^{-3}$) sous une pression de 0,45 bar. La technique de FTIR-ATR a permis de mettre en évidence la présence de trois colmatants (corps purs ou mélanges de composés de même nature), un colmatant, nommé colmatant 3 et identifié comme étant les EPS, et deux autres (colmatant 1 et colmatant 2) non encore bien identifiés mais qui sont suspectés d'être respectivement les ions phosphates et EDTA. Une cartographie des trois composés a été établie et a montré des dépôts hétérogènes des colmatants 1 et 2 avec une tendance à l'accumulation préférentielle au milieu de la membrane (selon l'axe « horizontal ») et sur son bord externe (selon l'axe « vertical ») et une hétérogénéité moins marquée du dépôt d'EPS.

Les analyses AFM ont montré que la rugosité (R_a) de la membrane colmatée semblait supérieure à celle de la membrane neuve, et qu'elle semblait augmenter le long de la surface membranaire dans le sens de l'écoulement ($R_a = 3,6 / 5,0 / 8,1 \text{ nm}$ respectivement pour la membrane neuve et la membrane colmatée en son milieu et en sortie). Les images de phase ont également montré une modification des interactions entre la pointe et la surface analysée, qui pourraient traduire une modification de la dureté d'un échantillon ou du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface.

Nous donnons les perspectives de ce travail, dans un premier temps en termes applicatifs par rapport à l'objectif consistant à récupérer et concentrer les EPS de *P. cruentum* sur une

membrane organique, puis sur un plan plus scientifique concernant la compréhension de la mise en place du colmatage.

Sur le plan applicatif, de nombreuses perspectives peuvent être proposées :

- Faire des essais de concentration sur un module plan de type « filtre presse » ou tubulaire (UF) pour déterminer le FRV maximal atteignable et suivre l'évolution de la performance de la membrane sous différentes conditions opératoires de vitesses tangentielles, ceci en estimant la concentration de gel, le taux de rétention en polysaccharides et en protéines, et en calculant le rendement en EPS sur la base des bilans matière. Effectuer également une diafiltration pour éliminer les sels et pré-purifier les EPS. Etudier, dans ce contexte, l'évolution de la rhéologie (viscosité et élasticité) des solutions de rétentat et de perméat au cours de la concentration et de la diafiltration.
- Effectuer des essais d'UF avec des membranes organiques en PES de seuil de coupure plus élevé et déterminer un seuil de coupure optimal sur la base des critères « flux de perméation », « rétention en EPS » et « intensité du colmatage et nettoyabilité de la membrane ».
- Etudier l'influence de prétraitements des solutions d'EPS en vue de leur clarification, par microfiltration par exemple, sur les flux de perméation, en particulier dans les conditions usuelles de mise en œuvre des modules spiralés (une clarification peut-elle permettre d'envisager une pré-concentration significative des EPS sur un module spiralé ?)
- Etudier l'effet de la force ionique et du pH sur la filtrabilité des solutions d'EPS de *P. cruentum* et sur le colmatage de la membrane.
- Travailler sur la solubilisation des EPS liés pour augmenter les rendements (*P. cruentum*) ou rendre possible la récupération d'EPS lorsqu'ils restent très majoritairement liés (*A. platensis*).

Sur le plan scientifique, les principales perspectives sont les suivantes :

- Développer une méthode permettant de quantifier précisément par FTIR-ATR la quantité d'EPS dans le dépôt irréversible, en s'appuyant sur un étalonnage effectué à partir de spectres établis sur des coupons de membrane sur lesquels des masses connues d'EPS auront été déposées (traitement en cours).

- Simuler l'écoulement par la mécanique des fluides numérique (CFD pour Computational Fluid Dynamics) pour étudier les corrélations éventuelles entre la distribution des colmatants à la surface de la membrane et l'hétérogénéité de l'écoulement.
- Effectuer des autopsies membranaires après des filtrations effectuées dans différentes conditions pour mieux comprendre l'influence des paramètres opératoires sur la mise en place du colmatage irréversible, ou encore celle des différentes fractions composant les solutions (fraction colloïdale en particulier), afin de voir si on détecterait toujours les mêmes constituants (colmatants) ou pas, et s'il y aurait une évolution dans l'hétérogénéité du dépôt de ces colmatants.
- Mieux caractériser du point de vue physico-chimique la fraction réversible du colmatage, pour mieux comprendre l'influence des conditions opératoires sur sa mise en place. Parmi les questions méritant réponse : ce dépôt est-il un véritable gel du point de vue physico-chimique, et quelle est sa structure ? Peut-on agir sur l'intensité du colmatage réversible en jouant sur les paramètres opératoires de la filtration ou sur la composition du milieu de culture et donc du surnageant filtré ?

Références Bibliographiques

- Abdulqader, G., Barsanti, L., Tredici, M., 2000. Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. <https://doi.org/10.1023/A:1008177925799>
- Adda, M., Merchuk, J.C., (Malis) Arad, S., 1986. Effect of nitrate on growth and production of cell-wall polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium*. *Biomass* 10, 131–140. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(86\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0144-4565(86)90061-2)
- Aikawa, S., Joseph, A., Yamada, R., Izumi, Y., Yamagishi, T., Matsuda, F., Kawai, H., Chang, J.-S., Hasunuma, T., Kondo, A., 2013. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy Environ. Sci.* 6, 1844–1849. <https://doi.org/10.1039/C3EE40305J>
- Aimar, P., 2006. Filtration membranaire (OI, NF, UF) Mise en œuvre et performances. *Tech. Ing. Opérations Unit. Tech. Séparatives Sur Membr.* base documentaire : TIB331DUO.
- Aimar, P., Bacchin, P., Maurel, A., 2010a. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Tech. Ing. Opérations Unit. Tech. Séparatives Sur Membr.* base documentaire : TIB331DUO.
- Aimar, P., Bacchin, P., Maurel, A., 2010b. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) Aspects théoriques : perméabilité et sélectivité. *Tech. Ing. Opérations Unit. Tech. Séparatives Sur Membr.* base documentaire : TIB331DUO.
- Alazmi, R., Nassehi, V., Wakeman, R., 2010. Calcium cation interactions with polysaccharides and proteins in wastewater UF membrane fouling. *Membr. Technol.* 2010, 6–12. [https://doi.org/10.1016/S0958-2118\(10\)70015-X](https://doi.org/10.1016/S0958-2118(10)70015-X)
- Arad, S., Atar, D., 2007. Viscosupplementation with algal polysaccharides in the treatment of arthritis. *WO/2007/066340*.
- Arad, S. (Malis), Levy-Ontman, O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.008>
- Arad, S.M., Friedman, O.D., Rotem, A., 1988. Effect of Nitrogen on Polysaccharide Production in a *Porphyridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2411–2414.

- Arad, S.M., Rapoport, L., Moshkovich, A., van Moppes, D., Karpasas, M., Golan, R., Golan, Y., 2006. Superior biolubricant from a species of red microalga. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 22, 7313–7317. <https://doi.org/10.1021/la060600x>
- Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., 1998. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 18, 7–12.
- Ayyavoo, J., Nguyen, T.P.N., Jun, B.-M., Kim, I.-C., Kwon, Y.-N., 2016. Protection of polymeric membranes with antifouling surfacing via surface modifications. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 506, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.026>
- Bacchin, P., Aimar, P., Field, R., 2006. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *J. Membr. Sci.* 281, 42–69. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.014>
- Bacchin, P., Aimar, P., Field, R.W., 2006. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *J. Membr. Sci.* 281, 42–69. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.014>
- Bacchin, P., Aimar, P., Sanchez, V., 1995. Model for colloidal fouling of membranes. *AIChE J.* 41, 368–376. <https://doi.org/10.1002/aic.690410218>
- Balti, R., Le Balc'h, R., Brodu, N., Gilbert, M., Le Gouic, B., Le Gall, S., Siquin, C., Massé, A., 2018. Concentration and purification of *Porphyridium cruentum* exopolysaccharides by membrane filtration at various cross-flow velocities. *Process Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.021>
- Barnier, H., Ferreira, D.S.P., Gudín, C., Thepenier, C., 1987. Process for the preparation and extraction of polysaccharides from a culture of *porphyridium cruentum* and apparatus for carrying out this process. EP0311496B1.
- Blatt, W.F., Dravid, A., Michaels, A.S., Nelsen, L., 1970. Solute Polarization and Cake Formation in Membrane Ultrafiltration: Causes, Consequences, and Control Techniques, in: Flinn, J.E. (Ed.), *Membrane Science and Technology: Industrial, Biological, and Waste Treatment Processes*. Springer US, Boston, MA, pp. 47–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1851-4_4

- Campbell, M.J., Walter, R.P., McLoughlin, R., Knowles, C.J., 1993. Effect of temperature on protein conformation and activity during ultrafiltration. *J. Membr. Sci.* 78, 35–43. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(93\)85245-R](https://doi.org/10.1016/0376-7388(93)85245-R)
- Challouf, R., Trabelsi, L., Ben Dhieb, R., El Abed, O., Yahia, A., Ghozzi, K., Ben Ammar, J., Omran, H., Ben Ouada, H., 2011. Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 831–838. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400024>
- Cheng, J., Xia, A., Liu, Y., Lin, R., Zhou, J., Cen, K., 2012. Combination of dark- and photo-fermentation to improve hydrogen production from *Arthrospira platensis* wet biomass with ammonium removal by zeolite. *Int. J. Hydrog. Energy, ICCE-2011* 37, 13330–13337. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.071>
- Cheryan, M., 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. CRC Press.
- Cho, B., Fane, A., 2002. Fouling transients in nominally sub-critical flux operation of a membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 209, 391–403. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00321-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00321-6)
- Cogne, G., Gros, J.-B., Dussap, C.-G., 2003a. Identification of a metabolic network structure representative of *Arthrospira (spirulina) platensis* metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 667–676. <https://doi.org/10.1002/bit.10808>
- Cogne, G., Lehmann, B., Dussap, C.-G., Gros, J.-B., 2003b. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: culture medium optimization. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 588–593. <https://doi.org/10.1002/bit.10504>
- Cohen, Z., Cohen, S., 1991. Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 16–19. <https://doi.org/10.1007/BF02660301>
- Cornet, J.-F., 1992. Etude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur. Etablissement d'un modèle structuré. Applications à un écosystème clos artificiel. (Theses). Université Paris XI Orsay.

- Csőgör, Z., Kiessling, B., Perner, I., Fleck, P., Posten, C., 2001. Growth and product formation of *Porphyridium purpureum*. *J. Appl. Phycol.* 13, 317–324. <https://doi.org/10.1023/A:1017945513485>
- D. Fox, R., 1999. La spiruline, technique, pratique et promesse. EDISUD, Aix-en-Provence.
- D. Fox, R., 1986. Algoculture : la spirulina, un espoir pour le monde de la faim, Edisud. ed. Edisud.
- de Barros, S.T.D., Andrade, C.M.G., Mendes, E.S., Peres, L., 2003. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *J. Membr. Sci.* 215, 213–224. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00615-4](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00615-4)
- De Bruijn, J.P.F., Salazar, F.N., Bórquez, R., 2005. Membrane Blocking In Ultrafiltration: A New Approach to Fouling. *Food Bioprod. Process.* 83, 211–219. <https://doi.org/10.1205/fbp.04012>
- de Jesus Raposo, M., de Morais, R., Bernardo de Morais, A., 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Mar. Drugs* 11, 233–252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>
- de Jesus Raposo, M.F. de J., de Morais, A.M.M.B., de Morais, R.M.S.C., 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.013>
- de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.B., de Morais, R.M.S.C., 2015. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Mar. Drugs* 13, 2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- De Philippis, R., Colica, G., Micheletti, E., 2011. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 697. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3601-z>
- De Philippis, R., Vincenzini, M., 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 151–175. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00365.x>

- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 34, 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Delcroix, C., Bonnet, J.-P., Etienne, M., Moulin, P., 2015. Influence of ionic strength on membrane selectivity during the ultrafiltration of sulfated pentasaccharides. *Polysacch. Polysacch. Deriv. Prod. BASIC Sci. Appl.* 116, 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.013>
- Depraetere, O., Pierre, G., Noppe, W., Vandamme, D., Foubert, I., Michaud, P., Muylaert, K., 2015. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Res.* 10, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.014>
- Deschoenmaeker, F., Facchini, R., Cabrera Pino, J.C., Bayon-Vicente, G., Sachdeva, N., Flammang, P., Wattiez, R., 2016. Nitrogen depletion in *Arthrospira* sp. PCC 8005, an ultrastructural point of view. *J. Struct. Biol.* 196, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.08.007>
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dvir, I., Chayoth, R., Sod-Moriah, U., Shany, S., Nyska, A., Stark, A.H., Madar, Z., Arad, S.M., 2000. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *Br. J. Nutr.* 84, 469–476.
- Dvir, I., Stark, A.H., Chayoth, R., Madar, Z., Arad, S.M., 2009. Hypocholesterolemic Effects of Nutraceuticals Produced from the Red Microalga *Porphyridium* sp. in Rats. *Nutrients* 1, 156–167. <https://doi.org/10.3390/nu1020156>
- Espinasse, B., Bacchin, P., Aimar, P., 2008. Filtration method characterizing the reversibility of colloidal fouling layers at a membrane surface: analysis through critical flux and osmotic pressure. *J. Colloid Interface Sci.* 320, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.01.023>

- Espinasse, B., Bacchin, P., Aimar, P., 2002. On an experimental method to measure critical flux in ultrafiltration. *Desalination* 146, 91–96. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00495-2](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00495-2)
- Eteshola, E., Gottlieb, M., Arad, S.M., 1996. Dilute solution viscosity of red microalga exopolysaccharide. *Chem. Eng. Sci.* 51, 1487–1494.
- Eteshola, E., Karpasas, M., Arad, S., Gottlieb, M., 1998. Red microalga exopolysaccharides: 2. Study of the rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. *Acta Polym.* 49, 549–556. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4044\(199810\)49:10/11<549::AID-APOL549>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4044(199810)49:10/11<549::AID-APOL549>3.0.CO;2-T)
- Fabregas, J., García, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A.I., Gómez-Puertas, P., Escribano, J.M., Otero, A., Coll, J.M., 1999. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Res.* 44, 67–73.
- Faerman, V., Mukmenev, I., Shreiber, I., 2009. Release of polysaccharide by sonication of cells (*Porphyridium* sp.). *Acoust. Phys.* 55, 270–272. <https://doi.org/10.1134/S1063771009020171>
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P.A., Li, L., 2007. Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate. *J. Phys. Chem. B* 111, 2456–2462. <https://doi.org/10.1021/jp0689870>
- Field, R.W., Pearce, G.K., 2011. Critical, sustainable and threshold fluxes for membrane filtration with water industry applications. *Membr. Sep. Colloid Sci.* 164, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.008>
- Field, R. W., Wu, D., Howell, J.A., Gupta, B.B., 1995. Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Membr. Sci.* 100, 259–272.
- Field, R.W., Wu, D., Howell, J.A., Gupta, B.B., 1995. Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Membr. Sci.* 100, 259–272. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)00265-Z](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)00265-Z)
- Filali Mouhim, R., Cornet, J.-F., Fontane, T., Fournet, B., Dubertret, G., 1993. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Lett.* 15, 567–572.

- Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., Gigova, L., 2009. Cancer Protective Action of Polysaccharide, Derived from Red Microalga *Porphyridium Cruentum* —A Biological Background. *Biotechnol. Equip.* 23, 783–787. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818540>
- Gekas, V., Hallström, B., 1987. Mass transfer in the membrane concentration polarization layer under turbulent cross flow: I. Critical literature review and adaptation of existing sherwood correlations to membrane operations. *J. Membr. Sci.* 30, 153–170. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)81349-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)81349-6)
- Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E., Karpasas, M., 2002. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydr. Polym.* 50, 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00019-X)
- Geresh, S., Arad, S., 1991. The extracellular polysaccharides of the red microalgae: chemistry and rheology. *Bioresour. Technol.* 38, 195–201.
- Geresh, S., Arad, S.M., Levy-Ontman, O., Zhang, W., Tekoah, Y., Glaser, R., 2009. Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr. Res.* 344, 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.11.012>
- Geresh, S., Dubinsky, O., Arad, S. (Malis), Christiaen, D., Glaser, R., 1990. Structure of 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-l-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the polysaccharides of various unicellular red algae. *Carbohydr. Res.* 208, 301–305. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)80116-K](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)80116-K)
- Geresh, S., Lupescu, N., Arad, S. (Malis.), 1992. Fractionation and partial characterization of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium*. *Phytochemistry* 31, 4181–4186. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80439-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80439-L)
- Ghosh, A., Balakrishnan, M., Dua, M., Bhagat, J., 2000. Ultrafiltration of sugarcane juice with spiral wound modules: on-site pilot trials. *J. Membr. Sci.* 174, 205–216. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00393-8)
- Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givernaud, A., Maes, E., Krausz, P., Strecker, G., 2004. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-

- resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydr. Res.* 339, 97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.09.020>
- González de la Vara, L., Gómez-Lojero, C., 1986. Participation of plastoquinone, cytochrome c 553 and ferredoxin-NADP⁺ oxido-reductase in both photosynthesis and respiration in *Spirulina maxima*. <https://doi.org/10.1007/BF00028477>
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* 32, 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2018. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Hayakawa, Y., Hayashi, T., Lee, J.B., Ozawa, T., Sakuragawa, N., 2000. Activation of heparin cofactor II by calcium spirulan. *J. Biol. Chem.* 275, 11379–11382.
- Hayashi, K., Hayashi, T., Kojima, I., 1996. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 1463–1471. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.1463>
- Hayashi, K., Hayashi, T., Morita, N., Kojima, I., 1993. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. *Phyther. Res.* 7, 76–80. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070118>
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., Kojima, I., 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 83–87. <https://doi.org/10.1021/np960017o>
- Heaney-Kieras, J., Roden, L., Chapman, D.J., 1977. The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochem. J.* 165, 1–9.
- Howell, J.A., 1995. Sub-critical flux operation of microfiltration. *J. Membr. Sci.* 107, 165–171. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(95\)00114-R](https://doi.org/10.1016/0376-7388(95)00114-R)

- Huleihel, M., Arad, S., 2001. Effect of *Porphyridium* sp. polysaccharide on malignant cell transformation by Moloney murine sarcoma virus. *Anticancer Res.* 21, 2073–2078.
- Huleihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S. (Malis), 2001. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. *J. Appl. Phycol.* 13, 127–134. <https://doi.org/10.1023/A:1011178225912>
- Iqbal, M., Zafar, S.I., 1993. Effects of photon flux density, CO₂, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Folia Microbiol. (Praha)* 38, 509–514. <https://doi.org/10.1007/BF02814405>
- Jermann, D., Pronk, W., Meylan, S., Boller, M., 2007. Interplay of different NOM fouling mechanisms during ultrafiltration for drinking water production. *Water Res.* 41, 1713–1722. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.030>
- Jönsson, A.-S., Trägårdh, G., 1990. Fundamental principles of ultrafiltration. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 27, 67–81. [https://doi.org/10.1016/0255-2701\(90\)85011-R](https://doi.org/10.1016/0255-2701(90)85011-R)
- Jubeau, S., 2012. Application du concept de bioraffinerie à la valorisation de la microalgue *Porphyridium cruentum* (Thèse de doctorat). Nantes.
- Kaji, T., Fujiwara, Y., Hamada, C., Yamamoto, C., Shimada, S., Lee, J.-B., Hayashi, T., 2002a. Inhibition of cultured bovine aortic endothelial cell proliferation by sodium spirulan, a new sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. *Planta Med.* 68, 505–509. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32564>
- Kaji, T., Fujiwara, Y., Inomata, Y., Hamada, C., Yamamoto, C., Shimada, S., Lee, J.-B., Hayashi, T., 2002b. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. *Life Sci.* 70, 1841–1848.
- Kaji, T., Okabe, M., Shimada, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Lee, J.-B., Hayashi, T., 2004. Sodium spirulan as a potent inhibitor of arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Life Sci.* 74, 2431–2439. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.061>
- Kaji, T., Shimada, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Lee, J.-B., Hayashi, T., 2002c. Inhibition of the Association of Proteoglycans with Cultured Vascular Endothelial Cell Layers by

- Calcium and Sodium Spirulan. *J. Health Sci.* 48, 250–255.
<https://doi.org/10.1248/jhs.48.250>
- Katsoufidou, K., Yiantsios, S.G., Karabelas, A.J., 2007. Experimental study of ultrafiltration membrane fouling by sodium alginate and flux recovery by backwashing. *J. Membr. Sci.* 300, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.05.017>
- Katsoufidou, K.S., Sioutopoulos, D.C., Yiantsios, S.G., Karabelas, A.J., 2010. UF membrane fouling by mixtures of humic acids and sodium alginate: Fouling mechanisms and reversibility. *Desalination* 264, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.08.017>
- Kecili, K., 2006. Etude et caractérisation de membranes synthétiques organiques immergées de microfiltration (MF) et d'ultrafiltration (UF) employées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine : intensification des opérations de déconditionnement et de nettoyage. Paris 6.
- Koo, C.H., Mohammad, A.W., Suja', F., Meor Talib, M.Z., 2012. Review of the effect of selected physicochemical factors on membrane fouling propensity based on fouling indices. *Desalination* 287, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.11.003>
- Le-Clech, P., Marselina, Y., Ye, Y., Stuetz, R.M., Chen, V., 2007. Visualisation of polysaccharide fouling on microporous membrane using different characterisation techniques. *J. Membr. Sci.* 290, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.12.012>
- Lee, M.-C., Chen, Y.-C., Peng, T.-C., 2012. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1562–1569. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4743>
- Lee, R.E., 2008. *Phycology* (4th edition). Camb. Univ. Press.
- Li, H., Li, Z., Xiong, S., Zhang, H., Li, N., Zhou, S., Liu, Y., Huang, Z., 2011a. Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. *Process Biochem.* 46, 1104–1109. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.028>
- Li, H., Li, Z., Xiong, S., Zhang, H., Li, N., Zhou, S., Liu, Y., Huang, Z., 2011b. Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass

- microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. *Process Biochem.* 46, 1104–1109. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.028>
- Li, S.-Y., Shabtai, Y., (Malis) Arad, S., 2000. Production and composition of the sulphated cell wall polysaccharide of *Porphyridium* (Rhodophyta) as affected by CO₂ concentration. *Phycologia* 39, 332–336. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-4-332.1>
- Listiarini, K., Tan, L., Sun, D.D., Leckie, J.O., 2011. Systematic study on calcium–alginate interaction in a hybrid coagulation-nanofiltration system. *J. Membr. Sci.* 370, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.12.047>
- Lo, Y.-M., Yang, S.-T., Min, D.B., 1996. Kinetic and feasibility studies of ultrafiltration of viscous xanthan gum fermentation broth. *J. Membr. Sci.* 117, 237–249. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(96\)00067-1](https://doi.org/10.1016/0376-7388(96)00067-1)
- Lupescu, N., Arad, S. (Malis), Geresh, S., Bernstein, M.A., Glaser, R., 1991. Structure of some sulfated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga. *Carbohydr. Res.* 210, 349–352. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)80136-B](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)80136-B)
- Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M., Montero, O., 2005. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *J. Food Eng.* 66, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.021>
- Majdoub, H., Ben Mansour, M., Chaubet, F., Roudesli, M.S., Maaroufi, R.M., 2009. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1377–1381. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.013>
- Marcati, A., Ursu, A.V., Laroche, C., Soanen, N., Marchal, L., Jubeau, S., Djelveh, G., Michaud, P., 2014. Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Res.* 5, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.006>

- Matsui, M.S., Muizzuddin, N., Arad, S., Marenus, K., 2003. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104, 13–22.
- Michaels, A.S., 1968. New separation technique for the CPI. *Chem Eng Prog* 64, 31–43.
- Mo, Y., Xiao, K., Shen, Y., Huang, X., 2011. A new perspective on the effect of complexation between calcium and alginate on fouling during nanofiltration. *Sep. Purif. Technol.* 82, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.08.033>
- Morineau-Thomas, O., Jaouen, P., Legentilhomme, P., 2002. The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella* sp. and *Porphyridium purpureum*): Advantage of a swirling decaying flow. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 35–42. <https://doi.org/10.1007/s00449-001-0278-1>
- Neemann, F., Rosenberger, S., Jefferson, B., McAdam, E.J., 2013. Non-covalent protein–polysaccharide interactions and their influence on membrane fouling. *J. Membr. Sci.* 446, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.06.054>
- Patel, A.K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A.V., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G., Michaud, P., 2013. Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.* 145, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.038>
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P., 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 917–941. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00183.x>
- Phélippé, M., 2017. Caractérisation des flux de carbone impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides de la cyanobactérie *Arthrospira* sp. PCC8005 cultivée eb photobioréacteur (Thèse de doctorat). Université de Nantes.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P., 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 781–796. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7>

- Porter, M.C., 1972. Concentration Polarization with Membrane Ultrafiltration. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 11, 234–248. <https://doi.org/10.1021/i360043a002>
- Pruvost, J., Cornet, J.-F., 2012. 10 Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. *Microalgal Biotechnol. Potential Prod.* <https://doi.org/10.1515/9783110225020.181>
- Qu, F., Liang, H., Wang, Z., Wang, H., Yu, H., Li, G., 2012. Ultrafiltration membrane fouling by extracellular organic matters (EOM) of *Microcystis aeruginosa* in stationary phase: Influences of interfacial characteristics of foulants and fouling mechanisms. *Water Res.* 46, 1490–1500. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.051>
- Qu, F., Liang, H., Zhou, J., Nan, J., Shao, S., Zhang, J., Li, G., 2014. Ultrafiltration membrane fouling caused by extracellular organic matter (EOM) from *Microcystis aeruginosa*: Effects of membrane pore size and surface hydrophobicity. *J. Membr. Sci.* 449, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.07.070>
- Rabiller-Baudry, M., 2009. Nettoyage et décolmatage des membranes de filtration. *Tech. Ing. Opérations Unit. Tech. Séparatives Sur Membr. base documentaire : TIB331DUO.*
- Rabiller-Baudry, M., Diagne, N.W., Lebordais, D., 2014a. How the experimental knowledge of the irreversible fouling distribution can contribute to understand the fluid circulation in a spiral ultrafiltration membrane. *Sep. Purif. Technol.* 136, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.040>
- Rabiller-Baudry, M., Diagne, N.W., Lebordais, D., 2014b. How the experimental knowledge of the irreversible fouling distribution can contribute to understand the fluid circulation in a spiral ultrafiltration membrane. *Sep. Purif. Technol.* 136, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.040>
- Ramus, J., 1972. The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. *J. Phycol.* 8, 97–111. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb04007.x>
- Reboloso Fuentes, M., Ación Fernández, G., Sánchez Pérez, J., Guil Guerrero, J., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.* 70, 345–353. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00101-1)

- Rechter, S., König, T., Auerochs, S., Thulke, S., Walter, H., Dörnenburg, H., Walter, C., Marschall, M., 2006. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res.* 72, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.06.004>
- Remigy, J.-C., Desclaux, S., 2007. Filtration membranaire (OI, NF, UF) Présentation des membranes et modules. Tech. Ing. Procédés Trait. Eaux Potables Ind. Urbaines base documentaire : TIB318DUO.
- Resosudarmo, A., Ye, Y., Le-Clech, P., Chen, V., 2013. Analysis of UF membrane fouling mechanisms caused by organic interactions in seawater. *Water Res.* 47, 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.024>
- Rezaei, H., Ashtiani, F.Z., Fouladitajar, A., 2014. Fouling behavior and performance of microfiltration membranes for whey treatment in steady and unsteady-state conditions. *Braz. J. Chem. Eng.* 31, 503–518.
- Richmond, A., 2004. Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology. Blackwell Science.
- Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89, 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Rossi, F., De Philippis, R., 2016. Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. pp. 565–590. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_21
- Rossi, N., 2005. Récolte de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* par techniques à membranes, interactions Procédé/Biomasse (Thèse de doctorat). Université de Nantes, Saint-Nazaire.
- Rossi, N., Derouiniotchaplain, M., Jaouen, P., Legentilhomme, P., Petit, I., 2008. *Arthrospira platensis* harvesting with membranes: Fouling phenomenon with limiting and critical flux. *Bioresour. Technol.* 99, 6162–6167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.023>
- Rossi, N., Derouiniot-Chaplain, M., Jaouen, P., Legentilhomme, P., Petit, I., 2008. *Arthrospira platensis* harvesting with membranes: fouling phenomenon with limiting and critical flux. *Bioresour. Technol.* 99, 6162–6167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.023>

- Rossi, N., Jaouen, P., Legentilhomme, P., Petit, I., 2004. Harvesting of cyanobacterium *Arthrospira platensis* using organic filtration membranes. *Food Bioprod. Process.* 82, 244–250.
- Saha, N.K., Balakrishnan, M., Ulbricht, M., 2007. Sugarcane juice ultrafiltration: FTIR and SEM analysis of polysaccharide fouling. *J. Membr. Sci.* 306, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.09.006>
- Shopen-Katz, O., Ling, E., Himelfarb, Y., Lamprecht, S., Arad, S., Shany, S., 2000. The effect of *Porphyridium* sp., biomass and of its polysaccharide in prevention and inhibition of human colon cancer. *Proc. Era Biotechnol.*
- Shrestha, R.P., Weinstein, Y., Bar-Zvi, D., Arad, S. (Malis), 2004. A Glycoprotein Noncovalently Associated with Cell-Wall Polysaccharide of the Red Microalga *Porphyridium* sp. (rhodophyta)*. *J. Phycol.* 40, 568–580. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.02177.x>
- Singh, V., Jain, P.K., Das, C., 2013. Performance of spiral wound ultrafiltration membrane module for with and without permeate recycle: Experimental and theoretical consideration. *Desalination* 322, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2013.05.012>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., Ma, C., 2009. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 45, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.013>
- Sun, L., Wang, L., Zhou, Y., 2012. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Polym.* 87, 1206–1210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.097>

- Susanto, H., Arafat, H., Janssen, E.M.L., Ulbricht, M., 2008. Ultrafiltration of polysaccharide–protein mixtures: Elucidation of fouling mechanisms and fouling control by membrane surface modification. *Sep. Purif. Technol.* 63, 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.06.017>
- Susanto, H., Widiassa, I.N., 2009. Ultrafiltration fouling of amylose solution: Behavior, characterization and mechanism. *J. Food Eng.* 95, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.003>
- Sweity, A., Ying, W., Ali-Shtayeh, M.S., Yang, F., Bick, A., Oron, G., Herzberg, M., 2011. Relation between EPS adherence, viscoelastic properties, and MBR operation: Biofouling study with QCM-D. *Water Res.* 45, 6430–6440. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.038>
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S. (Malis), 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 17, 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0679-7>
- Thepenier, C., Gudin, C., 1985. Studies on optimal conditions for polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Trabelsi, L., Ben Ouada, H., Zili, F., Mazhoud, N., Ammar, J., 2013. Evaluation of *Arthrospira platensis* extracellular polymeric substances production in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Folia Microbiol. (Praha)* 58, 39–45. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0170-1>
- Trabelsi, L., M’sakni, N.H., Ben Ouada, H., Bacha, H., Roudesli, S., 2009a. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 27–31. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0102-8>
- Trabelsi, L., Ouada, H.B., Bacha, H., Ghoul, M., 2009b. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Appl. Phycol.* 21, 405–412. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9383-8>

- van den Brink, P., Zwijnenburg, A., Smith, G., Temmink, H., van Loosdrecht, M., 2009. Effect of free calcium concentration and ionic strength on alginate fouling in cross-flow membrane filtration. *J. Membr. Sci.* 345, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.08.046>
- Van Eykelenburg, C., 1977. On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 43, 89–99. <https://doi.org/10.1007/BF00395664>
- Villacorte, L.O., Kennedy, M.D., Amy, G.L., Schippers, J.C., 2009. The fate of Transparent Exopolymer Particles (TEP) in integrated membrane systems: Removal through pre-treatment processes and deposition on reverse osmosis membranes. *Water Res.* 43, 5039–5052. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.030>
- Villay, A., 2013. Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale d'un exopolysaccharide produit par une microalgue rouge, *Rhodella violacea* : application à l'obtention d'actifs antiparasitaires (Thèse de doctorat). Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
- Vonshak, A., 1997. *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. CRC Press.
- Wemysy Diagne, N., Rabiller-Baudry, M., Paugam, L., 2013. On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux. *J. Membr. Sci.* 425–426, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>
- Wu, D., Howell, J., Field, R., 1999. Critical flux measurement for model colloids. *J. Membr. Sci.* 152, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00200-2)
- Xie, J.-H., Shen, M.-Y., Nie, S.-P., Zhao, Q., Li, C., Xie, M.-Y., 2014. Separation of water-soluble polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* by ultrafiltration process. *Carbohydr. Polym.* 101, 479–483. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.075>
- Xin, Y., Bligh, M.W., Kinsela, A.S., Wang, Y., David Waite, T., 2015. Calcium-mediated polysaccharide gel formation and breakage: Impact on membrane foulant hydraulic properties. *J. Membr. Sci.* 475, 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.10.033>
- Yao, M., Zhang, K., Cui, L., 2010. Characterization of protein–polysaccharide ratios on membrane fouling. *Desalination* 259, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.049>

- Yaron, A., Cohen, E., Arad, S.M., 1992. Stabilization of aloe vera gel by interaction with sulfated polysaccharides from red microalgae and with xanthan gum. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1316–1320. <https://doi.org/10.1021/jf00020a004>
- Ye, Y., Le Clech, P., Chen, V., Fane, A.G., Jefferson, B., 2005. Fouling mechanisms of alginate solutions as model extracellular polymeric substances. *Desalination* 175, 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.09.019>
- You, T., Barnett, S.M., 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 19, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.02.004>
- Zarrouk, C., 1966. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de "*Spirulina maxima*" (Setch et Gardner) Geitler (Thèse de doctorat). Université de Paris, France.
- Zazouli, M.A., Nasser, S., Ulbricht, M., 2010. Fouling effects of humic and alginic acids in nanofiltration and influence of solution composition. *Desalination* 250, 688–692. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.05.021>
- Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Li, L., Deng, J., Tan, C., Zhu, M., 2014. Influence of hydrophobic/hydrophilic fractions of extracellular organic matters of *Microcystis aeruginosa* on ultrafiltration membrane fouling. *Sci. Total Environ.* 470–471, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.052>

Titre : Récupération d'exopolymères issus de surnageants de culture de *Porphyridium cruentum* par techniques membranaires : étude de la filtrabilité des solutions sur une membrane organique et caractérisation du colmatage

Mots clés : exopolysaccharides (EPS), *Porphyridium cruentum*, membrane plane d'ultrafiltration en polyéthersulfone, colmatage

Résumé : Certaines microalgues peuvent excréter hors de la cellule des polysaccharides ayant des propriétés intéressantes dans différents secteurs industriels (santé, cosmétique, agroalimentaire, etc.). Les exopolysaccharides (EPS) solubilisés dans le milieu de culture pourraient être concentrés et purifiés par filtration sur membrane après élimination des cellules. Dans ce contexte, la thèse a porté sur l'étude de la filtrabilité des solutions d'EPS de *Porphyridium cruentum* sur une membrane plane d'ultrafiltration en polyéthersulfone d'un seuil de coupure égal à 50 kDa muni d'un espaceur côté alimentation.

Les solutions d'EPS ont été filtrées à petite échelle avec recyclage du rétentat et du perméat dans le bac d'alimentation. Des courbes flux de perméation-pression transmembranaire (PTM) ont été établies

jusqu'au flux limite pour différentes conditions de vitesse tangentielle (de 0,3 à 1,2 m.s⁻¹), de teneur en EPS (de 0,10 à 1,06 kg GlcEq.m⁻³) et de température (20 et 40 °C). Le colmatage de la membrane a été évalué par le biais du calcul des résistances hydrauliques de colmatage, du flux critique, et de cartographies FTIR-ATR et AFM du colmatage irréversible. Les résultats ont montré le caractère fortement colmatant des solutions d'EPS avec une prépondérance de la part du colmatage irréversible pour des pressions de filtration modérées et réversible pour des pressions proches de la PTM limite. Ainsi, la concentration des EPS d'un facteur 10 nécessiterait des vitesses tangentielles de l'ordre de 1 m.s⁻¹, ce qui serait envisageable dans un module plan de type "filtre presse", mais pas dans un module spiralé.

Title : Exopolymers recovery from culture supernatants of *Porphyridium cruentum* using membrane techniques: study of the solutions filterability on an organic membrane and fouling characterization

Keywords : exopolysaccharides (EPS), *Porphyridium cruentum*, ultrafiltration, flat polyethersulfone ultrafiltration membrane, fouling

Abstract : Some microalgae are able to excrete polysaccharides featuring properties which are of high interest and value to various fields (health, cosmetics, food, etc.). The exopolysaccharides (EPS) solubilized in the culture medium could be concentrated and purified by membrane filtration after removing the cells. Within this context, the thesis focused on the study of the filterability of *Porphyridium cruentum* EPS solutions on a flat polyethersulfone ultrafiltration membrane with a 50 kDa molecular weight cut-off.

The EPS solutions were filtered at a lab-scale with a complete recirculation of both retentate and permeate to the feed tank. Permeate flux-transmembrane pressure (TMP) curves were established up to the limiting flux for the filtration

of solutions with various values of cross-flow velocity (0.3 to 1.2 m.s⁻¹), EPS concentration (0.10 to 1.06 kg GlcEq.m⁻³) and temperature (20 and 40 °C). Membrane fouling was evaluated through the calculation of hydraulic fouling resistances, the critical flux and FTIR-ATR and AFM mapping of the irreversible fouling. The results showed the high fouling power of the EPS solutions as well as the preponderance of the irreversible fouling at moderate filtration pressures and the reversible one at pressures close to the limiting TMP. Thus, concentrating EPS by a factor of 10 would require cross-flow velocities of 1 m.s⁻¹, which would be feasible in a flat module (plate and frame filter press) but not in a spiral-wound module.